

Artículo original

Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador.

Chemical composition and biological activities of the essential oils of *Piper marginatum* Jacq. and *Piper tuberculatum* Jacq. from Ecuador.

Moncayo Shirley¹, Rondón María¹, Araujo Liliana², †Rojas Luis³, Cornejo Xavier⁴, Guamán Walter², Jaramillo Soraya².

¹Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ²Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. ³Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ⁴Herbario GUAY, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

Recibido: enero de 2021 –Aceptado: abril de 2021

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de las partes vegetativas de *Piper marginatum* Jacq. y *P. tuberculatum* Jacq., especies pertenecientes a la familia Piperaceae, colectados en la costa ecuatoriana. Los aceites esenciales fueron extraídos por hidrodestilación y caracterizados mediante CG-EM. La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante la técnica de microdilución en caldo frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antioxidante se evaluó empleando el método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil). El componente mayoritario en el aceite esencial de *P. marginatum* fue el curzereno (22,4%), y el del aceite de *P. tuberculatum* fue el dilapiol (49,15%). El aceite esencial de *P. tuberculatum* inhibió el crecimiento de *S. aureus*

(CMI=50-100 µg/mL) y *E. coli* (CMI= 200-400 µg/mL), mientras que el aceite esencial de *P. marginatum* resultó ser moderadamente activo frente a dichas cepas (CMI= 400-800 µg/mL). Los porcentajes de inhibición del DPPH fueron muy limitados, menores al 50%. Este es el primer reporte de la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* recolectados en las costas ecuatorianas. Estos resultados indicarían el potencial significativo de los aceites esenciales evaluados para el desarrollo de productos antibacterianos.

PALABRAS CLAVE

Aceite esencial, *Piper marginatum*, *Piper tuberculatum*, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

ABSTRACT

The aim of this work was to determinate the chemical composition and evaluate the biological activity of the essential oils of the vegetative parts

of *Piper marginatum* Jacq. and *P. tuberculatum* Jacq., species belonging to the Piperaceae family, collected in the Ecuadorian coast. The essential oils were extracted by hydrodistillation and characterized by GC-MS. The antimicrobial activity was evaluated using the broth microdilution technique against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *Candida albicans* yeast ATCC 10231. The antioxidant activity was evaluated using the DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. The major component in the essential oil of *P. marginatum* was curzerene (22.4%), and in *P. tuberculatum* was dillapiol (49.15%). The essential oil of *P. tuberculatum* inhibited the growth of *S. aureus* (MIC = 50-100 µg/mL) and *E. coli* (MIC = 200-400 µg/mL), while that the essential oil of *P. marginatum* showed moderate activity against these strains (MIC = 400-800 µg/mL). Very limited inhibition percentages were obtained, less than 50%. This is the first report of the chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *P. marginatum* and *P. tuberculatum* collected from Ecuadorian coast. These results would indicate the significant potential of the essential oils evaluated for the development of antibacterial products.

KEY WORDS

Essential oil, *Piper marginatum*, *Piper tuberculatum*, antimicrobial activity, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Piper L. y *Peperomia* Ruiz & Pav., son los géneros más grandes y conocidos dentro de la familia Piperaceae [1]. El género *Piper* comprende alrededor de 2000 especies ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo [2]. Su presencia es mayoritaria en los Neotrópicos, donde se han registrado hasta 1804 especies, desde el norte de México hasta Chile y Argentina [3,4]. Por sus

características aromáticas, son empleadas en perfumería y en las industrias alimenticia y farmacéutica [5].

En la medicina tradicional de América Latina, *Piper marginatum* es frecuentemente utilizada en América Central, América del Sur y las Antillas como analgésico, contra enfermedades gastrointestinales y urinarias [6], mientras que *P. tuberculatum* se emplea como diurético, analgésico, para tratar desórdenes digestivos y mordeduras de serpientes [7].

Algunos de estos efectos son atribuidos a los componentes químicos presentes en los aceites esenciales de este género, entre ellos fenilpropanoides, como el safrol, dilapiol, *trans* anetol y miristicina; además monoterpenos o sesquiterpenos [4].

El estudio de la actividad farmacológica de los aceites esenciales de *Piper* [8,9,10], está dirigido hacia el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, muchas de estas con resultados satisfactorios. Además, se han realizado investigaciones basadas en las actividades larvicida e insecticida de los fenilpropanoides presentes en los aceites esenciales de estas plantas [11].

El objetivo del presente estudio fue analizar los aceites esenciales obtenidos de las partes vegetativas de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* de la costa ecuatoriana y evaluar sus actividades antimicrobiana y antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Las hojas de *P. marginatum* Jacq. y *P. tuberculatum* Jacq., fueron colectadas en el cantón Cumandá en la provincia de Chimborazo y en el cantón El Triunfo, provincia del Guayas, Ecuador, respectivamente. La identificación de las muestras botánicas se realizó en el Herbario GUAY de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Guayaquil, Ecuador, donde se depositaron los vouchers de los especímenes bajo los códigos MER06 (*P. marginatum*) y MER07 (*P. tuberculatum*).

Extracción del aceite esencial: Las hojas frescas (300 g) de cada especie de *Piper* se sometieron a hidrodestilación, utilizando la trampa

de Clevenger durante cuatro horas. Los aceites obtenidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se conservaron en viales herméticamente cerrados a 4 °C protegidos de la luz hasta su análisis.

Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas: El análisis cualitativo y cuantitativo de los aceites fue realizado por CG-FID/CG-EM [12]. La temperatura de inyección fue de 250°C. La temperatura del CG fue programada como se describe a continuación: temperatura inicial de 60°C (1,0 min) con incremento de 4°C a 200°C y luego a 10°C/min hasta una temperatura final de 280°C. El gas portador fue He a 1,0 mL/min, valor constante. El análisis CG-EM fue obtenido en un equipo cromatográfico Hewlett Packard 6890 series II, acoplado a un sistema de espectrometría de masas Hewlett Packard 5973 equipado con un inyector automático. Se utilizó una columna capilar HP-5 de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25 μm de espesor de película. La energía de ionización fue de 70 eV. Una muestra de 1 μL de la solución al 2% del aceite en n-heptano fue inyectada con reparto de 100:1. La identificación de los componentes volátiles de los aceites esenciales obtenidos se hizo a través de las bases de datos Wiley y Nist y por cálculo de los índices de Kovats. Los índices de Kovats fueron calculados en relación con una mezcla de n-alcános $\text{C}_8\text{-C}_{24}$ y comparados con valores en la literatura. El método de normalización para los picos que representan el área fue usado para calcular el porcentaje de composición del aceite esencial [12,13].

Actividad antioxidante: Para determinar la actividad antioxidante de los aceites, se realizó el ensayo de eliminación de radicales libres descrito por Lai y col. con menores modificaciones [14], empleando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•). Se preparó una solución metanólica de cada aceite a una concentración de 40 mg/mL. A 0,2 mL de cada una de las soluciones de aceite esencial se le adicionó 2,8 mL de una solución de DPPH• (6×10^{-2} mM). La mezcla fue agitada vigorosamente y conservada en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro UV-visible Genesys 10 BIO a 517 nm. Como control negativo se utilizó una solución compuesta de 2,8 mL de DPPH y 200 μL de metanol y como

estándar antioxidante de referencia, una solución metanólica de ácido ascórbico a una concentración de 176 $\mu\text{g/mL}$. Los ensayos se realizaron por triplicado. Todos los reactivos empleados en el análisis fueron de grado analítico. El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, el metanol y el ácido ascórbico fueron suministrados por Sigma-Aldrich. La actividad antioxidante fue expresada como el porcentaje de inhibición de la absorción de los radicales (% I), el cual se calculó siguiendo la siguiente ecuación: [15,16]:

$$\% I = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs DPPH}} \times 100$$

Actividad antimicrobiana: La actividad antimicrobiana fue evaluada frente a las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); y las Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) y frente a la levadura *Candida albicans* (ATCC 10231).

Las cepas microbianas se conservaron a 4°C realizando siembras periódicas en agar cerebro corazón (agar BHI) para el mantenimiento de *E. faecalis* debido a sus exigencias metabólicas, en agar nutritivo (AN) para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, y en agar Dextrosa Sabouraud (ADS) para la levadura *C. albicans*. Todos los medios fueron adquiridos en Oxoid. Los ensayos de la detección de actividad antimicrobiana se ejecutaron a partir de cultivos desarrollados a 37 °C durante 24 h en agitación orbital en caldo nutritivo (CN), caldo infusión cerebro corazón (BHI) y medio líquido Sabouraud (MLS), según el microorganismo. La concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB) y concentración mínima fungicida (CMF) de los aceites esenciales frente a cada microorganismo fueron determinadas por triplicado, usando el método de microdilución en caldo [17]. Las soluciones concentradas de los aceites fueron preparadas en DMSO (50.000 $\mu\text{g/mL}$), a partir de las cuales se realizaron diluciones en medio de cultivo (CN, BHI o MLS) y se distribuyeron a concentraciones seriadas en los pozos de la microplaca, donde la proporción de DMSO nunca

excedió el 1% v/v. La concentración inicial de microorganismos en todos los pozos fue de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL, excepto en aquellos que se usaron como control negativo que solo contenían medio líquido. Para garantizar el crecimiento microbiano se usaron pozos como controles con células disueltas en el medio de cultivo, algunas carentes de aceites y otras tratadas con DMSO a la máxima concentración usada, para evidenciar la inocuidad de este disolvente. Las placas de 96 pozos fueron incubadas durante 24 h a 37 °C en agitación orbital y tras ese tiempo el crecimiento fue monitoreado por medición del incremento de la densidad óptica a 550 nm utilizando un lector de microplacas (Biotek). De todos los pozos sin crecimiento visible se sacaron alícuotas de 100 μ L que fueron subcultivadas en placas con AN, agar BHI o ASD e incubadas durante 24 h a 37 °C. Finalmente, el establecimiento de la CMI definida como la mínima concentración del aceite a la cual no hubo crecimiento y la CMB o CMF como la mínima concentración del aceite que produjo la muerte del 99,9 %, de la población inicial, se realizó mediante los recuentos de células viables.

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion versión 17. Las diferencias estadísticas entre las muestras se determinaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%, utilizando la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del aceite esencial: Los rendimientos de los aceites esenciales fueron 0,2% para *P. marginatum* y 0,8% para *P. tuberculatum*, calculados en base al peso fresco del material vegetal utilizado. Ambos aceites esenciales presentaron color amarillo claro.

En la Tabla 1, se muestra la composición química de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum*, la cual indica el porcentaje de área de cada compuesto, así como sus tiempos de retención e índices de Kovats. Se logró determinar un 93,83% de los componentes en el aceite esencial de *Piper marginatum*, el cual se caracterizó por su

alto contenido de sesquiterpenos oxigenados (49,61%) tales como curzereno (22,44%) y atractilona (18,15%), representando los compuestos mayoritarios, seguido por sesquiterpenos hidrocarbonados (25,18%), especialmente germacreno D (6,50%) y β -cariofileno (5,07%). Mientras que, en el aceite esencial de *P. tuberculatum*, se identificó el 97,85% de los componentes químicos, en su mayoría de naturaleza fenilpropanoide (51,70%) dentro de los cuales se determinó dilapiol como compuesto principal en un 49,15%.

Los compuestos curzereno y atractilona detectados como principales en el aceite de *P. marginatum*, también se han reportado en los aceites esenciales de otras especies del género *Piper*, pero con menor frecuencia [18,19]. El sesquiterpeno curzereno ha mostrado propiedad anticancerígena frente a distintas líneas celulares tanto en ensayos *In Vitro* como *In Vivo* [20] y se le ha atribuido una significativa actividad frente al melanoma [21].

Estudios previos reportan que el curzereno se forma a través de una reacción [3.3]-sigmatrópica o rearreglo de Cope [22], a partir de 1,4-dienos, tales como el furanodieno, presentes en los aceites esenciales. Estas reacciones pueden ocurrir durante el proceso de extracción de aceite y/o durante un análisis de cromatografía de gases, en las cuales se han empleado temperaturas superiores a 200 °C, debido a la sensibilidad térmica del furanodieno [23].

Estudios previos señalan a los sesquiterpenos dentro de los componentes predominantes en la composición química del aceite esencial de *P. marginatum*. Así, se identificaron mayoritariamente sesquiterpenos como el germacreno D (36,6%), β -elemeno (12,6%), germacreno B (12,4%), en el aceite esencial de *P. marginatum* recolectado en el municipio de Turbaco, Colombia [24], mientras el aceite esencial de las raíces de *P. marginatum* recogidas en Porto Velho en Brasil, tuvo en su mayoría compuestos sesquiterpénicos como el biciclogermacreno (9,4%), germacreno D (8,33%), germacreno B (8,07%) [25].

TABLA 1.
Composición química de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum*

Compuestos	TR (min.)	Área (%)	IKcal	Área (%)	IKcal	IKtab
		<i>P. marginatum</i>		<i>P. tuberculatum</i>		
α -Pinoeno	5,41	2,34	930	1,01	930	932
Sabineno	6,31	0,12	962	0,29	962	969
β -Pinoeno	6,41	2,93	965	0,43	965	974
β -Mirreno	6,69	0,10	974	0,51	984	988
α -Felandreno	7,09	-	-	0,48	996	1002
α -Terpinoeno	7,41	-	-	0,85	1005	1014
<i>p</i> -Cimeno	7,62	0,15	1002	1,16	-	1020
Limoneno	7,74	1,79	1007	4,40	1018	1024
1,8 Cineol	7,85	-	-	0,37	1023	1026
(<i>z</i>)- β -Ocimeno	7,94	1,39	1017	0,98	1027	1032
(<i>e</i>)- β -Ocimeno	8,25	2,58	1030	2,30	1041	1044
γ -Terpinoeno	8,59	-	-	0,89	1055	1054
Linalool	9,80	0,10	1093	1,32	1093	1095
Terpinoen-4-ol	12,30	0,11	1175	0,92	1175	1174
Cuminaldehído	14,30	-	-	0,60	1239	1246
Piperitona	14,80	2,91	1256	19,57	1259	1249
α -Terpinoen-7-al	15,76	-	-	0,52	1286	1281
Safrol	15,88	-	-	0,54	1290	1285
Z-Isosafrol	15,96	-	-	0,48	1292	1282
Carvacrol	16,26	-	-	0,28	1302	1298
β -Elemeno	19,20	3,02	1392	-	-	1406
β -Cariofileno	20,07	5,07	1421	1,14	1421	1417
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	20,53	-	-	0,41	1437	1432
α -Humuleno	21,12	1,50	1458	0,54	1458	1452
Alloaromadrendeno	21,34	1,11	1465	-	-	1461
Germacreno D	21,96	6,50	1486	2,60	1486	1484
Germacreno A	22,37	3,16	1510	0,50	1499	1508
Biciclogermacreno	22,42	-	-	0,73	1501	1500
Curzereno	22,45	22,44	1502	-	-	1499
Valenceno	22,71	-	-	0,32	1510	1499
δ -Cadineno	22,98	-	-	1,34	1519	1522
Miristicina	23,13	-	-	1,53	1524	1523
Elemol	23,97	6,29	1550	-	-	1548
Germacreno B	24,21	4,82	1557	0,37	1557	1559
<i>trans</i> -Nerolidol	24,34	-	-	0,30	1561	1569
Espatuleno	24,81	1,92	1574	-	-	1577
Óxido de cariofileno	24,98	0,22	1579	-	-	1582
Viridiflorol	25,23	-	-	1,02	1587	1592
Dilapiol	26,12	4,52	1618	49,15	1624	1620
β -Eudesmol	26,86	0,31	1648	-	-	1649
α -Eudesmol	26,95	0,28	1652	-	-	1652
Atractilona	28,10	18,15	1697	-	-	1657
Monoterpenos hidrocarbonados		11,25		12,14		
Monoterpenos oxigenados		3,12		22,70		
Sesquiterpenos hidrocarbonados		25,18		7,95		
Sesquiterpenos oxigenados		49,61		1,32		
Fenilpropanoides		4,52		51,7		
Otros compuestos		0,15		2,04		
Total de componentes identificados		93,83		97,85		

TR= Tiempo de retención; IKcal= Índice de Kovats calculado; IKtab= Índice de Kovats tabulado

Por el contrario, otras investigaciones de aceites de *P. marginatum* realizadas en países de América Central y otros de Sudamérica reportan los compuestos fenilpropanoides como los mayoritarios. Así, el aceite esencial de las hojas de

esta especie de Brasil reveló como principal compuesto a Z-asarona (30,4%), mientras que E-asarona fue mayoritario en la inflorescencia (22,1%) y tallo (32,6%) [26].

Además, en el análisis del aceite esencial de 22 muestras de hojas de *P. marginatum* colectadas en diferentes áreas de la Amazonía brasileña, se encontraron siete quimiotipos ricos en fenilpropanoides o sus derivados [27]. *P. marginatum* de Costa Rica exhibió anetol (45,9%) como compuesto mayoritario [28], mientras que, el aceite esencial de esta especie de *Piper* colectada en el municipio de Acandí, en Colombia, presentó *cis-p*-anetol (46,3%) y estragol (28,9%) como principales [24].

La comparación de los resultados obtenidos en el análisis químico del aceite esencial de *P. marginatum* colectada en la provincia de Guayas que se señalan en este trabajo con los reportados previamente en la literatura científica, permite que se aprecie una diferencia significativa en cuanto a los compuestos determinados y su proporción. Es bien conocido que la ubicación geográfica y la condición del hábitat afectan significativamente la composición química de los aceites esenciales [24], en este sentido, Moraes y col. (2014) [29] investigaron el efecto del tiempo de colección de las hojas de *P. marginatum* sobre el rendimiento del aceite esencial y sus componentes químicos, e indicaron un cambio en el ritmo circadiano, ya que la proporción de las clases químicas predominantes, fenilpropanoides y sesquiterpenos, variaron significativamente en las muestras colectadas en diferentes tiempos durante 24 h.

Estudios sobre la composición química del aceite esencial de *P. tuberculatum* de Venezuela, reportan un predominio del compuesto fenilpropanoide dilapiol [30], lo cual coincide con lo encontrado en la presente investigación. Sin embargo, estos datos difieren de la composición química de aceites esenciales de las hojas de esta especie colectadas en otras regiones, ya que los sesquiterpenos fueron el grupo químico predominante. Así, el aceite esencial de las hojas de *P. tuberculatum* colectadas en Brasil, contenían mayoritariamente β -cariofileno (40,2%) y espatulenol (15,77%) y los tallos, β -cariofileno (32,1%) [31,32]; en Colombia, el compuesto mayoritario fue β -farneseno [33]; mientras en Venezuela, fue el espatulenol (15,77%) [34]. También se ha informado de la presencia de monoterpenos como el α -pineno (26,54%) y

β -pineno (27,74%) en el aceite esencial de los frutos de *P. tuberculatum* [35].

Esta variabilidad intraespecífica puede responder a la ubicación geográfica, las condiciones ambientales y a las diferencias genéticas [7]. La presencia de dilapiol en las muestras colectadas en Ecuador, indicaría que *P. tuberculatum* pertenece a una variedad quimiotaxonómica diferente a las de otras regiones. El dilapiol se ha reportado como constituyente principal del aceite esencial de *P. aduncum* y posee una excelente capacidad insecticida y fungicida [36].

Actividad antioxidante: La aplicación del método del radical libre DPPH es una manera relativamente simple de evaluar la actividad antioxidante de extractos naturales debido a su fuerte capacidad donadora de hidrógeno. La capacidad antioxidante de los aceites esenciales se determinó a una concentración de 40 mg/mL. Los porcentajes de inhibición (% I) fueron 21% para *P. marginatum* y 45% para *P. tuberculatum* (Tabla 2). Para calcular la concentración inhibitoria media (IC₅₀), el % I debe ser superior a 50% [37]. Estos resultados indican que la capacidad antioxidante de estos aceites esenciales es muy limitada. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de los aceites esenciales de las especies evaluadas y el control ($p < 0,05$).

TABLA 2.

Actividad antioxidante de los aceites esenciales por el método DPPH

Aceites esenciales	Porcentaje de inhibición*
<i>P. marginatum</i>	21,16 ± 0,58 ^a
<i>P. tuberculatum</i>	44,67 ± 0,39 ^b
Control positivo	
Ácido ascórbico	84,01 ± 0,25 ^c

*Los valores se muestran como la media ± desviación estándar (n=3). Valores con letras distintas difieren estadísticamente en el test de Tukey ($p < 0.05$)

Es conocido que las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales se deben particularmente a la capacidad que poseen algunos de sus componentes, como los fenoles y terpenoides, para retrasar el estrés oxidativo en el sistema biológico. Sin embargo, algunos mecanismos propuestos explican que, mientras los compuestos fenólicos reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo

bloqueando la cadena oxidativa, los compuestos terpenoides presentes en el aceite esencial, principalmente los insaturados, pueden ser degradados por autooxidación, de manera similar a los lípidos insaturados, produciendo más especies reactivas capaces de propagar la cadena oxidativa [38]. Este hecho puede explicar la escasa capacidad antioxidante (21,16%) que presentó el aceite esencial de *P. marginatum*, ya que el análisis de la composición química arrojó porcentajes importantes de monoterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos hidrocarbonados y sesquiterpenos oxigenados, en un 11,25%, 25,18% y 49,61%, respectivamente. La presencia de curzereno como compuesto mayoritario (22,44%) pudo haber limitado la actividad antioxidante del aceite, lo que es similar a lo reportado en el estudio del aceite esencial de *Eugenia uniflora* L. que con un contenido de curzereno de 50,6% mostró un % I de 42,8% [21].

Podría esperarse una buena actividad antioxidante de los aceites esenciales con un gran contenido en compuestos fenólicos y un contenido modesto en terpenos insaturados. *P. tuberculatum* probablemente no mostró actividad antioxidante (% I < 50), a pesar de que dilapiol fue el compuesto mayoritario (49,15%), además safrol, Z-isosafrol y carvacrol también estaban presentes, esto debido a la presencia de terpenos insaturados minoritarios en el aceite esencial, los que podrían causar una reducción de la capacidad antioxidante de estos compuestos fenólicos [39].

Una investigación realizada en Colombia en la que se determinó la actividad antioxidante de los aceites esenciales de dos especímenes de *P. marginatum*, mostró que uno de los aceites con elevado contenido de fenilpropanoides, presentó una actividad antioxidante de 60% a una concentración de 2,5 µg/mL y el otro con germacreno D como componente mayoritario, tuvo una actividad de 90% a una concentración de 2 µg/mL [24]. En Brasil, el aceite esencial de las raíces de *P. marginatum* con el compuesto fenilpropanoide (*E*-anetol) predominante, mostró una actividad antioxidante de 93% a una concentración de 200 µg/mL [25]. En adición, este es el primer reporte sobre la actividad antioxidante del aceite esencial de *P. tuberculatum*.

Actividad antimicrobiana: La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* fue evaluada frente a cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) y frente a la levadura *Candida albicans*.

La Tabla 3 muestra las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), las concentraciones mínimas bactericidas (CMBs) y las concentraciones mínimas fungicidas (CMFs) de los aceites esenciales frente a las estirpes microbianas determinadas por el método de microdilución en caldo. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales evaluados ($p=0,9482$).

El aceite de *P. tuberculatum* ejerció un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, ya que se registraron CMI de 50-100 µg/mL y de 200-400 µg/mL, respectivamente; además, se evidenció una acción bactericida a la concentración de 200 µg/mL frente *S. aureus* y de 800 µg/mL frente *E. coli*. Sin embargo, ambas estirpes bacterianas exhibieron una sensibilidad moderada al aceite esencial de *P. marginatum* (CMI de 400-800 µg/mL y CMBs de 800 µg/mL).

Ambos aceites esenciales mostraron una actividad antimicótica moderada frente a *C. albicans* (CMI de 800-1600 µg/mL y CMF de 3200 µg/mL), pero inhibieron débilmente el crecimiento de las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* (1600-3200 µg/mL) y *K. pneumoniae* (3200-6400 µg/mL). *E. faecalis* resultó ser insensible a la acción de los dos aceites hasta la concentración de 6400 µg/mL.

Resultados similares fueron publicados en un estudio realizado en Brasil por Duarte y col (2007) [39], quienes mediante ensayos de microdilución evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *P. marginatum* frente a dos serotipos de *E. coli* y reportaron CMI de 700 y 900 µg/mL para los serotipos STEC0157 y EPEC0312, respectivamente. Sin embargo, estos autores señalaron que el aceite de *P. marginatum* no exhibió actividad frente a *C. albicans* a concentraciones inferiores de 2000 µg/mL [40].

TABLA 3

Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* expresada como Concentración mínima inhibitoria (CMI $\mu\text{g/mL}$)

Microorganismo	Aceites esenciales ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>P. marginatum</i>		<i>P. tuberculatum</i>	
	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
Bacterias Gram positivas				
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	400-800	800	50-100	200
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>6400	>6400	>6400	>6400
Bacterias Gram negativas				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	400-800	800	200-400	800
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1600-3200	6400	1600-3200	3200
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	3200-6400	>6400	3200-6400	>6400
Levadura				
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	800-1600	3200	800-1600	3200

CMI: concentración mínima inhibitoria; CMB: concentración mínima bactericida; CMF: concentración mínima fungicida; ATCC: American type culture collection

La investigación sobre la determinación de la actividad antimicrobiana, por el método de microdilución, frente las bacterias ATCC *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *S. aureus* de aceites esenciales extraídos (usando dióxido de carbono supercrítico) de las semillas de *P. tuberculatum*, mostró un efecto inhibitorio pero no letal de los aceites sobre el crecimiento de *S. aureus* y *B. subtilis* en TBS, pero estos aceites no tuvieron ningún efecto antibacteriano frente a *P. aeruginosa* y *S. enterica* Typhimurium [33].

Estos resultados avalarían los usos tradicionales de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* en casos de afectaciones dermatológicas y en trastornos gastrointestinales, entre ellos, diarrea [6,7].

Una de las propiedades de los aceites esenciales responsable de su actividad antimicrobiana, es su carácter hidrofóbico, por el cual, pueden romper las cadenas lipídicas presentes en las membranas celulares de los patógenos, permeabilizándolas y causando la pérdida de componentes intracelulares vitales [41].

La capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales podría estar condicionada por la actividad de sus componentes mayoritarios, sin embargo, hay evidencia del papel fundamental que desempeñan los compuestos minoritarios, al producir un efecto sinérgico entre componentes [41]. Aceites esenciales ricos en curzereno y en dilapiol como los de esta investigación han demostrado su efectividad antibacteriana [42,43].

Así mismo, algunos de los compuestos minoritarios identificados como α y β pineno, piperitona, safrol, limoneno, β -cariofileno poseen probada actividad antibacteriana [41,44,45].

CONCLUSIONES

Los principales constituyentes químicos encontrados en el aceite esencial de *P. marginatum* fueron los sesquiterpenos oxigenados, curzereno y atracilonona, mientras que el aceite esencial de *P. tuberculatum* se caracterizó por la presencia del fenilpropanoide dilapiol. La actividad antioxidante de los aceites esenciales de las especies de *Piper* estudiadas fue limitada, con un porcentaje de inhibición menor al 50%. Los resultados demuestran la capacidad inhibitoria de los aceites contra bacterias de importancia clínica como *E. coli* y *S. aureus*, lo cual avalaría sus aplicaciones etnobotánicas en casos de enfermedades dermatológicas y gastrointestinales, considerándolos una fuente significativa de nuevos productos antibacterianos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Universidad de Los Andes) y al Dr. Luis Rojas (QEPD) por el análisis de los resultados cromatográficos gases-masas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Jaramillo MA, Manos PS, Zimmer EA. Phylogenetic relationship of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. *Int J Plant Sci.* 2004; 165(3): 403-417.
- [2] Ghosh R, Darin K, Nath P., Deb P. An overview of various *Piper* species for their biological activities. *Int J Pharma Res Rev.* 2014; 3(1): 67-75.
- [3] Ulloa C, Acevedo P, Beck S, Belgrano M, Bernal R, Berry P, Brako L, Celis M, Davidse G, Forzza R, Gradstein R, Hokche O, León B, León-Yáñez S, Magill R, Neill D, Nee M, Raven P, Stimmel H, Strong M, Villaseñor J. L, Zarucchi L, Zuloaga F, Jørgensen P. An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science.* 2017; 358: 1614-1617.
- [4] Da Silva J, da Trindade R, Alves N, Figueiredo P, Maia J, Setzer W. Essential oils from Neotropical *Piper* species and their biological activities. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 2571-2613.
- [5] Bizzo HR, Hovell MC, Rezende CM. Brazilian essential oils: general view, developments and perspective. *Quim Nova,* 2009; 3: 588-594.
- [6] Brú J, Guzmán JD. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Rev Bras Farmacogn.* 2016; 26(6): 767-779.
- [7] Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, Khan T, Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Turkdonmez E, Valussi M, Tumer TB, Monzote Fidalgo L, Martorell M, Setzer WN. *Piper* species: A comprehensive review on their Phytochemistry biological activities and applications. *Molecules.* 2019; 24(7), 364.
- [8] Pretto I, Evaldt G, Machado A, Cibulski SP, Roehe PM, Alves L, Von Poser G. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Ind Crops Prod.* 2012; 40: 292-295.
- [9] Da Silva JK, Pinto LC, Burbano RM, Montenegro RC, Guimarães EF, Andrade E, Maia JGS. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Ind Crops Prod.* 2014; 58: 55-60.
- [10] Aumeeruddy E, Gurib-Fakim G, Mahomoodally F. Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of *Mauritius*. *Ind Crops Prod.* 2015; 71: 97-204.
- [11] Souto RN, Harada AY, Andrade EH, Maia JG. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) Neotrop *Entomol.* 2012; 41: 510-517.
- [12] Adams RP. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. San Diego, USA: Academic Press; 1989.
- [13] Sandra P, Bicchi C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Heidelberg, Alemania: Huethig; 1987.
- [14] Lai LS, Chou ST, Chao WW. Studies on the antioxidant activities of Hsian-tsoo (*Mesona procumbens* Hemsl) leaf gum. *J Agric Food Chem.* 2001; 49: 963-968.
- [15] Murillo EO, Lombo L, Tique M, Méndez JJ. Potencial antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harns (Fabaceae.) *Inf Tecnol.* 2007; 18: 65-74.
- [16] Ollanketo M, Peltoketo A, Hartonen K, Hiltunen R, Riekkola ML. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: Antioxidant activity of the extracts. *Eur Food Res Technol.* 2002; 215(2): 158-163.
- [17] Moujir L, Seca A, Araujo L, Silva A, Barreto C. A new natural spiro heterocyclic compound and the cytotoxic activity of the secondary metabolites from *Juniperus brevifolia* leaves. *Fitoterapia.* 2011; 82(2):225-229.
- [18] Andrade EHA, Alves CN, Guimaraes EF, Carreira LMM, Maia JGS. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. *Rich. Biochem Syst Ecol.* 2011; 39: 669-675.
- [19] Pino JA, Marbot R, Bello A, Urquiola A. Composition of the essential oil of *Piper hispidum* Sw. from Cuba. *J Essent Oil Res.* 2004; 16: 459-460.
- [20] Da Costa J, Barroso A, Mourão R, da Silva J, Maia J., Figueiredo P. Seasonal and Antioxidant evaluation of Essential Oil from *Eugenia uniflora* L., Curzerene-Rich, Thermally Produced *in Situ*.

- Biomolecules. 2020; 10(2): 328; doi: 10.3390/biom10020328.
- [21] Figueiredo P, Pinto L., da Costa J, da Silva A, Mourão R, Montenegro R, da Silva J, Maia J. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. J Ethnopharmacol. 2019; 232: 30-38.
- [22] Baldovini FT, Casanova J. Identification and quantitative determination of furanodiene, heat-sensitive compounds, in essential oil by ¹³C-NMR. Phytochemical Analysis. 2001; 12: 58-63
- [23] Chang R, de Moraes SAL, Napolitano DR, Duarte KC, Guzman VB, do Nascimento EA. A new approach for quantifying furanodiene and curzerene. A case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* (pitangueira) leaves. Rev Bras Farmacogn. 2011; 21: 392-396.
- [24] Jaramillo B, Julio J, Duarte E, González A, Julio L. Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Colombiano. B Latinoam Caribe Pl. 2015; 14: 343-354.
- [25] Bay F, Abreu R, Teixeira F, Bay M, Soares M, Alves V. Antioxidant activity and characterization of the essential oil from the roots of *Piper marginatum* Jacq. Ciência e Natura. 2016; 38(3): 1504-1511.
- [26] Autran ES, Neves IA, da Silva CS, Santos GK, da Câmara CA, Navarro DM. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). Biores Technol. 2009; 100: 2284-2288.
- [27] Andrade EH, Carreira LM, Silva MH, da Silva JD, Baston CN, Sousa PJ, Maia JG. Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. Chem. Biodivers. 2008; 5: 197-208.
- [28] Vogler B, Noletto JA, Haber WA, Setzer WN. Chemical constituents of the essential oils of three *Piper* species from Monteverde, Costa Rica. J Essent Oil-Bear, Plants. 2006; 9: 230-238.
- [29] Moraes M, Da Silva T, Da Silva R, Ramos C, Da Câmara C. Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. B Latinoam Caribe Pl. 2014; 13(3): 270-277.
- [30] Mora FD, Peña JJ, Rojas LB, Usubillaga A, Meléndez P. Composición química de los aceites esenciales de *Piper dilatatum* L.C. Rich. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Mérida, Venezuela. Ciencia. 2008; 16(3): 365-369
- [31] Navickiene HM, Morandim AD, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo DC, Telascrea M, Cavalheiro A, Lopes M, Bolzani B, Furlan M, Marques M, Young M, Kato MJ. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. Quim Nova. 2006; 29(3): 467-470.
- [32] Morandim AA, Pin AR, Pietro NA, de Oliveira HC, Mendes MJ, Alecio AC, Kato M, Oliveira J, Furlan M. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. J Med Plants Res. 2010; 4, 1810-1814.
- [33] Restrepo Z, Colmenares A, Mora L, Sánchez R. Extraction, chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of pipilongo (*Piper tuberculatum*) using supercritical carbon dioxide. Revista de Ciencias Universidad del Valle. 2013; 17(3): 45-56.
- [34] Ordaz G, D'Armas H, Yanez D, Moreno S. Chemical composition of essential oils from leaves of *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) and *Solanum subinerme* (Solanaceae) from Sucre, Venezuela. Rev Biol Trop. 2011; 59: 585-595.
- [35] Dos Santos V, Monteiro ÁB, Delmondes GA, do Nascimento EP, Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo FR, de Souza CK, Evangelista de Lacerda JF, Fernandes CN, Barbosa MO, Brasil AX, Tintino SR, Vega Gomez MC, Coronel C, Kerntopf MR. Antiparasitic activity and essential oil chemical analysis of the *Piper tuberculatum* Jacq Fruit. Iran J Pharm Res. 2018; 17(1): 268-275.
- [36] De Almeida RR., Souto RN, Bastos CN, da Silva MH, Maia JG. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole rich essential oil. Chem Biodivers. 2009; 6(9): 1427-1434.
- [37] Goupy PM, Hugues M, Boivin P, Amiot MJ. (1999) Antioxidant composition and activity of

barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. J Sci Food Agric. 1999; 79: 1625-1634.

[38] Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. J Agric Food Chem. 2013; 61: 10835-10847.

[39] Duarte M, Leme E, Delarmelina C, Soares A, Figueira G, Sartoratto A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J Ethnopharmacol. 2007; 111(2): 197-201.

[40] Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., & Delarmelina, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 2005; 97(2): 305-311.

[41] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. Int. J Food Microbiol. 2004; 94: 223-253.

[42] Hamzeh A, Ramezan A, Shiva M, Firoozeh C, Abdolhossein R. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from stems, leaves, fruits and roots of *Smyrniun cordifolium* Boiss. from Iran. J Essent Oil Res. 2006; 18(5): 574-577.

[43] Brazão M, Brazão F, Maia J, Monteiro M. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-

resistant strains. B Latinoam Caribe Pl. 2014; 13 (6): 517-526.

[44] Rondón ME, Velasco J, Cornejo X, Fernández J, Morocho V. Chemical composition and antibacterial activity of *Piper lenticellosum* C.DC essential oil collected in Ecuador. J Appl Pharm Sci. 2016; 6: 156-159.

[45] Han Y, Sun Z, Chen W. Antimicrobial Susceptibility and Antibacterial Mechanism of Limonene against *Listeria monocytogenes*. Molecules. 2109; 25(1): 33.

Moncayo Shirley, Orcid ID:0000-0003-2374-497X

Rondón María, OrcidD ID: 0000-0003-2393-751X

Araujo Liliana. Orcid ID: 0000-0001-8762-1413

†**Rojas Luis**, Orcid ID: 0000-0003-4508-1927

Cornejo Xavier, Orcid ID: 0000-0002-4081-4047

Guamán Walter, Orcid ID: 0000-0002-8511-9427

Jaramillo Soraya, Orcid ID:0000-0002-2607-429X