

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper auritum* Kunth (PIPERACEAE) DIFUNDIDA EN LA COSTA COLOMBIANA

RESUMEN

El aceite esencial de hojas e inflorescencias de *Piper auritum*, obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), se analizó por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El rendimiento de extracción fue de 2,3% para hojas y de 2,4% para inflorescencias. La identificación, mostró como componentes mayoritarios safrol, 94,0% (hojas) y 90,3% (inflorescencias) y miristicina, 3,2% (hojas) y 5,8% (inflorescencias). La actividad antioxidante del aceite fue evaluada y comparada con la de la vitamina E.

PALABRAS CLAVES: Aceite esencial, *Piper auritum*, safrol, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The essential oil of leaves and inflorescences of Piper auritum, was obtained by microwave-assisted hydrodistillation (MWHD) and analyzed by means of high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry (HRGC-MS). The extraction yield was 2,3% (leaves) and 2,4% (inflorescences). The main components were safrol (94,0% in leaves and 90,3% in inflorescences) and myristicin, (3,2% in leaves and 5,8% in inflorescences). The antioxidant activity of the oil was evaluated and compared with that of vitamin E.

KEYWORDS: Essential oil, *Piper auritum*, safrol, antioxidant activity.

ALEJANDRO GARCÍA RÍOS

Químico,
Estudiante de Maestría en Química,
Universidad Industrial de Santander

MIGUEL ANTONIO LEYVA

Estudiante de Ingeniería Química
Universidad Industrial de Santander

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ M.

Químico, Ph. D.
Profesor Titular
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
rene@tucan.uis.edu.co

ELENA E. STASHENKO

Química, Ph. D.
Profesora Titular
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
Directora CENIVAM
elena@tucan.uis.edu.co

1. INTRODUCCION

Durante la colecta botánica realizada en el NorEste colombiano, se tomaron muestras representativas de la especie *Piper auritum* Kunth (Piperaceae). La planta es un arbusto subleñoso de hasta 4 m de altura, conocida como Santamaría de anís o Anisillo, usada como condimento en países de América Central [1]. Sus hojas se emplean como emoliente, agente antirreumático, diurético, estimulante y abortivo [2,3]. Posee actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica y antidermatofítica [4,5].

El género *Piper*, ampliamente distribuido en el Trópico, contiene más de 1000 especies. Este género posee fenilpropanoides, lignanos, sesquiterpenos y monoterpenos como borneol, alcanfor, cineol, eugenol, safrol y una amplia variedad de componentes bencénicos [6].

El safrol, es un monoterpeno oxigenado, presente como compuesto mayoritario en especies tales como, *sassafras* (70-80%) y *Ocotea cymbarum* (90%) [7]. La biosíntesis propuesta para la formación de safrol, involucra la condensación de eritrosa 4P con fosfoenolpiruvato [8]. Hace parte de la lista de sustancias controladas por las autoridades, debido a su uso como precursor en la síntesis de drogas de uso

ilícito como MDMA [9] y por su efecto carcinogénico y citotóxico [10]. No obstante, es útil en la hemisíntesis de compuestos de elevada actividad biológica [8].

En este trabajo, se reporta la composición química obtenida por GC-MS, del aceite esencial extraído por MWHD, de hojas secas e inflorescencias de *Piper auritum* colectadas en la Costa colombiana. De igual forma, la actividad antioxidante del aceite se compara con la de la vitamina E.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material vegetal

Se utilizaron hojas secas e inflorescencias, en las extracciones realizadas por MWHD. La identificación taxonómica de las muestras botánicas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos testigos de la planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL N° 512209), así: *Piper auritum* Kunth.

2.2 Reactivos

Los reactivos y solventes empleados en este estudio fueron: etanol (99.8% pureza) y diclorometano,

suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). La vitamina E (97% pureza) y 2,2-difenil-1-picrilhidracina (DPPH, 90% de pureza) se adquirieron de Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwaukee, WI, EE.UU.). Los gases especiales para cromatografía se obtuvieron de AGA-Fano S.A. (Bucaramanga, Colombia).

2.3 Extracción

La hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd) se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger* [11,12] y un horno microondas comercial (*LG*, 720 W). Dentro del horno se colocó un balón (2 L) con agua destilada (300 mL) y material vegetal (100 g). El tiempo de extracción a 60% de potencia del horno, fue 30 min. El aceite esencial se separó del agua por decantación y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Luego, una alícuota del aceite (50 μL) se aforó a 1 mL con diclorometano, para el análisis cromatográfico.

2.4 Análisis cromatográfico

Para la identificación de los componentes presentes en los aceites esenciales se empleó un cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies* modelo 6890 *Series PLUS*, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies* 5973 *Network*, con sistema de datos HP MS *ChemStation* G17001DA (versión D.00.01.27, 2002), y bibliotecas de espectros Wiley, NIST y Adams, para el análisis de los espectros de masas. Se empleó una columna capilar DB-5 (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de 60 m x 0.25 mm, con fase estacionaria apolar de 5% fenil-poli (metilsiloxano) de 0.25 μm . La temperatura del horno se programó de: 45 °C durante 5 min con una rampa de calentamiento de 4° C/min hasta 150 °C por 2 min, posteriormente, a 5 °C/min hasta 250 °C por 5 min y, finalmente, a 10 °C/min hasta 275 °C por 15 min. Como gas de arrastre se empleó helio. El volumen de inyección fue de 1 μL en el modo *split*, con relación 1:30, realizado con un inyector automático *Agilent Technologies*, modelo 7683 *Series injector*. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 230 y 285 °C, respectivamente. La energía de los electrones bombardeantes fue 70 eV. La corriente iónica total reconstruida (TIC) y los espectros de masas de obtuvieron por medio de barrido automático en el rango de masas de m/z 40-350 Dalton, con analizador cuadrupolar operando en el modo de barrido completo, *full scan*.

Para la identificación de los compuestos por GC-MS también se usaron sus índices de retención de Kovàts, los cuales fueron comparados con los reportados en la literatura [13]. Los índices de Kovàts se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos ($\text{C}_{10}\text{-C}_{25}$)

(*Accustandard*, EE.UU.), analizados bajo las mismas condiciones de los aceites esenciales.

2.5 Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: a una solución de DPPH \cdot (90 μM , 2,5 mL) en etanol, se le adicionaron 0,5 mL del aceite, en concentraciones entre 27412 y 80675 ppm. Inmediatamente después, se midió la absorbancia a 514 nm a diferentes tiempos para generar así una relación de la capacidad "secuestradora" de radicales de cada concentración. La absorbancia inicial de la DPPH \cdot en el medio de reacción se determinó mediante una curva de calibración de soluciones en concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 mM a 514 nm. La capacidad de atrapar radicales se expresó como los mg/L de sustancia antioxidante necesarios para disminuir la concentración inicial de radical DPPH \cdot en un 50% (EC_{50}). Se utilizó como blanco una solución de DPPH \cdot (90 μM , 2,5 mL) en etanol, a la cual se le adicionaron 0,5 mL de etanol y se determinó su absorbancia a 514 nm, durante 30 minutos [14].

La actividad antioxidante del aceite esencial obtenido a partir de las hojas de *P. auritum*, se comparó con la de la vitamina E. De igual forma, que con el aceite esencial, se desarrolló el mismo procedimiento con la vitamina E. Ésta se utilizó como referencia en el análisis de los resultados, por su conocida acción como antioxidante de ruptura de cadena.

3. Resultados y Discusión

3.1 Metabolitos secundarios volátiles de *Piper auritum*

El rendimiento de la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd), del aceite esencial de *Piper auritum* fue de 2,3% para hojas secas y 2,4% para las inflorescencias.

En la Figura 1 se presenta el perfil cromatográfico resultante del análisis por GC-MS, del aceite esencial de *Piper auritum*, obtenido por MWHd de las hojas secas de la planta y en la Figura 2 el correspondiente a las inflorescencias. La identificación de los componentes y sus cantidades relativas (%) se reportan en la Tabla 1. Los compuestos encontrados en mayor porcentaje en el aceite esencial de hojas e inflorescencias, son de tipo aromático, sustituidos con grupos alquilo y alilo, además se observa alto contenido de compuestos oxigenados.

N° Pico	Componente	I _k	Cantidad relativa, %	
			Hojas	Inflorescencias
1	2-E-Hexenal	831	0.05	--
2	α-Terpineno	1020	0.06	0.09
3	p-Cimeno	1028	0.06	0.10
4	γ-Terpineno	1061	0.28	0.32
5	Terpinoleno	1089	0.21	0.22
6	2-Nonanona	1090	0.22	0.07
7	Nonanal	1105	--	0.08
8	Safrol	1302	93.24	90.30
9	α-Copaeno	1387	0.10	0.05
10	Metil eugenol	1399	0.46	0.57
11	trans-β- Cariofileno	1434	0.20	0.18
12	n-Pentadecano	1473	0.11	0.40
13	Miristicina	1528	4.34	5.84
14	Elemicina	1546	0.09	0.55

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de *Piper auritum*, obtenido por MWHHD.

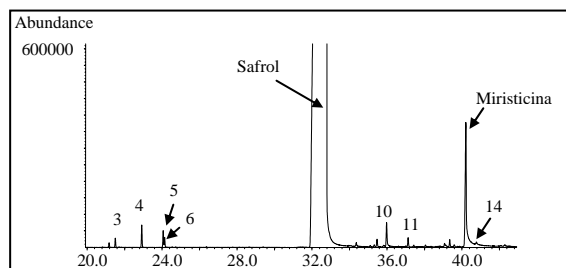


Figura 1. Cromatograma del aceite esencial de hojas secas de *Piper auritum*, obtenido por GC-MS.

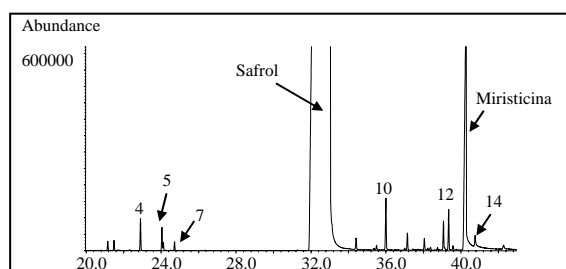


Figura 2. Cromatograma del aceite esencial de inflorescencias de *Piper auritum*, obtenido por GC-MS.

En ambos aceites, el safrol (Figura 3) fue el principal componente (93.2%, en hojas y 90.3%, en inflorescencias), siendo superior al reportado en la especie cultivada en Cuba, donde reportan un 64.5% del safrol [4]. La miristicina (4.3%, en hojas y 5.8%, en inflorescencias) fue el segundo compuesto mayoritario. Los otros compuestos identificados fueron seis monoterpenos oxigenados (1.0%) y dos sesquiterpenos (0.3%).

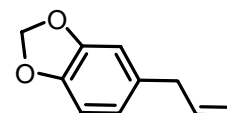


Figura 3. Estructura del safrol.

3.2 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Piper auritum*.

La disminución de la absorbancia a 514 nm, se empleó para evaluar la actividad antioxidante (reducción de radical DPPH[•]) durante el transcurso de la reacción. En la Figura 4 se muestra la tendencia al estado estacionario del aceite esencial de *P. auritum*, medida para diferentes concentraciones, en un rango de absorbancia de 0 – 1. La reacción entre los componentes del aceite y el radical DPPH[•] fue muy rápida durante los primeros 5 min, como se puede apreciar en el gráfico.

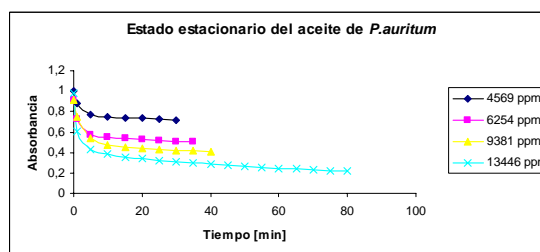


Figura 4. Estado estacionario de la reacción entre el aceite esencial de *P. auritum* con el radical DPPH, medido en función de la disminución de su absorbancia, a diferentes concentraciones del aceite (ppm).

El aceite esencial de *Piper auritum* presentó una baja actividad antioxidante comparado con el efecto

protector de la vitamina E, como se puede observar en la Figura 5. Dado que el análisis cromatográfico reveló la no existencia de compuestos de tipo fenólico, principales responsables de la actividad antioxidante de los aceites esenciales. Esta leve actividad antioxidante, se explicó por la presencia de hidrógenos arílicos.

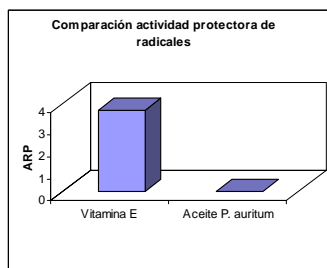


Figura 5. Comparación de la actividad antioxidante del aceite esencial y la vitamina E.

La concentración efectiva EC_{50} , para la vitamina E fue de 0.27 ppm, mientras que para el aceite esencial fue de 348 ppm. En ambas mediciones los coeficientes de variación estuvieron cercanos a 2%.

4. CONCLUSIONES

La técnica de MWHD, facilitó la extracción del aceite esencial de las hojas e inflorescencias de *Piper auritum*, dado el ahorro de tiempo, el porcentaje de aceite obtenido y su alto contenido de safrol. Al parecer, el método empleado no ocasiona alteraciones significativas a los aceites esenciales.

Entre los compuestos orgánicos volátiles presentes en los aceites esenciales analizados por GC-MS, se destaca el alto contenido de safrol (principal compuesto). Las concentraciones de safrol y el rendimiento del aceite, convierte a la especie *Piper auritum* en una fuente alternativa de safrol.

El aceite esencial evaluado presentó una baja actividad atrapadora del radical DPPH[•] (0.0029 mg/L), en comparación con la presentada por la vitamina E (3.69 mg/L), sustancia antioxidante usada como referencia.

5. AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS y al Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, por su apoyo financiero para la realización de este trabajo, Contrato RC-432-2004. Así mismo, a FUNDACOFAN por la recolección del material vegetal. Finalmente, al Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, por sus apoyos económico y logístico para llevar a cabo este trabajo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] VIZOSO, A.; *et al.*; Ausencia de potencial genotóxico *in-vitro* e *in-vivo* de un extracto fluido de *Piper auritum* H.K.B.; *Rev. Cubana Plant. Med.*; 1999; 3(2), pp. 57-64.
- [2] Cuba. Ministerio de Salud Pública: Guía terapéutica de fitofármacos y apifármacos. La Habana, 1992, p. 181.
- [3] GUPTA, M.D.; *et al.*, Safrole: the main component of essential oil from *Piper auritum* H.K.B. of Panamá, *J. Nat. Prod.*, 1985, 48, pp. 330-343.
- [4] HERNÁNDEZ, L.; *et al.*; Actividad antidermatofítica *in-vitro* de aceites esenciales, *Rev. Cubana Plant. Med.*, 2003, 2003(2).
- [5] VEGA, R. y LAGARTO, A.; Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto de *Piper auritum* H.B.K. y toxicidad aguda oral, *Rev. Cubana Plant. Med.* 1999, 4(1).
- [6] DE OLIVEIRA, L.; *et al.*, Genetic diversity of "*Pimenta longa*" genotypes. *Mol. Biol.*, 2004, 27(1).
- [7] FAO, Flavours and fragrances of plant origin, 1995.
- [8] COSTA, P.R.; Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados; *Quím. Nova*, 2000, 23(3).
- [9] Naciones Unidas, Oficina contra la droga y el delito, Tendencias mundiales de las drogas ilícitas, Nueva York, 2003.
- [10] JEURISSEN, S. *et al.*; Human cytochrome p450 enzyme specificity for bioactivation of safrole to the proximate carcinogen 1-hydroxysafrole, *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, pp. 1245-1250.
- [11] STASHENKO, E.E.; *et al.*, "HRGC and GC-MS Analysis of essential Oil from Colombian Ylang-Ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. Et Thomson, forma genuine)" *J. High Resol. Chromatogr.* 1993, 16, pp. 441-444.
- [12] COMBARIZA, M. Y.; STASHENKO, E.E.; *et al.*, Limonene concentration in Lemon (*Citrus volcameriana*) Peel oil as a function of ripeness, *J. High Resol. Chromatogr.* 1994, 17, pp. 643-646.
- [13] ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy, Ed. Allured, Illinois, 2004, p. 10.
- [14] BRAND-WILLIAMS, W.; *et al.*, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebens. Wiss. U. Technol.*, 1995, 28, pp. 25-30.