



Fraccionamiento bioquímico de las hojas de *Piper hispidum* Swartz

ESPINOZA, BORIS, A.¹
SALAMANCA, EFRAÍN, A.¹
FLORES, NINOSKA, A.¹

CORRESPONDENCIA: BORIS ESPINOZA
AEDOSP58@HOTMAIL.COM.

Resumen

Del fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de *Piper hispidum* Swartz, se aisló e identificó cuatro productos descritos previamente en la bibliografía, pero reportados por primera vez en esta especie: P1 (5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona), P2 (óxido de cariofileno), P3 (esfatulenol) y P4 (trans-fitol). Sus estructuras fueron elucidadas en base a los datos de RMN ¹H y ¹³C, incluyendo las correlaciones heteronucleares HSQC, HMBC y comparación con la literatura. La actividad leishmanicida de los compuestos fue ensayada contra dos cepas de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*. Los resultados demostraron que la flavanona P1 (5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona) presenta un CI₅₀ de 14.1 y 13.1 µg/mL y el terpeno P2 (óxido de cariofile-

Abstract

Fractionation of ethanol extract of leaves of *Piper hispidum* Swartz were isolated and identified four products previously found in bibliography, but first reported in this species: P1 (5-hydroxy-7,4'-dimetoxiflavanone), P2 (caryophyllene oxide), P3 (sphatulenol) and P4 (trans-phytol). Their structures were elucidated on the basis of data from ¹H and ¹³C NMR, including heteronuclear correlations HSQC, HMBC and comparison with the literature found. Leishmanicidal activity of the compounds was tested against two strains of *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*. The results showed that flavanone (5-hydroxy-7,4'-dimetoxiflavanone) with IC₅₀ = 14.1 and 13.1 µg/mL, and terpene (caryophyllene oxide) with IC₅₀ = 36.7 and 26.8 µg/mL were

¹ Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

no) una CI50 36.7 y 26.8 µg/mL, compuestos moderadamente activos comparados con la anfotericina B CI50= 0.21 y 0.09 µg/mL para ambas cepas.

moderately active compared with Amphotericin B IC50 = 0.21 and 0.09 µg/mL for both strains.

PALABRAS CLAVE

Piper hispidum Sw, flavanona, oxido de cariofileno, espatulenol, trans-fitol, leishmanicida.

KEY WORDS

Piper hispidum Sw, flavanone, caryophyllene oxide, sphenatulenol, trans-phytol, leishmanicide.

INTRODUCCIÓN

Piper hispidum Swartz pertenece a la familia de las Piperaceae, género Piper. Es un arbusto que crece en zonas tropicales, como pequeñas manchas o agrupaciones en la selva, crece en zonas con alta precipitación fluvial a una altura menor a 200 m (Parthasarathy, 2006). Por sus características morfológicas, esta especie se ha diferenciado en más de 6 variedades, distribuidas ampliamente desde las Antillas y Centro América hasta los bosques tropicales de Sud América (Erika, et al, 2008).

El género Piper ha demostrado tener una gran variedad de especies con metabolitos secundarios interesantes, con diversas actividades y utilizados extensamente de forma tradicional. Estos se encuentran en diferentes partes de la planta: hojas, tallos, inflorescencias y raíces (Parmar, 1997). Estudios fitoquímicos reportados de *P. hispidum* SW y *P. hispidum* H.B.K., han demostrado el aislamiento de metabolitos como: amidas, aceites esenciales, flavonoides entre otros, con actividad antifúngica (Alecio, 1998), antibacteriana (Delgado, 2007) y leishmanicida respectivamente (Hermoso, 2003).

En la medicina tradicional, las diferentes variedades existentes de *Piper hispidum* se usan para el tratamiento de diversas afecciones como: los escalofríos, antiséptico, contra el dolor de estómago (Mitchell, 2006) y tratamiento de la úlcera gástrica (Goel, 2002). Según la farmacopea tradicional "Tacana. Conozcan nuestras árboles, nuestras hierbas" (1999) los pueblos Tacana, Mosekene y Chimane usan la infusión de las hojas para el tratamiento de diversas parasitosis. Se considera que solo el 10% de las especies conocidas mundialmente pertenecientes a esta familia han sido químicamente investigadas (Kato, 2007).

La búsqueda de agentes antiparasitarios para enfermedades consideradas huérfanas por la OMS-OPS, abren paso a la realización de estudios exhaustivos para el aislamiento y posterior identificación de los metabolitos secundarios presentes en *P. hispidum*, con posible actividad frente a parásitos de Leishmania y Plasmodium. En la presente investigación se han aislado 4 compuestos, encontrados en otras especies pertenecientes a la familia Piperaceae, pero reportadas por primera vez en *P. hispidum* Sw.

METODOLOGÍA

Técnicas generales

Los espectros de RMN¹H y RMN¹³C se obtuvieron utilizando un espectrómetro BRUKER de 300 MHz. Los valores del desplazamiento químico (δ) fueron reportados en ppm y las constantes de acoplamiento (J) están expresadas en Hz. Los productos fueron disueltos en CDCl₃.

La cromatografía líquida al vacío (CLV) y las cromatografías en columna (CC) se realizaron en gel de sílice fino (0,063; 0,200 mm de diámetro). Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas cromatográficas con base de aluminio de 0,25 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm, Whatman AL-SIL G/UV₂₅₄.

Material vegetal

Las hojas de *Piper hispidum* Swartz (GB 1925), fueron colectadas en la provincia Abel Iturralde (13°46'S, 68°12' W) del departamento de La Paz, a una altura de 380 m.s.n.m en el año 2008. Las hojas fueron secadas y pesadas (500 g), se maceraron con etanol al 96% durante 3 días. El macerado etanólico se filtró, y concentró en rotaevaporador (Laborota 4000) acoplado a baja presión, a una temperatura de 40°C (90 RPM) obteniendo así el extracto crudo.

Preparación del extracto y aislamiento

El extracto crudo se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂/EtOH (1:1), las dos fases formadas se separaron, filtraron y concentraron en rotaevaporador obteniéndose dos extractos, un extracto etanólico (28 g) y un extracto orgánico (18,4 g). La actividad leishmanicida de ambos extractos fue evaluado, siendo el extracto orgánico activo frente a 2 cepas de Leishmania. El extracto orgánico fue sujeto a un fraccionamiento por CLV en sílica gel, utilizando mezclas de éter de petróleo/ CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂/MeOH obteniéndose nueve fracciones (F1-F9).

La fracción F5 (102,2 mg) se separó por CC con un sistema de elusión de Éter de petróleo/CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂/MeOH en orden creciente de polaridad, obteniéndose 18 fracciones. Después de realizar el análisis por CCF se reunieron estas en 6 fracciones (F5.1- F5.6). La fracción F5.3 (17,6 mg) fue purificada por cromatografía en capa fina utilizando como sistema de elusión CH₂Cl₂/MeOH (100 ml:10 gotas), aislándose el producto P1 denominado como 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona.

La fracción F4 (202,0 mg) fue separada por cromatografía en columna con un sistema de elusión de Éter de petróleo/CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂/MeOH en orden creciente de polaridad, obteniendo 20 fracciones. Después de un análisis por CCF estas se reunieron en 8 fracciones (F4.1- F4.8). La fracción F4.4 (33,4 mg) fue purificada por cromatografía en capa preparativa utilizando un sistema de elusión CH₂Cl₂/Me₂CO (97:3), aislándose el producto P2 conocido como oxido de cariofileno.

La fracción F2 (74,2 mg) se separó por CC con un sistema de elución de Éter de petróleo/CH₂Cl₂ en orden creciente de polaridad, obteniéndose 10

fracciones. Realizado el análisis de los componentes por CCF estas se reunieron en 3 fracciones (F2.1- F2.3). Las tres fracciones se purificaron por cromatografía en columna utilizando un sistema de elusión Hexano/Et₂O (85:15). De la fracción F2.1 se han aislado los productos P3 esfatenol y P4 transfitol

Actividad leishmanicida

La actividad leishmanicida *in vitro* fue evaluada frente a formas promastigotes de *Leishmania braziliensis* clon1 (M2904 C192 RJA) y *Leishmania amazonensis* Lma (MHOM/BR/76/LTB-012). Los parásitos crecieron a 28°C en cultivo estacionario que fueron llevados a 1x10⁴/100µL/pocillo, en microplacas de 96 pocillos en medio para *Leishmania* RPMI 1640.

Las muestras y las drogas estándar se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Las cepas fueron cultivadas en medio Schneider suplementado al 5% con suero bobino fetal inactivo (56° por 30 minutos). Los parásitos en fase de crecimiento fueron distribuidos en micro placas de 96 pocillos a una concentración de 1 x 10⁶ parásitos/mL y cada pozo es tratado con diferentes concentraciones de los extractos y sus fracciones durante 72 horas.

La viabilidad de los parásitos se determinó por el método colorimétrico XTT-PMS. En cada pocillo con parásitos se le añadió 50 µL de reactivo XTT-PMS y se incubó durante 4 horas a 37°C. Después las placas fueron leídas en un lector ELISA a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados de actividad leishmanicida son expresados en valores de CI₅₀ (concentración de la droga que inhibe el 50% del desarrollo del parásito), obtenido graficando la absorbancia en función de las concentraciones de parásitos viables. Las pruebas fueron realizadas por triplicado, el análisis de los datos se realizó mediante Microsoft Excel 2000.

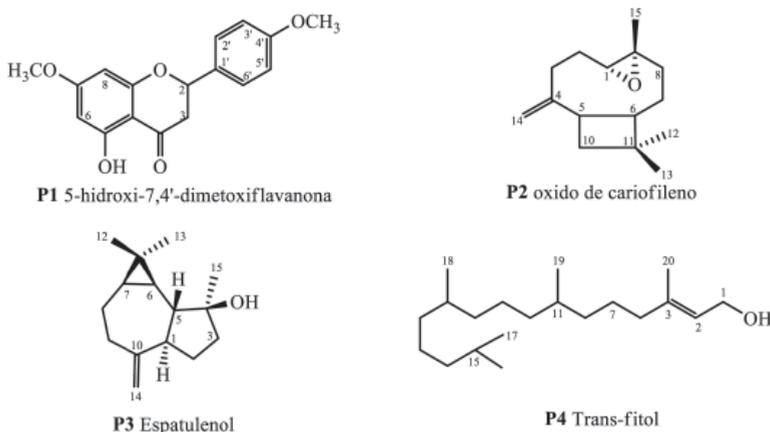
RESULTADOS Y DISCUSION

El fraccionamiento-bioguido del extracto etanólico (CI₅₀ = 41.1µg/L, 37.7µg/mL) de las hojas de *P. hispidum* Sw fue realizado sobre 2 cepas de *Leishmania*: *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. La actividad leishmanicida fue encontrada en la fase orgánica (CI₅₀ = 83.6µg/L, 81 µg/L). Del sub-fraccionamiento de la fase orgánica se han obtenido 9 sub-fracciones (F1-F9), de las cuales se han aislado e identificado cuatro productos: el producto P1(1) de la fracción F5, el producto P2(2) de la fracción F4 con actividades moderadas frente ambas cepas. Los productos P3 (3) y P4 (4) de la fracción F2.

El compuesto P1 presentó una fórmula molecular C₁₇H₁₆O₆ datos obtenidos por EMAR. Su espectro RMN¹H (Tabla 1) presentó señales de un sistema AX₂ con una señal a δ 5.39 (dd, J= 3.0, 13 Hz) asignado a un protón oximetínico en C2, acoplado a dos protones δ 2.81 (dd, J= 3.0, 17.1 Hz) y δ 3.13 (dd, J= 3.0, 17.1 Hz) asignables a un metileno H-3. Así mismo, se observaron dos singuletes a δ 3.83 y δ 3.86 asignables a dos grupos metoxilo; señales para seis protones aromáticos a δ 6.98 (dd, J= 2.1 Hz), 6.97 (dd, J=2.1 Hz) y 7.39 (dd, J=2.85 Hz) que integran a un protón cada uno y que conforman un anillo aromático con regiosustitución para y dos dobletes a δ 6.07(J= 2.3 Hz) y 6.09 (J= 2.3 Hz) que integran a un protón cada uno correspondientes al otro

anillo aromático, indicando una sustitución 1, 3 sobre dicho anillo. Un singulete para protón fenólico a δ 12.05, intercambiable con agua deuterada, este último característico de un grupo fenólico en disposición sin planar a un grupo carbonilo.

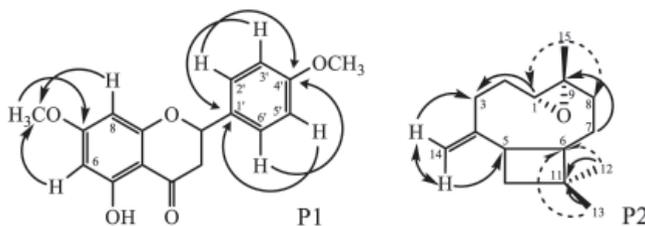
El espectro RMN ^{13}C (tabla 1) mostró señales para 17 átomos de carbono, asignados como dos carbonos metoxílicos a δ 55.37 y 55.67, un carbono metilénico, siete carbonos metínicos y siete carbonos cuaternarios, destacándose la señal de un carbonilo a δ 196.0 (C-4), un carbono oximetínico a δ 79.0 (C-2) y un carbono metilénico a δ 43.2 (C-3). El análisis del conjunto de señales por los experimentos de HSQC y HMBC confirmaron la presencia en la molécula de dos anillos aromáticos y un anillo central correspondiente a una estructura $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$, característica de una flavanona.



La localización de los grupos metoxilos en la molécula se determinó mediante HSQC y HMBC (Figura 1), destacando las correlaciones protón-carbono de uno de los metoxilo a δH 3.86 y los protones a δH 7.46 (H-2', H-6') con un carbono cuaternario a δC 160.07 (C-4'), los protones a δH 6.98 (H-2', H-6') con el carbono a δC 130.40 (C-1'); y el otro metoxilo a δH 3.82 con el carbono a δC 167.97 (C-7). Nos ayudó a establecer la regiosustitución en cada uno de los anillos en la molécula. Estos datos y la comparación con los datos de la bibliografía química de compuestos relacionados, nos permitieron establecer la estructura de P1 como 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona (Erika, 2006)

Figura 1

Correlaciones de RMN $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ del experimento (HMBC) para los compuestos P1 y P2



El compuesto P2 presentó la fórmula molecular $C_{15}H_{24}O$ por EMAR. El espectro de RMN 1H (Tabla 1) presenta señales claras para 3 grupos metilo a δ 0.99 (s, Me-12), 1.01 (s, Me-13) y 1.2 (s, Me-15), dos singuletes de protones vinílicos a δ 4.86 (s, H14a) y 4.98 (s, H14b). En los espectros RMN ^{13}C (Tabla 1) se observaron señales de 15 carbonos, con la presencia de tres grupos metilo, seis metilenos, tres metinos y tres carbonos cuaternarios; destacándose las señales del metileno geminal a δ 112.73 (C-14), y el carbono cuaternario vinílico a δ 151.84 (C-4).

Tabla 1
Datos de $^1H - ^{13}C$ RMN (δ , $CDCl_3$) de los compuestos P1 y P2

(P1) 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona			(P2) Oxido de cariofileno		
Posición			Posición		
	δH	δC		δH	δC
1			1	2.89 dd	63.74
2	5.39 d	79.01	2	2.12 m	39.16
3 ^a	2.81 dd	43.21	3	2.30 m	30.18
3b	3.13 dd		4		
4		196.02	5	2.62 m	48.72
5		164.15	6	1.69 m	50.78
6	6.09 d	95.09	7	1.30 m	29.81
7		167.98	8	1.42 m	39.76
8	6.07 d	94.23	9		
1'		130.40	10	1.64 m	27.21
2'	7.46 d	127.73	11		
3'	6.98 d	114.24	12	0.99 s	29.88
4'		160.07	13	1.01 s	21.62
5'	6.98 d	114.73	14a	4.86 s	112.74
6'	7.46 d	127.73	14b	4.98 s	
OCH ₃	3.83 s	55.67	15	1.21s	16.98
OCH ₃ '	3.86 s	55.36			

* Los datos se basaron en los experimentos DEPT, HSQC y HMBC

De acuerdo a los experimentos HSQC y HMBC, las relaciones más características en la molécula están dadas por la correlación de los protones vinílicos δH 4.86 (H-14a) y δH 4.98 (H-14b) con los carbonos δC 30.18 (C-3) y δC 50.79 (C-5). El protón δH 2.88 (H-1) con el carbono δC 30.18 (C-3). El protón δH (H-7) con el carbono de δC 59.82 (C-9). La correlación entre los protones de los grupos metilo δH 0.99 (Me-12) y el metileno δH 1.01 (Me-13) con el carbono cíclico a δC 50.79 (C-6) y los protones del grupo metilo δH 1.21 (Me-15) con los carbonos cíclicos δC 63.74 (C-1) y δC 39.77(C-8). Lo cual nos confirma la estructura cíclica de la molécula formando un oxido con dos anillos de nueve y cuatro carbonos, la existencia de un vinilo lateral a la cadena, 2 grupos metilo sobre el carbono C-11 y un grupo metilo sobre el carbono C9, nos ayudó a establecer la estructura del producto P2 como **óxido de cariofileno** (Torquillo, 1999).

Los espectros RMN ^1H y RMN ^{13}C de los compuestos P3 y P4 son semejantes a los reportados en la literatura, asignables al tran-fitol (P3) (Orjala, 1993) y al esfatulenol (P4) (Fuyihiko, 1985), encontrándose en otras especies de la familia *Piperaceae* como *P. aduncum*, *P. rusby* (Flores, 2007), *P. frimbiolatum* y *P. obliquum* (Mundina, 1998).

Tabla 2

Actividad leishmanicida de los extractos y metabolitos aislados *P. hispidum* Swartz

	CI ₅₀ µg/mL	
	L. amazonensis	L. braziliensis
Extracto crudo etanólico	41.1	37.7
Fracción acuosa	> 100	> 100
Fracción diclorometano	83.6	81
P1	31.5	37.8
P2	36.7	26.8
P3	38.8	53.7
P4	58.8	43.9

Patrón: Anfotericina B (CI₅₀ = 0.8 µg/mL; 0.2 µg/mL respectivamente)

Los compuestos aislados de *P. hispidum* fueron analizados para determinar la actividad leishmanicida (Tabla 2). Los resultados de la evaluación leishmanicida sobre cultivos de promastigotes *in vitro* de *L. braziliensis* y *L. amazonensis* mostraron que el producto P1 (flavanona) presentó la mejor actividad frente a las dos cepas con CI₅₀ 14.1 y 13.1 µg/mL respectivamente. Los productos P2 (óxido de cariofileno), P3 (trans-fitol) y P4 (espatulenol) fueron moderadamente activos, los valores de CI₅₀ se presentan en la tabla 2. Como control se utilizó la anfotericina B con CI₅₀ 0.8 y 0.2 µL. Las actividades de los compuestos P3 y P4 son semejantes a los obtenidos en el estudio sobre la actividad leishmanicida en *P. rusby* (Flores, 2007).

Datos espectroscopicos

PRODUCTO P1: 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona. Aislado como aceite amarillo, 7.5 mg (0.0015%).

RMN ^1H (δ , CDCl₃): 2.81 (1H, dd, J=3.0, J=17.1 Hz, H-3a) y 3.13 (1H, dd, J=3.0, J=17.1 Hz, H-3b), 3.83 (3H, s, OMe), 3.86 (3H, s, OMe), 5.39 (1H, dd, J=3.0, J=13 Hz, H-2), 6.07 (1H, d, J=2.31 Hz, H-8), 6.09 (1H, d, J=2.29 Hz, H-6), 6.98 (2H, d, J=2.8 Hz, H-3'H-5'), 7.39 (2H, d, J=2.1 Hz, H-2'H-6'), 12.05 (1H, s, OH). **RMN ^{13}C (δ , CDCl₃):** 43.21 (C-3), 55.37 (OCH₃), 55.67 (OCH₃), 79.0 (C-2), 94.23 (C-8), 95.09 (C-6), 103.43 (C10), 114.24 (C-3', C-5'), 127.73 (C-2', C-6'), 130.40 (C-1'), 160.07 (C4'), 162.91 (C9), 164.5 (C-5), 167.9 (C-7), 196.0 (C-4).

PRODUCTO P2: Óxido de cariofileno. Aislado como aceite, 13.7 mg (0.0027%).

RMN ^1H (δ , CDCl₃): 0.99 (3H, s, Me-12), 1.01 (3H, s, Me-13) y 1.2 (3H, s, Me-15), 1.30 (2H, m, H-7), 1.64 (2H, m, H-10), 1.42 (2H, m, H-8), 1.69 (1H, m,

H-6), 2.12 (2H, m, H-2), 2.30 (2H, m, H-3), 2.62(1H, m, H-5), 2.89 (1H, dd, J= 4.1, 10.5 Hz, H-1), 4.86 (s, H-14a) y 4.98 (s, H-14b). $RMN_{13}C$ (δ , $CDCl_3$): 16.98 (Me-15), 21.62 (Me-13), 27.21 (C-10), 29.81 (C-7), 29.88(Me-12), 30.18 (C-3), 34.01 (C-11), 39.16 (C-2), 39.76 (C-8), 48.72 (C-5), 50.78 (C-6), 59.82 (C-9), 63.74 (C-1), 112.73 (C-14), 151.84 (C-4).

PRODUCTO P3: Esfatulenol. Aislado como laca, 43.1 mg (0.0086%).

Los RMN 1H y ^{13}C (δ , $CDCl_3$) son idénticos a los reportados en la literatura (Fuyihiko, 1985).¹³

PRODUCTO P4: Trans-fitol. Aislado como laca 43.1 mg (0.0086%).

Los RMN 1H y ^{13}C (δ , $CDCl_3$) son idénticos a los reportados en la literatura (Orjala, 1993).¹²

AGRADECIMIENTOS

BME, agradece a la cooperación IRD-FRANCIA, por la beca otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas gestión 2008-2010. ENFQ agradece a la cooperación ASDI-SAREC por el financiamiento del proyecto con fondos concursables ASDI/TB-BRC 2009 y 2010.

REFERENCIAS

- Alecio, C., da Silva, V., Marx, M.C., Kato, M., Furlan, M. (1998). Antifungal Amide from leaves of *Piper hispidum*. Journal of Natural Products, 37(2), 637-639.
- Delgado, W. A., Cuca L. E. (2007). Composición química del aceite esencial de los frutos de *P. hispidum* Kunth. Revista de Productos Naturales, 1(1), 5-8.
- Erika, A., Plazas, G., Luis, E., Cuca, S., Wilman, A., Delgado, A. (2008). Flavonoides aislados de lãs inflorescencias de *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) y derivados acetilados. Revista Colombiana de Química, 37(2), 135-144.
- Flores, N., Cabrera, G., Jiménez, I.A., Piñero, J., Giménez, A., Bourdy, G., Cortés-Selva, F., Bazzocchi I.L. (2007) Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. Planta Medica, 73(3), 206-11.
- FONAMA, IRD, UMSA, CIPTA. (1999). Tachana. Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas "Ecuánasha aquí, ecuanashaid'renecuana, me schanapaque". La Paz, CID.
- Fuyihiko, I. Akira, A. (1985) Analysis of 1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance of spatulenol by two-dimensional methods. Journal of the Chemical Society: Perkin 2, 1985, 11, 1773-78.
- Goel, R., Sairam, K. (2002) Anti-ulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasma*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. Indian Journal of Pharmacology, 34, 100-110.
- Hermoso, A., Jiménez, A., Mamani, Z., Bazzocchi, I., Piñero, J., et al. (2003). Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 11, 3975-3980.
- Kato, M., Furlan, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. Pure Applied Chemistry, 79(4), 529-38.
- Mitchell, S., Ahmad, M. (2006). A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica 1948-2001. West Indian Medical Journal, 55(4), 243-69.
- Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Gupta, M., Adzet, T., Casanova, J. Cañigueral, S. (1998). Leaf essential oils of three Panamanian *Piper* species. Phytochemistry, 47(7), 1277-1282.
- Orjala, J., Wright, A.D., Erdelmeier, A.J., Sticher, O. & Rali, T. (1993). New monoterpene-substituted dihydrochalcones from *Piper aduncum*. Helvetic Chemistry Acta, 76, 1481-88.
- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O., Prasad, K. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. Phytochemistry, 46(4), 597-673.
- Parthasarathy, U., Jayarajanand, S., Parthasarathy, V. (2006). Biodiversity of *Piper* in South India-application of GIS and cluster analysis. Current Science, 91(5), 652-658.
- Torquillo, H., Pinto, A. Godoy, R. (1999). Essential oil of *Piper permucratum* Yuncker (Piperaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Essential Oil Research, 11(4), 429-230.