

# Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. f.

## *Antimicrobial actions of Illicium verum Hook. f.*

DE M<sup>1</sup>, DE AK<sup>2</sup>, MUKHOPADHYAY R<sup>3</sup>, MIRÓ M<sup>4</sup> Y ANERJEE AB<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, University College of Science, 35 Ballygunge Circular, Road, Calcutta 700 019, India. <sup>2</sup>Indian Science Congress Association, 14 Dr Biresch Guha Street, Calcutta 700 014, India. <sup>3</sup>Medicinal Chemistry Division, Indian Institute of Chemical Biology, 4 Raja S C Mullick Road, Calcutta 700 032, India (\*Corresponding author). <sup>4</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, 18071-Granada, Spain.

### RESUMEN

Entre las diferentes especies de *Illicium*, *Illicium verum* Hook.f., conocido vulgarmente como anís estrellado, posee potentes propiedades antimicrobianas. Los estudios químicos realizados indican que la mayor parte de esta actividad antimicrobiana se debe al anetol [1-metoxi-4-(1-propenil)-benceno] presente en el fruto desecado de esta planta. Ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) con el anetol aislado, en comparación con un patrón de anetol, indicaron que es efectivo sobre diferentes microorganismos, entre los que se encuentran cepas de bacterias, levaduras y hongos.

PALABRAS CLAVE: *Illicium verum*, anetol, actividad antimicrobiana, CMI.

### ABSTRACT

Among the different *Illicium* species, *Illicium verum* Hook.f commonly known as star anise, possesses potent antimicrobial properties. Detailed chemical studies indicate that a major portion of this antimicrobial activity is due to anethole [1-methoxy-4-(1-propenyl)-benzene] present in the dried fruit of this plant. Minimum inhibitory concentration (MIC) studies with isolated anethole, as compared with standard anethole, indicated that it is effective against different microorganisms including bacteria, yeast and fungal strains.

KEY WORDS: *Illicium verum*, anethole, antimicrobial action, MIC.

### INTRODUCCIÓN

De las diferentes especies de *Illicium* presentes en todo el mundo, las principales son *Illicium dunnianum*, *Illicium griffithii*, *Illicium verum* e *Illicium anisatum*. Entre ellas, *Illicium verum* Hooker fillius es atóxica y ha sido usada en preparados culinarios y como medicinal.

*Illicium verum* Hooker fillius, comúnmente llamado anís estrellado, es un miembro de las *Magnoliaceae*. Se distribuye en el Atlántico, Norteamérica y las zonas tropicales y subtropicales de Asia. Se cultiva extensivamente en Kwangsi (Sureste de China) y en Tonkin (Indo-

### INTRODUCTION

Among the different varieties of *Illicium* species present throughout the world, the most frequently occurring ones are *Illicium dunnianum*, *Illicium griffithii*, *Illicium verum* and *Illicium anisatum*. Among these, *Illicium verum* Hooker fillius is non-poisonous and has been used in culinary preparations and also as medicine.

*Illicium verum* Hooker fillius or commonly called star anise, is a member of *Magnoliaceae*. It is distributed in North America, Atlantic and the tropical and subtropical zones of Asia. It is extensively cultivated in a limited area with

china), un área con factores ecológicos particulares. En India, se encuentra principalmente en la zona del extremo Noreste y también en la región de los Ghats occidentales. Los frutos se venden habitualmente en los mercados. El anís estrellado es usado frecuentemente como especia en la cocina china.

El fruto tiene un sabor agradable, aromático, dulce y un grato olor que se parece al anís. Se usa como un agente aromatizante en confitería, caramelos, chicles, tabaco, encurtidos, piensos, licores y preparativos farmacéuticos. También se usa en productos de perfumería y jabones. El fruto se mastica para perfumar el aliento y ayudar a la digestión (1).

*Illicium verum* es un árbol de hoja perenne que alcanza una altura de 8-15 m. La vida media del árbol es de 80-100 años. Los frutos tienen forma estrellada, con 8 carpelos que contienen semillas marrones. Se recolectan antes de su completa madurez, cuando el contenido de aceite esencial es máximo. Se usan como condimento para aromatizar salsas curry, en confitería y licorería y para la conservación de encurtidos.

El aceite esencial de anís estrellado es un líquido de color amarillo pálido. Una muestra del aceite obtenido exclusivamente de los frutos presenta las siguientes propiedades: peso específico 0.984 a 25°C, índice de refracción 1.5572 a 25°C, rotación óptica  $\pm 0.12$  y solubilidad en 1.5 volúmenes o más de etanol de 90° (2).

El aceite esencial de anís estrellado es estimulante, eupéptico, carminativo, suavemente expectorante y diurético (2). Se conoce su utilidad en flatulencias, dolores espasmódicos y disentería. Alivia los cólicos y es un ingrediente común en las pastillas para la tos. El aceite se emplea en reumatismos y también como antiséptico. Es útil contra los piojos y chinches, formando parte de los aerosoles para desparasitar el ganado. Se usa como antipirético y en la sarna. También es muy útil en el estreñimiento y en el insomnio.

Estudios preliminares realizados en nuestros laboratorios revelan que el anís estrellado tiene propiedades antimicrobianas (3). Realizando una búsqueda de especies con actividad antimicrobiana, el extracto alcohólico de anís estrellado mostró una significativa inhibición del crecimiento de algunos microorganismos como *B. subtilis*, *E. coli* y *S. cerevesiae*. Sin embargo, el componente de este extracto responsable de la actividad antimicrobiana no fue identificado entonces.

particular ecological factors in Kwangsi in South East China and Tonkin in Indo-china. In India, it is found mainly in the extreme North Eastern zone and also in the Western Ghats region. The fruits are commonly sold in the markets. Star anise is frequently used as spice in Chinese cuisine. The fruit has an agreeable, aromatic, sweet taste and a pleasant fragrance resembling anise. The fruit is used as a flavoring agent in confectioneries, candies, chewing gums, tobacco, pickles, animal feeds, liquors and pharmaceutical preparations. It is also used in perfumeries and soaps. The fruit is chewed to sweeten the breath and help digestion (1).

*Illicium verum* is an evergreen tree attaining a height of 8-15 m. The average life of the tree is 80-100 years. The fruits are star shaped, consisting of 8 carpels and contain brown seeds. They are collected before they are quite ripe, when the essential oil is at its maximum. It is used as a condiment for flavoring curries, confectionery and spirits and for pickling.

Star anise oil is a pale yellowish liquid. A genuine sample of the oil derived exclusively from the fruit displays the following properties: the specific gravity at 25°C is 0.984, the refractive index at 25°C is 1.5572, optical rotation  $\pm 0.12$ , soluble in 1.5 volumes or more of 90% ethanol (2).

The oil of star anise is stimulant, eupéptic, carminative, mildly expectorant and diuretic (2). It is found to be useful in flatulence, spasmodic pains and dysentery. It relieves colic and is a common ingredient of cough lozenges. The oil is employed as an applicant in rheumatism and also used as an antiseptic. It is useful against body lice, bedbugs and is an ingredient of cattle sprays. It is used in fevers and scabies. It is also highly useful in constipation and insomnia.

Preliminary studies from our laboratories have indicated that star anise has antimicrobial properties (3). While screening other spices for antimicrobial components, alcoholic extract of star anise indicated significant inhibition of growth against some test organisms like *B. subtilis*, *E. coli* and *S. cerevesiae*. However, the exact component of this extract responsible for the antimicrobial activity was not then identified. In this paper, studies have been carried out to identify the antimicrobial components present in *Illicium verum*.

En este trabajo se han realizado ensayos para identificar los componentes antimicrobianos presentes en *Illicium verum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Extracción.** 2.5 kg de frutos desecados de anís estrellado (*I. verum*) obtenidos del Consejo de las Especies, Cochin, India, fueron troceados, molturados y extraídos con 5 l de éter de petróleo (60-80°C) en un aparato Soxhlet durante 7 días. El extracto fue filtrado, concentrado y ensayada su actividad antimicrobiana. El residuo de la extracción fue recogido y percolado en frío con 10-12 l de etanol (90°) durante 21 días. El extracto obtenido fue concentrado a presión reducida y ensayada su actividad antimicrobiana. El extracto concentrado pesó aproximadamente 500 g.

**Cromatografía en columna.** El extracto de éter de petróleo del anís estrellado no mostró ninguna actividad antimicrobiana. Sin embargo, como el extracto etanólico fue muy activo como antimicrobiano, se utilizó en posteriores investigaciones. El extracto desecado (50 g) fue adsorbido en gel de sílice (60-120 mesh, E. Merck) empacado en una columna cromatográfica (90 x 8 cm) y eluído sucesivamente con aproximadamente 2 l de éter de petróleo (60-80°C), 4 l de benceno, 5 l de benceno-acetato de etilo (3:1), 5 l de benceno-acetato de etilo (1:1) y 5 l de acetato de etilo. Los eluatos fueron recogidos, concentrados y reunidos en diferentes fracciones. Las fracciones fueron cromatografiadas en capa fina y se ensayaron sobre *B. subtilis*, *E.coli*, y *S. cerevisiae*. Finalmente las fracciones que presentaban inhibición del crecimiento fueron identificadas y reunidas las que tenían idéntico cromatograma.

**Cromatografía en capa fina (CCF).** La CCF de las mencionadas fracciones fue realizada en silicagel G 60 (Merck) con una fase móvil de éter de petróleo-éter etílico-ácido acético glacial (89:10:1). Aparecieron distintas manchas cuando la placa fue colocada en la cámara de yodo. Las fracciones que contenían una sola mancha fueron reunidas, sometidas a una posterior CCF preparativa y analizadas por CLAR.

**Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).** Los materiales purificados fueron posteriormente analizados por CLAR utilizando una

## MATERIALS AND METHODS

**Extraction.** 2.5 kg of dried of star anise fruit (*I. verum*) obtained from the Spices Board, Cochin, India were broken into pieces, ground and then extracted with 5 l of petroleum ether (60-80°C) in a Soxhlet apparatus for 7 days. The extract was filtered, concentrated and tested for antimicrobial activity. The residue of the extraction was collected and cold percolated with 10-12 l of ethyl alcohol (90%) for 21 days. The extract obtained was concentrated under reduced pressure, and tested for antimicrobial activity. The concentrated extract weighed about 500 g.

**Column Chromatography.** The petroleum ether extract of star anise did not show any antimicrobial activity. However, as the ethyl alcohol extract was found to be highly active as an antimicrobial agent, it was subjected to further investigation. 50 g of the dried extract was adsorbed on silica gel (60-120 mesh, E. Merck) packed into a chromatographic column (90 x 8 cm) and eluted successively with approximately 2 l of petroleum ether (60-80°C), 4 l of benzene, 5 l of benzene-ethyl acetate (3:1), 5 l of benzene-ethyl acetate (1:1) and 5 l of ethyl acetate. The eluants were collected, concentrated and pooled in different fractions. The fractions were subjected to TLC and also tested against *B. subtilis*, *E.coli*, and *S. cerevisiae*. Finally, the fractions showing the growth inhibitory effects were identified and pooled together on the basis of their identical TLC spots.

**Thin Layer Chromatography (TLC).** TLC of the above fractions was carried out on silica gel G 60 (Merck) with solvent petroleum ether-diethyl ether-glacial acetic acid (89:10:1). Distinct spots were found when the plate was put into the iodine chamber. The fractions containing single spot were pooled together, subjected to further preparative TLC and verified by HPLC.

**HPLC Analysis:** The above purified materials were further analyzed by HPLC using reversed phase C-18 Novapack column (15 cm x 4.9 mm) with methyl alcohol-water (60:40) at a flow rate of 2 ml/min, under a pressure of 2400 psi by the Stricher *et al* (4) method as modified by De & Ghosh (5). Anethole was detected at the 100 ng level by UV monitoring at 259 nm using HPLC model 440, Waters Associates. A Comparison was made with the peak given by 20 µg of standard anethole.

columna de fase inversa C-18 Novapack (15 cm x 4.9 mm) con metanol-agua (60:40) a un caudal de 2 ml/min y presión de 2400 psi, según el método de Stricher y col.(4), modificado por De y Ghosh (5). El anetol fue detectado a nivel de 100 ng mediante espectroscopía UV a 259 nm, usando un cromatógrafo CLAR modelo Waters 440. La comparación fue realizada con el pico obtenido por la inyección de 20 µg de anetol patrón.

*Ensayos espectroscópicos.* El compuesto aislado fue sometido a espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS) a una concentración de 200 ppm en etanol, en un espectrofotómetro Karl-Zeiss VSU 1 Varian 634S. El espectro IR del compuesto fue analizado en forma de una fina película líquida en un espectrofotómetro modelo JASCO FT/IR 410. Los espectros <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN fueron realizados en CDCl<sub>3</sub> mediante un espectrofotómetro Bruker DPX-300, empleando TMS como patrón interno. La CG-EM fue realizada en un aparato Fisons Instruments GC 8000, con detector MD 800. La columna usada fue DB-5MS (30m x 0.25 mm).

*Actividad antimicrobiana.* El espectro antimicrobiano se determinó *in vitro*, utilizándose diferentes microorganismos, mediante la técnica habitual en placas de agar. Los organismos de prueba incluyeron hongos saprofitos filamentosos, dermatofitos, patógenos vegetales, levaduras y bacterias. Los organismos se cultivaron en presencia de diferentes dosis (10-100 µg/ml) de los compuestos patrón y problema en medios de agar/levadura según la técnica de Hufford y col.(6). Se consideraba que un organismo era sensible a las muestras cuando su crecimiento era inhibido a todas las dosis. Los diámetros de la zona de inhibición fueron medidos después de incubación a 37°C durante 48 horas y fueron expresados en mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la muestra para un determinado microorganismo era aquella con la que no se observaba ningún crecimiento.

*Patrón.* Se utilizó anetol [1-metoxi-4-(1-propenil)-benceno] Merck como patrón de referencia para los ensayos cromatográficos, espectroscópicos y antimicrobianos.

## RESULTADOS

Los frutos de anís estrellado molidos y desengrasados manifestaron los mayores efectos

*Spectroscopy studies.* The isolated compound was subjected to ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy at a concentration of 200 ppm in ethanol using Karl-Zeiss VSU 1 Varian 634S spectrophotometer. The IR spectrum of the compound was recorded as a thin liquid film on a JASCO Model FT/IR 410 spectrophotometer. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were taken in CDCl<sub>3</sub> on a Bruker DPX-300 spectrophotometer employing TMS as internal standard. GC-MS was recorded on a Fisons Instrument GC 8000 Series, with MD 800 detector. The Column used was the DB-5MS (30m x 0.25 mm).

*Antimicrobial activities.* Antimicrobial spectrum of compounds was determined *in vitro* using different micro organisms by the standard agar cup plate method. The tested organisms included saprophytic filamentous fungi, dermatophytes, plant pathogens, yeasts and bacteria. Organisms were allowed to grow in the presence of different doses (10-100 µg/ml) of test and standard compounds in molten agar/yeast media as followed by Hufford *et al* (6). If the growth of organisms was prevented at any dose of the compound then it was considered that the organism was sensitive towards the test compounds. The zone diameters were measured after incubation at 37°C for 48 hours and were expressed in mm scale. The concentration of the compound at which no growth of the organisms was observed was considered as the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compound for that particular organism.

*Standard compound.* Anethole [1-methoxy-4-(1-propenyl)-benzene] Merck was used as the reference compound for chromatographically, spectroscopic and antimicrobial studies.

## RESULTS

In short, the oil-free and the ground star anise fruits indicated most inhibitory effects against the test organisms when eluted with petroleum ether-benzene (1:10) (Table 1). Subject to TLC gave single spot (C) which corresponded with that of standard anethole (B). Yield of the purified compound was 75%.

The IR, UV, MS and NMR spectra of the isolated compound clearly indicated its identity with anethole. The MS showed the molecular ion peak (M<sup>+</sup>) at *m/z* 148 with distinct fragmen-

inhibitorios frente a los microorganismos de prueba cuando el extracto fue eluido con éter de petróleo-benceno (1:10) (Tabla 1). En la CCF de esas fracciones se observaba una sola mancha, concordante con el patrón de anetol. El rendimiento del compuesto purificado fue del 75%.

Los espectros IR, UV, EM y RMN del compuesto aislado indicaron su identidad con el anetol. La EM mostró el pico de ión molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  148, con distintos picos fragmentados a  $m/z$  133 ( $-CH_3$ ) y  $m/z$  117 ( $-OCH_3$ ). El pico base también confirmó la naturaleza aromática del compuesto.

Esto fue apoyado por los espectros IR y UV. El espectro IR presenta fuertes bandas a 1606, 1509 y 1456  $cm^{-1}$ , mientras que el espectro UV mostró una fuerte absorción a 259 nm, indicando un cromóforo conjugado con el anillo aromático.

El espectro  $^1H$ -RMN (Tabla 2) mostró un anillo fenilo disustituido con dos grupos de protones similares (dos dobletes de protones a  $\delta$  7.22 y 6.79) acoplados en orto ( $J = 8.1$  Hz) y un singlete de tres protones ( $\delta$  3.73) para un grupo metoxilo aromático.

Un doblete de un protón ( $\delta$  6.31,  $J = 16$  Hz) junto con un multiplete de un protón ( $\delta$  6.05) y un doblete de tres protones ( $\delta$  1.82,  $J = 6$  Hz) indicó la presencia de un grupo propenilo. El alto valor de la constante de acoplamiento ( $J = 16$  Hz) entre los protones olefínicos confirmó su posición *trans*. Un intenso pico a 965  $cm^{-1}$  en el espectro IR es también una evidencia de los hidrógenos olefínicos.

Los resultados del  $^1H$ -RMN fueron apoyados por los espectros  $^{13}C$ -RMN (desacoplamiento C-H, DEPT 135 y DEPT 90) del compuesto (Tabla 3). El anillo aromático dio señales para dos carbonos cuaternarios a  $\delta$  158.53 y 130.72,  $C^1$  y  $C^4$  respectivamente.

Dos grupos de señales para carbonos similares fueron observados a  $\delta$  126.79 ( $C^2$  y  $C^6$ ) y 113.81 ( $C^3$  y  $C^5$ ). El carbono del metoxilo aromático ( $C^7$ ) mostró señales a  $\delta$  55.06, mientras que el grupo propenilo dio señales a 130.33 ( $C^8$ ), 123.27 ( $C^9$ ) y 18.27 ( $C^{10}$ ).

Los espectros IR, UV Y RMN ( $^1H$  y  $^{13}C$ ) del compuesto aislado fueron comparados con los del patrón de anetol y resultaron ser idénticos. En los ensayos de CLAR, el anetol aislado presentó un único pico a 16.5 min, concordante con el del patrón. El compuesto presentó una fuerte

ted peaks at  $m/z$  133 ( $-CH_3$ ) and  $m/z$  117 ( $-OCH_3$ ). The parent peak being the base peak also confirmed the aromatic nature of the compound. This was further supported by the IR and UV spectra. IR spectrum displayed strong bonds at 1606, 1509 and 1456  $cm^{-1}$  while the UV spectrum showed strong absorption at 259 nm indicating a chromophore conjugated with aromatic ring.

The  $^1H$  NMR spectrum (Table 2) displayed a disubstituted phenyl ring having two sets of similar protons (two proton doublets at  $\delta$  7.22 and 6.79) ortho-coupled ( $J = 8.1$  Hz) to each other and a three-proton singlet ( $\delta$  3.73) for an aromatic methoxy group. A one-proton doublet ( $\delta$  6.31,  $J = 16$  Hz) together with a one-proton multiplet ( $\delta$  6.05) and a three-proton doublet ( $\delta$  1.82,  $J = 6$  Hz) indicated the presence of a propenyl group. The high value of the coupling constant ( $J = 16$  Hz) between the olefinic protons confirmed their *trans*-relationship. A strong peak at 965  $cm^{-1}$  in the IR spectrum is also evidence for the presence of *trans*-olefinic hydrogens.

The  $^1H$  NMR results were further supported by the  $^{13}C$  (C-H decoupled, DEPT 135 and DEPT 90) spectra of the compound (Table 3). The aromatic ring gave signals for two quaternary carbons at  $\delta$  158.53 and 130.72 for  $C^1$  and  $C^4$  respectively. Two sets of similar carbon signals were observed at  $\delta$  126.79 ( $C^2$  &  $C^6$ ) and 113.81 ( $C^3$  &  $C^5$ ). The aromatic methoxy carbon ( $C^7$ ) showed signals at  $\delta$  55.06, while the propenyl group displayed signals at 130.33 ( $C^8$ ), 123.27 ( $C^9$ ) and 18.27 ( $C^{10}$ ).

The IR, UV and NMR ( $^1H$  and  $^{13}C$ ) spectra of the isolated compound were compared with those of standard anethole and were found to be identical. During HPLC the anethole designated compound exhibited a single peak after 16.5 min which was comparable with standard anethole. The compound gave strong absorption in UV at 259 nm (Fig. 1). The results strongly indicate the purity of the isolated anethole.

Antimicrobial studies with the isolated compound as compared with standard anethole indicated that both are comparable in inhibiting microorganismic growth. The MIC values indicate that this isolated anethole is as effective as the standard anethole in not only inhibiting bacterial growth, but also fungal and yeast growth (Fig. 2 a, b).

absorción UV a 259 nm (Fig. 1). Los resultados indicaron claramente la pureza del anetol aislado.

Los ensayos antimicrobianos con el compuesto aislado en relación con el patrón de anetol indicaron que ambos eran comparables en la inhibición del crecimiento de los microorganismos. Los valores de CMI indicaron que el anetol aislado es tan eficaz como el patrón no sólo en la inhibición del crecimiento bacteriano, sino también en el de hongos y levaduras (Fig. 2 a, b).

**TABLA I.** Efecto de las distintas fracciones de la columna cromatográfica de *I.verum* en el crecimiento de microorganismos.

PRINCIPALES FRACCIONES	ORGANISMOS ENSAYADOS		
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevesiae</i>
Éter de petróleo	-	-	-
Éter de petróleo:Benceno	++	++	++
Benceno	-	-	-
Benceno:Acetato de Etilo	+	+	+
Acetato de Etilo	-	-	-

(- indicates growth of the microorganism).

**TABLE I.** Effect of Different Column Chromatographic Fractions of *I.verum* on Growth of Microorganisms.

MAJOR FRACTIONS	TEST ORGANISMS		
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevesiae</i>
Petroleum Ether	-	-	-
Petroleum Ether:Benzene	++	++	++
Benzene	-	-	-
Benzene:Ethyl Acetate	+	+	+
Ethyl Acetate	-	-	-

(- indica crecimiento del microorganismo).

**TABLA II.** Señales  $^1\text{H}$ -RMN del anetol purificado en  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz con TMS como patrón interno

Carbono Número	Desplazam. Quím. (ppm)	Número de Protones	Constante Acoplam. (J)	( $\text{H}_i$ ) Multiplicidad	Posibles Asignaciones
1	-	-	-	-	-
2	7.22	1H	8.1Hz	doblete	protón aromático acopl. orto
3	6.79	1H	8.1Hz	doblete	protón aromático acopl. orto
4	-	-	-	-	-
5	6.79	1H	8.1Hz	doblete	protón aromático acopl. orto
6	7.22	1H	8.1Hz	doblete	protón aromático acopl. orto
7	3.73	3H	-	singlete	-OCH <sub>3</sub> -
8	6.31	1H	16Hz	doblete	-CH=CH-CH <sub>3</sub>
9	6.05	1H	-	multiplete	-CH=CH-CH <sub>3</sub>
10	1.82	3H	6Hz	doblete	-CH=CH-CH <sub>3</sub>

**TABLE II.**  $^1\text{H}$ MNR signals of purified anethole in  $\text{CDCl}_3$  on 300 MHz spectrometer with TMS as internal standard.

Carbon No	Chemical Shift (ppm)	No of Protons	Coupling Constant (J)	( $\text{H}_i$ ) Multiplicity	Possible Assignments
1	-	-	-	-	-
2	7.22	1H	8.1Hz	doublet	ortho-coupled aromatic proton
3	6.79	1H	8.1Hz	doublet	ortho-coupled aromatic proton
4	-	-	-	-	-
5	6.79	1H	8.1Hz	doublet	ortho-coupled aromatic proton
6	7.22	1H	8.1Hz	doublet	ortho-coupled aromatic proton
7	3.73	3H	-	singlet	-OCH <sub>3</sub> -
8	6.31	1H	16Hz	doublet	-CH=CH-CH <sub>3</sub>
9	6.05	1H	-	multiplet	-CH=CH-CH <sub>3</sub>
10	1.82	3H	6Hz	doublet	-CH=CH-CH <sub>3</sub>

**TABLA III.** Datos espectrales  $^{13}\text{C}$ -RMN (75MHz) del anetol extraído en  $\text{CDCl}_3$ .

Carbono Núm.	Desplazam. Químico (ppm)	Asignación
C <sub>1</sub>	158.53	cuaternario aromático
C <sub>2</sub>	126.79	metino aromático
C <sub>3</sub>	13.81	metino aromático
C <sub>4</sub>	130.72	cuaternario aromático
C <sub>5</sub>	113.81	metino aromático
C <sub>6</sub>	126.79	metino aromático
C <sub>7</sub>	55.06	metoxilo aromático
C <sub>8</sub>	130.33	metino olefínico
C <sub>9</sub>	123.27	metino olefínico
C <sub>10</sub>	18.27	metilo

**TABLE III.**  $^{13}\text{C}$ NMR (75MHz) spectral data of extracted anethole in  $\text{CDCl}_3$ .

Carbon No	Chemical shift (ppm)	Assignment
C <sub>1</sub>	158.53	aromatic quaternary
C <sub>2</sub>	126.79	aromatic methine
C <sub>3</sub>	13.81	aromatic methine
C <sub>4</sub>	130.72	aromatic quaternary
C <sub>5</sub>	113.81	aromatic methine
C <sub>6</sub>	126.79	aromatic methine
C <sub>7</sub>	55.06	aromatic methoxy
C <sub>8</sub>	130.33	olefinic methine
C <sub>9</sub>	123.27	olefinic methine
C <sub>10</sub>	18.27	methyl



FIGURA 1. Absorción UV del anetol extraído y patrón.

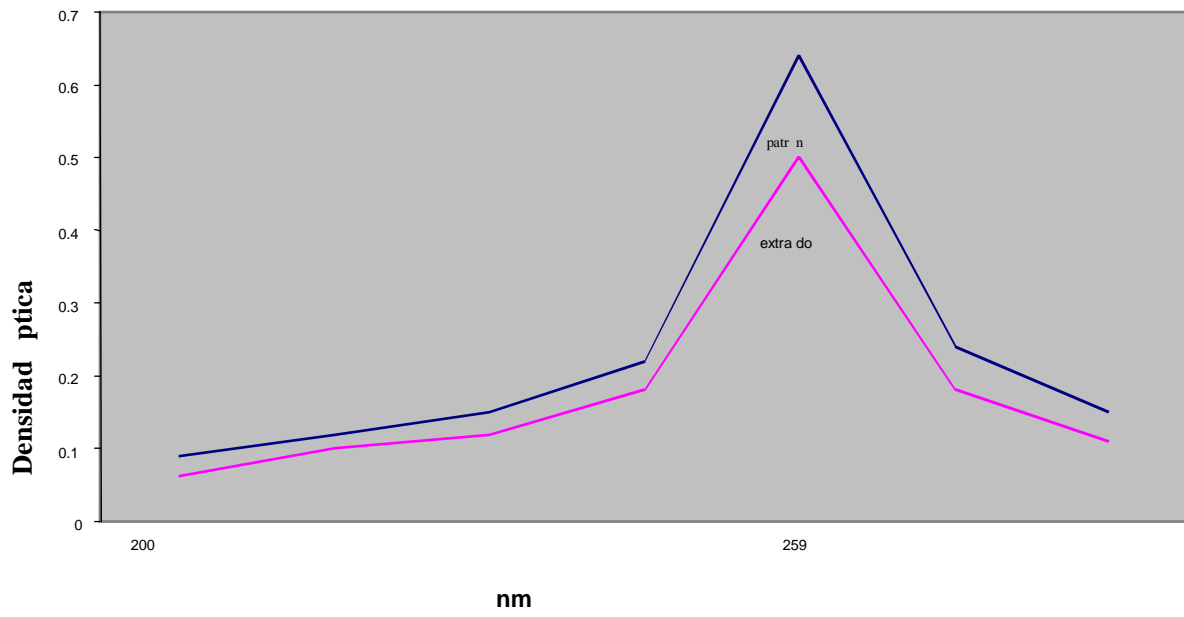


FIGURE 1. UV absorption of standard and extracted anethole.

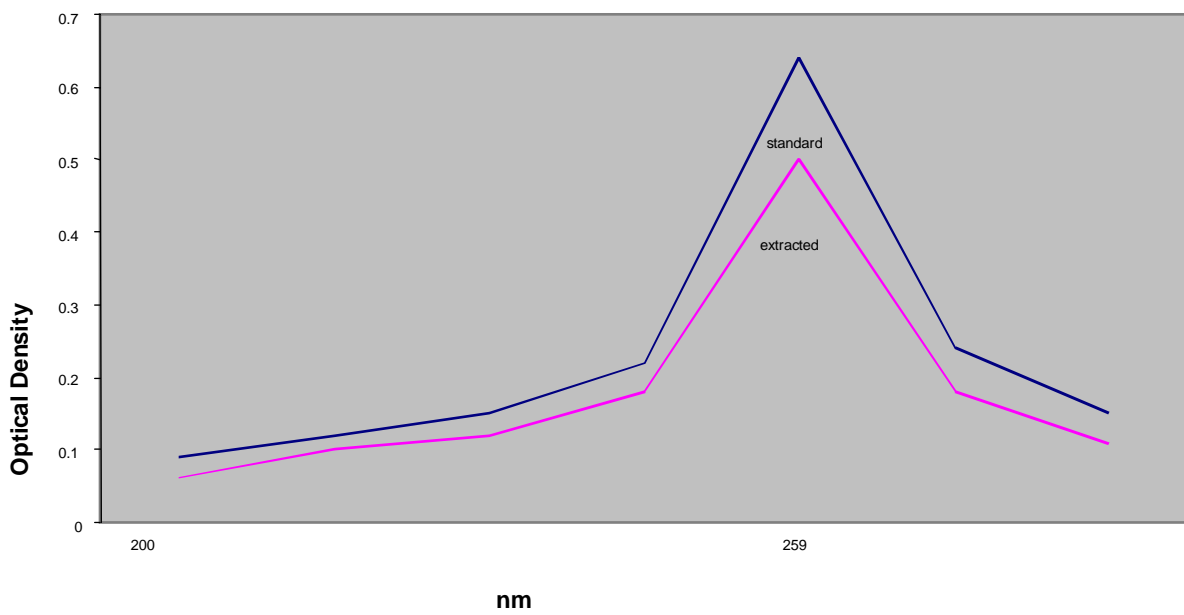
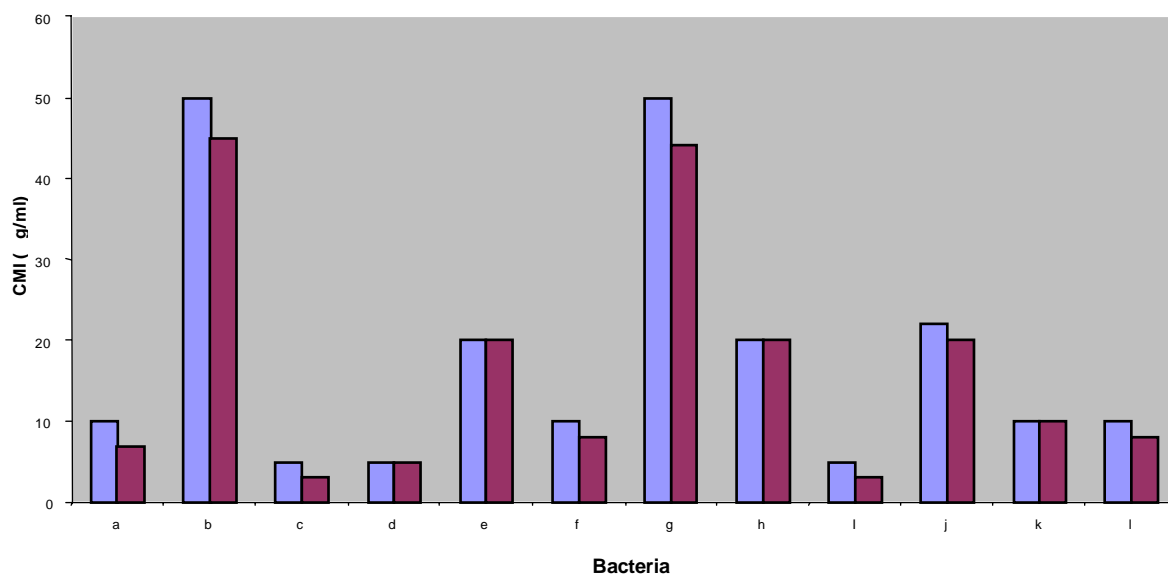


FIGURA 2A. CMI del anetol patrón (barras de la izquierda) y extraído (barras de la derecha) sobre diversos microorganismos (bacterias).

FIGURE 2A. MIC of standard (left bars) and extracted anethole (right bars) against different microorganisms (bacteria).



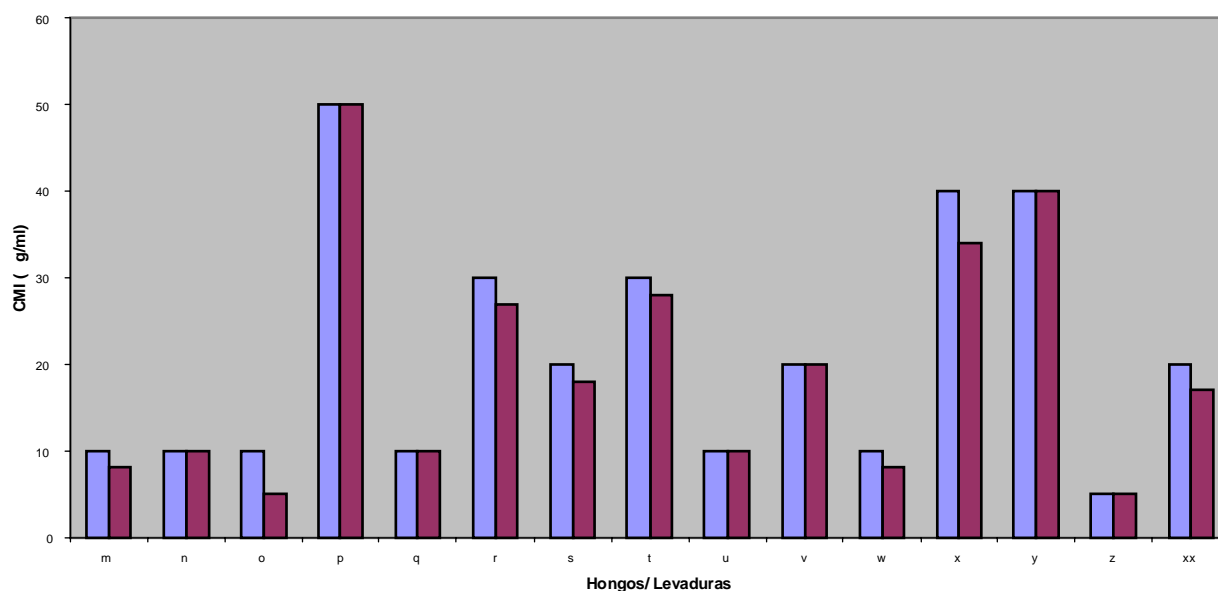
a. *Escherichia coli*  
 b. *Klebsiella pneumoniae*  
 c. *Sarcina lutea*  
 d. *Rhizobium leguminosarum*

e. *Klebsiella aerogenes*  
 f. *Agrobacterium tumefaciens*  
 g. *Bradyrhizobium japonicum*  
 h. *Staphylococcus aureus*

i. *Bacillus subtilis*  
 j. *Bacillus megatarium*  
 k. *Bacillus licheniformis*  
 l. *Bacillus cereus*

FIGURA 2B. CMI del anetol patrón (barras de la izquierda) y extraído (barras de la derecha) sobre diversos microorganismos (hongos/levaduras).

FIGURE 2B. MIC of standard (left bars) and extracted anethole (right bars) against different microorganisms (fungi/yeasts).



m. *Sclerotium rolfsii*  
 n. *Macrophomina phaseolina*  
 o. *Fusarium spp*  
 p. *Aspergillus niger*  
 q. *Helminthosporium oryzae*

r. *Aspergillus flavus*  
 s. *Trichophyton rubrum*  
 t. *Curvalaria spp*  
 u. *Myrothecium roridum*  
 v. *Exserohilum furcicum*

w. *Penicillium cryogenum*  
 x. *Pestalotiopsis versicolor*  
 y. *Aspergillus versicolor*  
 z. *Saccharomyces cerevisiae*  
 xx. *Saccharomyces pombe*

## DISCUSIÓN

Hasta la fecha se han realizado muy pocos trabajos sobre la composición química del anís estrellado indio. Los datos sobre el anís (*Pimpinella anisum*) y el hinojo (*Foeniculum vulgare*), del grupo del anís estrellado, indican que el *trans*-anetol es el componente principal, con algunos derivados del anetol y pequeñas cantidades de sesquiterpenos (7).

Algunos trabajos indican que el anís estrellado contiene anetol como uno de los compuestos principales (8). Sin embargo, no está disponible en la literatura ningún método simple y claro para aislar el anetol de *Illicium verum*.

El anetol es un compuesto terapéuticamente importante, con actividades antiinflamatorias y antifúngicas (9,10,11,12).

La actual demanda de agentes antimicrobianos naturales (tanto antifúngicos como antibacterianos) y la interminable búsqueda de principios naturales biológicamente activos, justifica el desarrollo de un método para el aislamiento de anetol de alta pureza a partir de la especie india *Illicium verum*, ampliamente disponible en la zona.

De este estudio se desprende que la actividad antimicrobiana del anís estrellado se debe principalmente al anetol. Sin embargo, durante el aislamiento del anetol, otras fracciones también presentaron componentes secundarios con alguna actividad antimicrobiana, que puede no ser debida al anetol. En este momento estamos trabajando para identificar estos componentes y comprobar su posible actividad antimicrobiana.

## DISCUSSION

Very little work has been done to date on the chemical composition of Indian star anise. Data on anise seeds (*Pimpinella anisum*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) of the star anise group indicate that *trans*-anethole is the main component, with some derivatives of anethole and small quantities of sesquiterpenes (7). Some reports indicate that star anise contains anethole as one of the major compounds (8). However, no simple and clear method for isolating anethole from *Illicium verum* is available in current literature.

Anethole is a therapeutically important compound, with anti-inflammatory and anti-fungal activities (9,10,11,12).

With the demand for naturally occurring antimicrobial (both antifungal and antibacterial) agents and a never ending search for natural biologically-active products, it is therefore of interest to develop a method for the isolation of highly purified anethole from the locally available Indian *Illicium verum* species.

With the results obtained from this study, it is clear that the antimicrobial activity of star anise is mainly due to anethole. However, while isolating anethole, other fractions also indicated minor compounds with some antimicrobial activities, which possibly, may not be attributed to anethole. Studies are now being undertaken to identify these compounds and to test their possible antimicrobial activity.

## BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- 1 Wealth of India, vol. 1, Raw Materials. CSIR, New Delhi, India (1948) p 253.
- 2 Verghese J. The world of spices and herbs. Spice India 1998; 11: 15-18.
- 3 De M, De AK, Sen P, Banerjee AB. Isolation of antimicrobial compounds from star anise. Proceedings of National Conference on Recent Trends in Spices and Medicinal Plant Research, 1998, B-7.
- 4 Stricher O, Soldati F, Jhoshi RK. HPLC separation and quantitative determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nor-dihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures *and fructus capsici*. J Chromatog 1978; 166: 221-231.
- 5 De AK, Ghosh JJ. Inflammatory effects of acute and chronic capsaicin treatment on rat paw. Phytother Res 1988; 2: 175-179.
- 6 Hufford CD, Funderburk MJ, Morgan JM, Robertson LW. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. J Pharm Sci 1975; 65: 789-792.
- 7 Sy L, Brown GD. Novel phenylpropanoids and lignans from *Illicium verum*. J Nat Prod 1998; 61: 987-992.
- 8 Kowk LL. Selective isolation of anethole from *fructus anisi stellati* (star anise) by supercritical fluid extract. Analytical Communic 1996; 33: 175-176.
- 9 Curtis OF, Shetty K, Cassagnol G, Peleg M. Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, eugenol, carvacrol, thymol) on a food spoilage yeast (*Debaromyces hansenei*). Food Biotechnol 1996; 10: 55-73.

- 10 Daw ZY. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production by some essential oils. Chem Mikrobiol Technol Lebensmittel 1994; 16: 129- 135.
- 11 Karapinar M, Aktug SE). Inhibition of food borne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. Int J Food Microbiol 1987; 4: 161-166.
- 12 Hosono A. Effect of spice extract on fungal inhibition. Lebensmitte Wissenschaftand Technol 1996; 29: 286-288.