



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.**

Identificación de alcanidas y ésteres α -insaturados en *Piper auritum* Kunth y la actividad biológica de sus extractos.

Tesis que presenta:

Biol. Aurora Ordóñez Rojas.

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de:

Biotecnología de Plantas

Director de tesis: Dr. Jorge Molina Torres

Irapuato, Guanajuato, México

Septiembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Estudios y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, por brindarme la oportunidad de realizar el posgrado y otorgarme todo el apoyo necesario.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la financiación y el apoyo para la realización de mi Maestría.

Al Dr. Jorge Molina Torres por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo en el Laboratorio de Fitobioquímica en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica, por su paciencia y dedicación para dirigir mi proyecto de Tesis.

Al MC. Enrique Ramírez Chávez por orientarme y siempre tener disposición de ayudarme y alentarme para la realización de este proyecto.

A mis sinodales Dr. John Délano Frier y la Dr. Silvia Valdés Rodríguez por brindarme su tiempo y apoyo para la dirección y revisión de mi trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Tonatiuh, Jess, Julieta e Isis por apoyarme y siempre creer en mí, por sus consejos, risas y locuras. ¡Los quiero!

A mis amigos de generación Alejandra, Rogelio, Jaime, Aníbal, Emmanuel por todas las aventuras y todo su apoyo brindado.

A Cecy, por no ser sólo mi amiga, sino una hermana, por tu apoyo y por tu amistad incondicional.



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 783881 otorgada durante el desarrollo de la presente investigación en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados I.P.N., Unidad Irapuato.

DEDICATORIAS

A mi madre y a mi padre por siempre creer en mí, por darme su apoyo incondicional y nunca dejarme caer, agradezco infinitamente su existencia. Esto no hubiera sido posible sin ustedes, son lo mejor de mi vida ¡Los amo!, gracias por confiar y creer siempre en mí.

A mi Tía Guadalupe, por todo su apoyo y por estar siempre, ¡Te quiero!

A toda mi familia tíos, primos, sobrinos, hermanos por brindarme su apoyo.

“La cosa más hermosa que podemos experimentar es el misterio. Es la fuente de toda arte y toda ciencia”

A. Einstein

ÍNDICE

RESUMEN	X
ABSTRACT.....	xi
1.1 Género Piper.....	1
1.1.1. Fitoquímica y actividades biológicas del género <i>Piper</i>	3
1.2 <i>Piper auritum</i> Kunth.....	4
1.2.1 Fitoquímica y estudios realizados en <i>Piper auritum</i>	5
1.3 Piperamidas y su actividad biológica.....	7
1.4 Alcamidas	11
1.4.1 Biosíntesis de alcamidas	13
1.4.2 Actividad biológica de las alcamidas.....	16
1.5 Síntesis enzimática.	18
1.6 Efecto de extractos obtenidos de plantas y alcamidas sobre el <i>quorum sensing</i>.	19
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVO GENERAL	23
V. OBJETIVOS PARTICULARES	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	24
6.1 Material biológico y obtención de los extractos.	24
6.2 Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).	25
6.3 Cromatografía de capa fina (TLC) preparativa.	25
6.4 Cromatografía de gases acopada a espectrometría de masas (GCEI/MS).	25
6.5 Programas para análisis MSChem, AMDIS y NIST.....	25
6.7 Síntesis química del 2E-4E-decadienoato de etilo y de su isómero 2E-4Z-decadienoato de etilo.	28
6.8 Síntesis química del decanoato de etilo y decanoato de metilo.....	28

6.9 Pruebas inhibición de los extractos de <i>P. auritum</i> y de los compuestos obtenidos por síntesis enzimática sobre el <i>quorum sensing</i>	29
VII. RESULTADOS	30
7.1 Perfil por HPTLC de los extractos etanólicos de <i>Piper auritum</i>	30
7.2 Perfil fitoquímico de los extractos por GCEI/MS.....	31
7.3 Confirmación de la presencia de alcanidas en los extractos de <i>P. auritum</i> por síntesis enzimática.....	34
7.3.1 <i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -decadienamida (pellitorina).....	34
7.3.2 <i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -decamonoenamida.....	37
7.3.3 <i>N</i> -metilbutil-2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -decamonoenamida.	39
7.4 Confirmación de la presencia del 2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -decadienoato de etilo y el 2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -decadienoato de metilo en los extractos de <i>P. auritum</i>	40
7.4.1 2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -decadienoato de etilo.....	40
7.4.2. 2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -decadienoato de metilo.....	41
7.5 Obtención del decadienoato de etilo y decadienoato de metilo.	44
7.6 Efecto de las alcanidas y ésteres alfa-insaturados, obtenidos por síntesis enzimática y química sobre el <i>quorum sensing</i>	47
VIII. DISCUSIÓN	50
IX. CONCLUSIONES	58
X. REFERENCIAS	59
APÉNDICE I	64
APÉNDICE II	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del género <i>Piper</i> y sus principales sitios de diversificación (Tomado de Jaramillo et al., 2001).....	2
Figura 2. Ejemplos de especies representativas del género <i>Piper</i> ..	2
Figura 3. Clasificación taxonómica de la especie <i>Piper auritum</i> (Kunth).....	4
Figura 4. Safrol, un fenilpropanoide que se encuentra en gran cantidad en extractos de <i>P. auritum</i>	6
Figura 5. Algunas de las piperamidas más comunes en especies del género <i>Piper</i>	8
Figura 6. Ruta metabólica propuesta para la biosíntesis de piperina (tomado de Okwute et al., 2013). El precursor es el ácido <i>p</i> -cumárico involucrado, también, en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides.	9
Figura 7. Ejemplos de especies de <i>Piper</i> del Viejo y Nuevo mundo.....	10
Figura 8. Estructura básica de las alcaloides por definición en el laboratorio de Fitobioquímica..	11
Figura 9. Ejemplos de alcaloides y especies productoras de estos compuestos.....	12
Figura 10. Modelo enzimático PKS <i>alk</i> propuesto para la síntesis de afinina propuesto por Molina-Torres (Comunicación personal)..	15
Figura 11. El mecanismo de <i>quorum-sensing</i> en bacterias Gram (-). Éste involucra dos componentes principales: una proteína receptora o activadora de la transcripción (RP) y el autoinductor, que en este caso pertenece a las <i>N</i> -acil-homoserinlactonas (AHL). Al acumularse la AHL, en respuesta a la densidad celular alta, se une a la RP, que induce la expresión de genes. La RP se compone de 2 dominios: uno <i>N</i> terminal que interactúa con el autoinductor y uno <i>C</i> terminal, que se relaciona con sitios de unión a ADN (modificado de Kievit et al., 2000).	20
Figura 12. Autoinductores a los que responde <i>C. violaceum</i> . Se puede observar que la principal diferencia es la longitud de la cadena (tomado de Gomi- Kazunori et al., 2006).20	
Figura 13. Ensayo de inhibición del extracto de <i>Syzygium aromaticum</i> sobre el <i>quorum sensing</i> en <i>C. violaceum</i> . 1 y 2: TLC (Cromatografía de capa fina) del extracto y bioautografía donde se puede observar el sitio donde hay inhibición. 3 y 4: Estándar de eugenol.....	21

- Figura 14.** Evaluación de la inducción de violaceína por A: N-hexanoil feniletilamida y B: N-hexanoil feniletilamida, en *C. violaceum* CV026. Las concentraciones incrementan de acuerdo con las manecillas del reloj: 0, 20, 40, 60 y 80 μg por disco (tomado de Vázquez-Martínez et al., 2017). 22
- Figura 15.** Diferentes tejidos de *P. auritum*. **A:** Hoja, **B:** Tallos, **C:** Raíz y **D:** Inflorescencias. (Material proporcionado por la Universidad Veracruzana). 24
- Figura 16.** Método utilizado para la síntesis enzimática de alcanidas mediante la reacción con la lipasa B de *Candida antarctica*. El nucleófilo utilizado fue Isobutilamina (IA) . Los compuestos obtenidos fueron: **A:** N-isobutil-2E,4E-decadienamida (pellitorina), **B:** N-isobutil-2E,4Z-decadienamida, **C:** N-isobutil-2E-monodecaenamida. 27
- Figura 17.** HPTLC de los extractos etanólicos de *P. auritum*, 30
- Figura 18.** Estructura química del safrol (**A**) y la miristicina (**B**). La diferencia entre los dos compuestos es únicamente un grupo metoxi. 31
- Figura 19.** Comparación del TIC del 2E-4Z-decadienoato de etilo (Morado) vs el TIC del 2E-4E-decadienoato de etilo (Gris), obtenido después del proceso de isomerización. Se puede observar que los porcentajes de los isómeros se invierten una vez llevada a cabo la reacción 34
- Figura 20.** TIC del extracto etanólico de tallo de *P. auritum* donde se muestra el pico que representa a la pellitorina a un TR = 21.043 μmin ? (azul) vs el pico de la pellitorina obtenida por síntesis enzimática a un TR = 20.945 (morado). 35
- Figura 21.** Comparación del espectro de masas de la pellitorina presente en el extracto de *P. auritum* (rojo) vs la obtenida por síntesis enzimática (azul). En la parte de arriba se justifican los fragmentos más abundantes de acuerdo con el patrón de fragmentación que presenta la molécula. 36
- Figura 22.** Cromatograma de la N-isobutil-2E,4Z-decadienamida, la cual se detecta a un TR = 19.284. A un lado se muestra el espectro de masas correspondiente. 37
- Figura 23.** Comparación del TIC de la 2E-decamonoenamida sintetizada enzimáticamente (**A**) con un TR = 19.097, vs. la presente en extracto etanólico de Tallo (**B**) a un TR = 19.07. Se puede observar que los TR son muy similares. 38
- Figura 24.** Comparación del espectro de masas de la 2E-decamonoenamida presente en el extracto de tallo de *P. auritum* (rojo) y la obtenida por síntesis enzimática (azul). En la parte superior se justifican los fragmentos más abundantes de acuerdo con el patrón de fragmentación que presenta la molécula. 38
- Figura 25.** Espectro de masas de la N-metilbutil-2E-4E-decamonoenamida detectada en los extractos de tallo e inflorescencia *P. auritum*. En la parte superior se justifican algunos de los fragmentos principales de la molécula. 39

- Figura 26.** Comparación del TIC del 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo con un TR = 11.202 (**A**), vs el TIC del extracto etanólico de tallo en donde se pudo identificar el 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo a un TR = 11.253 (**B**)..... 40
- Figura 27.** Comparación del espectro de masas del 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo y el del compuesto presente en el extracto etanólico de tallo de *P. auritum*. Se muestra la justificación de los fragmentos principales. 41
- Figura 28.** Comparación del TIC del extracto etanólico de tallo (morado), donde se detecta al 2*E*-4*E*-decadienoato de metilo a un TR = 9.501 vs. el TIC del compuesto obtenido por síntesis química (rojo), a un TR = 9.496. 42
- Figura 29.** Comparación del espectro de masas del 2*E*-4*E*-decadienoato de metilo obtenido por síntesis (rojo) vs el del compuesto presente en el extracto etanólico de tallo de *P. auritum*..... 42
- Figura 30.** TIC del 2*E*-4*Z*-decadienoato de metilo con un TR = 8.821..... 43
- Figura 31.** Comparación del espectro de masas del 2*E*-4*Z*-decadienoato de metilo obtenido por síntesis enzimática (rojo) y el reportado por la biblioteca NIST (azul). 43
- Figura 32.** TIC del decadienoato de etilo, detectado a un TR = 8.765 (**A**), vs el TIC del decadienoato de metilo a un TR = 7.565 (**B**). Ambos compuestos fueron obtenidos por síntesis química. 44
- Figura 33.** Comparación de los espectro de masas de **A**: decadienoato de etilo y **B**: decadienoato de metilo, obtenidos por síntesis química, (rojo) vs los reportados por la biblioteca NIST (azul) y la justificación de los fragmentos principales. 45
- Figura 34.** Efecto de los extractos de *P. auritum* sobre el *quorum sensing* en *C. violaceum*.. 46
- Figura 35.** TIC de la banda con R_f = 0.81 del extracto etanólico de raíz obtenida de la placa preparativa donde se pudo identificar a la miristicina como compuesto activo. También, se muestra el espectro de masas del compuesto presente en el extracto (rojo) comparado con el reportado en la Biblioteca NIST (azul). 47
- Figura 36.** Efecto de las moléculas obtenidas por síntesis sobre el *quorum sensing* en *C. violaceum*.. 48
- Figura 37.** Modelo de biosíntesis propuesto para la pellitorina, en base al descrito en el Laboratorio de Fitobioquímica para la síntesis de afinina..... 54
- Figura 38.** Fenilpropanoides que inhiben el *quorum sensing* **A**: Miristicina, **B**: Eugenol. . 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos metabolitos aislados de <i>Piper auritum</i>	5
Tabla 2. Grupos amino más comunes en las alcaloides y los respectivos aminoácidos de los que provienen.	13
Tabla 3. Alcaloides reportadas en especies del género <i>Piper</i> (tomado de Parmar et al., 1997).	17
Tabla 4. Compuestos mayoritarios detectados en los extractos etanólicos de <i>P. auritum</i> y su distribución en los diferentes tejidos de la planta. En la segunda columna se muestra el promedio (\bar{X}) del tiempo de retención (TR) de cada uno de los compuestos obtenido de tres cromatogramas de cada uno de los extractos etanólicos y su desviación estándar (DS)..	32
Tabla 5. Alcaloides y ésteres alfa-insaturados identificados por GC/ EIMS en los extractos etanólicos de <i>P. auritum</i> y su distribución. En la segunda columna se muestra el promedio (\bar{X}) del tiempo de retención (TR) de cada uno de los compuestos obtenido de tres cromatogramas y su desviación estándar (DS).....	33
Tabla 6. Determinación de crecimiento por densidad óptica (DO) a 600 nm. En gris se pueden observar los valores de los controles utilizados.....	49

RESUMEN

Se realizó un perfil de alcanidas en los diferentes tejidos de *Piper auritum*. Para esto, se obtuvo el extracto etanólico de hojas, tallos, inflorescencias y raíces. Posteriormente, cada extracto fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (GC/EIMS), donde se identificó al safrol y a la miristicina como compuestos mayoritarios. Se detectaron tres alcanidas: *N*-isobutil-2*E*-4*E*-decadienamida (pellitorina), *N*-isobutil-2*E*-decamonoenamida y *N*-metilbutil-2*E*-4*E*-decadienamida, cada una con una distribución distinta en la planta. Para confirmar la presencia de estas alcanidas, se realizó la síntesis enzimática de estos compuestos, usando la enzima Novozym lipasa B de *Candida antarctica*. Esto permitió comparar su tiempo de retención y su espectro de masas con los de las alcanidas presentes en los extractos y de esta manera corroborar su identidad y presencia en *P. auritum*. También, se detectaron dos ésteres alfa-insaturados, 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo y 2*E*-4*E*-decadienoato de metilo que son reportados por primera vez en plantas de este género. Para confirmar la presencia de estos ésteres, se llevó a cabo su síntesis mediante la isomerización del éster de pera comercial (2*E*-4*Z*-decadienoato de etilo) a 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo y mediante una reacción de metilación del ácido 2*E*-4*E*-decadienoico, se obtuvo el metil éster correspondiente. Adicionalmente, se evaluó la capacidad inhibitoria del *quorum sensing* de los extractos, por métodos de bioautografía utilizando la cepa reportera de *Chromobacterium violaceum* CV026, donde se observó que los extractos de tallo y raíz poseen compuestos que inhiben este sistema. Las alcanidas y los ésteres obtenidos por síntesis también fueron evaluados, observándose que los ésteres inhiben el *quorum sensing* a partir de concentraciones de 25 µg, a diferencia de las alcanidas que inducen este sistema de comunicación, actuando como moléculas señalizadoras.

ABSTRACT

A profile of alkamides in the different tissues of *Piper auritum* was obtained. For this, ethanolic extracts of leaves, stems, inflorescences and roots was obtained. Subsequently, each extract was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry with electronic impact ionization (GC/ EIMS), where safrole and myristicin were identified as major compounds. Three alkamides were detected: *N*-isobutyl-2*E*-4*E*-decadienamamide (pellitorine), *N*-isobutyl-2*E*-decamonoenamamide and *N*-methylbutyl-2*E*-4*E*-decadienamamide, each with a different distribution in the plant. To confirm the presence of these alkamides, the enzymatic synthesis of these compounds was performed, using the enzyme Novozym lipase B of *Candida antarctica*. This allowed to compare their retention times and their mass spectra with those of the alkamides present in the extracts and in this way corroborate their identity and presence in *P. auritum*. Also, two alpha-unsaturated esters, ethyl 2*E*-4*E*-decadienoate and methyl 2*E*-4*E*-decadienoate were detected that are reported for the first time in plants of this genus. To confirm the presence of these esters, their synthesis was carried out by means of the isomerization of the commercial pear ester (2*E*-4*Z*-ethyl decadienoate) to ethyl 2*E*-4*E*-decadienoate and by a methylation reaction of the resulting 2*E*-4*E* decadienoic acid, the corresponding methyl ester was obtained. Additionally, the *quorum sensing* inhibitory capacity of the extracts was evaluated by bioautography methods using the *Chromobacterium violaceum* CV026 reporter strain of, where it was observed that stem and root extracts contained compounds that inhibit this system. The alkamides and esters obtained by synthesis were also evaluated, observing that the esters inhibit the *quorum sensing* starting from 25 µg, unlike the alkamides, that induce this communication system, acting as signaling molecules.

I. ANTECEDENTES

1.1 Género *Piper*.

La familia Piperaceae comprende tres géneros: *Piper*, *Ottonia* y *Piperomia*. Específicamente el género *Piper* se caracteriza por tener importancia económica y en la medicina tradicional. Este género se distribuye de manera pantropical e incluye más de 1,500 especies, lo que lo hace uno de los más diversos y amplios (Figura 1) (Jaramillo y Manos, 2001). Las especies que comprenden este género son morfológicamente bastante uniformes y se conforma por plantas epífitas, lianescentes y en ocasiones árboles pequeños. Las hojas aromáticas, simples o alternas, pecioladas, de formas variables y con márgenes enteros. Inflorescencias solitarias, generalmente opuestas a las hojas, raramente agrupadas, compuestas por decenas a miles de flores pequeñas (por ejemplo, *Piper auritum*) agrupadas en forma de espiga, umbelas o panículas. Flores unisexuales o hermafroditas con brácteas subyacentes. Frutos en forma de baya, semi-ovados o globosos, sésiles o con pedicelos que van de color amarillo a rojo y muy fragantes al llegar a la madurez. Los tallos se caracterizan por ser flexibles compuestos de nodos que se rompen fácilmente, conocidos como “Huesos de *Piper*”. La mayoría de las especies son aromáticas y producen pequeñas perlas oleosas en tallos y hojas que son utilizadas como alimento por insectos mutualistas. (Lee-Dyer *et al.*, 2004; Mangion, 2011).

La especie más representativa de este género es *Piper nigrum* Linneo, conocida comúnmente como “pimienta negra”. Esta especie es uno de los cultivos de mayor importancia en varios países, ya que es uno de los condimentos más utilizados a nivel mundial. Los frutos inmaduros son la fuente de producción de “pimienta negra”, mientras que los maduros dan lugar a la “pimienta blanca” (Scott *et al.*, 2008). En la medicina tradicional *Piper nigrum* L. es utilizada como infusión para el tratamiento de diarrea, fiebre, cólicos y padecimientos gastrointestinales (Mgbeahuruike *et al.*, 2017).

Dentro del uso tradicional que se les da a las especies del género *Piper*, se tiene a *P. methysticum* G. Forst, que es la fuente natural de una bebida narcótica conocida como “Kava kava, kawa-kawa o kava”, utilizada ritualmente por los polinesios. En Asia las hojas *P. betle* L. se mastican después de la comida para mejorar la digestión. Algunas otras especies como *P. cubeba* L. (“pimienta cubeb”), *P. longum* L. (“pimienta larga”) y *P. auritum* Kunth (“hierba santa”) se utilizan localmente como condimentos o con fines medicinales (Lee-Dyer *et al.*, 2004) (Figura 2).

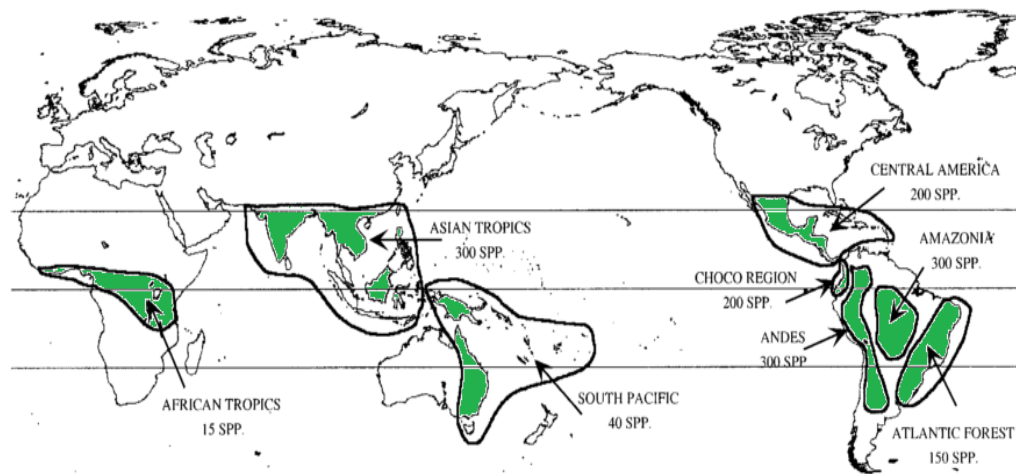


Figura 1. Distribución del género *Piper* y sus principales sitios de diversificación (tomado de Jaramillo *et al.*, 2001).



Figura 2. Algunas especies representativas del género *Piper*. **A:** *P. nigrum*, comúnmente conocida como “pimienta negra”, una de las especies con mayor importancia económica a nivel mundial. **B:** *P. methysticum*, cuyo nombre común es “Kava kava”, utilizada ritualmente en Polinesia. **C:** *P. betle*, utilizada principalmente como estimulante de la digestión.

1.1.1. Fitoquímica y actividades biológicas del género *Piper*.

Debido a la importancia del género *Piper*, existen diversos estudios de su composición química. Hasta el momento se han reportado cerca de 667 compuestos, que comprenden alcaloides, amidas, lignanos, neolignanos, terpenos, propenilfenoles, esteroides, kavapironas, chalconas, piperólidos, entre otros (Lee-Dyer *et al.*, 2004). La importancia de estudiar con mayor detalle la composición de diferentes especies de este género radica en que muchos de los extractos obtenidos mostraron presentar metabolitos con actividad biológica. Por ejemplo, algunos componentes de los extractos etanólicos de los frutos de *P. nigrum* mostraron tener actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *B. sphaericus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes* y *Chromobacterium violaceum*. Además, se observó que el extracto etanólico de esta especie inhibe el crecimiento de bacterias que son resistentes a múltiples medicamentos y actúa sinérgicamente con algunos antibióticos para potenciar su actividad (Reddy *et al.*, 2004). El aceite esencial obtenido mediante arrastre de vapor de las hojas de *P. chaba* L., inhibió el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum capsici*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani*, así como el de *P. hispidinervum* C. DC., presentó actividad antiprotozoaria contra *Acanthamoeba polyphaga* (Sauter *et al.*, 2012). Los extractos de *P. clausenianum* (Miq.) C. DC., poseen una gran cantidad de nerolidol, que resultó efectivo contra la formación, el crecimiento y la estabilidad de las biopelículas producidas por *Candida albicans*. De algunas especies como *P. acutifolium* (Ruiz & Pav.) y *P. anduncum* L., se han aislado metabolitos que han mostrado ser efectivos para combatir algunos parásitos. Un ejemplo es el metil-3-4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) benzoato que mostró actividad contra *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. Además, se ha demostrado que algunos alcaloides y amidas como la piperina, presente en algunas especies del género *Piper* inhibe la proliferación de algunas líneas celulares de cáncer y se ha evaluado su actividad antitumoral en ratones (Mgbeahuruike *et al.*, 2017).

1.2 *Piper auritum* Kunth.

P. auritum Kunth (Figura 3), comúnmente conocida como “hierba santa” o “acuyo” es una de las especies más comunes del Nuevo Mundo. Se caracteriza por ser un arbusto que puede alcanzar hasta los 6 m de altura. Sus hojas son acorazonadas y grandes de hasta 50 cm de longitud y 30 cm de ancho. Las inflorescencias se presentan en forma de espiga de color verde pálido a blanco.

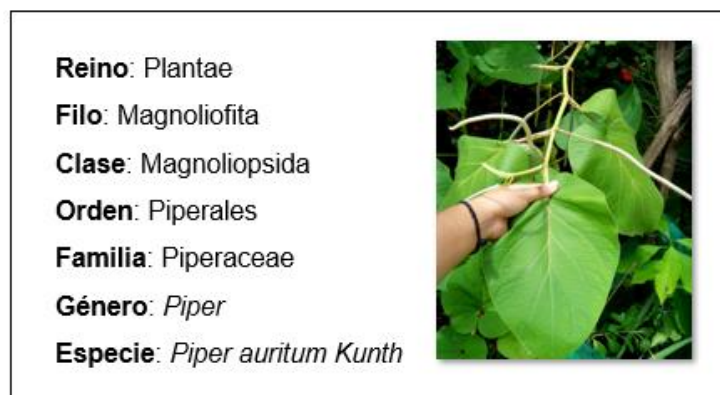


Figura 3. Clasificación taxonómica de la especie *Piper auritum* (Kunth).

Es conocida en varios lugares de la República Mexicana y en algunos países de Centro y Sudamérica con los nombres comunes de quelite, hoja del cáncer, acuyo, cordoncillo, corrimiento, hierba anís, higuera, acuyo cimarrón, hoja de Santa María, entre otros. Se distribuye en México, Belice, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Colombia (Tebbs, 1989). Específicamente en México, se encuentra en los estados de Chiapas, Tabasco, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán y es utilizada como sudorífico, analgésico para el tratamiento de cólicos, dolor de cabeza, dolor de muelas e incluso como un estimulante digestivo (Monzote *et al.*, 2010). Es utilizada como condimento en algunos estados de México para la elaboración de tamales, mole verde y “tapixtle”, que es un guisado típico de Veracruz. En Belice, se fuma como sustituto de la marihuana y en algunas comunidades indígenas de Centroamérica se elabora un jugo de las hojas machadas para prevenir paludismo y retirar piojos y garrapatas (Vizcaíno-Páez, 2013).

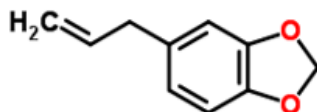
1.2.1 Fitoquímica y estudios realizados en *Piper auritum*.

Debido a la diversidad de compuestos presentes en el género *Piper* y a las propiedades biológicas que presentan, se han realizado estudios enfocados a la caracterización y evaluación extractos obtenidos de especies como *P. auritum*. Específicamente de esta especie, se han aislado fenilpropanoides, terpenos, flavonas y esteroides. (Parmar *et al.*, 1997). En la Tabla 1, se presentan algunos de los compuestos ya reportados para esta especie.

Tabla 1. Algunos metabolitos aislados de *Piper auritum* (Tomado de Parmar *et al.*, 1997).

Clasificación	Compuestos
Propenilfenoles	Elemicina Eugenol Miristicina Safrol
Terpenos	Bisaboleno Borneol Acetato de borneol α -Pino, β -Pino Cariofileno Copaeno Limoneno Epatuleno Terpinoleno Transfitol
Flavonas	7,4'-Dimetoxi-5,3'-dihidroxi-flavona
Esteroides	Sitosterol

En cuanto a la actividad biológica de *P. auritum*, Monzonte *et al.* (2010) caracterizaron el aceite esencial de esta especie y evaluaron su toxicidad y su actividad contra *Leishmania*. El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/ EIMS), reveló que el compuesto mayoritario es el safrol (Figura 4) con una abundancia del 87%. El aceite esencial fue activo contra los promastigotes de *Leishmania major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. donovani* y, a su vez, inhibió el crecimiento intracelular de amastigotes de *L. donovani*.

**Safrol**

$C_{10}H_{10}O_2$
Masa promedio: 162.185 Da

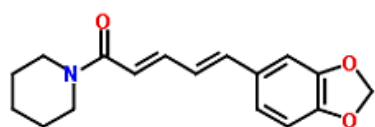
Figura 4. Estructura química del safrol, un fenilpropanoide que es el componente principal del aceite esencial de *P. auritum*.

En el 2012, Pineda *et al.*, evaluaron la eficacia de cuatro extractos utilizando diferentes solventes: n-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, así como el aceite esencial de *P. auritum* y *P. holtonii* sobre la inhibición del crecimiento de tres hongos patógenos de frutos de importancia agrícola: *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae*. Los extractos que mostraron mayor actividad contra estos patógenos fueron el hexánico y el aceite esencial de ambas especies. Los compuestos mayoritarios identificados fueron safrol para *P. auritum* y apiol para *P. holtonii*. En el mismo año, se llevó a cabo un estudio donde se evaluó el efecto anti nutricio y la toxicidad de los extractos hexánico y metanólico de semillas de *Azardichta indica* y de hojas de *P. auritum* y *Petiveria alliacea* sobre larvas de *Spodoptera exigua* en condiciones de campo y laboratorio. El mayor efecto se observó con los extractos de *A. indica* seguidos de los de *P. auritum* (Delgado-Barreto *et al.*, 2012). Sánchez *et al.*, en el 2013, mostraron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. auritum* sobre *Xanthomonas albilineans* y *X. campestris*. Además, el trabajo realizado por Caballero-Gallardo *et al.* (2014), evaluó la actividad repelente y la toxicidad de los aceites esenciales de *P. auritum* y *P. multiplinervium* sobre *Tribolium castaneum*. El aceite esencial *P. auritum* mostró una actividad repelente más eficiente en comparación con el de *P. multiplinervium*, además de causar un 100% de letalidad durante un periodo mínimo de exposición. Los compuestos identificados a los que se les atribuyó esta actividad fueron safrol y miristiceno, para *P. auritum* y β -elemeno, trans- β -cariofileno y óxido de cariofileno para *P. multiplinervium*.

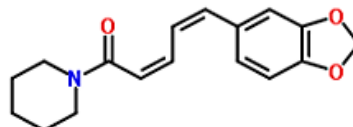
1.3 Piperamidas y su actividad biológica.

Las piperamidas son, al igual que las alcanoides, compuestos alfa insaturados que se presentan en especies del género *Piper*. La mayoría de estos compuestos se conforman de una parte ácida, como por ejemplo el ácido cinámico, que forma un grupo amida con un nitrógeno que se encuentra en un anillo de 5 o 6 carbonos, o en algunas ocasiones unido a una cadena isobutilo. La primer piperamida aislada fue la piperina, obtenida de *P. nigrum*, que es responsable del sabor y olor característico que posee la pimienta, y es la más común en especies de este género. Sin embargo, existen algunas otras con amplia distribución como la chavicina, piperilina y piperlonguminina que, estructuralmente, difieren en el sustituyente y el patrón de sustitución en el grupo aromático (Figura 5).

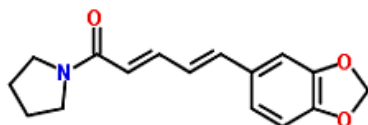
Aunque la ruta de biosíntesis de estos compuestos aún no ha sido del todo elucidada, se ha propuesto, para el caso de la piperina, que la síntesis comienza con la formación del piperoil CoA, derivada del cinamoil CoA involucrada en la ruta del ácido shikímico para la síntesis de fenilpropanoides. El alargamiento de la cadena se da por la unión de unidades de acetil CoA o malonil CoA mediante reacciones tipo Claisen. El cetoéster resultante se reduce con NADPH, y por último ocurre una reacción de deshidratación para dar lugar a la piperoil CoA. La parte amino que se une a este compuesto para formar el enlace amida, proviene de la L-lisina que se descarboxila en presencia de piridoxal fosfato (PLP) para dar lugar a la cadaverina, que a su vez sufre una desaminación oxidativa por la enzima diaminoxidasa para formar un amino-aldehído. Posteriormente, se cicla para dar lugar a la formación de una imina (piperideina), que se reduce a piperidina. Por último este compuesto se condensa con el piperoil-CoA y da lugar a la piperina (Figura 6) (Okwute *et al.*, 2013). Otros investigadores han propuesto que las piperamidas, lignanos y kavapironas se sintetizan a partir de fenilpropanoides que derivan del ácido cinámico. Sin embargo, no hay estudios concretos que corroboren alguna de las de las propuestas anteriores.

**Piperina**

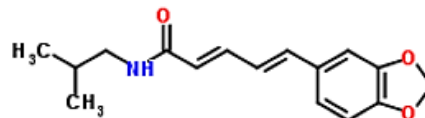
$C_{17}H_{19}NO_3$
Masa promedio: 285.338 Da

**Chavicina**

$C_{17}H_{19}NO_3$
Masa promedio: 285.338 Da

**Piperilina**

$C_{16}H_{17}NO_3$
Masa promedio: 271.311 Da

**Piperlonguminina**

$C_{16}H_{19}NO_3$
Masa promedio: 273.327 Da

Figura 5. Estructura química de algunas de las piperamidas más comunes en especies del género *Piper*. Se puede observar que la principal diferencia en las estructuras es el sustituyente unido al carbonilo de la cadena alifática.

Las piperamidas han mostrado tener una amplia gama de actividades biológicas. En el caso de la piperina, se ha observado que posee actividad antimetastásica, antidepressiva, hepatoprotectora y antitumoral, además de funcionar como un regulador de la hormona tiroidea y de los niveles de glucosa en ensayos *in vivo* en ratones. Específicamente de *P. chava* (Trel. & Yunck), se aislaron 16 amidas, entre ellas la piperchabamida B y D, piperlonguminina, retrofractamida C, y retrofractamida que mostraron un efecto hepatoprotector bastante eficaz. Además, algunas piperamidas como la piplartina, dihidropiplartina y la fargamida aisladas de *P. tuberculatum* mostraron actividad antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides*, mostrando mayor eficacia en comparación con estándares como el miconazol, aun utilizando concentraciones considerablemente bajas (Perez-Gutierrez *et al.*, 2013).

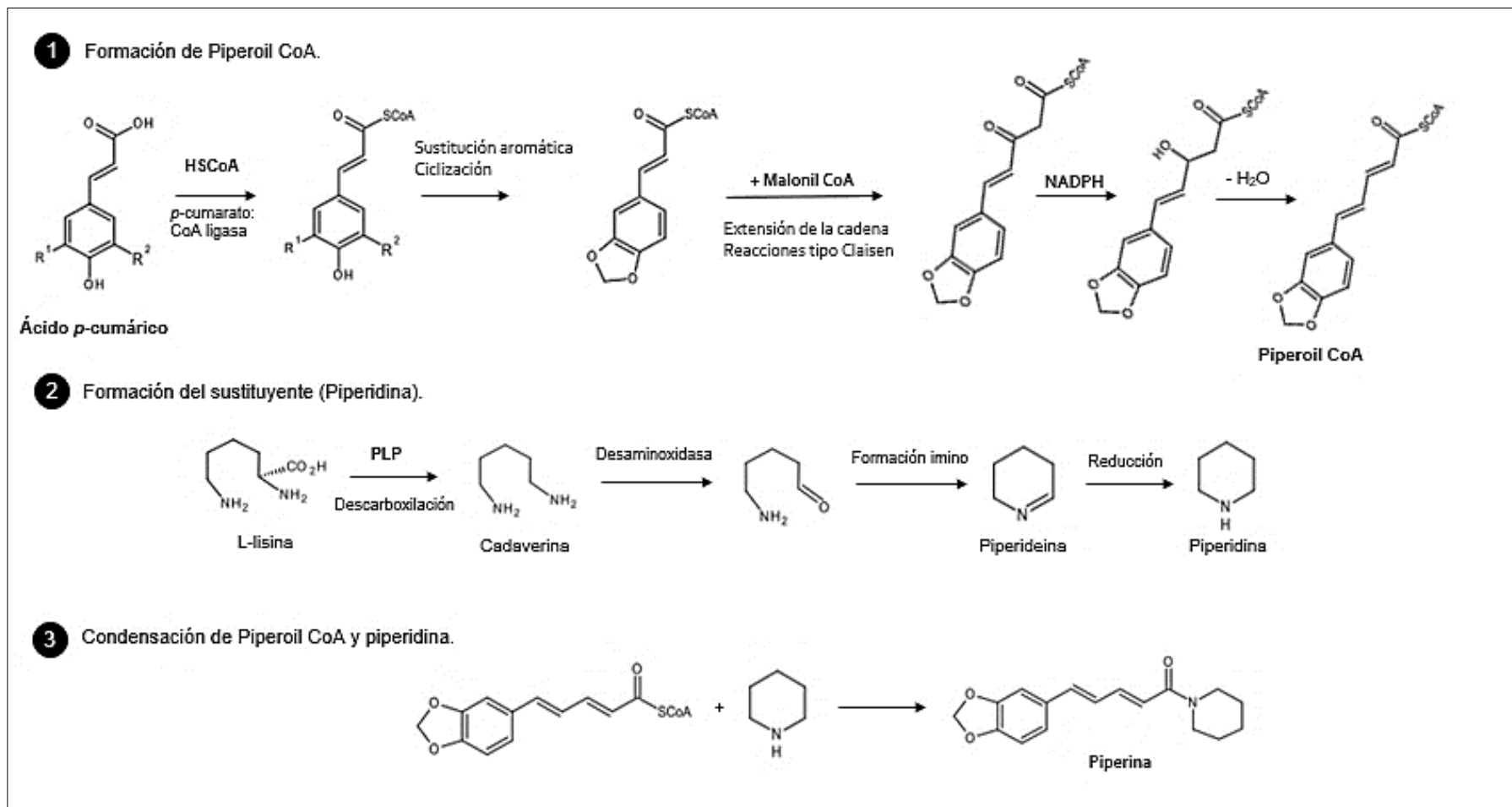


Figura 6. Ruta metabólica propuesta para la biosíntesis de piperina (de acuerdo a Okwute *et al.*, 2013). El precursor es el ácido *p*-cumárico involucrado también en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides.

Las piperamidas son compuestos específicos para el género *Piper* y se encuentran en aproximadamente el 75% de las especies. Sin embargo, estos compuestos presentan cierta tendencia en cuanto a su distribución. Algunas piperamidas como la pipericida y la guineesina se encuentran exclusivamente en especies del Viejo Mundo (Europa, Asia, África e Islas circundantes) y piperamidas como la piplartina únicamente se presenta en especies del Nuevo Mundo (América). Además, se ha observado que las especies nativas del Nuevo Mundo poseen una menor diversidad de estos compuestos. Uno de los ejemplos más claros es *P. chaba* (Trel. & Yunck), especie nativa del sureste de Asia que cuenta con más de 20 piperamidas en su composición, en comparación con *P. anduncum* L. nativa de Centroamérica, que no presenta este tipo de compuestos (Figura 7). Sin embargo, se han identificado en su composición algunos fenilpropanoides como el safrol y la miristicina que provienen de la misma ruta de biosíntesis (Lee-Dyer *et al.*, 2004).



Figura 7. Ejemplos de especies del género *Piper* del Viejo y Nuevo mundo. *P. chaba* (Trel. & Yunck), especie originaria de Asia, que cuenta con más de 20 piperamidas en su composición **(A)**. *P. anduncum* L., especie originaria de América Central, que no posee piperamidas **(B)**.

1.4 Alcamidas

Las alcamidas son compuestos que se caracterizan por producir sensación de pungencia, cosquilleo, salivación excesiva y tener un efecto anestésico local (Greger, 2015). Se forman por la unión de grupos acilo para formar una cadena alifática de longitud mediana a larga (C6 a C18) que posee una insaturación en la posición alfa unida a un grupo amino proveniente de un aminoácido por medio de un enlace amida que se forma por una reacción de descarboxilación al momento de la condensación de la molécula (Figura 8). De acuerdo con su estructura, pueden clasificarse principalmente en olefínicas, las cuales presentan dobles ligaduras y acetilénicas, con triples ligaduras (Molina-Torres *et al.*, 2001). Estos compuestos se han reportado en 8 familias de plantas: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae y Rutaceae (Greger, 2015).

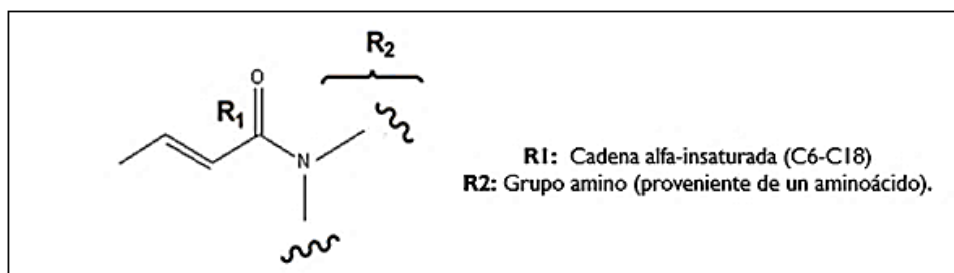


Figura 8. Estructura básica de las alcamidas por definición del laboratorio de Fitobioquímica (Cinvestav, Irapuato). **R1:** Representa la cadena alfa insaturada que puede tener una longitud de C6-C18. **R2:** Es el grupo amino proveniente de un aminoácido que va a formar el enlace amida con la cadena insaturada mediante una reacción de descarboxilación.

Dentro de la familia Asteraceae se han aislado alcamidas en los géneros *Acmella*, *Anacyclus*, *Echinaceae* y *Heliopsis*. Un ejemplo es la *N*-isobutil-2*E*, 6*Z*, 8*E*-decatrienamida, llamada “spilanthol”, aislada por primera vez de flores de *Spilanthes oleraceae*. Sin embargo, años después esta especie fue reclasificada como *Acmella oleraceae* (L.) R. K. Jansen (Greger, 2015). Este compuesto, que también es conocido como “afinina”, fue aislado de las raíces de *H. longipes* (Acree *et al.*, 1945)) una planta con actividad insecticida de México erróneamente clasificada como *Erigeon affinis*. La estructura del spilanthol o afinina no se confirmó hasta 1963 por

Crombie *et al.* (1963). Posteriormente, se aclaró que la especie había sido mal identificada y se trataba de *H. longipes*, una planta conocida como “chilmecatli”, “chilcuague o “chilcuán”, una planta endémica de la Sierra Gorda que es utilizada con fines medicinales y culinarios (Molina-Torres *et al.*, 2001). Otro ejemplo es la pellitorina, una alcanida aislada por primera vez de *Anacyclus pyrethrum* conocida como “pellitori” (para una revisión general de alcanidas ver Greger, 2015), que es hasta la fecha la más ampliamente distribuida, ya que además de presentarse en especies de la familia Asteraceae, también se ha reportado presente en la familia Piperaceae, Rutaceae, Aristolochiaceae, Menispermaceae y Poaceae. Específicamente en la familia Rutaceae, se han reportado alcanidas que se caracterizan por tener grupos hidroxilo, como el sanshool e hidroxisanshool, aisladas de especies del género *Zanthoxylum*, que son conocidas comúnmente como “zansho o pimienta china” y que son utilizadas principalmente para la preservación de alimentos y como saborizantes (Figura 9) (Molina-Torres *et al.*, 2001).

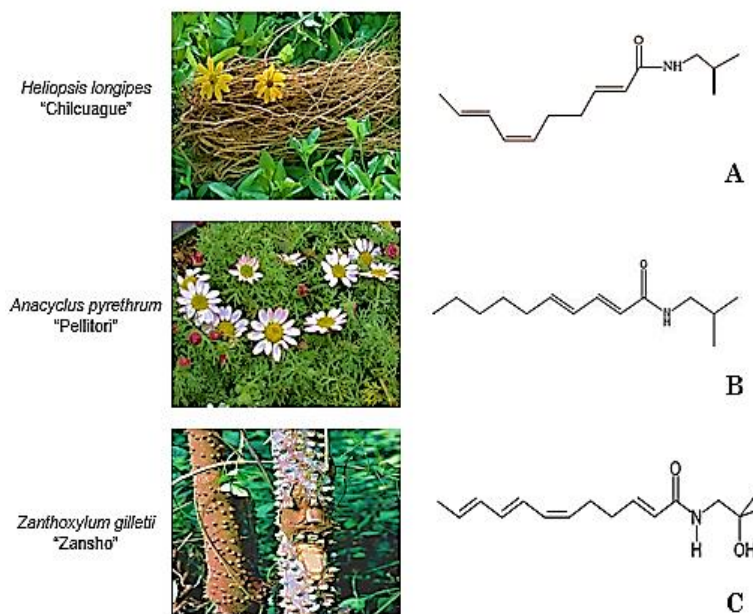
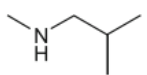
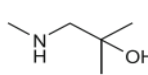
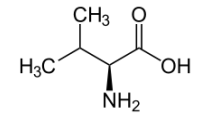
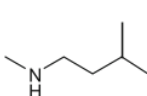
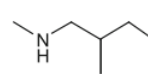
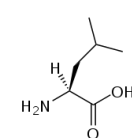
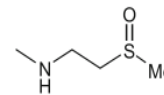
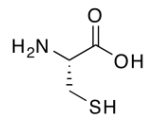


Figura 9. Ejemplos de alcanidas y especies productoras de estos compuestos. **(A)** Afinina, presente en las raíces de *Heliopsis longipes*, comúnmente conocida como “chilcuague”. **(B)** Pellitorina, una de las alcanidas más comunes, aislada por primera vez de *Anacyclus pyrethrum*, conocida comúnmente como “pellitori”. **(C)** Hidroxi-sanshool, presente en *Zanthoxylum gillettii* comúnmente conocido como “zansho”.

1.4.1 Biosíntesis de alcanidas

La parte amino de las alcanidas, como ya se mencionó anteriormente, proviene de un aminoácido, que es incorporado posterior a una reacción de descarboxilación. En la Tabla 2, se presentan algunos de los aminoácidos que, con mayor frecuencia, actúan como precursores inmediatos del grupo amino en la síntesis de alcanidas (Greger, 2015).

Tabla 2. Grupos amino más comunes en las alcanidas y los respectivos aminoácidos de los que provienen.

Grupo amino		Aminoácido
		
Isobutilamina	Hidroxi-isobutilamina	Valina
		
Isopentilamina	2-Metilbutilamina	Leucina
		
2-(sulfonilmetil)-etilamina		Cisteína

La ruta de biosíntesis de alcanidas aún no ha sido elucidada y varias propuestas han surgido. Greger (1984), propuso que la parte acídica de las alcanidas proviene del ácido oleico, en donde las dobles y triples ligaduras, son efecto de la acción de desaturasas y acetilenasas, donde a su vez ocurrían reacciones de isomerización. Más recientemente (Minto *et al.*, 2008), enriquecieron esta propuesta al mencionar que la síntesis se produce en diferentes compartimentos celulares en forma sucesiva. Desde hace algunos años en el laboratorio de Fitobioquímica dirigido por el Dr. Jorge Molina Torres, se ha elucidado sobre la ruta de biosíntesis de la cadena

acilo (Salgado-Garciglia *et al.*, 1995). Más recientemente, se llevó a cabo un proyecto de doctorado (Butimea Cantúa, 2018) donde se confirmó, a nivel molecular, que la ruta de biosíntesis de la afinina, es llevada a cabo por un complejo policétido sintasa multi enzimático denominado PKS *alk* (Figura 10), en donde intervienen las siguientes enzimas: acetiltransferasa (AT), cetosintetasa (KS), cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), enoilreductasa (ER) y una tioesterasa (TE). Es importante aclarar que en la policétido sintetasa involucrada en la síntesis de alcanidas, solamente existe un paso de enoil reductasa, a diferencia de la biosíntesis de ácidos grasos por la “Fatty acid synthase” (FAS). El proceso PKS *alk* para afinina involucra 4 módulos que se describen a continuación (Butimea Cantúa *et al.*, 2018):

Modulo I: Ocurre la condensación de acetil CoA con malonil-CoA para dar lugar, mediante la enzima condensante (KS), a la 3-cetobutiril-ACP. Posteriormente, se reduce el grupo cetona a 3-hidrobutiril-ACP por acción de una cetoreductasa (KR) utilizando NADPH. Después se lleva a cabo una deshidratación por medio de una deshidratasa (DH), formando alfa trans- Δ -buteno-ACP.

Modulo II: Aquí se lleva a cabo la condensación del trans- Δ -buteno-ACP con un malonil-CoA para la formación de *trans*- Δ -hexanoil-ACP. A su vez, en este módulo hay un mecanismo de isomerización *trans-cis*, que permite la formación e incorporación de un enlace *cis*, para dar lugar a la región 2Z, 4E de dicha molécula.

Modulo III: El 6-*cis*,8-*trans*- Δ -hexanoil-ACP se condensa con malonil-CoA para la formación de 4-*trans*,6-*cis*-8-*trans*- Δ -octanoil-ACP. Aquí interviene una enoil reductasa (ER) la cual hace que se pierda el doble enlace formando 4-*cis*,6-*trans*- Δ -octanoil-ACP utilizando NADPH como fuente de reducción.

Modulo IV: Se lleva a cabo la condensación del 4-*cis*,6-*trans*- Δ -octanoil-ACP con la malonil-CoA formando 2-*trans*,6-*cis*,8-*trans*- Δ -decanoil-ACP y por medio de una tioesterasa (TE) se liberará la cadena de diez átomos de carbono denominada 2E, 6Z, 8E-decatrieno. Por último, esta cadena se condensa con una valina formando N-isobutil-2E, 6Z, 8E decatrienamida.

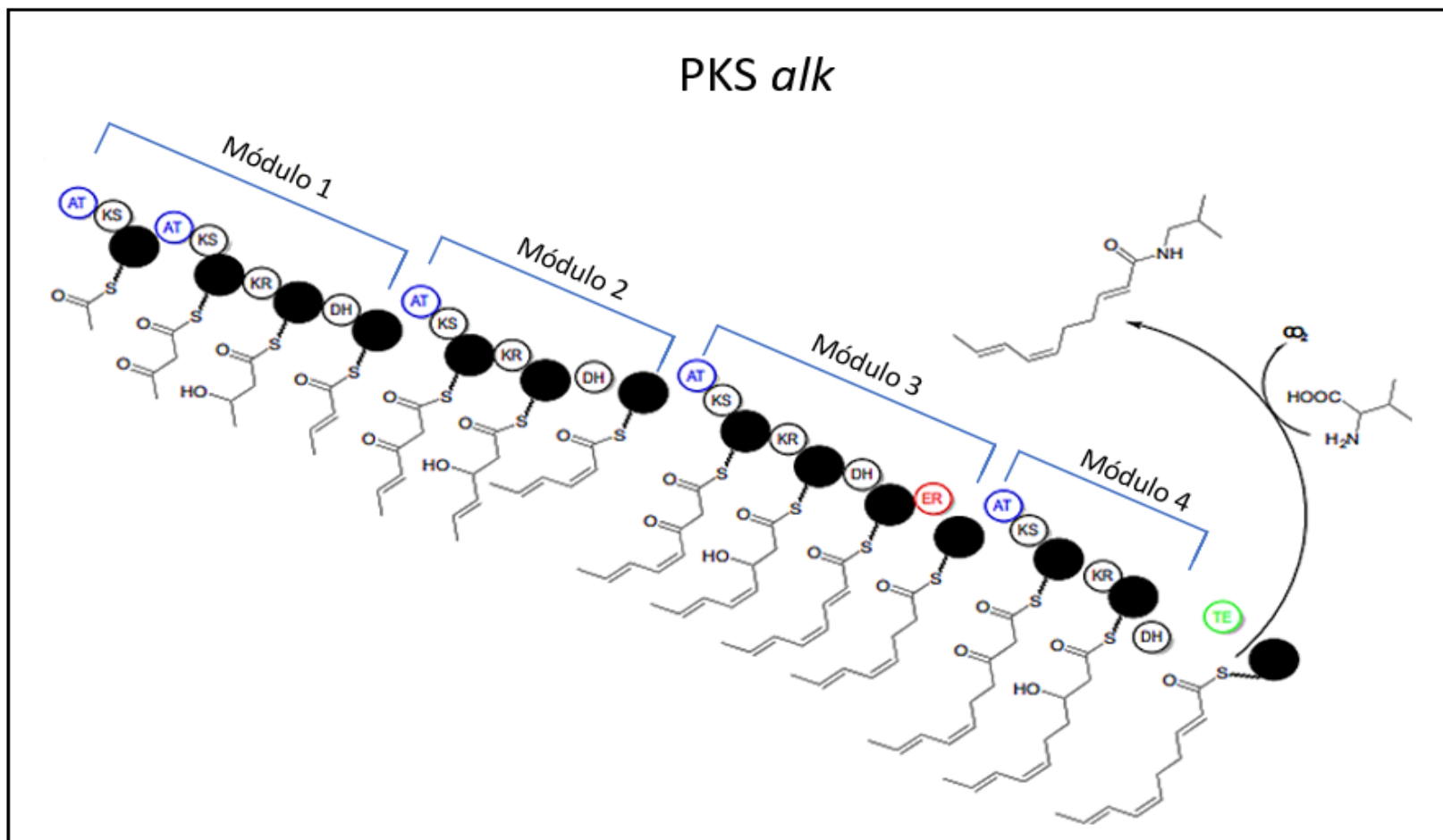


Figura 10. Modelo enzimático del complejo enzimático *PKS alk* propuesto para la síntesis de afinina por Molina-Torres (Comunicación personal). Acetiltransferasa (AT), cetosintetasa (KS), cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), enoilreductasa (ER) y tioesterasa (TE).

1.4.2 Actividad biológica de las alcanidas.

Se han realizado diversos estudios que han demostrado que las alcanidas tienen actividades biológicas de interés. En 1998, Molina-Torres *et al.*, demostraron que la afinina (*N*-isobutil-2*E*, 6*Z*, 8*E*-decatrienamida) en concentraciones de 25 µg/ ml, inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. También, se ha evaluado el efecto de la afinina y sus derivados, como la *N*-isobutil-2*E*-decenamida y la *N*-isobutil-decanamida, sobre el crecimiento y el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis thaliana*. Se observó que la afinina a concentraciones de 10⁻⁶ a 10⁻⁴ M promueve la elongación de la raíz primaria y el desarrollo de raíces laterales, seguida de las otras alcanidas que también mostraron actividad, pero a concentraciones más elevadas (Ramírez-Chávez *et al.*, 2004).

De igual manera Molina-Torres *et al.* (2008), analizaron la actividad bactericida de ocho alcanidas obtenidas por síntesis enzimática, en donde observaron que la longitud de la cadena en aquellas alcanidas que presentaban un sustituyente isobutilo es capaz de influir en forma importante sobre su bioactividad. La *N*-isobutil-octanamida y la *N*-isobutil-dodecamida inhibieron el crecimiento de *B. subtilis* en un 95.4 y 98.3%, respectivamente, en comparación con la *N*-isobutil-hexanamida, que únicamente inhibió en 53.4%. Observaron, también, que la *N*-(2-feniletíl)-decanamida, presentó la mayor actividad entre las alcanidas que se evaluaron. Con estos resultados, pudieron concluir que las alcanidas con un sustituyente feniletíl son más activas en comparación con las que presentan el sustituyente isobutil. Además, observaron que las alcanidas con cadenas C8-C10 muestran mayor actividad que las C6 y C12.

Por definición las alcanidas presentan insaturación 2*E*, lo que les brinda la característica de tener actividad antifúngica. Además, alcanidas aisladas de los géneros *Echinaceae*, *Anacyclus*, *Spilanthes*, *Heliopsis*, *Piper* y *Achillea* presentan actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora (Para una revisión de alcanidas *senso lato*, ver la base de datos de Boonen *et al.*, 2012).

1.4.3. Alcamidas en el Género *Piper*.

Las alcamidas presentes en especies de la familia Piperaceae se caracterizan por presentar, en su mayoría, sustituyentes isobutilo (Greger, 2015). Una de las alcamidas más distribuida en el género *Piper* es la pellitorina, aislada de frutos y raíces de *P. nigrum* L., y detectada en otras especies como *P. chaba* L., *P. longum* L., entre otras. En 1997 Parmar *et al.*, reportaron una revisión de los metabolitos presentes en las especies de este género en donde también se reportaron algunas alcamidas (Tabla 3).

Tabla 3. Alcamidas reportadas en especies del género *Piper* (tomado de Parmar *et al.*, 1997).

ALCAMIDA	ESPECIE
N-Isobutil-2E,4E-decadienamida (pellitorina)	<i>P. attenuatum</i>
	<i>P. chaba</i>
	<i>P. guineense</i>
	<i>P. hancei</i>
	<i>P. longum</i>
	<i>P. nepalense</i>
	<i>P. nigrum</i>
	<i>P. novae hollandiae</i>
	<i>P. pedicellosum</i>
	<i>P. peepuloides</i>
	<i>P. ribesoides</i>
N-Isobutil-2E,4E-dodecadienamida	<i>P. guineense</i>
	<i>P. peepuloides</i>
N-Isobutil-2E,4E-eicosadienamida	<i>P. guineense</i>
	<i>P. longum</i>
	<i>P. macropodum</i>
N-Isobutil-2E,4E-octadecadienamida	<i>P. nigrum</i>
	<i>P. argyrophyllum</i>
	<i>P. guineense</i>
N-Isobutil-2E,4E-octadienamida	<i>P. longum</i>
	<i>P. banksii</i>
	<i>P. nigrum</i>
	<i>P. novae hollandiae</i>
N-Isobutil-2E,4E-octadienamida	<i>P. longum</i>
	<i>P. longum</i>

1.5 Síntesis enzimática.

En la mayoría de las ocasiones, los compuestos presentes en plantas que son de interés para la investigación molecular y biomédica presentan una distribución restringida a ciertas especies. Además, usualmente son sintetizados en cantidades reducidas, lo que dificulta su extracción. Actualmente, el uso de enzimas para la catálisis de reacciones químicas ha mostrado ser una alternativa práctica y eficiente para la obtención de compuestos con actividad biológica, frente a la síntesis orgánica tradicional (Molina-Torres *et al.*, 2008).

La síntesis enzimática involucra el uso de enzimas que han sido explotadas para la síntesis orgánica. Actualmente, uno de los casos más estudiados es el de las lipasas, que en condiciones naturales catalizan la hidrólisis de ésteres a sus correspondientes ácidos y alcoholes. Sin embargo, se ha observado que, en condiciones anhidras, utilizando solventes orgánicos y adicionando nucleófilos como alcoholes, aminas o tioles, este tipo de enzimas con capaces de llevar a cabo reacciones de transesterificación, aminólisis y tioesterificación, respectivamente (Molina-Torres *et al.*, 2008).

La lipasa B de *Candida antarctica* es una de las enzimas más eficientes para la producción de aminas y amidas usando diferentes procedimientos enzimáticos. El fácil manejo de esta enzima, su bajo costo y su disponibilidad comercial la convierten en una herramienta ideal para síntesis de una amplia gama de compuestos nitrogenados que pueden utilizarse para la producción de productos farmacéuticos o relacionados con el sector industrial (Gotor-Fernández *et al.*, 2006). Un ejemplo del uso de esta enzima para síntesis es el estudio realizado por Molina-Torres *et al.* (2008), en donde se realizó la síntesis de diez alcaloides usando la enzima Novozym lipasa B de *C. antarctica*, usando como substratos ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos con la adición de isobutilamina o feniletilamina en presencia de tolueno anhidro. Esto permitió la obtención y evaluación del efecto de las alcaloides sobre bacterias Gram⁺ y Gram⁻.

1.6 Efecto de extractos obtenidos de plantas y alcamidas sobre el *quorum sensing*.

El *quorum sensing*, es un proceso descubierto y descrito hace 25 años en dos bacterias con bioluminiscencia: *Vibrio fischeri* y *V. harveyi* (Miller *et al.*, 2001). Este proceso se da tanto en bacterias Gram⁺ y Gram⁻. Depende de la densidad poblacional y puede describirse como el sistema de comunicación célula-célula, donde se produce, detecta y responde a moléculas señalizadoras extracelulares llamadas autoinductores (Stauff *et al.*, 2011). Es importante mencionar, que el *quorum sensing* está involucrado en la producción de factores de virulencia como la síntesis de exopolisacáridos, la formación de biopelículas, e incluso en algunas bacterias patógenas, este proceso regula la producción de pigmentos y antibióticos. Específicamente en las bacterias Gram⁻, el *quorum sensing* esta mediado por autoinductores específicos llamados *N*-acil-homoserinlactonas (AHL), en donde a una densidad poblacional alta se unen a la proteína activadora de la transcripción (RP), que enciende los genes responsables de este proceso (Figura 11). Debido a que ya se conoce este sistema de comunicación bacteriano, actualmente se ha dado la búsqueda de compuestos que no actúen como bactericidas, sino que inhiban este proceso, siendo una alternativa eficaz para atenuar su virulencia y combatir las infecciones provocadas por bacterias que ya muestran resistencia a antibióticos (Suryanarayana *et al.*, 2013).

La inhibición del *quorum sensing* puede deberse a diferentes mecanismos. Por ejemplo: (1) bloqueando la proteína receptora, (2) reduciendo la producción de moléculas señalizadoras (AHL), (3) degradando las AHL, o (4) mimetizando la función de las AHL, ocasionando que la comunicación se vea afectada. Se ha observado que algunos extractos de plantas poseen compuestos que actúan como inhibidores del *quorum sensing*, principalmente porque su estructura química es muy similar a las moléculas señalizadoras y a su capacidad de degradar a las proteínas receptoras (Chandria-Kalia, 2013). Para realizar ensayos que permitan la evaluación de metabolitos que inhiban el *quorum sensing*, se necesita de un reportero. Uno de los más usados es *Chromobacterium violaceum*, una bacteria Gram⁻ de amplia distribución, que como respuesta a la expresión de genes que

regulan el *quorum sensing*, produce violaceina, un antibiótico de color violáceo. Generalmente se utiliza la cepa CV026, una mutante deficiente en la sintasa que produce el autoinductor y que requiere de la adición exógena de AHL. Esta bacteria, responde, además, a una amplia variedad de autoinductores, que como podemos observar en la Figura 12, varían en la longitud de la cadena.

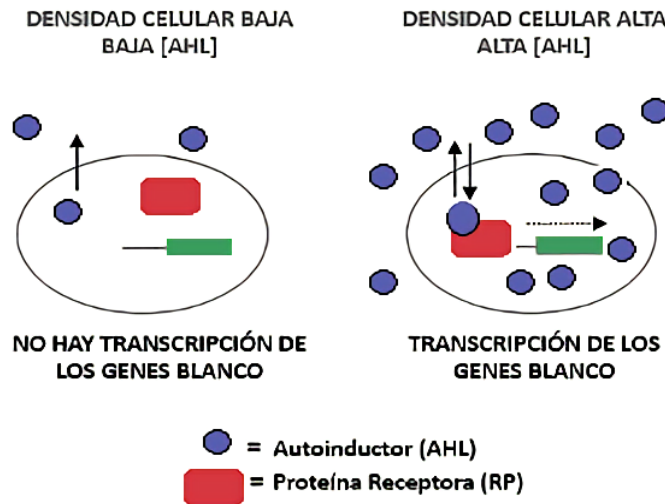


Figura 11. El mecanismo de *quorum-sensing* en bacterias Gram (-) involucra dos componentes principales: una proteína receptora o activadora de la transcripción (**RP**) y el autoinductor, que en este caso son las *N*-acil-homoserinlactonas (**AHL**). Al acumularse la AHL, en respuesta a la densidad celular alta, se une a la RP, que induce la expresión de genes específicos. La RP se compone de 2 dominios: un *N* terminal que interactúa con el autoinductor y un *C* terminal que se relaciona con sitios de unión a ADN (Modificado de Kievit *et al.*, 2000).

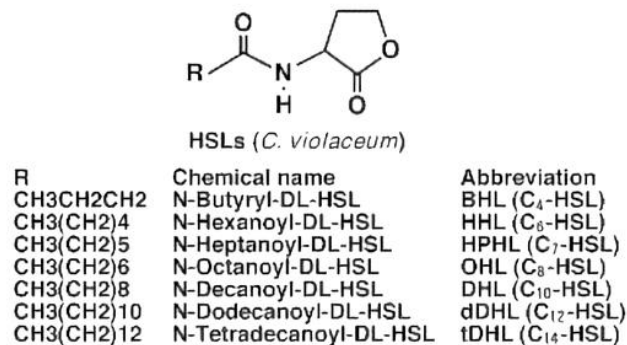


Figura 12. Autoinductores a los que responde *C. violaceum*. Se puede observar que la principal diferencia es la longitud de la cadena (Tomado de Gomi- Kazunori *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Zhou *et al.* (2013), se evaluó la capacidad de inhibición del *quorum sensing* del extracto de *Syzygium aromaticum* (clavo) utilizando la cepa reportera CV026 de *C. violaceum*, mediante métodos de bioautografía. Posteriormente, mediante un análisis de HPLC, lograron identificar al eugenol como el compuesto responsable de dicha actividad (Figura 13).

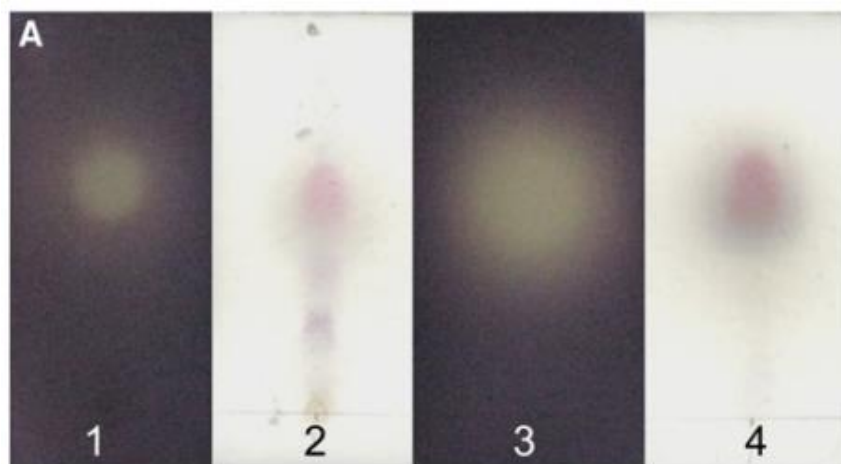


Figura 13. Ensayo de inhibición del extracto de *Syzygium aromaticum* sobre el *quorum sensing* en *C. violaceum*. **1 y 2:** TLC (Cromatografía de capa fina) del extracto y bioautografía donde se puede observar el sitio donde hay inhibición. **3 y 4:** Estándar de eugenol.

Específicamente en plantas del género *Piper*, existe un trabajo de Ying-Tun *et al.* (2013), en donde se evalúa esta actividad con extractos de *P. nigrum* L., *P. betle* L. y *Gnetum gnemon* utilizando como reporteros a *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Escherichia coli* [pSB401], *E. coli* [pSB1075] y *C. violaceum* CV026. Se encontró que los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *P. betle*, muestran mayor inhibición del *quorum sensing*. Los compuestos responsables de dicha actividad no fueron identificados.

Por otro lado, en un trabajo reciente (Vázquez-Martínez *et al.*, 2017), se observó que dos alcaloides, la *N*-hexanoil isobutilamida y la *N*-hexanoil feniletilamida obtenidas por síntesis enzimática, mostraron un efecto positivo en la inducción de violaceína en *C. violaceum*. La *N*-hexanoil isobutilamida indujo la producción de este compuesto desde 10 µg, mientras que la *N*-hexanoil feniletilamida la indujo a partir

de 40 μg (Figura 14). Esto indicó que estos compuestos muestran una actividad análoga a las *N*-acil-homoserinlactonas.

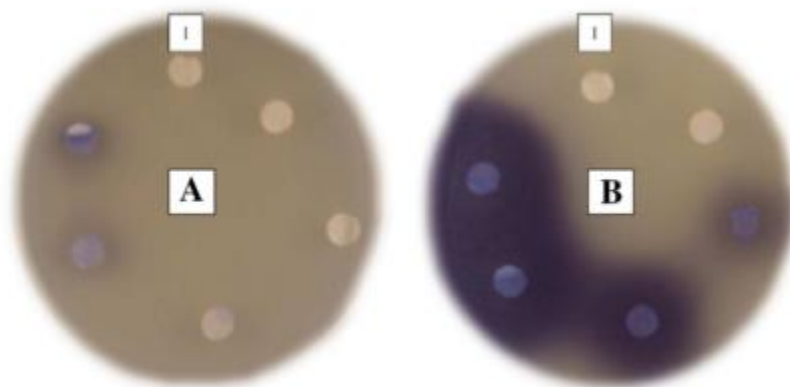


Figura 14. Evaluación de la inducción de violaceína por A: *N*-hexanoil feniletíl amida y B: *N*-hexanoil feniletíl amida, en *C. violaceum* CV026. La concentración incrementa de acuerdo con las manecillas del reloj: 0, 20, 40, 60 y 80 μg por disco (Tomado de Vázquez-Martínez *et al.*, 2017).

III. HIPÓTESIS

Piper auritum es una especie útil para el estudio de la biosíntesis de alcaloides, ya que al ser una especie originaria del Nuevo Mundo, carece de piperamidas y posee precursores de los compuestos de interés.

IV. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el perfil de piperamidas y alcaloides en extractos etanólicos obtenidos de diferentes tejidos de *P. auritum*.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los extractos etanólicos de los diferentes tejidos de *P. auritum* (hojas, tallos, raíces e inflorescencias).
- Realizar un perfil general de los extractos etanólicos de *P. auritum* por HPTLC.
- Realizar, en forma comparativa, un perfil fitoquímico de los extractos etanólicos de los diferentes tejidos de *P. auritum* mediante GC/ EIMS.
- Determinar el perfil de alcaloides y piperamidas presentes en *P. auritum*.
- Confirmar la estructura de los alcaloides presentes en *P. auritum* por síntesis enzimática.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos y compuestos obtenidos por síntesis sobre el *quorum sensing*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Material biológico y obtención de los extractos.

El material biológico (Figura 15), fue proporcionado por el laboratorio de la Dra. Vianey del Rocío Torres, de la Universidad Veracruzana, quienes también realizaron la correcta herborización e identificación de la especie. Este material fue colectado específicamente en la ciudad de Xalapa, Veracruz (Latitud: 19.5426, Longitud: -96.9137 19° 32' 33" Norte, 96° 54' 49" Oeste). El material vegetal se pesó obteniéndose 529, 46.7, 18.5, 23.35 y 190 g de tallos, inflorescencias, hojas, nervaduras y raíces, respectivamente, para después macerar en alcohol etílico al 96% durante una semana. Por último, cada uno de los extractos se filtró y concentró en un rotavapor de la marca Büchi (manufacturado en Suiza), acoplado a una bomba de vacío modelo V-700 y un controlador modelo V-850 de la misma marca a una temperatura de 60° C y una presión de vacío de 175 mbar, hasta llevarlos a sequedad para después disolverlos nuevamente en etanol y llevarlos a un volumen final de 10 ml cada uno.

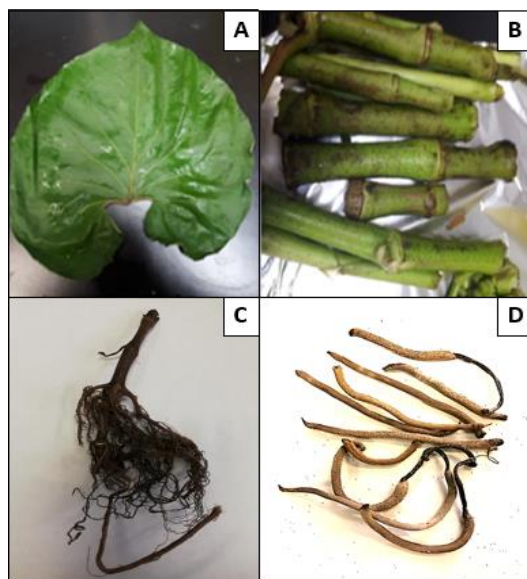


Figura 15. Aspecto de diferentes tejidos de *P. auritum*. **A:** Hoja, **B:** Tallos, **C:** Raíz y **D:** Inflorescencias. (Material proporcionado por la Universidad Veracruzana).

6.2 Cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC).

Como primer paso exploratorio de la composición de los extractos se desarrolló una HPTLC de cada extracto de uno de los tejidos de *P. auritum*. Para esto se utilizaron placas de HPTLC de 20 x 10 cm de Silica Gel 60 F₂₅₄ (Merck Millipore, fabricación alemana) y la aplicación de las muestras se realizó con el equipo CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (ATS) (manufacturado en Suiza). El desarrollo de las placas se llevó a cabo utilizando como fase móvil hexano y acetato de etilo a una proporción 2:1 v/v. La visualización de las placas se realizó bajo luz u.v. a longitudes de onda de 254 nm y 366 nm, respectivamente, mediante el equipo CAMAG TLC Visualizer (manufacturado en Suiza), y el análisis de éstas, mediante el software visionCATS.

6.3 Cromatografía de capa fina (TLC) preparativa.

Para la pre-purificación de algunos compuestos obtenidos y sintetizados se utilizó TLC preparativa con placas de sílice de 20 x 20 cm (Analtech Uniplate) (fabricación en USA), de 0.5 mm de espesor con soporte de vidrio.

6.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización por Impacto electrónico (GC/ EIMS).

Las muestras se analizaron con cromatógrafo de gases (Agilent Technologies modelo 7890A; manufacturado en USA), acoplado a un detector de espectrometría de masas (Hewlett Packard, modelo 5975C; fabricación en USA), con ionización por impacto electrónico y un cuadrupolo para la separación de iones cargados, con una columna J & W DB-1MS de 60 m x 250 µm de diámetro x 0.25 µm de espesor. La fase estacionaria compuesta en un 100% por dimetilpolisiloxano y la fase móvil por helio, como gas acarreador.

6.5 Programas para análisis MSChem, AMDIS y NIST.

La información que proviene del equipo de espectrometría de masas al analizar cada una de las muestras es recopilada por el programa MSChem, que permite la obtención del "Total Ion Chromatogram" (TIC), que es una representación gráfica que representa el total de iones registrados por el electromultiplicador vs el tiempo y el total de iones detectados en cada barrido de una duración de 3 "scans" por

segundo. Para analizar los TIC de cada de cada una de las muestras, se recurrió al programa AMDIS (del inglés “Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System”), que lleva a cabo la deconvolución de los iones componentes de los picos detectados para agrupar iones componentes en función a su distribución binomial eliminando los iones de fondo o con una distribución diferente. Los iones con distribución similar después de la deconvolución los asocia en forma de un espectro de masas. Posteriormente, el espectro de masas de cada uno de estos componentes es comparado con los espectros de masas de la base de datos del NIST v 11 (del inglés, “National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Data Base” del departamento de comercio de los EUA) enlistando en orden decreciente los espectros de masas más similares a cada componente del TIC.

6.6 Síntesis enzimática de la *N*-isobutil-2*E*, 4*E*-decadienamida (pellitorina), *N*-isobutil-2*E*, 4*Z*-decadienamida y *N*-isobutil-2*E*-monodecaenamida.

Para llevar a cabo la síntesis del *N*-isobutil-2*E*, 4*E*-decadienamida (pellitorina), se partió de la isomerización del 2*E*-4*Z*-decadienoato de etilo comúnmente conocido como éster de pera (Bedoukian Research, INC.; USA) (Apéndice II. Especificaciones del producto y comprobación de su pureza), que se utiliza ampliamente en la industria como saborizante y para la elaboración de fragancias. Para esto, 100 mg de este compuesto se disolvieron en 3 ml de etanol, se vaciaron en una celda de cuarzo y se agregó un cristal de yodo para después someterlo a radiación con una lámpara de luz UV de onda corta (254 nm de longitud) a temperatura ambiente durante 60 min, tiempo en el cual la reacción llegó al equilibrio. Cada quince min se tomó una alícuota de esta solución para monitorear la relación de isómeros por GC/ EIMS. Para retirar el yodo, se agregaron 2 g de yoduro de potasio que reacciona formando yodo-yoduro de potasio con 4 ml de agua y la solución se mantuvo en agitación constante durante 5 min. Después se agregaron 8 ml de hexano y se agitó nuevamente durante 5 min para obtener el sobrenadante por decantación y llevar a sequedad con flujo de nitrógeno.

Una vez realizado el procedimiento anterior que permitió la obtención del 2*E*-4*E*-de etilo, se agregaron 100 mg de este compuesto en un reacti-vial con 3 ml de alcohol

ter-amílico, 50 mg de sulfato de sodio anhidro, 36.5 mg de isobutilamina y 50 mg de la enzima comercial Novozym 435 de *C. antarctica* Sigma-Aldrich (USA), junto con un agitador magnético. Esto se mantuvo a una temperatura de 70°C durante 72 h y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. El producto de la reacción se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un vial de vidrio donde el alcohol ter-amílico se evaporó mediante flujo con nitrógeno, y de esta manera se resuspendió el residuo en 2 ml de etanol absoluto. De esta solución se tomó una alícuota para ser analizada por GC/ EIMS y verificar la síntesis del compuesto. Para la síntesis de la *N*-isobutil-2*E*-monodecaenamida se llevó a cabo el procedimiento anterior, a diferencia de que se utilizó como sustrato el 2*E*-decanoato de etilo, que solo presenta una insaturación. Cabe mencionar que la síntesis enzimática también se llevó a cabo usando como sustrato el éster de pera para la obtención del isómero de las pellitorina, la *N*-isobutil-2*E*, 4*Z*-decadienamida (Figura 16).

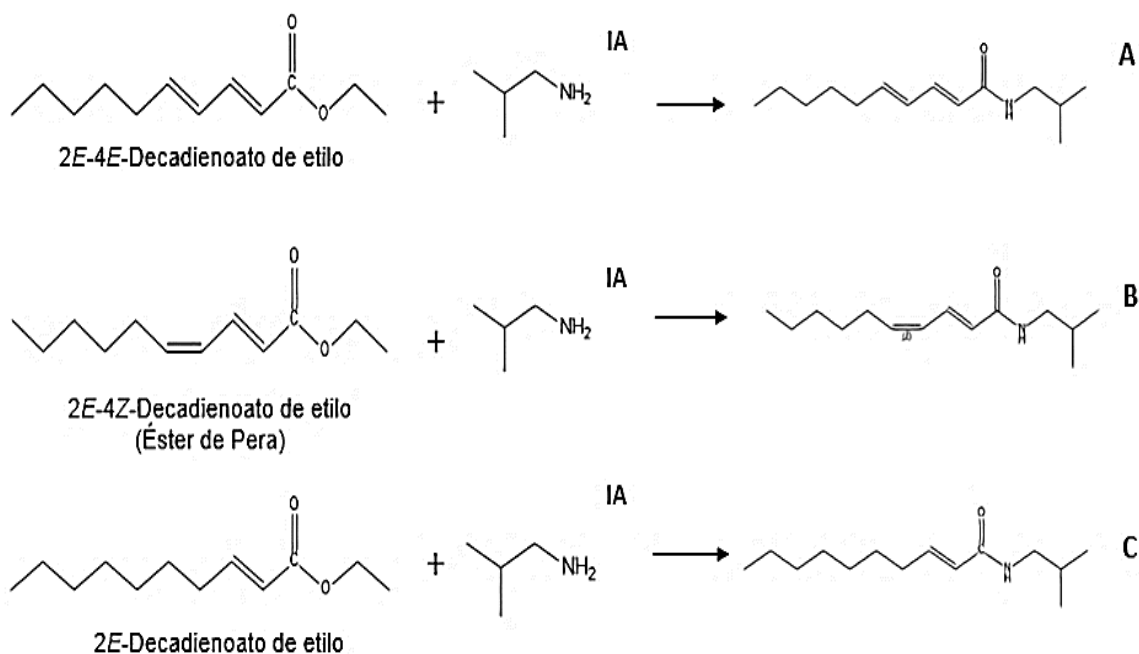


Figura 16. Método utilizado para la síntesis enzimática de alcamidas mediante la reacción con la lipasa B de *Candida antarctica*. El nucleófilo utilizado fue isobutilamina (IA). Los compuestos obtenidos fueron: **A:** *N*-isobutil-2*E*,4*E*-decadienamida (pellitorina), **B:** *N*-isobutil-2*E*, 4*Z*-decadienamida, **C:** *N*-isobutil-2*E*-monodecaenamida.

6.7 Síntesis química del 2E-4E-decadienoato de etilo y de su isómero 2E-4Z-decadienoato de etilo.

Para la síntesis de este compuesto se llevó a cabo una saponificación. Para ello, se pesaron 100 mg de 2E-4E-decadienoato de etilo y se disolvieron en etanol, para después agregar 2 ml NaOH al 0.5 M. Esta solución se incubó a 80 °C por 1 h, después se dejó enfriar y se neutralizó agregando 1 ml de HCl al 1 M. Para obtener el ácido graso libre, se agregó 2 ml de agua más 2 ml de hexano. Posteriormente, se decantó para únicamente obtener la fracción de hexano. Esta se llevó a sequedad para agregar después HCl al 1 M disuelto en metanol. Esta solución se incubó nuevamente a 80 °C por 1 h, se evaporó el solvente con flujo de nitrógeno y se resuspendió en iso-octano. Para obtener el isómero correspondientes se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando 2E-4E-decadienoato de etilo (éster de pera), para después analizar cada muestra por GC/ EIMS y verificar la formación de dichos compuestos.

6.8 Síntesis química del decanoato de etilo y decanoato de metilo.

Con la finalidad de comparar la actividad biológica de los ésteres alfa-insaturados y evaluar la importancia de las insaturaciones y su isomería se sintetizaron las moléculas saturadas. Para la síntesis química de cada compuesto se utilizaron 100 mg de cloruro de decanoilo, disuelto en 40 ml de diclorometano y 1 ml de etanol en el caso del decanoato de etilo y 1 ml de metanol para el decanoato de metilo. Estas soluciones se dejaron en agitación constante por 15 min a temperatura ambiente y después se agregaron 20 ml de agua para detener la reacción. La solución obtenida se colocó en un embudo de separación y se recuperó la fase de diclorometano a la que se le agregó sulfato de sodio anhidro para quitar el exceso de agua. Por último, esta solución se filtró y se concentró con flujo de nitrógeno para evaluar el rendimiento final.

6.9 Pruebas de inhibición de los extractos de *P. auritum* y de los compuestos obtenidos por síntesis enzimática sobre el *quorum sensing*.

La evaluación del efecto de los extractos de *P. auritum* sobre el *quorum sensing* se realizó por el método de bioautografía, que se basa en el uso de TLC. Para esto, se utilizaron placas preparativas de 20 x 20 cm de Silica Gel de 0.5 mm de espesor de la marca Analtech (fabricación en USA), en donde se aplicaron 50 µg de cada uno de los extractos de los diferentes tejidos, para posteriormente desarrollarla en una fase móvil de hexano y acetato de etilo a una proporción 2: 1 v/ v. Una vez totalmente evaporado el solvente de la placa, esta se cubrió con una suspensión de la bacteria reportera CV026 de *C. violaceum* en 50 ml de medio LB, a la cual se le adicionó un autoinductor exógeno (la C6-AHL) a una concentración de 20 µM. Posteriormente la placa se incubó a 32° C por 24 horas en condiciones de humedad. La actividad puede detectarse por las zonas blancas o incoloras bajo un fondo púrpura a morado.

Para evaluar el efecto de las alcanidas y ésteres obtenidos por síntesis sobre el *quorum sensing*, se llevó a cabo el mismo procedimiento. Sin embargo, en este caso la aplicación de cada uno de los compuestos fue por "spot" en concentraciones de 25, 50, 75, 100, 150 y 200 µg sobre placas de aluminio para TLC de 20 x 10 cm cubiertas por Silica Gel 60 F₂₅₄ (Sigma-Aldrich).

Por último, para asegurar que dichos compuestos afectan este mecanismo y no inhiben el crecimiento o tienen actividad bactericida, se utilizaron matraces con 50 ml de medio LB a los que se les agregó 1 ml de una suspensión bacteriana que fue incubada por 24 h con una densidad óptica (DO) de 1.9313, para posteriormente adicionarles la concentración máxima utilizada en cada uno de los tratamientos. En el caso de los extractos, se utilizó el volumen correspondiente a 50 µg y en el caso de las alcanidas y ésteres 200 µg. Por último, se midió la DO inicial de cada matraz y 24 h después de incubación.

VII. RESULTADOS

7.1 Perfil por HPTLC de los extractos etanólicos de *Piper auritum*.

Como se mencionó anteriormente, como primer paso se llevó a cabo una exploración fitoquímica de los diferentes extractos por HPTLC. Se puede observar, en la Figura 17, la diferenciación de cada uno de los tejidos visualizando la placa a 254 y 366 nm, lo que nos permitió observar compuestos que por su estructura química absorben a dicha longitud de onda y emiten fluorescencia. Aunque no se utilizó ningún estándar, se sabe que el safrol y la miristicina, compuestos ya reportados para esta especie, presentan un R f. (Factor de retención que se define como la relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa) de 0.9 y 0.8 respectivamente, utilizando como fase móvil hexano y acetato de etilo a una proporción 2: 1 v/ v. Además, estos dos compuestos bloquean la fluorescencia de la placa al ser expuesta a luz u. v de 254 nm y a luz u.v de 365 nm emiten fluorescencia de color azul intenso. Esto nos indicó que, probablemente, algunas de las bandas observadas con esos valores de Rf pertenezcan a esos compuestos (Wagner, 1996).

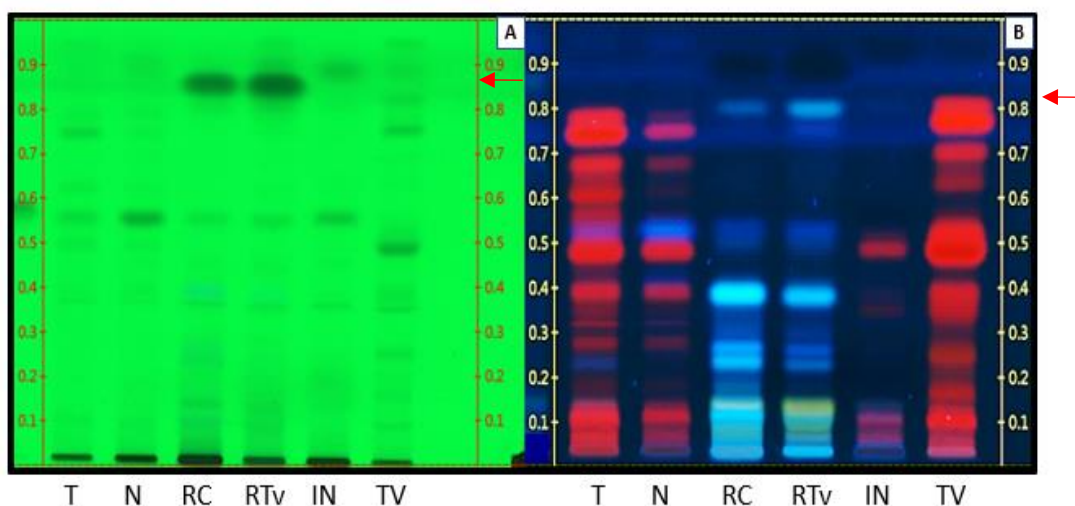


Figura 17. HPTLC de los extractos etanólicos de *P. auritum*, T= Tallo, N=Nervaduras, RC=Corteza de raíz, RTv= Tejido vascular de raíz, IN= Inflorescencias y TV= Tejido verde de hojas (lámina foliar). La figura **A** muestra la placa visualizada con luz UV a 254 nm y la figura **B**, con luz UV a 365 nm. Las flechas indican algunas bandas que podrían representar al safrol o a la miristicina.

7.2 Perfil fitoquímico de los extractos por GC/EIMS.

Mediante el análisis general por GC/ EIMS, fue posible observar que cada uno de los tejidos mostró tener un perfil característico, teniendo como componente mayoritario al safrol en tallos, hojas e inflorescencias y a la miristicina específicamente en raíz (Figura 18). También, pudo detectarse la presencia de algunos terpenos como el copaeno y el cariofileno, algunos otros fenilpropanoides como el metoxieugenol y el apiol, además de una gran cantidad de ácidos grasos y sus respectivos ésteres. En la Tabla 4, se muestran los compuestos mayoritarios y la distribución que tienen cada uno en los diferentes tejidos de la planta. En el Apéndice I, se muestra el cromatograma de cada uno de los extractos con su respectiva tabla de compuestos. Cabe resaltar que el objetivo del presente trabajo fue la identificación de alcanidas y piperamidas. De acuerdo con los análisis de los cromatogramas no se detectaron piperamidas, como era de esperarse. Sin embargo, se encontraron 3 compuestos que, aunque no estaban registrados dentro de la biblioteca de NIST, de acuerdo con los espectros de masas y a los iones que los conformaban, coincidieron con 3 alcanidas, tales como; la *N*-isobutil-2*E*,4*E*-decadienamida (pellitorina), *N*-isobutil-2*E*-monodecaenamida y *N*-metilbutil-2*E*,4*E*-decadienamida, cada una con una distribución distinta en la planta. Además, se detectaron dos compuestos que tampoco se encontraban en la biblioteca NIST, que de acuerdo con su espectro de masas permitió suponer que se trataba de compuestos alfa-insaturados al igual que las alcanidas, pero con grupos éster, el 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo y del 2*E*-4*E*-decadienoato de metilo (Tabla 5).

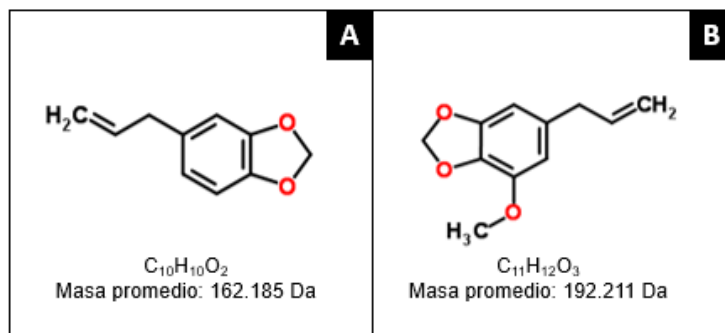
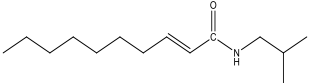
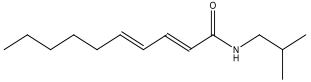
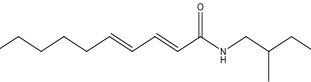
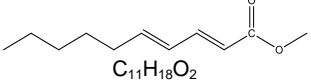
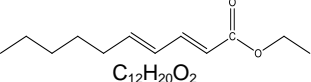


Figura 18. Estructura química del safrol (**A**) y la miristicina (**B**). La diferencia entre los dos compuestos es únicamente un grupo metoxi unido al anillo aromático.

Tabla 4. Compuestos mayoritarios detectados en los extractos etanólicos de *P. auritum* y su distribución en los diferentes tejidos de la planta. En la segunda columna se muestra el promedio (\bar{X}) del tiempo de retención (**TR**) de cada uno de los compuestos obtenido de tres cromatogramas de cada uno de los extractos etanólicos y su desviación estándar (**DS**).

COMPUESTO	$\bar{X}_{TR} \pm DS$	TALLOS	HOJAS		INFLORESCENCIAS	RAÍZ	
			Nervaduras	Lámina foliar		Corteza	Tejido vascular
Safrol	7.40 ± 0.03	+	+	+	+	+	+
2-Metoxi-3-(2-propenil)-fenol	8.57 ± 0.05				+		
Metileugenol	9.12 ± 0.05				+		
Copaeno	9.27 ± 0.02	+				+	
α-Cubeneno	9.49 ± 0.07	+					
Cariofileno	10.35 ± 0.05	+		+	+		
Miristicina	11.33 ± 0.03					+	+
Gama-elemeno	11.78 ± 0.03				+		
Elemicina	11.99 ± 0.05				+		
Cadineno	12.14 ± 0.05				+		
Trans-Nerolidol	12.34 ± 0.07			+			
Nerolidol 2	12.70 ± 0.05				+		
Metoxieugenol	13.14 ± 0.05	+	+		+		+
Espatuleno	13.39 ± 0.03				+		
Apiol	14.95 ± 0.05						+
Metil-éster del ácido hexadecanoico	21.15 ± 0.02				+		
Ácido n-hexadecanoico	21.94 ± 0.03	+	+		+		+
Etil éster del ácido hexadecanoico	22.75 ± 0.05	+	+	+	+	+	+
Metil-éster-9-12 (Z, Z) del ácido octadienoico	24.94 ± 0.02				+		
Metil-éster-9-12-15 (Z, Z, Z) del ácido octadecatrienoico	25.03 ± 0.02				+		
Metil-éster-9-del ácido octadecenoico	25.12 ± 0.05				+		
Fitol	25.48 ± 0.04	+	+	+			
Metil-éster del ácido octadecanoico	25.74 ± 0.03				+		
Etil-éster-9, 12- del ácido octadecadienoico	26.11 ± 0.02	+		+	+	+	+
Etil-éster del ácido-9-octadecenoico	26.27 ± 0.05			+			
Etil-éster-9-12-15 (Z, Z, Z) del ácido octadecatrienoico	26.45 ± 0.05			+		+	+
Etil oleato	26.54 ± 0.03				+	+	+
Ácido linoleico	26.65 ± 0.03	+					
Etil-9, 12, 15-octadecatrienoato	26.86 ± 0.03	+					
Etil-éster del ácido octadecanoico	27.33 ± 0.05	+		+			
9-Octadecenamida	30.32 ± 0.05	+					
2-Adamantil-éster, o-Ácido anísico	32.56 ± 0.02	+					
Fenil-metil-éster, del ácido dodecanoico	34.71 ± 0.05	+			+		
Ergostenol	47.36 ± 0.03			+			
Estigmasterol	48.16 ± 0.03			+			
Sitosterol	49.74 ± 0.05			+			

Tabla 5. Alcamidas y ésteres alfa-insaturados identificados por GC/ EIMS en los extractos etanólicos de *P. auritum* y su distribución. En la segunda columna se muestra el promedio (\bar{X}) del tiempo de retención (TR) de cada uno de los compuestos obtenido de tres cromatogramas y su desviación estándar (DS).

COMPUESTO	\bar{X} TR \pm DS	TALLOS	HOJAS		INFLORESCENCIAS	RAÍCES	
			Nervaduras	Lámina foliar		Corteza	Tejido vascular
<p><i>N</i>-Isobutil 2<i>E</i>-decamonoenamida</p>  <p>$C_{14}H_{25}NO$ Masa promedio: 225.370 Da</p>	19.02 \pm 0.05	+			+		
<p><i>N</i>-Isobutil 2<i>E</i>-4<i>E</i> decadienamida (pellitorina)</p>  <p>$C_{14}H_{25}NO$ Masa promedio: 223.354 Da</p>	21.04 \pm 0.07	+	+		+	+	+
<p><i>N</i>-Metilbutil 2<i>E</i>-4<i>E</i> decadienamida</p>  <p>$C_{15}H_{27}NO$ Masa promedio: 237.381 Da</p>	23.79 \pm 0.05	+			+		
<p>2<i>E</i>-4<i>E</i>-decadienoato de metilo</p>  <p>$C_{11}H_{18}O_2$ Masa promedio: 182.259.286 Da</p>	9.53 \pm 0.05				+		
<p>2<i>E</i>-4<i>E</i>-decadienoato de etilo</p>  <p>$C_{12}H_{20}O_2$ Masa promedio: 196.286 Da</p>	11.28 \pm 0.03	+					

7.3 Confirmación de la presencia de alcanidas en los extractos de *P. auritum* por síntesis enzimática.

7.3.1 *N*-isobutil-2*E*, 4*E*-decadienamida (pellitorina).

Como se mencionó anteriormente en la metodología para la síntesis enzimática de la pellitorina, se llevó a cabo como primer paso la isomerización del éster de pera. En la Figura 19, podemos observar dos cromatogramas sobrepuestos, en donde a un TR= 10.354 min se detectó el pico correspondiente del 2*E*-4*Z*-decadienoato de etilo y a un TR= 11.207 min el pico correspondiente al 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo, obtenido después del proceso de isomerización con yodo e irradiación con luz UV al que fue expuesto el éster de pera. Cabe mencionar que el éster comercial no se encuentra totalmente puro, encontrándose el éster *EZ* con un porcentaje del 98.5% y el éster *EE* en un 1.5%. Después de la isomerización, se observó que los porcentajes se invierten obteniéndose el éster *EE* con un porcentaje del 94% y el *EZ* con un 6%.

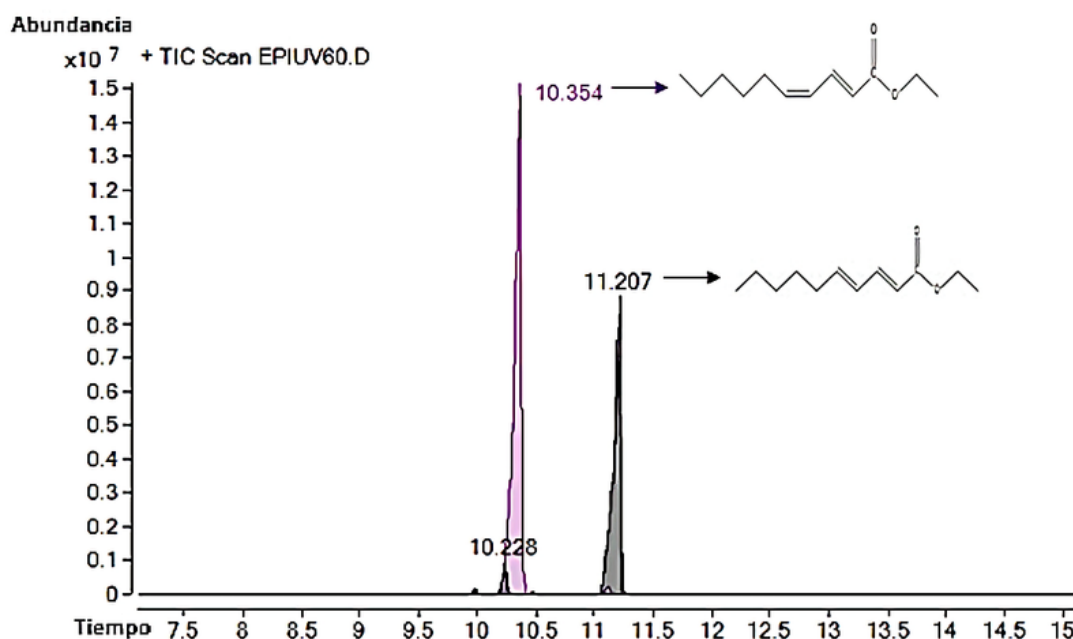


Figura 19. Comparación del TIC del 2*E*-4*Z*-decadienoato de etilo (morado) vs el TIC del 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo (gris), obtenido después del proceso de isomerización. Se puede observar que los porcentajes de los isómeros se invierten una vez llevada a cabo la reacción

Una vez corroborándose la obtención del 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo, se prosiguió de acuerdo con la metodología a la síntesis enzimática de la pellitorina. De acuerdo con el cromatograma que se analizó después de efectuarse la síntesis, la pellitorina se detectó a un TR= 20.945 min. De acuerdo con el espectro de masas se identificó un ion padre de 151 m/ z. Además, se presentó el siguiente espectro másico: 223 [M+], 69 (15%), 53 (16.5%), 95 (16.85%), 66 (20.2%), 67 (21%), 152 (37.8), 96 (55.6%), 81 (61.3%) y 151.1 (100%). En la Figura 20, se observan dos TIC sobrepuestos donde se puede comparar el pico de la pellitorina sintetizada que presenta un TR muy similar al pico correspondiente a esta alcanida presente en el extracto etanólico de tallo con un TR= 21.043, que presentó este compuesto como uno de los mayoritarios. El espectro másico de la pellitorina detectada en el extracto fue: 223 [M+], 69 (16.3%), 53 (16.6%), 95 (16.87%), 66 (20.4%), 67 (20.6 %), 152 (37.8%), 96 (55.4%), 81 (62.4%) y 151.1 (100%), que coincide con el del compuesto obtenido por la síntesis. En la Figura 21 se muestra la comparación de ambos espectros de masas. Esto nos permitió corroborar, la presencia de esta alcanida en *P. auritum*.

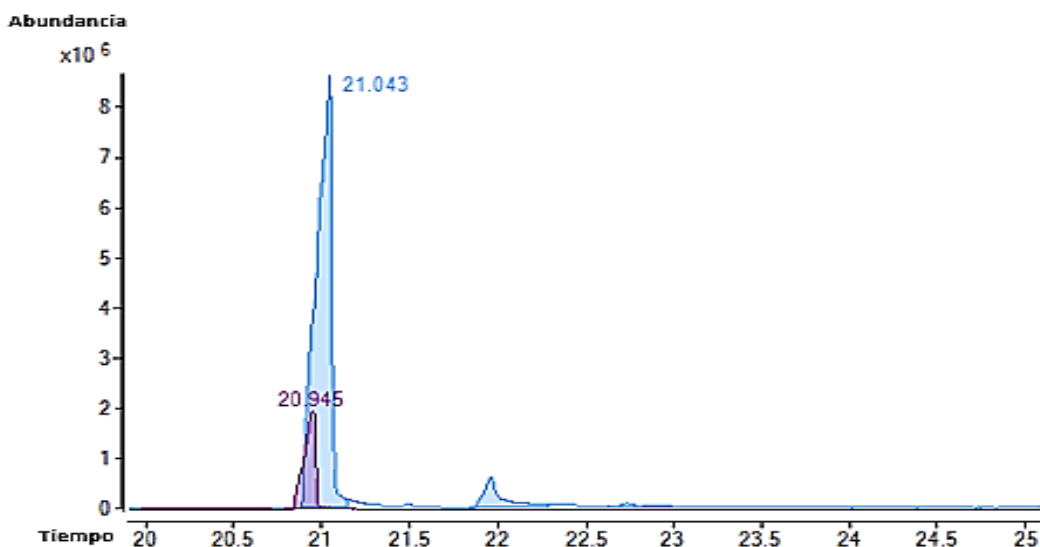


Figura 20. TIC del extracto etanólico de tallo de *P. auritum* donde se muestra el pico que representa a la pellitorina a un TR= 21.043 min (azul) vs el pico de la pellitorina obtenida por síntesis enzimática a un TR= 20.945 min (morado).

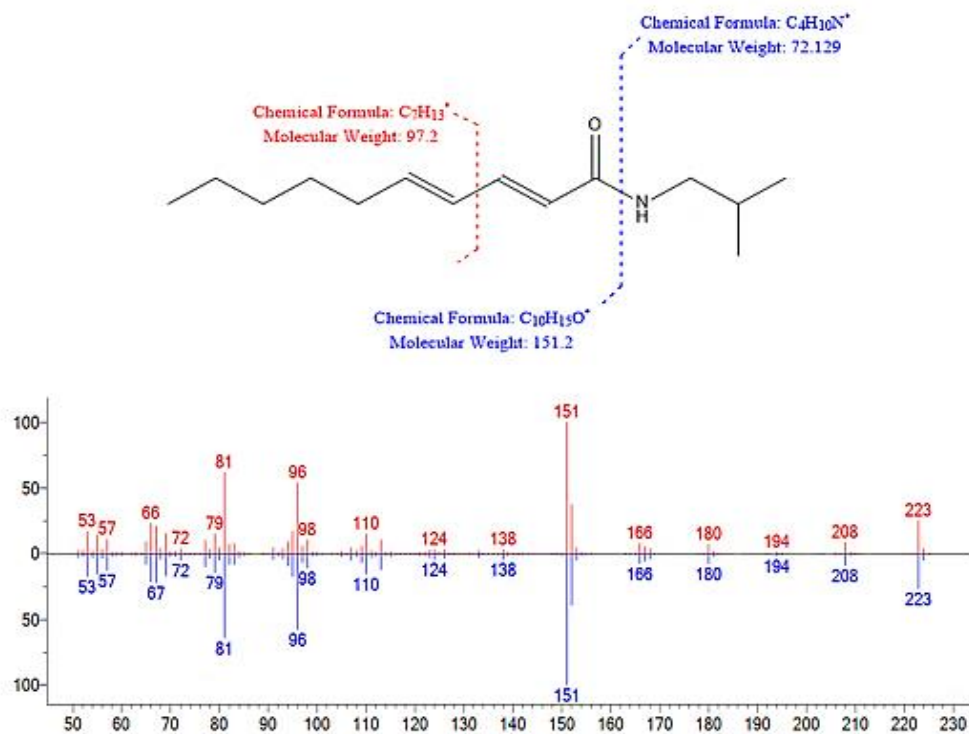


Figura 21. Comparación del espectro de masas de la pellitorina presente en el extracto de *P. auritum* (rojo) vs la obtenida por síntesis enzimática (azul). En la parte de arriba se justifican los fragmentos más abundantes de acuerdo con el patrón de fragmentación que presenta la molécula.

Como se mencionó en la metodología, también se llevó a cabo la síntesis del isómero de la pellitorina (*N*-isobutil-2*E*, 4*Z*-decadienamida), utilizando como sustrato, el 2*E*-4*Z*-decadienoato de etilo o éster de pera. Al analizar la muestra por GC/ EIMS, esta molécula se detectó a un TR= 19.284 min y de acuerdo con el espectro de masas el ion padre fue 66 m/ z. Es espectro másico fue el siguiente: 223 [M+], 77 (31.4%), 79 (41.6%), 57 (44.2%), 67 (51.1%), 53 (60%), 151 (60.2%), 55 (63.3%), 81 (88.9%) y 66 (100%). En la Figura 22 se muestra el TIC y el espectro de masas correspondiente a dicha molécula, el cual difiere en la abundancia de algunos iones con respecto a la pellitorina.

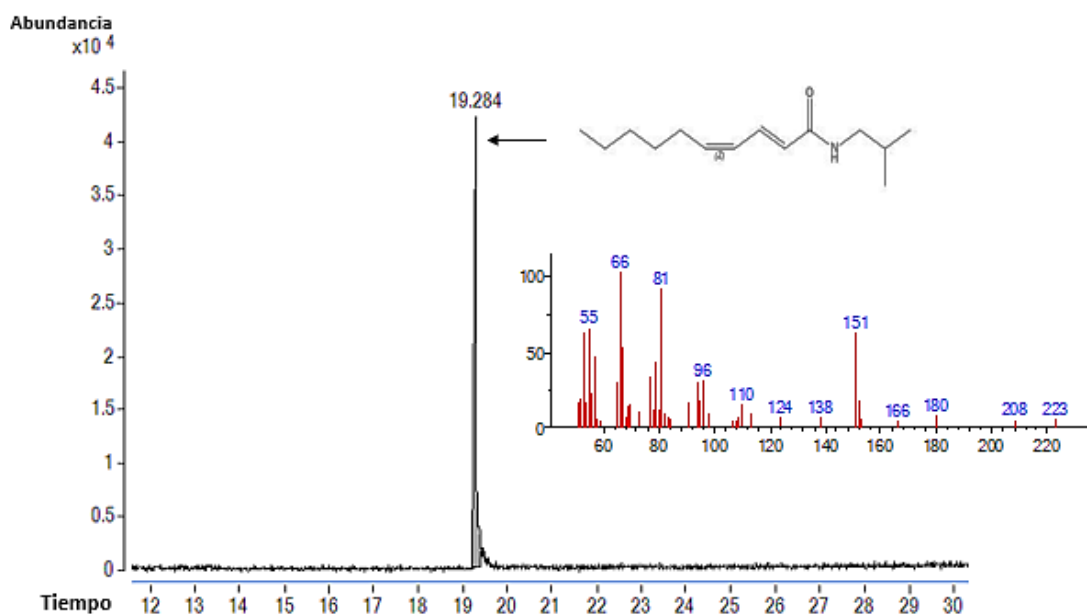


Figura 22. Cromatograma de la *N*-isobutil-2*E*, 4*Z*-decadienamida, la cual se detecta a un TR= 19.284 min. A un lado se muestra el espectro de masas correspondiente.

7.3.2 *N*-isobutil-2*E*-decamonoenamida.

La *N*-isobutil-2*E*-decamonoenamida, a diferencia de la pellitorina, sólo presenta una sola insaturación en la posición alfa y su síntesis se llevó a cabo utilizando como sustrato el 2*E*-decanoato de etilo. Del análisis por GC /EIMS del cromatograma se pudo identificar el pico correspondiente a este compuesto a un TR= 19.097 min. Para este tiempo, se identificó un ion padre de 153 m/z en el espectro de masas y el siguiente espectro másico: 225 [M⁺], 83 (11.7%), 68 (11.7%), 210 (12.95%), 154 (15.9%), 126 (21.6%), 69 (23.6%), 170 (25.2%), 55 (42%) y 153 (100%). Esta alcanida se identificó en el extracto etanólico de tallo e inflorescencia a un TR= 19.023 min, muy similar al del compuesto sintetizado químicamente. A diferencia de la pellitorina, esta alcanida se encuentra en cantidades mucho menores, por lo que en la Figura 23 se muestra el cromatograma de esta alcanida en el extracto etanólico de tallo y el correspondiente a la obtenida por síntesis. A su vez, en la Figura 24 se comparan los espectros de masas que contribuyeron a confirmar la presencia de esta alcanida en los extractos de la planta.

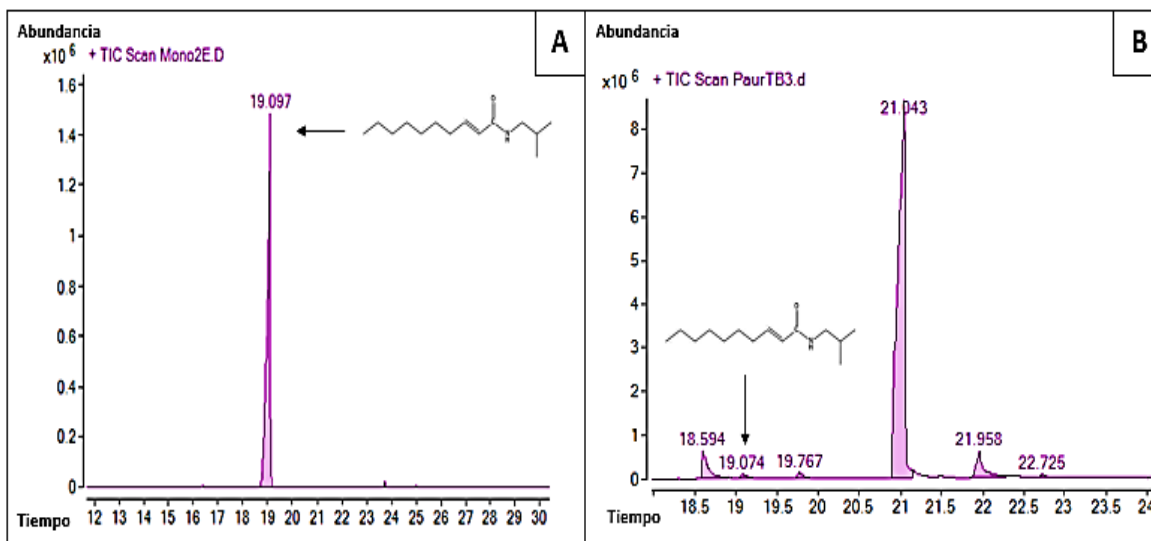


Figura 23. Comparación del TIC de la 2*E*-decamonoamida sintetizada enzimáticamente (**A**) con un TR= 19.097, vs la presente en extracto etanólico de tallo (**B**) a un TR= 19.07 min. Se puede observar que los TR son muy similares.

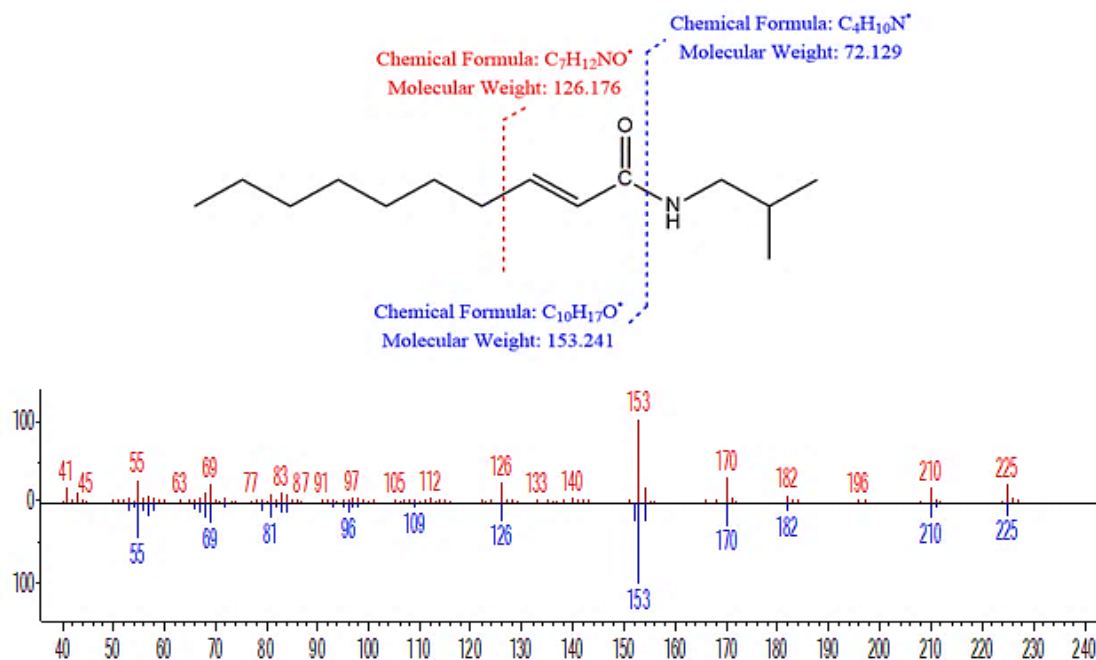


Figura 24. Comparación del espectro de masas de la 2*E*-decamonoamida presente en el extracto de tallo de *P. auritum* (rojo) y la obtenida por síntesis enzimática (azul). En la parte de arriba se justifican los fragmentos más abundantes de acuerdo con el patrón de fragmentación que presenta la molécula.

7.3.3 *N*-metilbutil-2*E*-4*E*-decamonoenamida.

Esta alcanamida se detectó en los extractos de tallo e inflorescencia a un TR= 23.79 min. Aunque no se llevó a cabo la síntesis enzimática de este compuesto para su confirmación, al analizar el espectro de masas de esta molécula, se detectó un ion padre de 151 m/z y el siguiente espectro másico: 237 [M+], 79 (28%), 73 (33%), 57 (34 %), 67 (37%), 69 (37.3%), 55 (52.4%), 96 (54%), 81 (69.4%) y 151 (100%). En la figura 25, es posible observar el espectro de masas con la justificación de los fragmentos principales, lo que nos brinda evidencia de la identidad y presencia de esta alcanamida en *P. auritum*.

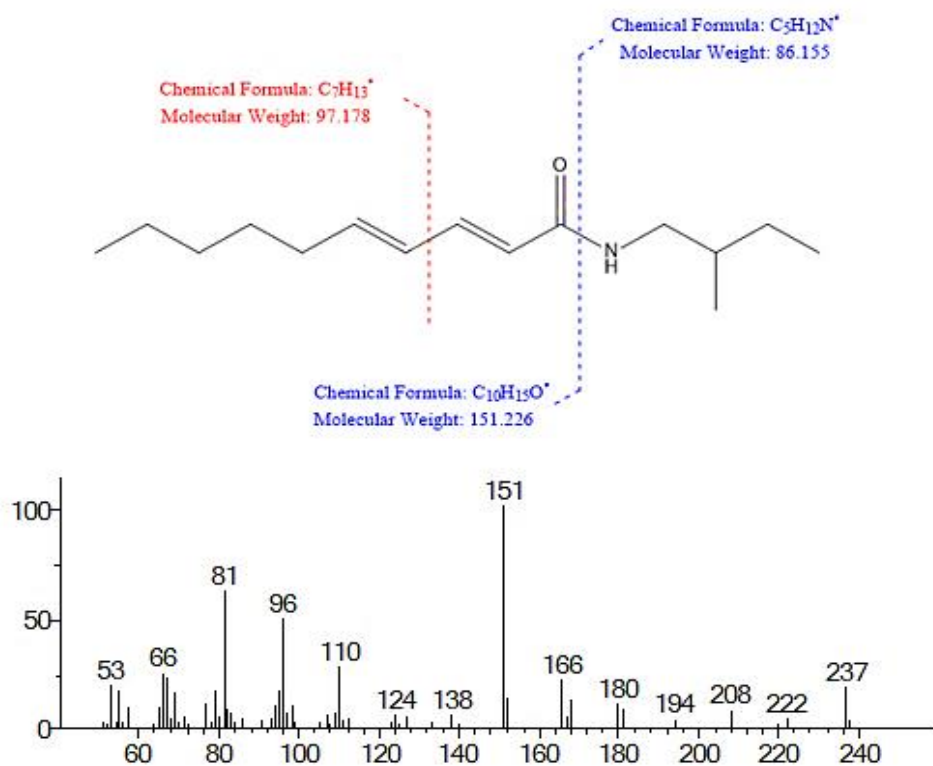


Figura 25. Espectro de Masas de la *N*-metilbutil-2*E*-4*E*-decamonoenamida detectada en los extractos de tallo e inflorescencia *P. auritum*. En la parte de arriba, se justifican algunos de los fragmentos principales de la molécula.

7.4 Confirmación de la presencia del 2E-4E-decadienoato de etilo y el 2E-4E-decadienoato de metilo en los extractos de *P. auritum*.

7.4.1 2E-4E-decadienoato de etilo.

Para la obtención del etil éster 2E-4E-decadienoato de etilo, se llevó a cabo la isomerización del éster de pera descrita en la metodología anterior. El compuesto obtenido se analizó por GC/ EIMS, donde se observó un pico a un TR= 11.061 min. En el espectro de masas se identificó un ion padre de 125 m/ z. Además, se presentó el siguiente espectro másico: 196 [M+], 105 (27.3%), 151 (36.1%), 161.1 (36.2%), 55 (41.6%), 91.1 (46.6%), 67 (70%), 97 (81.4%), 81 (81.6%) y 125 (100%) con una pureza del 94%. El espectro de masas y el tiempo de retención obtenido de esta molécula coincide con un de los picos presentes en el cromatograma del extracto etanólico de tallo de *P. auritum*, lo que sugiere que la presencia de este compuesto puede ser reportada para esta especie (Figura 26 y 27).

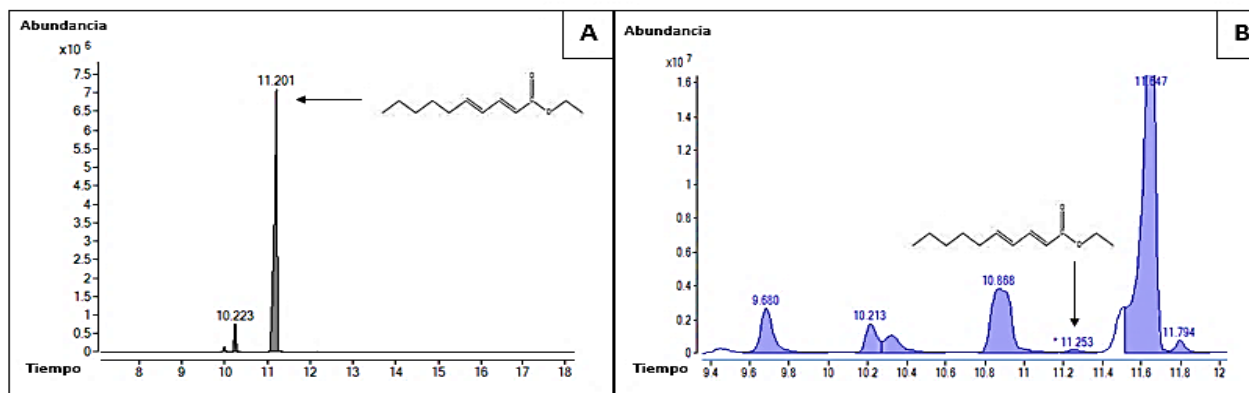


Figura 26. Comparación del TIC del 2E-4E-decadienoato de etilo con un TR= 11.202 min (A), vs el TIC del extracto etanólico de tallo en donde se identificó el 2E-4E-decadienoato de etilo a un TR=11.253 min (B).

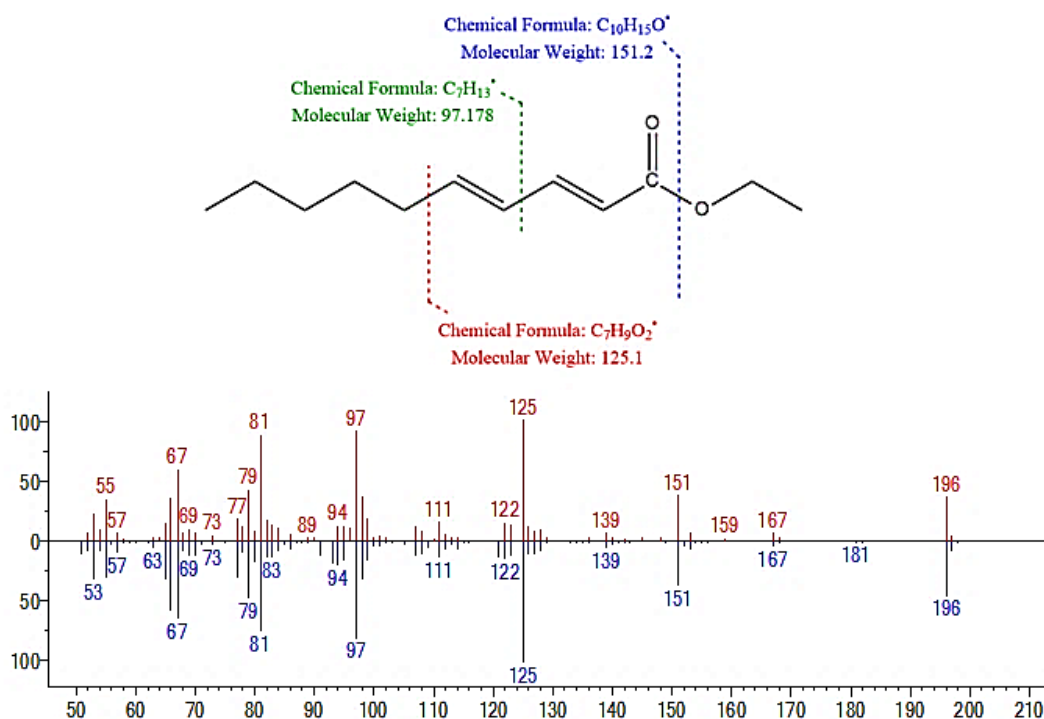


Figura 27. Comparación del espectro de masas del 2E-4E-decadienoato de etilo y el del compuesto presente en el extracto etanólico de tallo de *P. auritum*. Se muestra la justificación de los fragmentos principales.

7.4.2. 2E-4E-decadienoato de metilo

Para la comprobación de la presencia de este compuesto en el extracto de tallo e inflorescencias de *P. auritum*, se sintetizó químicamente de acuerdo con lo descrito en la metodología. El compuesto obtenido se analizó por GC/ EIMS presentando un TR= 9.496 min. En el espectro de masas de esta molécula se identificó un ion padre de 111 m/ z. Se presentó, además, el siguiente espectro másico: 182 [M+], 65 (20%), 53 (22.4%), 59 (22.8%), 182 (27.2%), 67 (31.7%), 66 (37.7%), 79 (39.2%), 81 (51.7%) y 111 (100%). El espectro de masas y el tiempo de retención obtenido de esta molécula coincide con un de los picos presentes en el cromatograma del extracto etanólico de tallo de *P. auritum* (Figuras 28 y 29), lo que sugiere que la presencia de este compuesto puede ser reportada para esta especie.

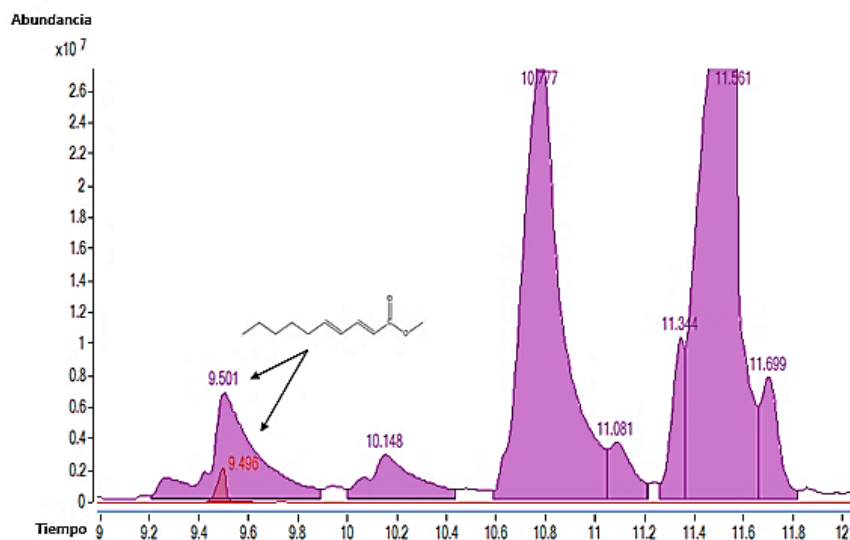


Figura 28. Comparación del TIC del extracto etanólico de tallo (morado), donde se detecta al 2E-4E-decadienoato de metilo a un TR= 9.501 min vs el TIC del compuesto obtenido por síntesis química (rojo), a un TR= 9.496 min.

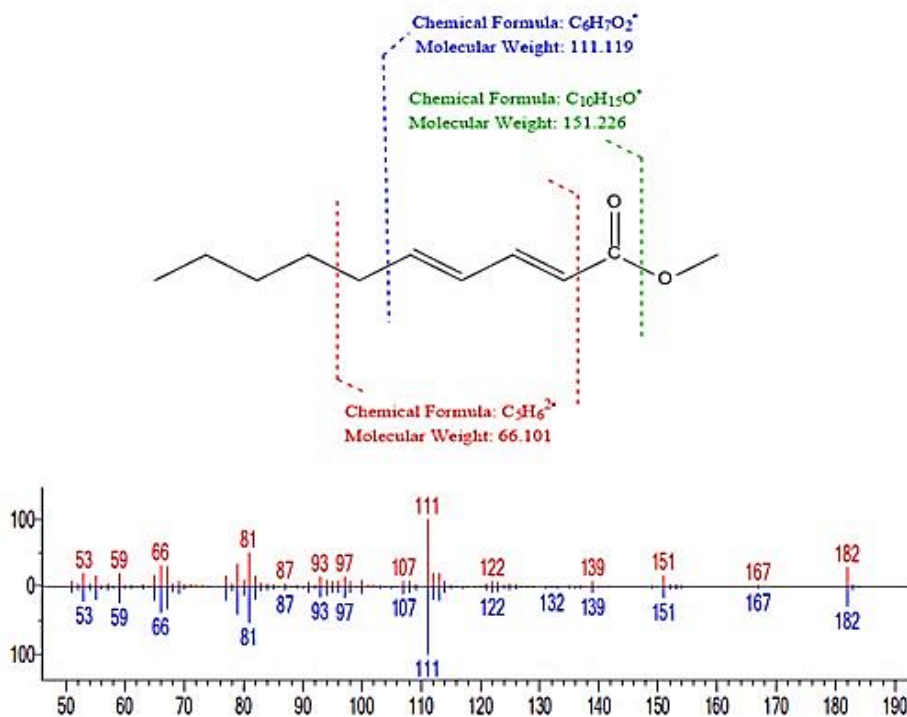


Figura 29. Comparación del espectro de masas del 2E-4E-decadienoato de metilo obtenido por síntesis (rojo) vs el del compuesto presente en el extracto etanólico de tallo de *P. auritum* (azul). Se muestra la justificación de los fragmentos principales.

El isómero de esta molécula (*2E-4Z*-decadienoato de metilo) también se sintetizó bajo la misma metodología, utilizando como sustrato el éster de pera. Al analizar la muestra por GC/ EIMS se encontró que dicho compuesto fue detectado a un TR = 8.821 min (Figura 30). Al analizar el espectro de masas se detectó un ion padre de 111 m/z, y se observó el siguiente espectro másico: 182 [M+], 55 (29.1%), 59 (31.8%), 113 (32.3%), 53 (32.8%), 67 (49%), 79 (52.5%), 66 (54.2%), 81 (76.2%) y 111 (100%). En la Figura 31, se puede observar el espectro de masas de la molécula sintetizada, comparado con el de la Biblioteca NIST.

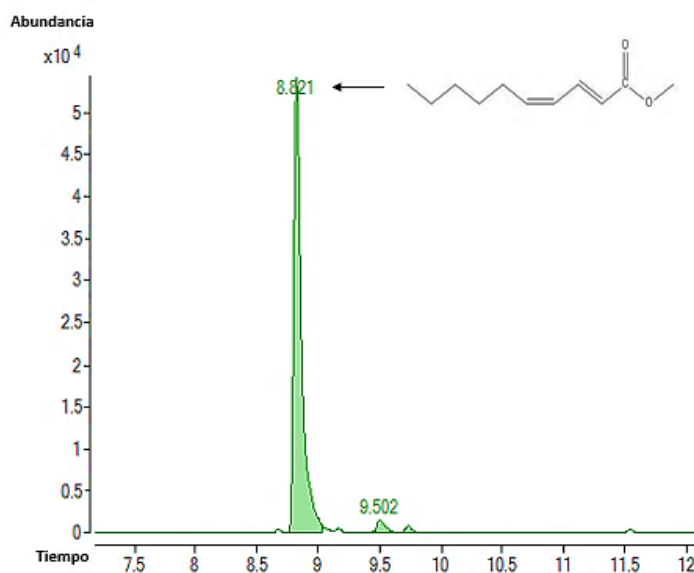


Figura 30. TIC del *2E-4Z*-decadienoato de metilo con un TR= 8.821 min.

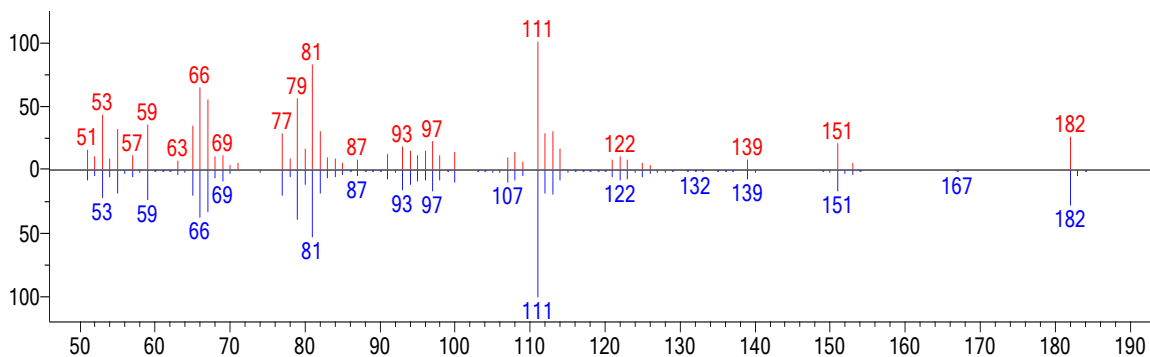


Figura 31. Comparación del Espectro de Masas del *2E-4Z*-decadienoato de metilo obtenido por síntesis enzimática (rojo) y el reportado por la biblioteca NIST (azul).

7.5 Obtención del decadienoato de etilo y decadienoato de metilo.

Con la finalidad de conocer la importancia de las insaturaciones y la isomería sobre la actividad biológica de los ésteres alfa-insaturados detectados en nuestros extractos, se sintetizaron los compuestos saturados, tanto del etil éster como del metil éster. De acuerdo con el análisis que se llevó a cabo por GC/ EIMS, el decadienoato de etilo se detectó a un TR= 8.765 min, mientras que el decadienoato de metilo se detectó a un TR= 7.565 min, con una pureza del 93 y 96 % respectivamente (Figura 32). De acuerdo con espectro de masas del primer compuesto, se detectó un ion padre de 88 m/z y el siguiente espectro másico: 200 [M+], 61 (14.5%), 60 (16.4%), 157 (17.2%), 155 (18.2%), 70 (19.4%), 73 (21.6%), 55 (25.6%), 101 (42.1%) y 88 (100%). El decadienoato de metilo presentó un ion padre de 59 m/z y como espectro másico: 186 [M+], 143 (10.2%), 53 (12.6%), 56 (14.1%), 57 (16.3%), 69 (17.7%), 87 (45.6%), 55 (65.5%), 74 (99.4%) y 59 (100%) (Figura 32). En la Figura 33 se muestran los espectros de masas de ambos compuestos, en comparación con los reportados en la Biblioteca NIST.

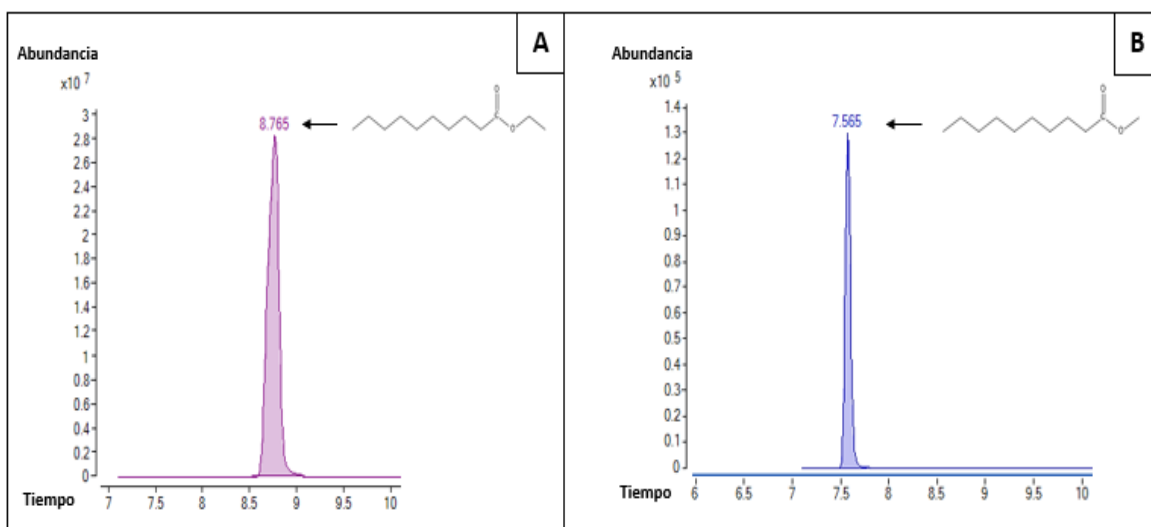


Figura 32. TIC del decadienoato de etilo, detectado a un TR= 8.765 min (A), vs el TIC del decadienoato de metilo a un TR= 7.565 min (B). Ambos compuestos fueron obtenidos por síntesis química.

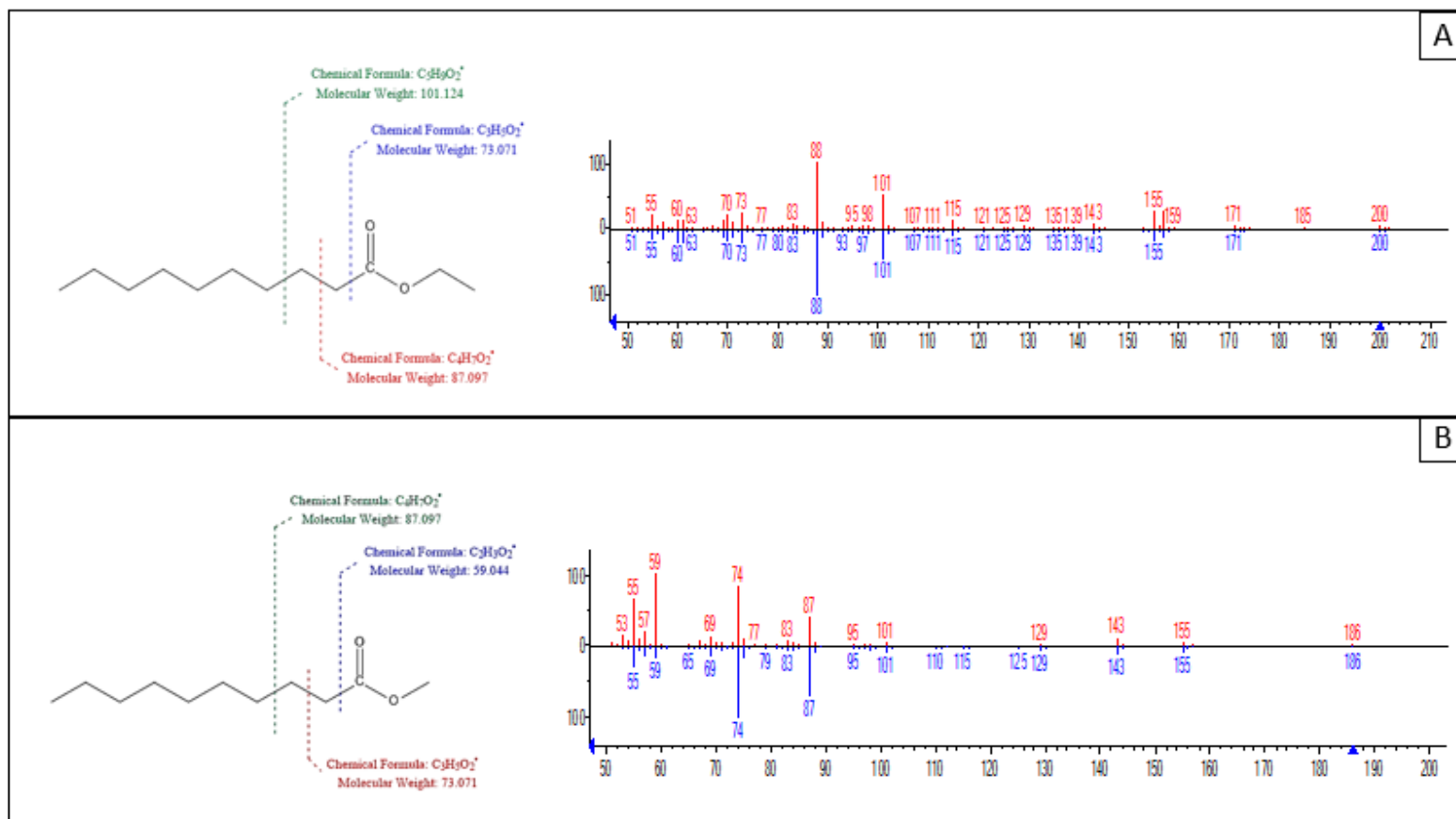


Figura 33. Comparación del espectro de masas de **A:** decadienoato de etilo y **B:** decadienoato de metilo, obtenidos por síntesis química, (rojo) vs. los reportados por la biblioteca NIST (azul) y la justificación de los fragmentos principales.

7.6 Efecto de los extractos de *P. auritum* sobre el *quorum sensing*.

Como se mencionó en la metodología, se evaluó el efecto de los extractos de hojas (lámina foliar), nervaduras, tallos, inflorescencias y raíces sobre el *quorum sensing*, utilizando como reportero a la cepa bacteriana CV026 de *C. violaceum* mediante el método de bioautografía. Como podemos observar en la Figura 34, en el extracto de tallo y raíz se identificó una banda con un R f. = 0.37 que muestra inhibición. Además, en el extracto de raíz se observó otra banda con un R f. = 0.81 que también muestra bioactividad. Para identificar estos compuestos, se utilizaron placas preparativas, de las que fue posible raspar las bandas con los Rf correspondientes y analizarlas por GC/ EIMS. El único compuesto que pudo identificarse bajo este método fue el que presentaba un R. f = 0.81 presente en el extracto de raíz, el cual corresponde a la miristicina. En la Figura 35, se muestra el cromatograma del compuesto, que presentó un TR = 6.911 min con una pureza del 90%. El espectro de masas, al ser comparado con el reportado en la biblioteca NIST, tuvo un “match” de 959 y mostró un ion padre de 192 m/ z. El espectro másico fue el siguiente: 196 [M+], 77 (17.4%), 161 (17.63%), 131 (17.67%), 65 (20%), 119 (21.6%), 165 (24.1%), 91 (32.6%), 28 (40.2%) y 191 (100%).

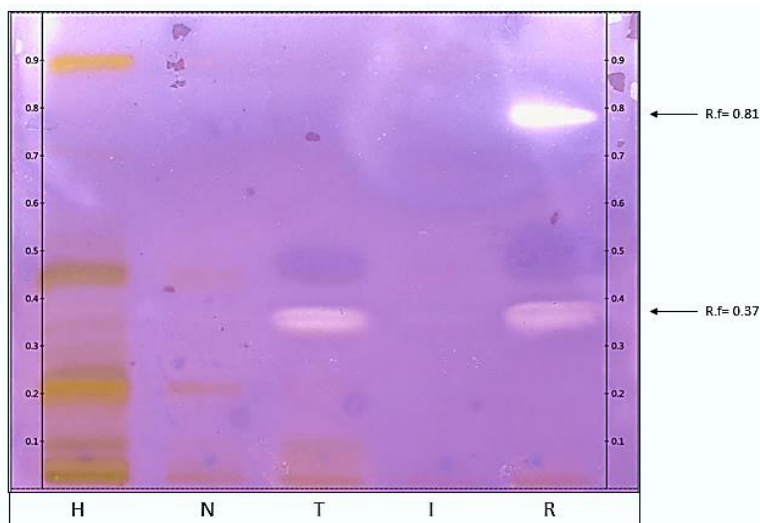


Figura 34. Efecto de los extractos de *P. auritum* sobre el *quorum sensing* en *C. violaceum*, **H** = hojas (lámina foliar), **N** = nervaduras, **T** = tallos, **I** = inflorescencias y **R** = raíces. Se pueden observar dos compuestos que presentaron inhibición a un R. f= 0.37, presente en los extractos de tallo y raíz, además de otra banda, con un R. f= 0.81, presente únicamente en el extracto de raíz. Los análisis de GC/ EIMS revelaron que uno de los compuestos bioactivos corresponde a la miristicina (ver abajo).

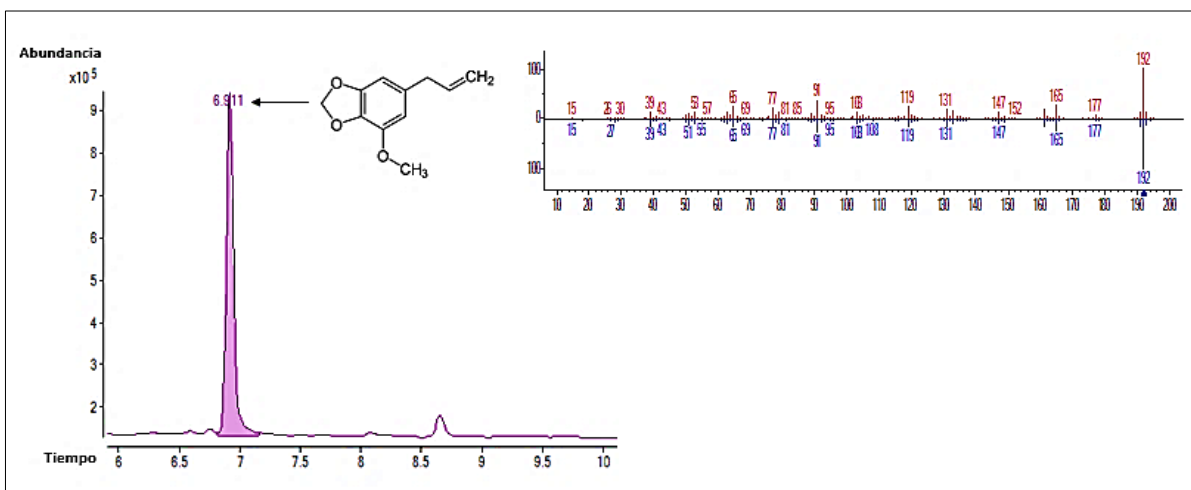


Figura 35. TIC de la banda con R. f= 0.81 del extracto etanólico de raíz obtenida de la placa preparativa donde se pudo identificar a la miristicina como compuesto activo. También se muestra el espectro de masas del compuesto presente en el extracto (rojo) comparado con el reportado en la Biblioteca NIST (azul).

7.6 Efecto de las alcanidas y ésteres alfa-insaturados, obtenidos por síntesis enzimática y química sobre el *quorum sensing*.

Se evaluó el efecto de 9 compuestos obtenidos por síntesis enzimática y química a diferentes concentraciones sobre el *quorum sensing*. En la Figura 36, podemos observar que las alcanidas no mostraron inhibición bajo ninguna de las concentraciones a evaluar. Sin embargo, se puede apreciar que inducen este proceso, actuando probablemente como moléculas señalizadoras. Por otro lado, los ésteres sí mostraron inhibición del *quorum sensing*. Específicamente, éste fue afectado al usar concentraciones de 150 µg y 200 µg. Se puede apreciar, además, que el 2E-4E-decadienoato de etilo muestra mayor inhibición en comparación con el 2E-4Z-decadienoato de etilo y el decanoato de etilo, lo que indica que la molécula que posee ambas insaturaciones en posición *trans* es más bioactiva. Por otro lado, fue posible observar que en los ésteres con sustituyente metilo, el efecto es el contrario, ya que el 2E-4Z-decadienoato de metilo mostró mayor inhibición en comparación con el 2E-4E-decadienoato de metilo y el decanoato de metilo. Con estos resultados es posible inferir que la isomería no es el único factor involucrado en la bioactividad de estas moléculas, sino que el sustituyente, en este caso etilo o metilo, también es importante.

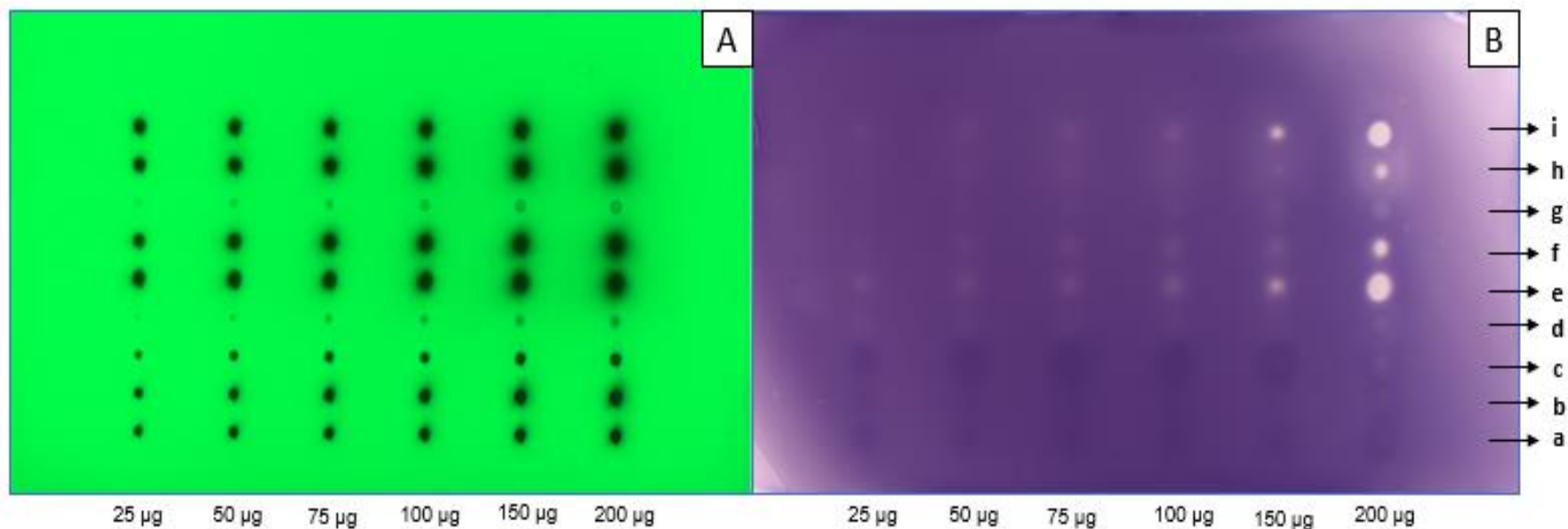


Figura 36. Efecto de las moléculas obtenidas por síntesis sobre el *quorum sensing* en *C. violaceum*. **A:** Placa observada a 254 nm antes de aplicar la suspensión bacteriana. **B:** Placa después de 24 h de incubación con la bacteria. Se puede observar en los diferentes carriles las concentraciones evaluadas. Las moléculas utilizadas fueron **a:** *N*-isobutil-2*E*, 4*E*-decadienamida (pellitorina), **b:** *N*-isobutil-2*E*, 4*Z*-decadienamida, **c:** *N*-isobutil-2*E*-decamonoenamida, **d:** decanoato de etilo, **e:** 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo, **f:** 2*E*-4*Z*-decadienoato de etilo, **g:** decanoato de metilo, **h:** 2*E*-4*E*-decadienoato de metilo, **i:** 2*E*-4*Z*-decadienoato de metilo.

Para comprobar que los extractos y compuestos obtenidos por síntesis no inhiben el crecimiento de *C. violaceum*, se midió la Densidad óptica (DO) de una suspensión bacteriana sometida a los diferentes tratamientos utilizando la concentración máxima de cada uno de éstos. Se puede apreciar en la Tabla 7 que ninguno de los extractos de alcanidas o ésteres, inhibieron el crecimiento después de las 24 h de exposición. Incluso algunos tratamientos muestran valores superiores al control, lo que sugiere que tanto los compuestos presentes en los extractos como las moléculas obtenidas por síntesis química afectan directamente el *quorum sensing*.

Tabla 6. Determinación de crecimiento por densidad óptica (DO) a 600 nm. En gris se pueden observar los valores de los controles utilizados.

TRATAMIENTO	DO Inicial	DO 24 h
Control sin EtOH	0.1069	1.9634
Control con EtOH	0.1175	1.8992
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -decadienamida	0.119	2.0473
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -decadienamida	0.116	2.0133
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -decamonoenamida	0.1283	1.9286
2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -decadienoato de etilo	0.0907	1.9723
2 <i>E</i> -4 <i>Z</i> -decadienoato de etilo	0.1488	2.0334
Decadienoato de etilo	0.1105	2.0684
2 <i>E</i> -4 <i>E</i> -decadienoato de metilo	0.1301	1.8617
2 <i>E</i> -4 <i>Z</i> -decadienoato de metilo	0.1274	2.0071
Decadienoato de metilo	0.0997	2.0841
Extracto etanólico de Hoja (Tejido verde)	0.1092	2.0358
Extracto etanólico de Nervadura	0.1125	1.916
Extracto etanólico de Tallo	0.1115	2.0665
Extracto etanólico de Inflorescencia	0.1169	1.8349
Extracto etanólico de Raíz	0.1132	2.0461

VIII. DISCUSIÓN

Específicamente en *P. auritum*, los estudios se han enfocado en caracterizar el aceite esencial y algunos extractos para probar algunas actividades biológicas contra hongos y bacterias. En el análisis que se llevó a cabo de cada uno de los extractos de los tejidos de la planta en este estudio, se pudo identificar al safrol y a la miristicina como compuestos mayoritarios. Esto coincidió con lo reportado por Caballero-Gallardo *et al.* (2014). Sin embargo, la distribución de estos compuestos en la planta es muy específica, ya que de acuerdo con lo que se observó en este estudio, el safrol se encuentra en las hojas específicamente en la lámina foliar, tallos e inflorescencias y, en cantidades mucho menores, en nervaduras y raíces. Sin embargo, la miristicina, únicamente se detectó en la raíz. Ambos compuestos son fenilpropanoides y aunque específicamente estos no han sido evaluados para conocer su función dentro de la planta o su actividad biológica, se sabe que tienen un papel ecológico importante en las plantas, al participar en procesos de defensa contra fitopatógenos, además de tener efecto anti nutricional contra insectos herbívoros, aunque aún se desconocen los mecanismos por los que actúan (Harmantha *et al.*, 2003). El safrol, es un metabolito con amplia distribución en el género *Piper*, ya que además de ser el principal componente en *P. auritum* también ha sido reportado en especies como *P. xylosteoides*, *P. hispidinervium*, *P. marginatum*, *P. cavalcantei* y *P. callosum*, que son especies nativas de Sudamérica. Se sabe que este compuesto tiene actividad nefrotóxica, hepatotóxica y cancerígena. Sin embargo, es utilizado en algunos países como un aditivo en alimentos y para la elaboración de fragancias. Además, es un precursor utilizado para la producción de 3,4-metilendioxi-metanfetamina (MDMA), un psicotrópico comúnmente conocido como “Éxtasis” y es utilizado también para la síntesis de heliotropina (fragancia), y piperoil butóxido, un insecticida (Dognini *et al.*, 2012). Por lo anterior, podemos concluir que *P. auritum* es una fuente natural rica de estos dos compuestos.

Como ya se ha mencionado, las piperamidas son compuestos característicos de especies del género *Piper*. Cabe resaltar que una de las piperamidas más comunes es la piperina, que ha sido aislada de 20 especies de este género. Al analizar los

extractos de los diferentes tejidos de la planta por GC/ EIMS no se detectó ningún compuesto de este tipo. Esto pudo deberse a que *P. auritum* es una especie nativa del Nuevo Mundo, lo que representa un factor importante ya que se sabe que las especies que emergieron en esta zona geográfica tienen una menor diversidad de este tipo de compuestos. Además, poseen una amplia diversidad de fenilpropanoides, como lo es el safrol, apiol, metoxieugenol, entre otros, que provienen de la misma ruta de biosíntesis (Lee-Dyer *et al.*, 2004).

Aunque no se detectaron piperamidas, sí se identificó y confirmó la presencia de 3 alcanidas no reportadas anteriormente para esta especie. La primera de ellas fue la *N*-isobutil-2*E*, 4*E*-decadienamida (pellitorina), que ya había sido reportada para especies de este género como *P. nigrum*, *P. attenuatum*, *P. chaba*, *P. guineense*, *P. hancei*, *P. longum*, entre otras (Parmar *et al.*, 1996) y fue detectada específicamente en los extractos de tallo, nervaduras, inflorescencias y en menor proporción en el de raíz. Esta alcanida es una de las más conocidas, ya que está ampliamente distribuida en las familias Asteraceae, Piperaceae, Rutaceae, Aristolochiaceae, Menispermaceae y Poaceae. Este compuesto tiene diversas actividades biológicas, entre las que destacan su efecto insecticida, específicamente contra como *Callosobruchus chinensis*, una plaga de almacén que afecta a los granos de frijol principalmente y a una gran cantidad de cultivos de leguminosas en diversos países del mundo (Scott *et al.*, 2008). Además, se ha comprobado que esta molécula inhibe la proliferación de algunos parásitos como *Tripanosoma cruzi* y que posee una potente actividad citotóxica contra las líneas celulares HL60 y MCT-7 relacionadas con leucemia y cáncer de mama, respectivamente.

La segunda alcanida que se identificó fue la *N*-isobutil-2*E*-decamonoenamida, que sólo ha sido reportada de manera natural en una especie de la familia Poaceae, *Cissampelos glaberrima* y este estudio representa el primer reporte de su presencia en alguna especie del género *Piper* (Rosario *et al.*, 1996). Esta alcanida, fue obtenida por el grupo de Molina-Torres y col. (2004) mediante la reducción catalítica de la afinina en donde se evaluó su efecto como regulador del crecimiento de raíz

en *Arabidopsis*. Se pudo observar que este compuesto, junto con la *N*-isobutil-decanamida a concentraciones de 10^{-8} y 10^{-7} M, promovieron la elongación de raíz; además, se comprobó que el efecto observado se produjo por un mecanismo independiente de la señalización de auxinas. Posteriormente, esta alcanida fue obtenida por síntesis enzimática, para poder evaluar su actividad contra algunas bacterias Gram⁺ y Gram⁻, observándose que a concentraciones de entre 5 y 50 mg L⁻¹, inhibe el crecimiento de *B. subtilis* y *Erwinia carotovora*, respectivamente. (Molina-Torres *et al.*, 2008).

La tercer alcanida que se detectó fue la *N*-metilbutil-2*E*, 4*E*-decadienamida, también reportada por primera vez en la familia Piperaceae. Las alcanidas con el sustituyente metilbutil, se han detectado específicamente en las tribus Hetlianthaeae y Anthemideae, en la especie *Anacyclus pyrethrum* y en la familia Rutaceae, específicamente en las tribus Clauseneae y Zanthoxyleae (Boonen *et al.*, 2012). Aunque no se han realizado muchos estudios de actividad biológica de este tipo de alcanidas, se sabe que poseen potencial como inhibidores de enzimas como las ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 (Greger, 2015). Con respecto a esto, es importante conocer el mecanismo de acción por el que pueden inhibir la actividad de este tipo de enzimas y evaluar su potencial antimicrobiano e insecticida para compararlo con otras alcanidas.

En base a los anterior, se puede afirmar que *P. auritum* es un buen modelo de estudio para la biosíntesis de alcanidas. De acuerdo al modelo PKS *alk* propuesto en el laboratorio de Fitobioquímica para la síntesis de afinina, donde la enoil reductasa (ER) está presente únicamente en el módulo III de la sintasa, se puede deducir que para la síntesis de pellitorina, esta enzima estaría involucrada en el módulo I y II, lo que justificaría la posición de las dos insaturaciones presentes en esta molécula. En la Figura 37 se muestra el modelo propuesto para la biosíntesis de pellitorina. Con respecto a las otras alcanidas identificadas en este estudio, probablemente para el caso de la *N*-metilbutil-2*E*, 4*E*-decadienamida, el modelo sería muy similar al de la pellitorina, con la diferencia de que el aminoácido con el que se condensaría la cadena alifática sería una leucina. Para la *N*-isobutil-2*E*-

decamonoenamida, la sintasa debería contar con 3 pasos de ER, a excepción del último módulo, que da lugar a la α insaturación de las alcanidas.

Además, de la detección de las alcanidas antes mencionadas, se confirmó la presencia de dos ésteres alfa-insaturados: 2E-4E-decadienoato de etilo y 2E-4E-decadienoato de metilo localizados específicamente en tallo e inflorescencia. Estos son ésteres reportados por primera vez en plantas de este género. Aunque no se sabe la función de estos compuestos, Night *et al.* (2005) observaron que el 2E-4Z-decadienoato de etilo (éster de pera), funciona como un kairomona, es decir un atrayente de insectos, particularmente de *Cydia pomonella*, conocida comúnmente como “polilla de la manzana”. Este insecto es el responsable de severas pérdidas en miles de diferentes cultivares de manzana. En este estudio, evaluaron la capacidad atrayente no sólo de este compuesto sino de su isómero 2E-4E-decadienoato de etilo, y algunas otras moléculas de cadenas de 10 carbonos con grupos aldehídos, acetatos o alcoholes como sustituyentes. Sin embargo, el éster de pera mostró una alta especificidad para la atracción de estos insectos, tanto de machos como de hembras, lo que podría permitir el uso de este metabolito para el monitoreo de los insectos hembra y controlar la población e incluso disminuir el uso de insecticidas. Aunque se sabe poco acerca de la ecología de los insectos polinizadores y hospederos de las plantas del género *Piper*, sería de especial interés, evaluar los ésteres alfa-insaturados identificados en *P. auritum*, como atrayentes con otro tipo de insectos como coleópteros o áfidos que se sabe colonizan a especies de este género (Lee-Dyer *et al.*, 2004), y evaluar su especificidad para promover el desarrollo de nuevos productos de origen vegetal que pudieran ser útiles para el control de plagas en otras especies de importancia económica.

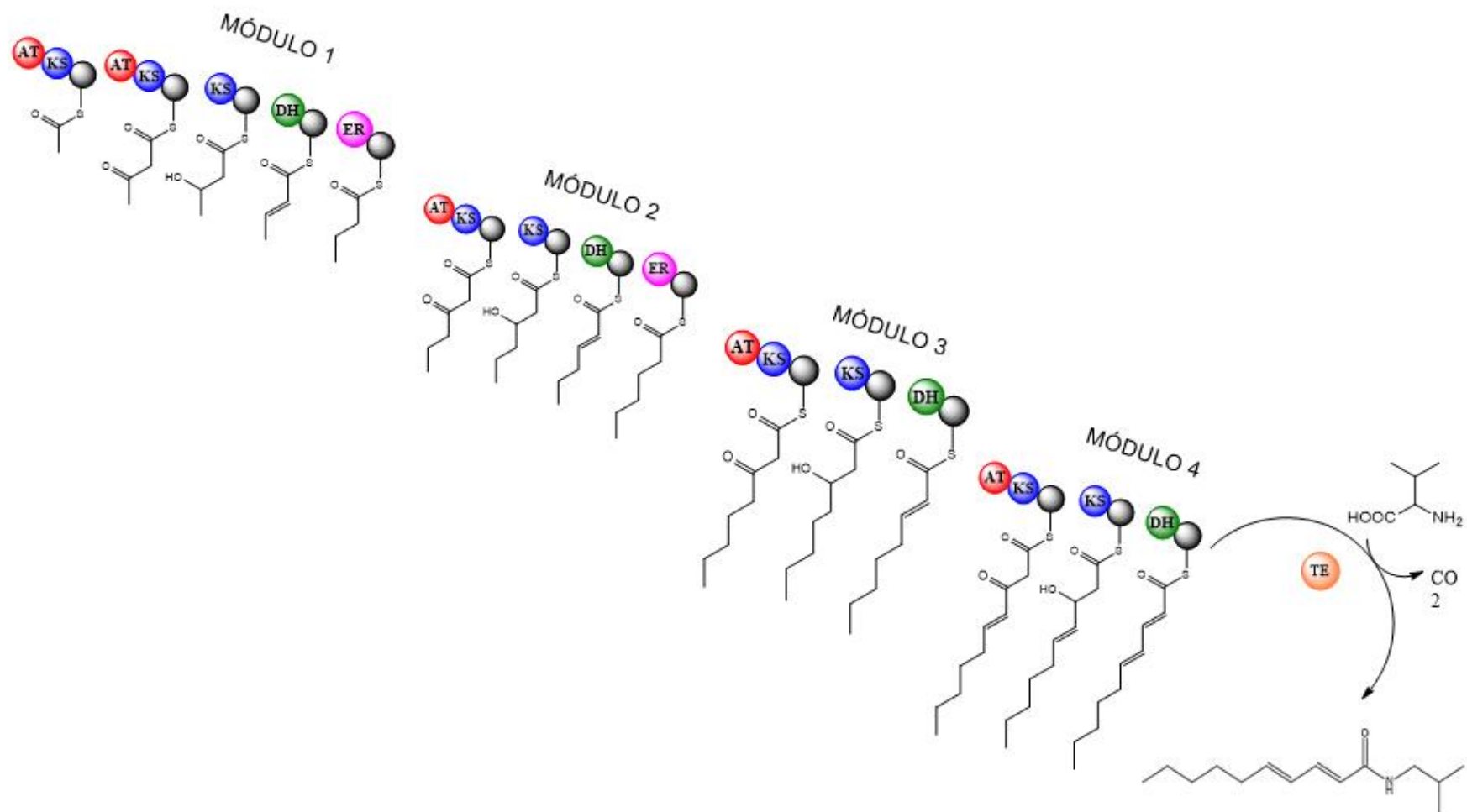


Figura 37. Modelo de *biosíntesis* propuesto para la pellitorina, en base al descrito en el Laboratorio de Fitobioquímica para la síntesis de *afinina*. Este modelo difiere únicamente en que posee dos enoil reductasas (ER) en el módulo I y II, en comparación con el de la *afinina*, que cuenta con una ER únicamente en el Módulo III. Otros componentes representados son aquellos con actividad de acetiltransferasa (AT), cetosintetasa (KS), cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), enoilreductasa (ER) y tiosterasa (TE).

Como ya se ha mencionado las especies del Género *Piper* poseen una gran cantidad de metabolitos de interés debido a la amplia gama de actividades biológicas que presentan. Esto se comprobó al evaluar el efecto de los extractos de los diferentes tejidos de *P. auritum* sobre el *quorum sensing* en *C. violaceum*. Específicamente, los extractos de tallo y raíz fueron los que mostraron inhibición en las pruebas de bioautografía, aunque sólo fue posible identificar uno de los compuestos responsables por GC/ EIMS, que resultó ser la miristicina. Desde hace algunos años se ha observado que los extractos de las especies del género *Piper* son capaces de inhibir este sistema de comunicación bacteriana. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Ying-Tan y col. (2013), en el cual se evaluó la actividad de *P. nigrum*, *P. betle* y *Gnetum gnemon* sobre el *quorum sensing* usando como cepas reporteras a *P. aeruginosa* PA01, *E. coli* [pSB401], *E. coli* [pSB1075] y *C. violaceum* CV026. Se pudo observar que los extractos de las 3 especies mostraron inhibición. Sin embargo, la de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *P. betle* fue mayor. En base al estudio que se realizó y a estos antecedentes, se puede decir que las especies del género *Piper* son ricas en metabolitos capaces de inhibir este proceso microbiano y pueden ser una alternativa para combatir cepas bacterianas resistentes y disminuir la expresión de factores de virulencia y patogenicidad.

Se sabe que los compuestos que inhiben el *quorum sensing* pueden tener al menos dos mecanismos de acción: i) cuando un metabolito posee una estructura muy similar al autoinductor y es capaz de mimetizar su función ocasionando que más adelante el proceso de comunicación bacteriano no sea el adecuado, o ii) cuando el metabolito es antagónico al autoinductor impidiendo la unión de esta molécula a la proteína receptora, evitando de esta manera la expresión de los genes involucrados (Suryanarayana *et al.*, 2013). La miristicina es un fenilpropanoide, que inhibe el *quorum sensing*, y se sabe está presente en varios extractos y aceites esenciales de diferentes especies de *Piper*, cuya función es actuar sinérgicamente con otros compuestos que intervienen en el sistema de defensa en las plantas. Probablemente su actividad inhibitoria del *quorum sensing* se deba, a que impide la

unión del autoinductor, en este caso la 6-HSL, a la proteína receptora. Sin embargo, un estudio más profundo deberá realizarse para corroborar esta propuesta. Anteriormente Zhou *et al.* (2012), demostraron que el extracto de clavo inhibe el *quorum sensing*, utilizando como cepas reporteras a *P. aeruginosa* QSIS-lasl y *C. violaceum* CV026, identificando al eugenol como el responsable dicha inhibición. Tanto el eugenol, como la miristicina son fenilpropanoides que derivan de la misma ruta de biosíntesis y poseen estructuras similares (Figura 38). Esto indica que este tipo de compuestos son capaces de inhibir este sistema de comunicación bacteriano. Por lo tanto, sería de interés evaluar dicha actividad con metabolitos similares y elucidar su mecanismo de acción.

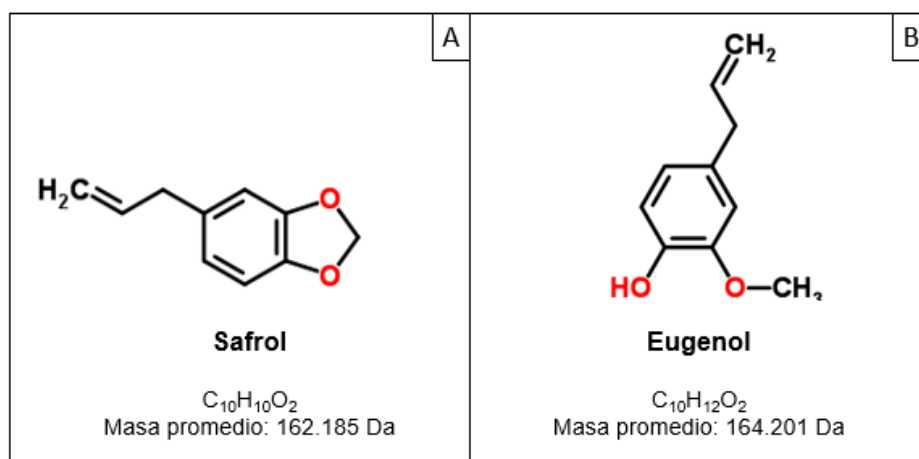


Figura 38. Fenilpropanoides que inhiben el *quorum sensing* **A:** Miristicina, **B:** Eugenol.

En las pruebas de inhibición de *quorum sensing* realizados con alcanidas y ésteres alfa insaturados de este estudio, se pudieron observar diferentes aspectos. Específicamente, las alcanidas no mostraron inhibición, pero se pudo observar que, al contrario, inducen este sistema. Lo anterior podría deberse a que su estructura, que es bastante similar a las AHL, pudiera ser la responsable de que éstos compuestos estén actuando de la misma forma uniéndose a la proteína receptora encendiendo los genes para la producción de violaceína. Esto tiene similitud con lo reportado por Vázquez-Martínez *et al.* (2017), quienes observaron que dos alcanidas, la *N*-hexanoil isobutilamida y la *N*-hexanoil feniletíl amida, al igual que las AHL actuaban como señales capaces de inducir el *quorum sensing* en *C. violaceum*. Además, la *N*-hexanoil isobutilamida fue más efectiva al inducir la producción de

violaceína a partir de los 10 μg , en comparación con la *N*-hexanoil feniletilamida que tuvo efecto a partir de los 40 μg (Figura 14). En base a estos resultados y los observados en los ensayos realizados en este estudio, se puede decir que las alcanidas modulan el *quorum sensing* actuando como moléculas señalizadoras que inducen este sistema de comunicación bacteriano. El caso contrario se observó con los ésteres, que tuvieron actividad inhibitoria a partir de los 25 μg . Lo anterior coincide con los mecanismos de acción de las moléculas que inhiben el *quorum sensing* que se mencionaron anteriormente, que son compuestos con cadenas alifáticas similares a las presentes en las homoserinlactonas, con la diferencia de presentar un grupo éster en lugar de un grupo amida. Debido a lo anterior, podrían estar mimetizando la función del autoinductor, pero impidiendo la unión de éste a la proteína receptora. Es importante dar continuidad al estudio de este tipo de moléculas que anteriormente no habían sido evaluadas en este aspecto, ya que mostraron ser eficientes inhibiendo este proceso. Además, se propone evaluar a profundidad su mecanismo de acción para correlacionar la importancia de la isomería y los sustituyentes que presentan.

En base a lo que se analizó en este trabajo, se puede decir que *P. auritum* es una especie con una amplia gama de metabolitos de interés. Sería importante estudiar y evaluar a profundidad de éstos en relación con su papel ecológico dentro de la planta o a su actividad biológica. Además, sería importante analizar en este sentido otras especies nativas de América para poder relacionar de una manera más acertada la presencia de piperamidas y alcanidas en base a la distribución de las especies de este género.

IX. CONCLUSIONES

Se detectó y confirmó la presencia de la *N*-isobutil-2*E*, 4*E*-decadienamida (pellitorina) en los extractos de *P. auritum*. Esta alcanida ya había sido reportada en otras especies de este género.

Se detectó y confirmó la presencia de la *N*-isobutil-2*E*-decamonoenamida y de la *N*-metilbutil-2*E*, 4*E*-decadienamida, compuestos que no habían sido reportadas en especies de la familia Piperaceae.

No se detectaron piperamidas en *P. auritum*. Sin embargo, se identificaron fenilpropanoides, como el safrol y la miristicina, que derivan de la misma ruta de biosíntesis.

Se identificaron dos ésteres α -insaturados: el 2*E*-4*E*-decadienoato de etilo y el 2*E*-4*E*-decadienoato de metilo. Resultaría muy interesante evaluar algunas de sus actividades biológicas, en comparación con las alcanidas, y determinar su potencial como atrayentes de insectos.

La miristicina, presente en el extracto etanólico de raíz de *P. auritum*, inhibe el *quorum sensing* en *C. violaceum*.

Las alcanidas evaluadas en este estudio modulan el *quorum sensing* induciendo este sistema de comunicación, probablemente por su parecido estructural a los autoinductores. Sin embargo, los ésteres inhiben este proceso, en donde se pudo apreciar que tanto la naturaleza del sustituyente, así como la isomería de los dobles enlaces, son factores importantes para su efecto.

La presencia de alcanidas permite a *P. auritum* ser un modelo para el estudio de la biosíntesis de estos compuestos, en base al propuesto anteriormente para la afinina.

X. REFERENCIAS

- Boonen J., Bronselaser A., Nielandt J., Veryser L. De Tré G., De Spiegeller. 2012. "Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides." *Journal of Ethnopharmacology* 142:563–90.
- Buitimea-Cantúa G. Vidal. 2018. Identificación de los genes de la biosíntesis de la cadena acilo de la afinina a través del análisis del transcriptoma y expresión diferencial entre dos especies del Género *Heliopsis*. Tesis para obtener el grado en Doctor en Ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas. Cinvestav, Unidad Irapuato.
- Buitimea-Cantúa G V, Méndez-Bravo A, Marsch-Martínez N, Molina-Torres J. 2018. Polyketide Synthase (PKS) mediated acyl chain Biosynthesis of alkamides. Affinin in *Heliopsis longipes*: de novo RNAseq and Comparative Transcriptomic Analysis. Scientific Reports. Sometido Marzo 2018.
- Caballero-Gallardo K., Olivero-Verbel J., Pino-Benítez N., Stashenko-Elena E. 2014. Chemical Composition and Bioactivity of *Piper auritum* and *P. multiplinervium* Essential Oils against the Red Flour Beetle , *Tribolium Castaneum* (Herbst). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas 13(1):10–19.
- Delgado-Barreto E., García-Mateos M. R., Ybarra-Moncada M. C., Luna-Morales C., Martínez-Damián M.T. 2012. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azardichta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. Revista Chapingo Serie Horticultura 18 (1): 55-69.
- Dognini J., Meneghetti-Emanuelle K., Teske-Morgana N., Begnini-Iêda M., Rebelo-Ricardo A., Dalmarco-Eduardo M., Verdi Marcio., André L. de Gasper (2012). Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel, *Journal of Essential Oil Research*, 24:3, 241-244

- Gomi K., Toshiaki K., Yutaka T., Shigeru F., Akiko U., Haruhiko., Akira W., Toshihiro N. 2006. Mouse and Human Cell Activation by *N*-Dodecanoyl-DL-Homoserine Lactone, a *Chromobacterium violaceum* Autoinducer, *Infection and immunity*. P. 74, 7029–7031.
- Gotor-Fernández V., Busto E., Gotor V. 2006. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Advanced Synthesis & Catalysis* . 348, 797 – 812
- Greger, Harald. 1984. “Alkamides: Structural Relationships , Distribution and Biological Activity1.” *Planta Medica*. 366–75.
- Greger, Harald. 2016. “Alkamides: A Critical Reconsideration of a Multifunctional Class of Unsaturated Fatty Acid Amides.” *Phytochemistry Reviews* 15(5):729–70.
- Jaramillo, M. Alejandra and Paul S. Manos. 2001. “Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus Piper (Piperaceae).” *American Journal of Botany* 88(4):706–16.
- Koeller, Kathryn M. and Chi-huey Wong. 2001. “Enzymes for Chemical Synthesis”. *Latin American Journal of Pharmacy*. 27 (5): 852-8 (2008).
- Lee-Dyer., Richards-Joe and Dodson Craig. 2004. Isolation Synthesis and Evolutionary Ecology of Piper Amides.
- Mangion, C.P. (2011). *Piperaceae*. In Short, P.S. & Cowie, I.D. (eds).Flora of the Darwin Region. (Northern Territory Herbarium, Department of Natural Resources, Environment, the Arts and Sport). Vol. 1, pp. 1–3.
- Mgbeahuruike, E. E., T. Yrjönen, H. Vuorela, and Y. Holm. 2017. “Bioactive Compounds from Medicinal Plants: Focus on Piper Species.” *South African Journal of Botany* 112:54–69.

- Miller, Melissa B. and Bonnie L. Bassler. 2001. "Quorum Sensing in Bacteria". *Annual Revision of Microbiology*. 55:165–99
- Minto RE, Blacklock, J B. 2008. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products *Progress in Lipid Research* 47 (4):233-306.
- Molina-Torres, Jorge and García-Chávez Abraham. 2001. "Alcamidas En Plantas: Distribución e Importancia." *Avance Y Perspectiva* 20 (Noviembre-Diciembre):
- Molina-Torres Jorge., Santos-Escobar Fernando, González-Arno María T. 2008., Ramírez-Chávez Enrique and Sánchez-Pavón Esmeralda. "Síntesis Enzimática de Alcamidas En Sistemas No Acuoso Y Ensayo de Su Bioactividad In Vitro." *Latin American Journal of Pharmacy*. 27(5):852–58.
- Monzote, Lianet, García Marley., Montalvo Aan M., Scull Ramón., and Miranda Migdalia. 2010. "Chemistry, Cytotoxicity and Antileishmanial Activity of the Essential Oil from *Piper Auritum*." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 105(2):168–73.
- Night, A. L. A. N. K. 2005. "Specificity of Codling Moth (Lepidoptera : Tortricidae) for the Bioassays with Pome Fruit Volatiles , Analogue , and Isomeric Compounds." *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 4046–53.
- Okwute, Simon Koma et al. 2013. "Piperine-Type Amides : Review of the Chemical and Biological Characteristics." *International Journal of Chemistry*. 5(3):99–122.
- 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., and Boll, P. M. 1997. *Phytochemistry of the genus Piper*. *Phytochemistry* 46: 597–673.
- Pérez-Gutiérrez R. M., Neira González A. M., Hoyo-Vadillo C. 2013. Alkaloids from Piper: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol. 13, No. 1

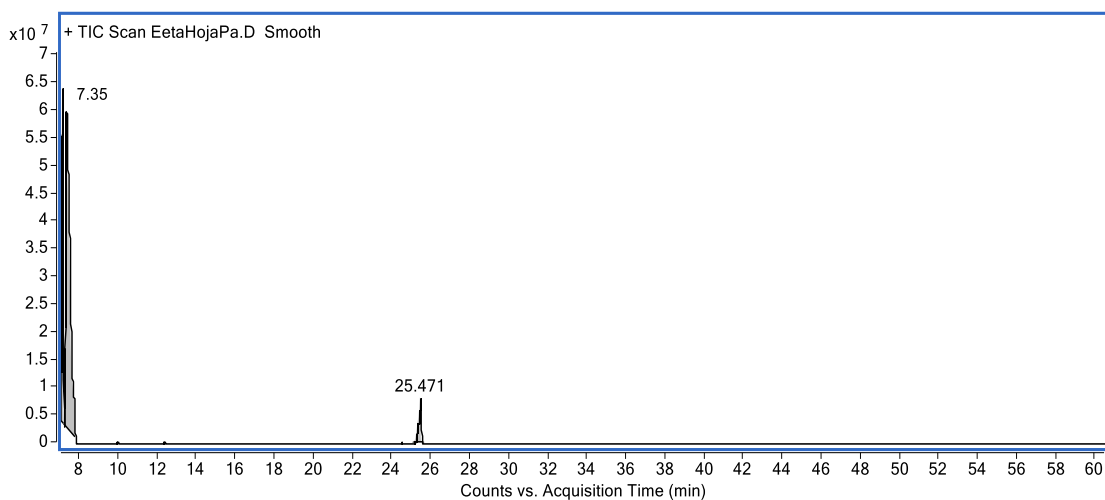
- Pineda Rodrigo, Samuel Vizcaíno, Carlos García, Jesus Gil, and Diego Durango. 2012. "Chemical Composition and Antifungal Activity of *Piper Auritum* Kunth and *Piper Holtonii* C. DC. against Phytopathogenic Fungi." *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(December):507–15.
- Ramírez-Chávez, Enrique, López-Bucio José, Herrera-Estrella Luis, and Molina-Torres Jorge. 2004. "Alkamides Isolated from Plants Promote Growth and Alter Root Development in Arabidopsis." *Plant Physiology* 134(3):1058–68.
- R. de Kievit Teresa and H. Iglewski Barbara. 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*. 68 : 4839-4849.
- Reddy, S.Venkat et al. 2004. "Antibacterial Constituents from the Berries of *Piper Nigrum*." *Phytomedicine* 11(7–8):697–700.
- Rosario-Loureiro S., Da Silva Antonio J., Paz Parente J. 1996. Alkamides from *Cissampelos glaberrima*. *Planta Medica*. 62: 376—377
- Sánchez, Yaíma, Teresa M. Correa, Yudith Abreu, and Pino Oriela. 2013. "Efecto Del Aceite Esencial de *Piper Auritum* Kunth Y Sus Componentes Sobre *Xanthomonas Albilineans* (Ashby) Dowson Y *Xanthomonas Campestris* Pv. *Campestris* (Pammel) Dowson." *Revista de Protección Vegetal* 28(3):204–10.
- Sauter-Ismael Pretto et al. 2012. "Chemical Composition and Amoebicidal Activity of *Piper Hispidinervum* (Piperaceae) Essential Oil." *Industrial Crops and Products* 40(1):292–95.
- Salgado-Garciglia R. 1995. Estudio bioquímico de la síntesis de afinina en cultivos in vitro de raíces transformadas de *Spilanthes oppositifolia* (Lam.) D´arcy. Doctorado, CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, Irapuato
- Scott,-Ian M., HelenR. J., Bernard J. R. Philogène, and John T. Arnason. 2008. "A Review of Piper Spp. (Piperaceae) Phytochemistry, Insecticidal Activity and Mode of Action." *Phytochemistry Reviews* 7(1):65–75.

- Stauff-Devin L., Bonnie-L. B., Howard Hughes., Chevy C. 2011. "Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA Recognition and Gene Regulation by the CviR Receptor." 193(15):3871–78.
- Suryanarayana-Halkare V., Ananthapadmanabha-Bhagwath A., PUNCHAPADY-DEVASYA R. 2013. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3(12): 954-959.
- Tebbs, M. C. 1989. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. *Bulletin of the Natural History Museum of London* 19: 117–158.
- Yi-Tang L., Wai-Fong Y.,Kok-Gan C. 2013. *Piper nigrum*, *Piper betle* and *Gnetum gnemon*- natural food sources with anti *quorum sensing* properties. *Sensors*. 13, 3975-3985.
- Vizcaíno-Paez Samuel. 2013. Safrol y Apiol: metabolismo, preparación de derivados y actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobromae*. Tesis de Maestría en Ciencias-Químicas. Universidad Nacional de Colombia.
- Vázquez-Martínez J., Nieto-Álvarez, E., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J. 2017. Enzymatic Method for *N*-Acyl Homoserine Lactones Synthesis Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase. *Catalysis Letters*. 148: 62-67.
- Zhou Liman, Zheng Hongda, Tang Yidan, Yu Wengong y Gong Qianhong. 2013. Eugenol inhibits *quorum sensing* at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology Letters*. 4 (35): 631-637.

APÉNDICE I

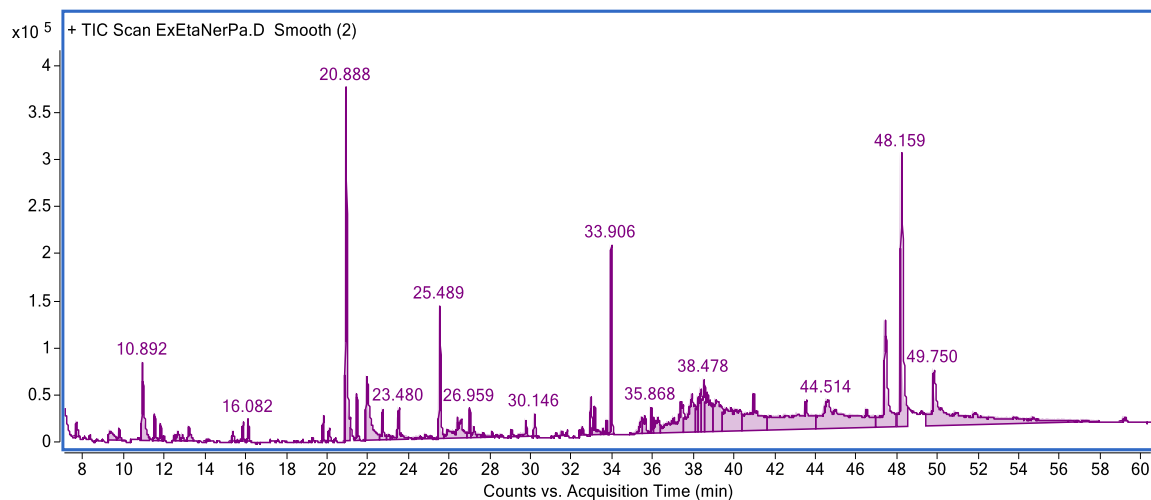
Cromatogramas y compuestos principales de los extractos etanólicos de *Piper auritum*.

a) Extracto etanólico de hojas (lámina foliar)



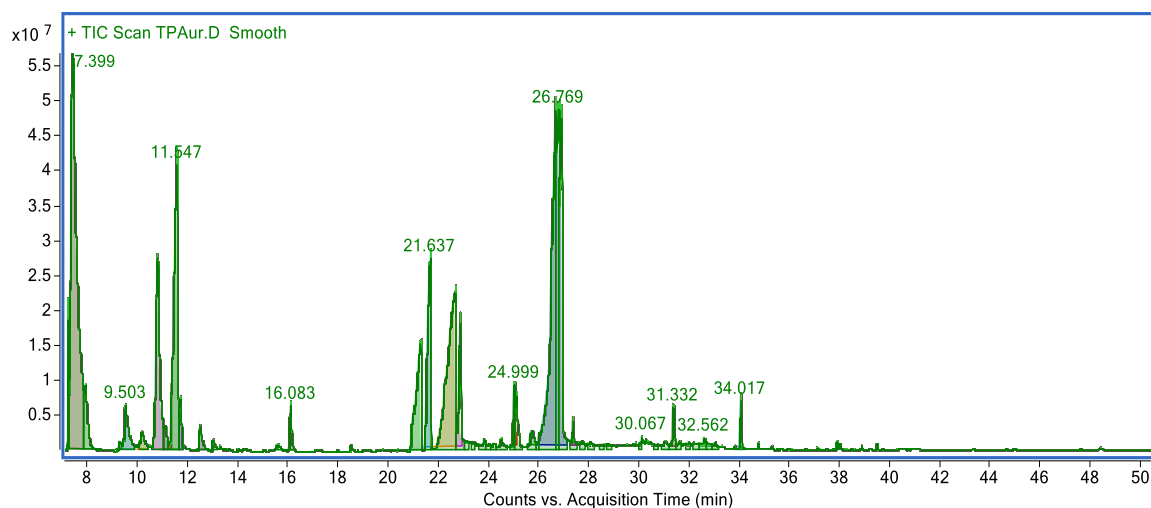
RT	COMPUESTO	Área%	CAS#	Qual	Pureza	MATCH
7.347	Safrol	73.06	000094-59-7	96	98	947
9.975	Cariofileno	0.18	000087-44-5	98	76	917
12.339	Trans-Nerolidol	0.13	007212-44-4	91	85	938
22.387	Etil éster del ácido hexadecanoico	0.04	000628-97-7	96	94	936
25.477	Fitol	5.21	000150-86-7	87	98	902
26.110	Etil-éster-9, 12- del ácido octadecadienoico	0.03	007619-08-1	99	95	904
26.202	Etil-éster-9-12-15 (Z, Z, Z) del ácido octadecatrienoico	0.02	001191-41-9	98	85	866
26.274	Etil-éster del ácido-9-octadecenoico	0.01	006114-18-7	96	91	829
26.876	Etil-éster del ácido octadecanoico	0.02	000111-61-5	97	91	888

b) Extracto etanólico de hojas (nervaduras)



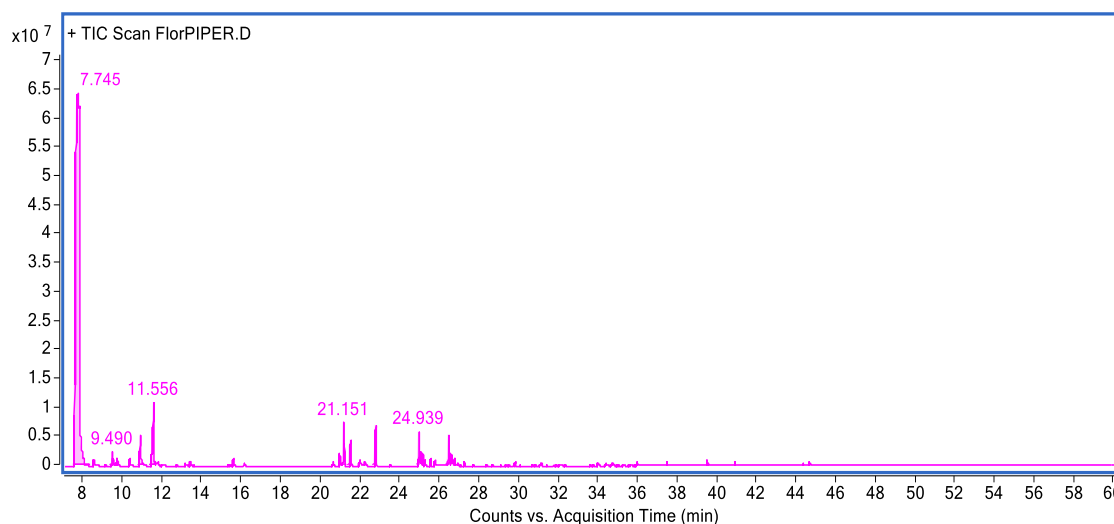
RT	COMPUESTO	Área%	CAS#	Qual	Pureza	MATCH
7.648	Safrol	0.84	000094-59-7	97	58	708
9.740	Metil-éster 2E-4Z ácido decadienoico	0.39				
10.885	Compuesto MW/180	4.0	004493-42-9	90	43	769
13.160	Metoxieugenol	1.04	006627-88-9	87	69	785
20.891	pellitorina	11.61	-	-	-	-
22.680	Etil éster del ácido hexadecanoico	0.90	000628-97-7	94	70	770
25.489	Fitol	4.08	000150-86-7	96	91	937
47.364	Ergosterol	5.42	1000214-17	70	67	854
48.162	Estigmasterol	13.10	000083-48-7	99	89	936
49.747	Sitosterol	2.86	000083-46-5	50	41	731

c) Extracto etanólico del tallo



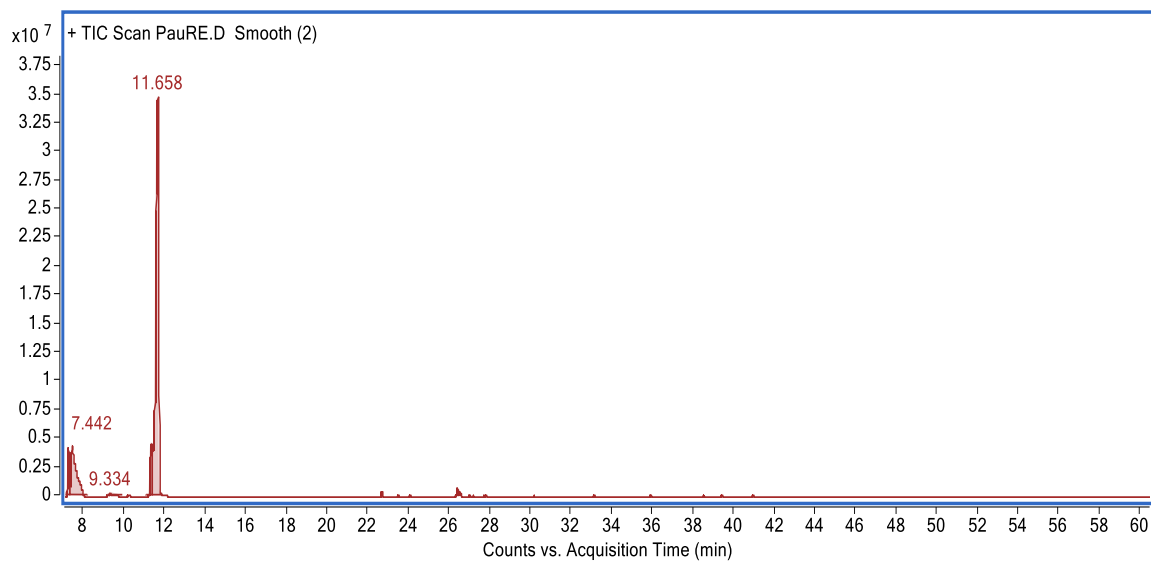
RT	COMPUESTO	Área%	CAS#	Qual	Pureza	MATCH
7.401	Safrol	20.24	000094-59-7	96	95	811
9.267	Copaeno	0.21	1000360-33-0	99	71	855
9.530	2E-4E decadienoato de metilo	-	-	-	-	-
10.154	Cariofileno	0.43	000087-44-5	99	55	975
11.28	2E-4E decadienoato de etilo	-	-	-	-	-
12.998	Metoxieugenol	0.25	006627-88-9	99	91	948
19.02	N-isobutil-2E-decamonoenamida	-	-	-	-	-
21.266	pellitorina	4.63	-	-	-	-
22.640	Ácido n-hexadecanoico	10.78	000057-10-3	99	85	919
22.840	Etil éster del ácido hexadecanoico	2.58	000628-97-7	97	91	925
23.79	N-metilbutil-2E,4Z- decadienamida	-	-	-	-	-
25.002	Metil-éster-9-12 (Z, Z) del ácido octadienoico	1.06	000112-63-0	99	64	909
25.091	Metil-éster-9-12-15 (Z, Z, Z) del ácido octadecatrienoico	0.75	000301-00-8	99	65	938
25.702	Fitol	0.51	000150-86-7	99	39	608
26.652	Ácido linoleico	14.81	463-40-1	99	25	832
26.777	Etil-éster-9, 12- del ácido octadecadienoico	7.07	007619-08-1	93	36	849
26.868	Etil-9, 12, 15-octadecatrienoato	6.0	1000336-77-4	99	58	763
27.334	Etil-éster del ácido octadecanoico	0.32	000111-61-5	99	66	915
30.325	9-Octadecenamida	0.03	000301-02-0	80	22	758
32.563	2-Adamantil-éster, o-Ácido anísico	0.09	-	62	34	812
34.712	Fenil-metil-éster, del ácido dodecanoico	0.05	000140-25-0	80	55	774
35.248	Etil éster del ácido docosanoico	0.03	005908-87-2	72	43	787
37.85	Fenil-metil-éster 9,12 (Z, Z) del ácido octadecadienoico	0.08	47557-83-5	-	68	683
37.969	9,12,15-Ácido Octadecatrienoico, Fenil-metil éster, (Z, Z, Z)-	0.06	77509-02-5	-	58	788
39.444	Escualeno	0.06	000111-02-4	94	64	942

d) Extracto etanólico de inflorescencias



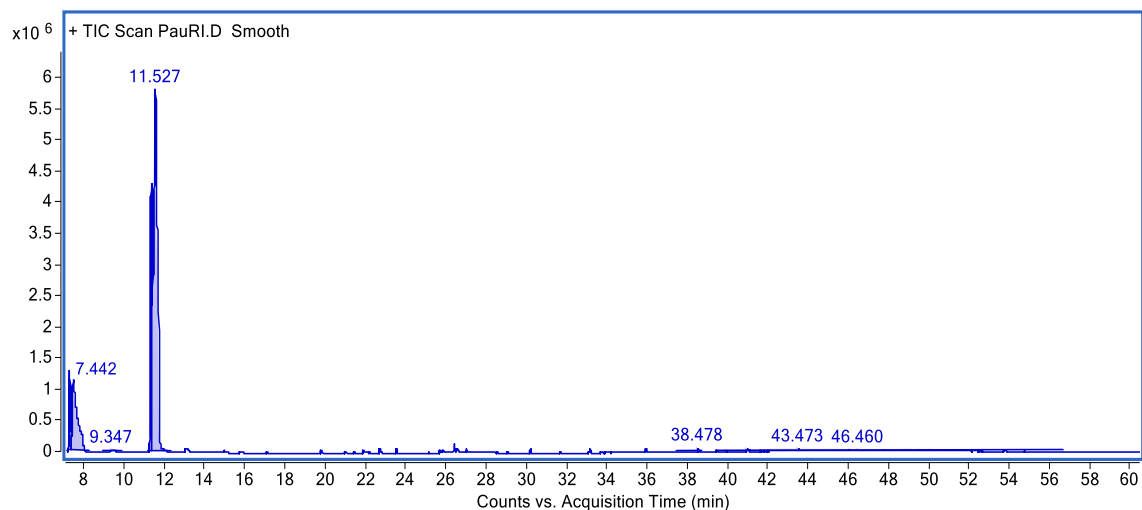
RT	COMPUESTO	Área%	CAS#	Qual	Pureza	MATCH
7.8341	Safrol	77.57	000094-59-7	97	91	950
8.569	2-Metoxi-3-(2-propenil)-fenol	0.30	001941-12-4	98	87	954
9.122	Metileugenol	0.10	000093-15-2	96	67	949
9.496	Alfa-cubenoeno	0.77	017699-14-8	96	59	768
9.530	2E-4E decadienoato de metilo	-	-	-	-	-
10.354	Cariofileno	0.52	000087-44-5	99	91	974
11.779	Gama-elemeno	0.22	339154-91-5	80	73	875
11.991	Elemicina	0.10	000487-11-6	98	81	899
12.146	Cadineno	0.10	000483-76-1	98	59	878
12.703	Nerolidol 2	0.11	1000285-43-6	86	69	939
13.143	Metoxieugenol	0.20	006627-88-9	99	88	942
13.394	Espatuleno	0.24	006750-60-3	93	89	933
19.020	N-isobutil-2E-decamonoenamida	-	-	-	-	-
20.601	Metil-9-hexadecanoato	0.20	001120-25-8	99	88	959
20.939	pellitorina	0.71				
21.152	Metil-éster del ácido hexadecanoico	1.80	000112-39-0	99	94	959
21.947	Ácido n-hexadecanoico	0.48	000057-10-3	99	87	928
22.201	Etil-9-hexanoato	0.21	054546-22-4	99	76	940
22.748	Etil éster del ácido hexadecanoico	1.56	000628-97-7	98	95	917
23.790	N-metilbutil-2E,4Z- decadienamida	-	-	-	-	-
24.941	Metil-éster-9-12 (Z, Z) del ácido octadienoico	1.36	000112-63-0	99	100	968
25.030	Metil-éster-9-12-15 (Z, Z, Z) del ácido octadecatrienoico	0.52	000301-00-8	99	82	958
25.122	Metil-éster-9-del ácido octadecenoico	0.47	1937-62-8	99	88	962
25.240	Metil-éster del ácido octadecenoico	0.22	112-62-9	99	84	961
25.740	Metil-éster del ácido octadecanoico	0.27	000112-61-8	99	68	934
26.438	Etil-éster-9, 12- del ácido octadecadienoico	1.21	007619-08-1	99	93	951
26.607	Etil oleato	0.43	000111-62-6	99	87	933
34.706	Fenil-Metil éster del ácido dodecanoico	0.13	000111-61-5	90	72	863
39.435	Escualeno	0.22	000111-02-4	95	76	956

e) Extracto etanólico de la raíz (corteza)



RT	COMPUESTO	Área%	CAS#	Qual	Pureza	MATCH
7.436	Safrol	15.43	000094-59-7	98	82	967
9.174	Copaeno	0.19	1000360-33-0	99	86	931
11.676	Miristicina	69.37	000607-91-0	97	98	954
20.935	pellitorina	-	-	-	-	-
22.675	Etil éster del ácido hexadecanoico	0.34	000628-97-7	99	97	947
26.375	Etil-éster-9, 12- del ácido octadecadienoico	0.63	007619-08-1	99	95	930
26.468	Etil-éster-9-12-15 (Z, Z, Z) del ácido octadecatrienoico	0.31	001191-41-9	99	85	942
26.548	Etil oleato	0.24	000111-62-6	99	86	909
39.382	Escualeno	0.1	000111-02-4	93	84	940

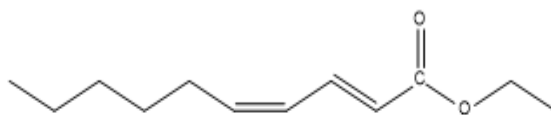
f) Extracto etanólico de la raíz (tejido vascular)



RT	COMPUESTO	Área%	CAS#	Qual	Pureza	MATCH
7.262	Safrol	5.27	000094-59-7	98	97	970
7.442	Safrol (Isómero 1)	14.75	000094-59-7	98	79	965
11.329	Miristicina	16.57	000607-91-0	98	100	908
11.530	Miristicina (Isómero 1)	59.23	000607-91-0	97	35	908
13.048	Metoxieugenol	0.61	006627-88-9	93	60	869
14.948	Apiol	0.18	00523-80-8	97	27	805
20.932	pellitorina	0.08	-	-	-	-
21.840	Ácido n-hexadecanoico	0.17	000057-10-3	93	82	870
22.670	Etil éster del ácido hexadecanoico	0.24	000628-97-7	99	86	908
25.674	9, 12-ácido octadecadienoico (Z, Z)	0.15	000060-33-3	99	86	856
26.362	Etil-éster-9, 12- del ácido octadecadienoico	0.33	007619-08-1	99	87	902
26.459	Etil-éster-9-12-15 (Z, Z, Z) del ácido octadecatrienoico	0.19	001191-41-9	99	65	832
26.543	Etil-oleato	0.12	000111-62-6	98	60	801

APÉNDICE II

Especificaciones del 2E-4Z-decadienoato de etilo (Bedoukian Research, INC.)



Chemical Formula: C₁₂H₂₀O₂

Molecular Weight: 196.3

Pureza Mínima:	98% (Más isómeros)
Isómero mayoritario:	92% (<i>E</i> , <i>Z</i>)
Isómero secundario:	0.1%-8.0% (Isómeros)
Apariencia:	Líquido ligeramente amarillo
Índice de Refracción:	1.485: 1.490 at 20 deg C
Gravedad específica:	0.900: 0.905 at 25 deg C

Para confirmar el porcentaje de pureza de este compuesto, el 2E-4Z-decadienoato de etilo fue analizado por GC/ EIMS. En base a esto, se pudo determinar que el éster de pera (TR= 10.849 min) se encontraba con un 98.5% de pureza, más el 1.5%, conformado por isómeros (TR= 10.464 min y 11.103 min, respectivamente).

