

COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL PROVENIENTE DE LA HOJAS DE *Piper pubinervulum* C. DC PIPERACEAE

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
THE ESSENTIAL OIL FROM LEAVES OF *Piper pubinervulum* C. DC PIPERACEAE

Paco F. Noriega^{1,*}, Tatiana Mosquera¹, Juan Abad¹, Diana Cabezas¹, Sebastián
Piedra¹, Ivonne Coronel¹, María E. Maldonado¹, Anna Bardiserotto², Silvia
Vertuani² y Stefano Manfredini²

¹ Universidad Politécnica Salesiana, Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad, Av 12 de Octubre No 24-22 y Wilson, Teléfono: (593) 2 3962900, Quito, Ecuador.

² Università degli studi di Ferrara, Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie, Via L. Borsari 46, 44121, Ferrara, Italia.

*Autor para correspondencia: pnoriega@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 14 de marzo de 2016. Aceptado, tras revisión, el 12 de octubre de 2016.

Resumen

Piper pubinervulum C. DC., es una planta medicinal utilizada por los indígenas amazónicos del sur del Ecuador, las hojas poseen características aromáticas. El objetivo de la presente investigación es la de extraer y analizar las propiedades químicas y de actividad biológica del aceite esencial proveniente de las hojas. El estudio de composición química a través de GC-EM y RMN ¹H arrojó la detección de 44 constituyentes dentro de los cuales β cariofileno, isoeugenol-metil éter, asarona y el nerolidol fueron los mayoritarios. La Actividad antioxidante del aceite fue evaluada por los métodos DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) y la fotoquimioluminiscencia (PCL). Adicionalmente se realizaron estudios de actividad empleando (HP)TLC-DPPH bioautográficos. La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de difusión de disco en dos bacterias Gram+, dos bacterias Gram- y dos levaduras. Los resultados más interesantes se producen con las dos levaduras *Candida tropicalis* (MIC 0,77 mg/ml) y *Candida albicans* (MIC 0,33mg/ml) donde la actividad fue similar al aceite esencial de *Thymus vulgaris* el estándar natural de referencia. Los buenos resultados con respecto a la actividad antifúngica nos llevan a concluir que el aceite esencial podría ser usado con esta finalidad.

Palabras claves: GC/EM, DPPH and ABTS test, MIC, bioautobiografía.

Abstract

Piper puvinerulum C. DC. is a medicinal plant used by Amazon Indians in southern Ecuador, the leaves possess aromatic characteristics. The objective of this research is to extract and analyze the chemical properties and biological activity of the essential oil from the leaves. The study of the chemical composition based on analysis GC-MS and ¹H RMN data resulted in the identification of 44 compounds including the main components: β-caryophyllene (1), isoeugenol methyl ether (2), asarona (3), and nerolidol (4). The antioxidant potential of the oils was assessed with the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), Photochemiluminescence and bioautographic HPTLC-DPPH methods. The antimicrobial activity was evaluated by means of disc diffusion method while the antimicrobial effect was evaluated in two Gram+ bacteria, two Gram- bacteria, and two yeasts. The essential oil was found effective against *Candida tropicalis* (MIC 0,77 mg/ml) and *Candida albicans* (MIC 0,33mg/ml) yeasts in a manner similar to the reference essential oil of *Thymus vulgaris*. The positive results in terms of antifungal activity suggest that the essential oil could be used for this purpose.

Keywords: GC/MS, DPPH and ABTS test, bioautography MIC.

Forma sugerida de citar: Noriega, P., T. Mosquera, J. Abad, D. Cabezas, S. Piedra, I. Coronel, M. E. Maldonado, A. Bardiserotto, S. Vertuani y S. Manfredini. 2016. **Composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial proveniente de la hojas de *Piper puvinerulum* C. DC Piperaceae.** La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 24(2):111-123. ISSN: 1390-3799.

1 Introducción

La Familia Piperaceae cuenta con unas 1919 especies distribuidas en las zonas tropicales. En la América tropical se tienen alrededor de 700 especies (Jaramillo y Manos, 2001). En Ecuador se tienen 4 géneros y 441 especies, de las cuales 134 son endémicas (Jørgensen y León-Yáñez, 1999).

P. pubinervulum está reducidamente distribuida en la cordillera oriental en Morona Santiago y la región del noreste de Perú, en la reserva Santiago-Comaina (Macbride, 1960). Es un arbusto perenne, con tallo leñoso de nudos engrosados y de consistencia herbácea frondosa, que alcanza los 3 m de altura; posee grandes hojas acorazonadas, lanceoladas de olor penetrante, levemente pubescente y flores blancas rudimentarias; con espigas opuestas a las hojas se asemejan a espigas como cordoncillos que producen un fruto de pulpa pequeña (Plant Caterpillar Parasitoid Interactions, 2013).

Aunque no se encuentra información etnofarmacológica sobre la planta, los principales usos populares son antigastrálgico, antireumático, analgésico y para contrarrestar las mordeduras de serpientes.

Dentro de los estudios de composición química y actividad biológica de especies de Piperaceae de origen amazónico, se destacan aquellos realizados en *Piper aduncum* (Oliveira *et al.*, 2013; Guerrini *et al.*, 2009), en el primera investigación se destaca la presencia de 1,8 cineol y en la segunda de dillapiol, *Piper hispidinervum* (Sauter *et al.*, 2012) en donde el componente principal es el safrol, *Piper auritum* (Diego, 2012) cuya molécula mayoritaria es el safrol y se resalta su actividad antifúngica, en *Piper holtonii* (Diego, 2012) la molécula más abundante es el apiol y se observa una muy buena actividad antifúngica, y *Piper divaricatum* (Barbosa *et al.*, 2012) en donde se observa un elevado contenido de safrol y una buena actividad antimicrobiana, entre los estudios más importantes.

El presente estudio centra su investigación en el análisis del aceite esencial proveniente de las hojas de *P. pubinervulum* debido a que esta parte de la planta es la usada por las comunidades indígenas y a que la misma al igual que otras variedades de piperáceas posee una aromaticidad característica. Para la especie en estudio no se encuentra información de composición química de su aceite esencial así como de actividad biológica, por lo que esta primera investigación tiene una importancia funda-

mental en la valoración de este recurso biológico de la amazonia ecuatoriana.

2 Materiales y métodos

2.1 Material vegetal

Las hojas de *P. pubinervulum* fueron recolectadas en la estación biológica Shakaim de la localidad amazónica de Huamboya, situada a 347 km al sureste de Quito, en la provincia de Morona Santiago. En las coordenadas, latitud 01°48'0.26"S; longitud 78°14'60"W, y a una altitud de 1.080 m.s.n.m. El reconocimiento botánico estuvo a cargo del Herbario del Instituto de Investigación y Posgrado de la Universidad Central del Ecuador.

El aceite esencial se obtuvo mediante destilación en corriente de vapor de las hojas frescas en un destilador de 250 L de capacidad. El rendimiento del aceite [% (p/p)] fue calculado considerando el peso del material vegetal; fue determinada la densidad empleando el método del picnómetro (Durst y Gokel, 1985).

2.2 Análisis GC/EM

El aceite esencial fue analizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Se usó un gas cromatógrafo Varian 3900, equipado con una columna Factor four VF-5ms (5%-fenil-95% dimetil polixiloxano) de 30 m de largo, con un diámetro interno de 0,25 mm y una película de 0,25 μ m, directamente acoplada a un espectrómetro de masas Varian 2100. El gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min, y un split ratio de 1:50. El análisis inicia a los 45°C y llega a los 100°C a una velocidad de 1°C por minuto, posteriormente se eleva a una temperatura de 250°C a una velocidad de 5°C, manteniéndose a esa temperatura por 15 minutos, el tiempo final de análisis fue de 90 minutos.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: energía de ionización, 70 eV; corriente de emisión, 10 μ Amp; velocidad de barrido, 1 scan/min; rango de masa, 35-400 Da; temperatura de la trampa 220°C; temperatura de línea de transferencia, 260°C.

2.3 Determinación de la composición del aceite esencial

La identificación de los compuestos fue efectuada por comparación de los espectros producidos por

ionización electrónica con la base de datos electrónica NIST 2001.

Adicionalmente se calcularon los índices de retención experimentales que fueron determinados en relación a los tiempos de retención de una serie de n-alcanos (C10-C30) estándar Sigma Aldrich. Fueron analizados los índices de retención teóricos comparados con bases de datos de espectros en moléculas aromáticas (Adams, 2007; Adams, 2012).

2.4 Espectroscopia RNM ^1H

El aceite entero fue analizado por el método RNM ^1H , con la finalidad de identificar los compuestos mayoritarios con base en datos descritos (Rossi et al., 2011; Noriega et al., 2014).

El espectro RNM ^1H fue obtenido en un espectrofotómetro Varian VNMRs-400 que opera a 399.97 MHz a una temperatura de 298 K. El aceite esencial a una concentración de 24 mg/ml se disolvió en cloroformo deuterado en tubos RMN de 5 mm de diámetro, el solvente usado para la calibración espectral fue cloroformo deuterado (^1H 7,26 ppm). El espectro ^1H se corrió utilizando una secuencia de pulso standar "s2pul", con 45.0 grados de impulso, y 3 segundos como tiempo de adquisición, con 8 repeticiones, 6400 Hz de ancho espectral, 0,33 Hz Resolución Fid. Las señales del espectro fueron comparadas con estándares puros de β cariofileno, nerolidol y asarona, presentes en diversas bases de datos (Predict ^1H Proton NMR spectra, 2013; BioPhat.Explore, 2013).

2.5 Estudio de las propiedades antioxidantes

Las propiedades antiradicalar y antioxidante del aceite de *P. pubinervulum* fueron analizadas por diversos ensayos: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) espectrofotométrico (Chen et al., 1999); DPPH en cromatografía de capa delgada de alta resolución (DPPH-(HP)TLC) (Rossi et al., 2011); (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (ABTS) espectrofotométrico (Scartezzini et al., 2006; Miller et al., 1996), y la Fotoquimioluminiscencia (PCL) (Popov y Lewin, 1996).

2.6 DPPH y ABTS espectrofotométrico

Para el ensayo DPPH se tomaron diversas cantidades del aceite de *P. pubinervulum* que fueron disuel-

tas en dimetil sulfóxido (DMSO) hasta un volumen de 100 μl . A cada solución se le añadieron 2,9 ml de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; $1 \times 10^{-4}\text{M}$ en etanol), a esta solución se la agitó vigorosamente por 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las absorbancias fueron medidas a 517 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240.

De forma similar se procedió con el test ABTS, a cada solución disuelta en DMSO se añadió 0,9 ml de (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonic ácido) diamonio sal) $1 \times 10^{-3}\text{M}$ radicalizado previamente con una solución de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ $7 \times 10^{-2}\text{M}$. Las absorbancias fueron medidas a 734 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV mini 1240. La actividad antiradicalar para cada mezcla fue calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I_{\text{pDPPH}}\% = \frac{A_b - A_a}{A_b} \times 100, \quad (1)$$

donde A_b y A_a son las absorbancias del blanco y de las muestras respectivamente luego de 30 min (DPPH) y 1 minuto ABTS. La actividad anti radicalar del aceite se evalúa con el cálculo del IC_{50} , que equivale al 50% de la inhibición de la oxidación del DPPH y el ABTS, este se calculó de los datos de las curvas de calibración obtenidas de los datos de la concentración en función del porcentaje de inhibición. Como referentes de actividad se empleó el aceite esencial de *T. vulgaris* y el BHA (butilhidroxianisol).

Los ensayos se hicieron por cuadruplicado para de esta manera calcular la desviación estándar en cada determinación de la capacidad inhibitoria al 50% (IC_{50}).

2.7 Fotoquimioluminiscencia

La fotoquimioluminiscencia (Photochemiluminescence PCL) mide la capacidad antioxidante en sustancia puras o en mezclas complejas sea en fase lipófila (ACL) o hidrófila (ACW). Para la medida de la actividad antioxidante del aceite esencial de *P. pubinervulum* se utilizó la metodología (ACL) por ser la más aconsejable para trabajar con aceites esenciales (Ziosi et al., 2010), como control positivo de actividad se usó el aceite de *Thymus vulgaris* y Trolox como estándar de referencia.

Todos los análisis realizados tanto en el aceite en ensayo (*P. pubinervulum*), como en el patrón natural (aceite de *T. vulgaris*) y blanco positivo sintético BHA, fueron realizados por triplicado usando un

análisis de varianza (ANOVA), empleando el programa STATISTICA 5.5. Un valor de probabilidad de $p \leq 0.05$ fue considerado como la significancia estadística.

2.8 Ensayo de actividad antiradicalar bioautográfica en cromatografía en capa delgada de alta resolución (DPPH-HP)TLC

La TLC bioautográfica es un ensayo de actividad antiradicalar que usa el radical DPPH para revelar la actividad separada de los compuestos en una mezcla compleja (Rossi *et al.*, 2011).

Para la prueba fueron disueltos 30 μ l de aceite de *P. pubinervulum* en 1 ml de metanol, se aplicaron directamente en una placa de sílica gel de alta resolución marca Merck 60, con indicador de fluorescencia F 254, las bandas fueron diseminadas con un espesor de 10 mm con la ayuda de un aplicador Linomat V (Camag). La fase móvil utilizada fue de tolueno/acetato de etilo/éter de petróleo (97/7/20).

En la placa desarrollada fue diseminada una solución metanólica de DPPH a una concentración de 0,5% (p/v), para determinar las fracciones activas y analizar su composición química con un análisis posterior de las moléculas en GC/EM.

2.9 Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica

2.9.1 Evaluación de la mínima concentración inhibitoria MIC

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se siguió la metodología de difusión en disco descrita en varias investigaciones con aceites esenciales (Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Adam *et al.*, 1998; Benkeblia, 2004). Fueron empleadas: Bacterias Gram+; *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 6538 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Bacterias Gram-; *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Levaduras; *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida albicans* ATCC 10231.

La actividad antimicrobiana se describe como la mínima concentración inhibitoria (MIC), en mg/ml,

se usó como patrón natural de referencia aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

La evaluación se realizó por triplicado, considerándose como valor de la mínima concentración inhibitoria a aquella que tenía dos coincidencias en tener un halo de inhibición superior a 1 mm por fuera del disco estéril.

2.9.2 Ensayo de actividad antimicrobiana bioautográfica en cromatografía en capa delgada de alta resolución HP-TLC

Son varios los estudios que detallan la evaluación de la actividad antimicrobiana bioautográfica (Rossi *et al.*, 2011; Purkayastha *et al.*, 2012; Sadgrove *et al.*, 2014), como una metodología útil en el estudio individualizado de las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana.

Para el ensayo se desarrolló una placa HPTLC usando como solvente una mezcla de tolueno/acetato de etilo/éter de petróleo (97/7/20), los volúmenes de siembra del extracto fueron diversos (20, 15 y 10 μ l) de una solución del aceite en metanol (30 mg/ml), realizados con la ayuda de un aplicador Linomat V (Camag). A la placa desarrollada se cubrió con un medio de cultivo que contenía una dilución de microorganismos; *S. aureus* (gram +) ATCC 6538 y *E. coli* (gram +) ATCC 8739. Además el medio contenía una solución de colorante TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride) para comprobar la vitalidad microbiana.

3 Resultados

3.1 Extracción del aceite esencial

El rendimiento promedio del aceite fue del 0,049% p/p, la densidad del mismo fue de 0,9652 g mL⁻¹.

3.2 Composición química

En el aceite esencial fueron detectados 44 compuestos de los cuales fueron identificados 36 que equivalen al 94,249% (Tabla 1) y los compuestos más abundantes incluyen al β -cariofileno, iso-eugenol metil éter, asarona y el nerolidol (Figura 1). La mayoría de los componentes son sesquiterpenos oxigenados.

Tabla 1. Moléculas presentes en el aceite esencial de *P. pubinervulum*.

N	Nombre del Compuesto	Porcentaje identificado	Porcentaje no identificado	IKt	IK ex	Método
1	α -Pino	0,26 \pm 0,13 %		939	944	GC-MS
2	β -Pino	0,52 \pm 0,23 %		979	991	GC-MS
3	linalol	1,40 \pm 0,15 %		1096	1114	GC-MS
4	(-)- α -copaeno	1,48 \pm 0,25 %		1376	1387	GC-MS
5	β -cubebeno	0,24 \pm 0,02 %		1388	1397	GC-MS
6	(-)- β -elemeno	1,63 \pm 0,13 %		1390	1398	GC-MS
7	(-)- α -gurjuneno	0,35 \pm 0,04 %		1409	1416	GC-MS
8	β -cariofileno	13,18 \pm 2,59 %		1419	1430	GC-MS RMN- ¹ H
9	β -copaeno	0,50 \pm 0,03 %		1432	1443	GC-MS
10	α -humuleno	1,18 \pm 0,13 %		1454	1468	GC-MS
11	(-)-allo-aromadendreno	0,48 \pm 0,13 %		1460	1473	GC-MS
12	(+)- γ -muurolo	0,52 \pm 0,08 %		1479	1490	GC-MS
13	germacreno D	3,00 \pm 0,32 %		1481	1494	GC-MS
14	(+)- β -selineno	1,25 \pm 0,10 %		1490	1501	GC-MS
15	(E)-muurolo-4-(14),5-dieno	0,31 \pm 0,03 %		1493	1504	GC-MS
16	bicyclgermacreno	3,01 \pm 0,35 %		1500	1510	GC-MS
17	(+)- α -muurolo	0,68 \pm 0,03 %		1500	1515	GC-MS
18	iso-eugenol metil éter	7,56 \pm 0,41 %		N.D.	1523	GC-MS
19	(-)- α -bulseneno	2,20 \pm 0,56 %		1509	1527	GC-MS
20	(-)-7-epi- α -selineno	0,97 \pm 0,17 %		1522	1531	GC-MS
21	(-)- δ -cadineno	3,12 \pm 0,04 %		1523	1538	GC-MS
22	elemicina	1,09 \pm 0,06 %		1557	1577	GC-MS
23	(E)-nerolidol	8,54 \pm 0,97 %		1562	1584	GC-MS RMN- ¹ H
24	γ -asarona	8,81 \pm 0,34 %		1574	1592	GC-MS
25	espathulenol	2,43 \pm 0,11 %		1578	1599	GC-MS
26	óxido de cariofileno	4,99 \pm 0,51 %		1583	1603	GC-MS
27	N.I.		0,52 \pm 0,20 %	N.D.	1608	GC-MS
28	globulol	0,38 \pm 0,13 %		1590	1618	GC-MS
29	N.I.		0,47 \pm 0,06 %	N.D.	1629	GC-MS
30	humuleno epóxido II	0,69 \pm 0,13 %		1608	1635	GC-MS
31	N.I.		0,38 \pm 0,09 %	N.D.	1654	GC-MS
32	N.I.		0,35 \pm 0,12 %	N.D.	1661	GC-MS

N	Nombre del Compuesto	Porcentaje identificado	Porcentaje no identificado	IKt	IK ex	Método
33	10-epi- α -muurolol	0,73 \pm 0,10 %		1640	1670	GC-MS
34	N.I.		0,53 \pm 0,09 %	N.D.	1675	GC-MS
35	dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido <4,6->	7,37 \pm 0,66 %		1654	1678	GC-MS
36	α -cadinol	1,78 \pm 0,13 %		1654	1683	GC-MS
37	N.I.		1,94 \pm 0,11 %	N.D.	1687	GC-MS
38	N.I.		0,35 \pm 0,16 %	N.D.	1700	GC-MS
39	asarona	3,56 \pm 0,33 %		1676	1706	GC-MS RMN- ¹ H
40	(-)- α -bisabolol	0,66 \pm 0,02 %		1685	1717	GC-MS
41	N.I.		0,59 \pm 0,16 %	N.D.	1724	GC-MS
42	thujopseno <-cis>	0,45 \pm 0,06 %		1708	1739	GC-MS
43	(E)-geranil linalol	4,53 \pm 0,77 %		2026	2052	GC-MS
44	N.I.		0,18 \pm 0,09 %	N.D.	2528	GC-MS

Tabla 2. IC₅₀ para el aceite esencial de *P. pubinervulum* y *T. vulgaris* por los test DPPH y ABTS.

Aceites esenciales y control positivo	DPPH IC ₅₀ μ g mL ⁻¹	ABTS IC ₅₀ μ g mL ⁻¹
<i>P. pubinervulum</i>	20399 \pm 80	416 \pm 7,0
<i>T. vulgaris</i>	388 \pm 20	2 \pm 0,000
BHA	59 \pm 20	1,5 \pm 0,000

Tabla 3. Fotoquimioluminiscencia (PCL) del aceite esencial de *P. pubinervulum* en contraste con el aceite de *Thymus vulgaris* expresado como μ mol de equivalentes de trolox por gramos de muestra.

Essential oils	μ mol Trolox g ⁻¹ (P \leq 0.05)
<i>P. pubinervulum</i>	1,8
<i>T. vulgaris</i>	272.0

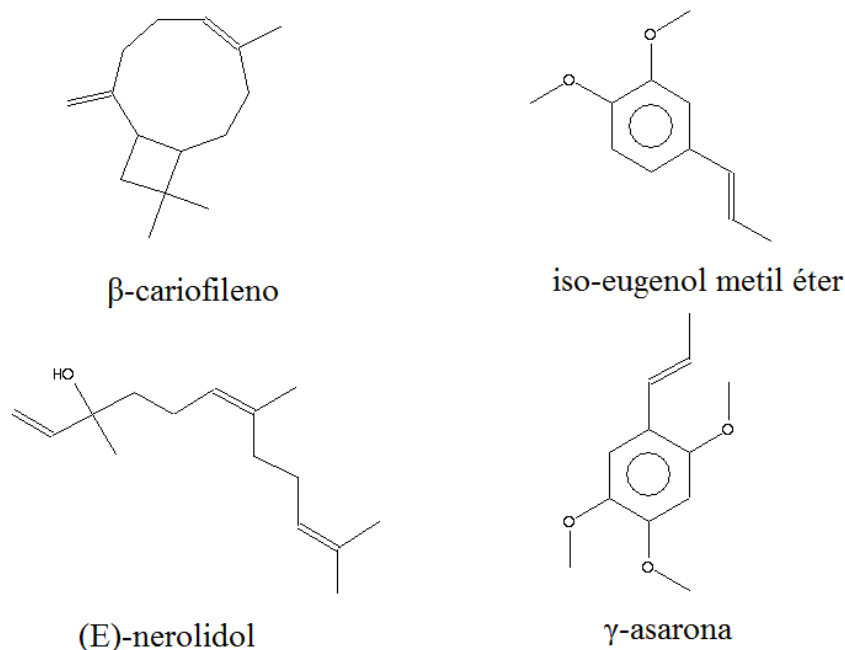


Figura 1. Constituyentes más abundantes en el aceite esencial de *P. pubinervulum*.

El análisis RMN ^1H hecho al aceite esencial evidenció la presencia de 3 compuestos que tuvieron los siguientes desplazamientos químicos en ppm:

cariofileno	nerolidol
a) 0,994/0,958	a) 1,595/1,586
b) 1,259	b) 1,666/1,654
c) 1,863/1840 y	c) 5,176/5,173 y
d) 5,051/4,994;	d) 5,219/5,216; y

asarona

- a) 3,864/3,3776 y
b) 6,503,

de los cuales en literatura se tenían sus respectivos espectros, los cuales fueron usados para comparar las señales individuales de cada uno de ellos (Figura 2).

3.3 Evaluación de actividad antioxidante

3.3.1 DPPH and ABTS test

Para evaluar la actividad antiradicalar del aceite esencial se procedió a calcular su IC₅₀ (concentración necesaria para inhibir el 50% de la oxidación), tanto para el método DPPH, como para el ABTS (Tabla 2). Como patrón de referencia natural se usó el aceite esencial de *T. vulgaris* y como compuesto de referencia el butil hidroxianisol (BHA).

3.3.2 PCL Test

Los resultados de la actividad antioxidante expresada como micro moles de trolox por gramo necesarios para inhibir la oxidación del luminol (Tabla 3).

En este test los resultados tienen una relación directa es decir a mayor equivalencia $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, mayor es la actividad antioxidante, el valor de $1.2 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, comparados con los $272 \mu\text{mol Trolox g}^{-1}$, dan a entender de una actividad antioxidante discreta en el aceite de *P. pubinervulum*.

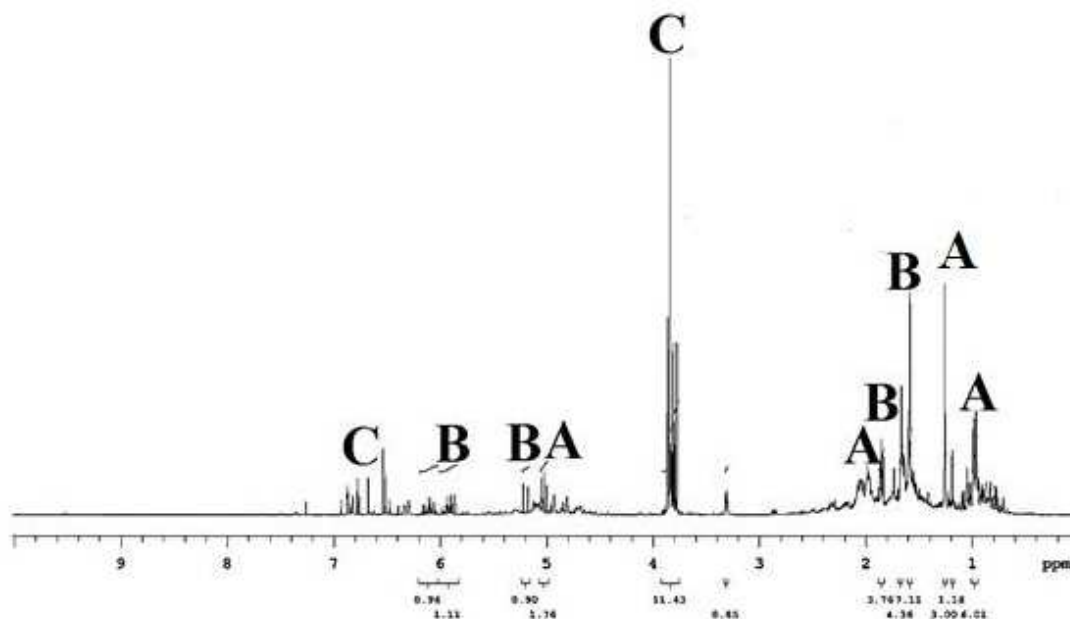


Figura 2. Espectro RMN ^1H del aceite esencial de *P. pubinervulum*. A: Señales del cariofileno, B: Señales del nerolidol, C: Señales de la asarona.

3.4 Actividad antiradicalar bioautográfica en cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC-DPPH)

La separación cromatográfica en capa fina evidenció la presencia de 5 bandas, 3 de las cuales decoloraron al revelador DPPH al 0,5% (p/v), y por ende manifiestan actividad antiradicalar, se pueden apreciar los resultados en la Tabla 4.

B.a: (HPTLC) del aceite esencial de *P. pubinervulum*; B.b: (HPTLC-DPPH) del aceite esencial de *P. pubinervulum*; B.c: (HPTLC-DPPH) del aceite esencial de *T. vulgaris*, control positivo. 1: Elemicina, (E)-nerolidol, γ -asarona, dimetoxi 5 vinyl 1,2 benzodioxido 4-6, α -bisabolol y geranil linalol. 2: Isoeugenol metil éter 3: β -cariofileno, α -humuleno, β -selineno, biciclogermacreno, α -bulseno, 7-epi- α -selineno y β -cadineno.

3.5 Evaluación de la mínima concentración inhibitoria MIC

Los resultados de la actividad antimicrobiana expresada como la mínima concentración inhibitoria

MIC se describen en la Tabla 5. El resultado refleja la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento de las bacterias y levaduras alrededor de un disco estéril mayor a 1 mm. Se considera un valor positivo si en al menos 2 de las 3 repeticiones la inhibición es la misma, en algunos casos la inhibición resultó ser igual a la del patrón natural de referencia el aceite esencial de *Thymus*.

3.6 Actividad antimicrobiana bioautográfica

Los resultados confirman actividad tanto para la bacteria Gram +, *S. aureus*, en este caso la actividad se denota en las fracciones de Rfs: 1 (Elemicina, (E)-nerolidol, γ -asarona, dimetoxi 5 vinyl 1,2 benzodioxido 4-6, α -bisabolol y geranil linalol) y 5 (β -cariofileno, α -humuleno α , β -selineno, biciclogermacreno, α -bulseno 7-epi- α -selineno y β -cadinene) Tabla 6; y en la bacteria Gram -, *E. coli*, para las fracciones de Rfs: 1, 2 (isoeugenol metil éter) y 5, evidenciables en la Tabla 7.

Tabla 4. (HPTLC-DPPH) bioautográfico del aceite esencial de *P. pubinervulum*.

Número de fracción separada del aceite por HP-TLC	Rf	Compuestos
1	0.50	Elemicina, (E)-nerolidol, γ -asarona, dimetoxi 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, α -bisabolol y geranil linalol
2	0.66	Isoeugenol metil éter
3	0.73	No presenta coloración amarilla (compuestos inactivos)
4	0.83	No presenta coloración amarilla (compuestos inactivos)
5	0.98	β -cariofileno, α -humuleno, β -selineno, biciclogermacreno, α -bulseno, 7-epi- α -selineno y β -cadineno

Tabla 5. Actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *P. pubinervulum*.

Microorganismos	<i>P. pubinervulum</i> MIC (mg mL ⁻¹)	<i>T. vulgaris</i> MIC (mg mL ⁻¹)
Bacteria Gram-		
Escherichia coli ATCC 8739	6.08	0.39
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	24.13	6.08
Bacteria Gram+		
Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 6538	3.09	1.54
Streptococcus mutans ATCC 25175	6.08	1.54
Levaduras		
Candida tropicalis ATCC 13803	0.77	0,77
Candida albicans ATCC 10231	0.39	0.39

Tabla 6. HPTLC-autobiográfico antimicrobiano en *S. aureus*.

Número de fracción separada del aceite por HP-TLC	Rf	Compuestos
1	0.50	Elemicina, (E)-nerolidol, γ -asarona, dimetoxi 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, α -bisabolol y geranil linalol
2	0.66	No presenta decoloración (compuestos inactivos)
3	0.73	No presenta decoloración (compuestos inactivos)
4	0.83	No presenta decoloración (compuestos inactivos)
5	0.98	β -cariofileno, α -humuleno, β -selineno, biciclogermacreno, α -bulseno, 7-epi- α -selineno y β -cadineno

Tabla 7. HPTLC-autobiográfico antimicrobiano en *E. coli*.

Número de fracción separada del aceite por HP-TLC	Rf	Compuestos
1	0.50	Elemicina, (E)-nerolidol, γ -asarona, dimetoxi 5 vinyl 1,2 benzodioxide 4-6, α -bisabolol y geranil linalol
2	0.66	Isoeugenol metil éter
3	0.73	No presenta decoloración (compuestos inactivos)
4	0.83	No presenta decoloración (compuestos inactivos)
5	0.98	β -cariofileno, α -humuleno, β -selineno, biciclogermacreno, α -bulseno, 7-epi- α -selineno y β -cadineno

4 Discusión

El presente estudio permitió revelar en un buen porcentaje la composición química del aceite esencial, para las moléculas más abundantes la confirmación se obtuvo por comparación del espectro RMN ^1H . La actividad antioxidante no resultó ser muy elevada en comparación con el referente natural, debido seguramente a que ninguno de los componentes mayoritarios presentan estudios contundentes de tener una elevada actividad antioxidante comparable con la del timol y el carvacrol presentes en *T. vulgaris*. Los resultados de mayor interés se relacionan con la evaluación de actividad antimicrobiana en donde se evidencian interesantes resultados en los respecta a las dos levaduras evaluadas *C. tropicales* y *C. albicans*, en este caso en la literatura científica es posible encontrar varios estudios que avalan una elevada actividad antifúngica en varios de los componentes mayoritarios como por ejemplo en el cariofileno (Sabulal *et al.*, 2006), y en el nerolidol (Lee *et al.*, 2007). De igual manera varios aceites esenciales ricos en estos componentes han demostrado tener una buena actividad como es el caso de *Bidens pilosa* (Deba *et al.*, 2008) y *Eugenia disenterica* (Costa *et al.*, 2000) en aceites ricos en cariofileno y *M. quinquenervia* (Lee *et al.*, 2008) caite rico en nerolidol. La especie *P. pubinervulum* podría constituirse en un recurso medicinal antifúngico que podría usarse de forma sostenible por las mismas comunidades indígenas que habitan en la zona sur oriental del Ecuador y que por lo general sufren de carencia de insumos médicos.

5 Conclusión

El resultado de mayor relevancia se relaciona con la actividad antifúngica en las dos levaduras en estudio, es importante resaltar que ambas son responsables de muchas afecciones en la salud, y se podría plantear trabajos posteriores para evaluar dicha actividad en productos de aplicación tópica. Como conclusión final tenemos que con los estudios de composición química y actividad biológica hechas en el aceite esencial de *P. pubinervulum*, se contribuye a la valoración de esta planta medicinal de uso cotidiano en las comunidades indígenas de la amazonia ecuatoriana.

6 Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por el financiamiento de la presente investigación.

Bibliografía

- Adam, K., A. Sivropoulou, S. Kokkini, T. Lanaras and M. Arsenakis. 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46:1739-1745.
- Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass

- spectrometry, 4th Ed. Allured publishing corporation.
- Adams, R. P. 2012. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press.
- Barbosa, Q. P., C. A. da Câmara, C. S. Ramos, D. C. Nascimento, J. V. Lima-Filho and E. F. Guimarães. 2012. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. **Química Nova**. 35:1806-1808.
- Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions *Allium cepa* and garlic (*Allium sativum*). **LWT-Food Science and Technology**. 37:263-268.
- BioPhat.Explore. 2013. <http://www.molecularnetworks.com/biopath3/biopath/mols/>. Acceso 19/12/2013.
- BioPhat.Explore. 2013. <https://translate.google.com.ec/#en/es/field%20code%20changed>. Acceso 19/12/2013.
- Chen, Y., M. Wang, R. T. Rosen and C. T. Ho. 1999. 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47:2226-2228.
- Costa, T. R., O. F. Fernandes, S. C. Santos, C. M. Oliveira, L. M. Lião, P. H. Ferri, ... and Maria do Rosário. 2000. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of ethnopharmacology**. 72(1):111-117.
- Deba, F., T. D. Xuan, M. Yasuda and S. Tawata. 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. **Food control**. 19(4):346-352.
- Diego, L. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. **Chilean Journal of Agricultural Research**. 72:4.
- Durst, H. D., y G. W. Gokel. 1985. Química orgánica experimental, 1^{ra} Ed. Ed Reverte, Barcelona. página 600.
- Guerrini, A., G. Sacchetti, D. Rossi, G. Paganetto, M. Muzzoli, E. Andreotti and R. Bruni. 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental toxicology and pharmacology**. 27:39-48.
- Jaramillo, M. A. and P. S. Manos. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**. 88:706-716.
- Jørgensen, P. M. y S. León-Yáñez. 1999. Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**. 75:1-1181.
- Lee, S. J., J. I. Han, G. S. Lee, M. J. Park, I. G. Choi, K. J. Na and E. B. Jeung. 2007. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporium gypseum* in a guinea pig model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 30:184-188.
- Lee, Y. S., J. Kim, S. C. Shin, S. G. Lee and I. K. Park. 2008. Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. **Flavour and Fragrance Journal**. 23(1):23-28.
- Macbride, J. F. 1960. Flora of Peru (Vol. 8). Chicago, IL: Field museum of natural history.
- Miller, N. J., J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley and C. A. Rice-Evans. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS letters**. 384:240-242.
- NIST/02. 2012. Mass Spectral Library, United States Government.
- Noriega, P. F. Rivera, A. Guerrini y E. Ankuash Tsamaraint. 2014. Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. 19:128-137.
- Oliveira, G. L., D. D. L. Moreira, A. D. R. Mendes, E. F. Guimaraes, L. S. Figueiredo, M. A. C. Kaplan and E. R. Martins. 2013. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 23:743-753.

- Plant Caterpillar Parasitoid Interactions. 2013. <http://caterpillars.lifedesks.org/pages/298118>. Acceso en 26/10/2013.
- Popov, I. y G. Lewin. 1996. Photochemiluminescent detection of antiradical activity; IV: testing of lipid-soluble antioxidants. **J. Biochem Biophys Methods**. 31:1-8.
- Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar and S. Ignacimuthu. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6:39.
- Purkayastha, S., R. Narain and P. Dahiya. 2012. Evaluation of antimicrobial and phytochemical screening of Fennel, Juniper and Kalonji essential oils against multi drug resistant clinical isolates. **Asian pacific journal of tropical Biomedicine**. 2:1625-1629.
- Rossi, D., A. Guerrini, S. Maietti, R. Bruni, G. Paganetto, F. Poli and G. Sacchetti. 2011. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador Croton lechleri Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food chemistry**. 126:837-848.
- Sabulal, B., M. Dan, R. Kurup, N. S. Pradeep, R. K. Valsamma and V. George. 2006. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**. 67:2469-2473.
- Sadgrove, N. J., I. R. Telford, B. W. Greatrex and G. L. Jones. 2014. Composition and antimicrobial activity of the essential oils from the *Phebalium squamulosum* species complex (Rutaceae) in New South Wales, Australia. **Phytochemistry**. 97:38-45.
- Sauter, I. P., G. E. Rossa, A. M. Lucas, S. P. Cibulski, P. M. Roehe, L. A. A. da Silva and G. L. von Poser. 2012. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**. 40:292-295.
- Scartezzini, P., F. Antognoni, M. A. Raggi, F. Poli and C. Sabbioni. 2006. Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis* Gaertn. **Journal of ethnopharmacology**. 104:113-118.
- Ziosi, P., S. Manfredini and S. Vertuani. 2010. Evaluating essential oils in cosmetics: antioxidant capacity and functionality. **Cosmetics and toiletries**. 125:32-40.