



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Postgrado en Química de Medicamentos
Mención Productos Naturales



**Estudio fitoquímico y actividad biológica de las hojas de
Piper marginatum Jacq (Piperaceae)**

www.bdigital.ula.ve

Lcda. Sarai Dugarte Torres
Tutor (a): Dra. Yndra Cordero de Rojas

Mérida, Octubre de 2021

C.C.Reconocimiento

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	X
DEDICATORIA	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
INTRODUCCIÓN	1
PRODUCTOS NATURALES	3
Biosíntesis de los metabolitos secundarios	4
Clasificación de los metabolitos secundarios	6
EXTRACTOS VEGETALES	8
Métodos de extracción	9
ANÁLISIS FITOQUÍMICO	11
ACEITES ESENCIALES	14
Clasificación de los aceites esenciales	16
Métodos de obtención de los aceites esenciales	17
FAMILIA PIPERACEAE	20
Características botánicas	20
Distribución y hábitat	22
Usos etnobotánicos	23
Componentes químicos de la familia Piperaceae	24
GÉNERO <i>PIPER</i>	24
Características botánicas	24
Distribución geográfica	25
Actividad biológica	26

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

Componentes químicos.....	27
<i>Piper marginatum</i> Jacq.....	41
Características botánicas.....	41
Distribución geográfica.....	42
Usos etnobotánicos.....	42
Compuestos químicos.....	43
Actividad biológica.....	45
SAFROL.....	47
Actividad biológica del safrol y sus derivados.....	50
MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	54
Según la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil.....	55
Según el tipo de interacción.....	56
Según la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria.....	56
MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	57
Espectroscopia Infrarrojo.....	57
Espectroscopia Ultravioleta.....	58
Espectrometría de Masas.....	58
Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.....	59
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	59
Radicales Libres.....	59
Antioxidantes.....	61

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

Métodos para la determinación de la actividad antioxidante.....	62
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	65
Bacterias.....	66
Hongos.....	71
Resistencia a los Antimicrobianos.....	72
Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana.....	75
HIPÓTESIS.....	82
OBJETIVOS.....	82
Objetivo General.....	82
Objetivos Específicos.....	82
PARTE EXPERIMENTAL.....	84
Materiales y equipos.....	84
Procedimiento de la Investigación.....	87
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
Obtención del aceite esencial de las hojas de <i>Piper marginatum</i>	103
Identificación de los componentes del aceite esencial de <i>Piper marginatum</i>	104
Obtención e Identificación del safrol.....	108
Análisis Fitoquímico.....	115
Análisis Cromatografía de Capa Fina (CCF).....	120
Cuantificación de Fenoles.....	121
Actividad Antioxidante.....	124
Actividad Antibacteriana.....	130
Actividad antifúngica.....	136

INDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

CONCLUSIONES.....	134
RECOMENDACIONES.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	140

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
N°		
1	Ejemplar típico de la familia Piperáceae.....	21
2	Distribución geográfica de la familia Piperaceae.....	22
3	Componentes químicos de <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	44
4	Hemisíntesis del piperonal.....	48
5	Derivados hemisintéticos de la Heliotropina.....	48
6	Antagonistas de receptores AMPA.....	51
7	Agentes antitumorales clínicos.....	51
8	Catecoles bioactivos derivados del safrol.....	52
9	Derivado del safrol con actividad analgésica.....	53
10	Análogos de la ampakina CX-516 a partir del safrol.....	53
11	Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo....	64
12	Diagrama de la pared celular de las bacterias gramnegativas	68
13	Diagrama de la pared celular de las bacterias grampositivas	70
14	Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en disco.....	77
15	Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en pozo.....	78
16	<i>Piper marginatum</i> Jacq.....	88
17	Ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición (%Inh) del radical DPPH.....	97
18	Cromatograma del Aceite Esencial de <i>Piper marginatum</i>	104
19	Estructuras químicas de los compuestos mayoritarios identificados del aceite esencial de <i>Piper marginatum</i> Jacq....	106
20	Espectro RMN- ¹ H (CDCl ₃) del safrol.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

(Continuación)

Figura N°	Título	Pág.
21	Espectro RMN- ¹³ C (CDCl ₃) del safrol.....	112
22	Espectro Infrarrojo del Safrol.....	112
23	Compuesto obtenido del aceite esencial de las hojas de <i>P. marginatum</i>	114
24	Espectro de Masas del Safrol.....	115
25	Patrón de Fraccionamiento del Safrol.....	115
26	Espectro Ultravioleta del Safrol.....	116
27	Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas de <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	118
28	Comparación de las Capas de Cromatografías de Capa Fina de las muestras analizadas.....	121
29	Curva de Calibración del Acido Galico con su ecuación de la recta.....	122
30	Determinación del Contenido Total de Compuestos Fenólicos del extracto etanólico de las hojas de <i>Piper marginatum</i>	123
31	Gráfico de curva de calibración del Patrón Ácido Ascórbico...	125
32	Muestras analizadas para determinar la actividad antioxidante	126
33	Grafico comparativo de los porcentajes de inhibición obtenidos en la Actividad antioxidante de los muestras ensayadas y el ácido ascórbico.....	126
34	Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto etanólico de hojas de <i>Piper marginatum</i>	127

ÍNDICE DE FIGURAS

(Continuación)

Figura N°	Título	Pág.
35	Resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	132
36	Resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	135

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°	Título	Pág.
1	Taxonomía de la familia Piperaceae.....	21
2	Clasificación taxonómica de las subfamilias que conforman la familia Piperaceae.....	23
3	Actividad biológica de algunas especies del género <i>Piper</i>	26
4	Alcaloides y amidas reportados en especies del género <i>Piper</i> ..	28
5	Fenilpropanoides aislados de las especies <i>Piper</i>	30
6	Lignanós y neolignanós aislados de algunas especies <i>Piper</i>	33
7	Terpenos aislados de especies <i>Piper</i>	34
8	Esteroides y triterpenos aislados de especies <i>Piper</i>	35
9	Kavapironas aislados de especies <i>Piper</i>	37
10	Piperolidas aisladas del <i>Piper sanctum</i>	38
11	Flavonas aisladas de algunas especies <i>Piper</i>	39
12	Flavononas aisladas de algunas especies <i>Piper</i>	40
13	Chalconas y dihidrochalconas aisladas de <i>Piper aduncum</i>	40
14	Clasificación taxonómica de especie <i>Piper marginatum</i> Jacq....	41
15	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	87
16	Resultados de la Cromatografía Seca del Aceite Esencial de <i>Piper marginatum</i>	92
17	Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.....	99
18	Identificación de los Componentes del Aceites Esencial de <i>Piper marginatum</i>	104
19	Desplazamientos Químicos en el RMN- ¹ H (CDCl ₃) del safrol....	111
20	Desplazamientos Químicos en el RMN- ¹³ C (CDCl ₃) del safrol...	112

ÍNDICE DE TABLAS

(Continuación)

Tabla N°	Titulo	Pág.
21	Bandas Observadas en el Espectro IR del safrol.....	113
22	Fragmentos (m/z) más notables en el Espectro de Masas del Safrol.....	115
23	Determinación de la Formula Molecular del Safrol.....	116
24	Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas de <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	117
25	Datos para Curva de Calibración con Ácido Gálico.....	122
26	Resultados obtenidos del Contenido Total de Compuestos Fenólicos del extracto etanólico de las hojas de <i>Piper marginatum</i>	123
27	Resultados obtenidos Curva de Calibración con Ácido Ascórbico.....	124
28	Resultados obtenidos de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> por el método de secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH).	125
29	Valores de obtenidos de Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto etanólico de hojas de <i>Piper marginatum</i>	127
30	Resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial, fracciones y extractos obtenidos de las hojas de <i>Piper marginatum</i>	131
31	Resultados de la actividad antifungica del aceite esencial, safrol y extractos obtenidos de las hojas de <i>Piper marginatum</i> ..	134

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema N°	Título	Pág
1	Biogénesis del safrol.....	49
2	Recolección y preparación del material vegetal de <i>P. marginatum</i> Jacq.....	89
3	Obtención del Aceite Esencial de las hojas de <i>P. marginatum</i>	90

www.bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de investigación a Dios Todo poderoso, Eterno a Él sea la gloria la honra por siempre.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios primeramente por permitirme culminar esta meta. A mis padres Nibia y Luis, por su amor, apoyo y confiar en mí, los amo. A mi hija Daniela Sarai que es mi inspiración. A Mamachela, mis tías Máyela y Yolanda que son mis consejeras y heroínas. A mis tíos Gregorio y Beto. A mis hermanos Daniel, Gricel, Isabela, Mariangel gracias.

A la memoria del Doctor Luis Rojas, que es un ejemplo de entrega, dedicación, y por dejarme un legado en la investigación, gracias siempre te recordare.

A mi apreciada Tutora Yndra Cordero, gracias por confiar en mi.

A mis queridas Profesoras Ysbelia Obregón, y Alída Pérez, por su apoyo incondicional siendo un ejemplo, a esta generación de investigadores.

Gracias a mis amigas Ana Contreras, María Flores, y profesores de post-grado y amigos de la mención productos naturales Nieves, Dilma, Gina, Yomarbi, Andrés, Garielys, licenciada Judith, Profesora Gina.

A demás quiero honrar al Doctor Palencia por su valiosa Colaboración y aporte a esta investigación.

Expreso mi gratitud a la Doctora Rosa Aparicio, Ingeniero Sulay Araque, Magister Ana Flores, Universidad de Colombia por su ayuda en la parte experimental.

A la ilustre Universidad de los Andes por formarme como Profesional. Gracias.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales, desde nuestros antepasados han sido una importante fuente de medicamentos, con el paso del tiempo la industria farmacéutica ha basado sus operaciones bajo el conocimiento de los productos naturales y su utilidad en la cura de algunas enfermedades. Hoy en día existe un interés en la búsqueda de métodos alternativos para el descubrimiento de compuestos que permitan generar nuevos fármacos y sean claves en ciertas áreas terapéuticas, tales como antioxidantes, inmunosupresores, antimicrobianos, antiparasitarios y algunas enfermedades metabólicas (Newman, Cragg y Snader, 2000; Rodríguez y cols., 2018). En la actualidad los productos naturales siguen siendo candidatos químicos con potencial farmacológico, y constituyen un significativo recurso para obtención de nuevas drogas (Newman, Cragg y Snader, 2003).

Durante los últimos años, las infecciones ocasionadas por bacterias y hongos han sido un problema de salud pública ya que estos microorganismos han creado resistencia a varios fármacos disponibles en el mercado (Burke, Berger y Schreiber, 2003; Sánchez y cols., 2011). Razón por la cual se mantiene la búsqueda de nuevos antimicrobianos para combatir las enfermedades, superar los problemas de resistencia microbiana y efectos secundarios (Kaya, Yigit y Benli, 2008; Zwenger y Basu, 2008; Rodríguez y cols., 2018).

Por otra parte, el desarrollo de diferentes patologías como diabetes y enfermedades cardiovasculares causadas por el estrés oxidativo, el cual se produce cuando existe un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y los sistemas de defensa antioxidante de nuestro organismo, que se ven sobrepasados (Rodrigo y Gil-Becerra, 2014). Las ERO contribuyen al envejecimiento celular, mutagénesis, carcinogénesis y enfermedades coronarias, posiblemente a través de la desestabilización de

membranas, daño al ADN y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Heim, Tagliaferro y Bobilya, 2002). En este sentido, el estudio de la capacidad antioxidante de las plantas medicinales y alimenticias ha crecido en las últimas décadas ya que un número importante de productos obtenidos de éstas, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, poseen efectos antioxidantes los cuales son evidenciados mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* asociadas a cada uno de ellos (Leos, Rivas y García, 2016).

En relación a lo anteriormente expuesto, la familia Piperaceae, presenta plantas que se localizan en las zonas tropicales y subtropicales del mundo siendo el género *Piper* el más estudiado, ya que cuenta con el mayor número de especies con diferentes actividades biológicas (antimicrobiana, antiinflamatoria, anticarcinogénico y antioxidante) (Parmar y cols., 1997; Jara, 2013; Rodríguez y cols., 2018).

Adicionalmente, es necesario destacar que la explotación y el empleo de safrol (compuesto mayoritario del aceite esencial de algunas especies de *Piper*) es limitada hasta ahora. Este fenilpropanoide tiene una amplia aplicación en la industria química como precursor sintético de butóxido de piperonilo, piperonal y medicamentos como Tadalafil, Cinoxacina y Levodopa. La versatilidad de su estructura, permite diversas transformaciones químicas, y la naturaleza biofórica de su subunidad, le confieren características únicas y la convierten en material de partida atractivo para la síntesis de compuestos con diferentes actividades farmacológicas (Lima, 2015).

En este sentido, la presente investigación tiene como objetivo principal determinar la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum* Jacq.

PRODUCTOS NATURALES

Para poder vivir, crecer y reproducirse los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. Estas transformaciones requieren energía que la obtienen en forma de ATP y la presencia de sistemas enzimáticos. El conjunto de reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con muy pequeñas modificaciones. Estos procesos se conocen como metabolismo primario y los compuestos implicados en las diferentes rutas se conocen como metabolitos primarios (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Por otra parte, se llama metabolismo secundario al conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo, los compuestos que participan en este metabolismo se denominan metabolitos secundarios, estas sustancias no están involucradas en el metabolismo "basal" o primario, en el cual se involucran azúcares, lípidos, proteínas y glicéridos, entre otras sustancias (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Hay que entender que la diferencia entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios es solo funcional, por lo que la divergencia entre las vías bioquímicas es difusa, y a veces un compuesto es considerado un metabolito primario, pero por la acción de una sola enzima se convierte en lo

que se considera un metabolito secundario. También hay compuestos clasificados como metabolitos secundarios que cumplen funciones primarias en las plantas (Valencia, 2013).

En relación a lo expuesto anteriormente, se establece en sentido amplio que un producto natural está formado por todos los compuestos de la Naturaleza y en un sentido más restrictivo un producto natural sólo es un metabolito secundario (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Biosíntesis de los metabolitos secundarios

La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles de metabolitos secundarios, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. Es así como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por parte de las plagas (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).

La biogénesis de los metabolitos secundarios comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Existen tres intermediarios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de metabolitos secundarios como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etc. Algunos esqueletos se

sintetizan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica tal es el caso de los flavonoides que se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico, a estos compuestos se les denomina de biogénesis mixta (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Para realizar la síntesis de metabolitos secundarios la naturaleza utiliza una serie de unidades básicas como material de construcción, éstos pueden poseer un átomo de carbono, dos, cinco, agrupamientos de seis y tres, de seis y dos, de cuatro átomos de carbono y uno de nitrógeno, etc. El más simple de los fragmentos (C_1) se compone de un solo átomo de carbono, normalmente en forma de metilo, frecuentemente unido a oxígeno, nitrógeno y ocasionalmente a carbono. Deriva a partir de S-metil-L-metionina. La unidad de C_2 es aportada por acetil-CoA, y lo normal es que muchas de estas unidades se encuentren formando parte de una cadena alquílica como en los ácidos grasos o formando parte de fenoles. La cadena ramificada de cinco átomos de carbono C_5 (unidad de isopreno) se encuentra presente en todos los productos derivados del mevalonato como son los terpenos y esteroides. Las unidades de fenil-propano C_6-C_3 derivan de L-fenilalanina o de L-tirosina, dos de los aminoácidos derivados del ácido shikímico. Es una unidad esencial en la construcción de compuestos aromáticos como por ejemplo los lignanos. A partir de ésta por pérdida de uno o dos átomos de carbonos se obtienen otras dos unidades esenciales como son C_6-C_2 y C_6-C_1 . Las unidades C_6-C_2N , también son formadas a partir de L-fenilalanina o L-tirosina, encontrándose presente en muchos alcaloides. Otras unidades básicas que también se encuentran presentes en los alcaloides son C_4N casi siempre como sistemas pirrolidínicos y C_5N en forma de anillos de piperidina (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Clasificación de los metabolitos secundarios

Para clasificar los metabolitos secundarios se han utilizado muchos puntos de vista, aunque en todos ellos es inevitable la superposición. Los criterios clasificatorios de mayor aceptación son: la estructura química, el origen biogenético, la acción biológica y la actividad farmacológica (Pedrozo, 2004). Siguiendo la clasificación de Taiz y Zeiger (2006), los metabolitos secundarios se clasifican en: sustancias nitrogenadas, compuestos fenólicos y terpenoides.

Sustancias nitrogenadas: Según Pérez y Jiménez (2011), los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y de gran interés para la industria farmacológica. Los alcaloides presentan unos caracteres comunes que los diferencian de los demás compuestos secundarios, pues son moléculas orgánicas más o menos complejas, de carácter básico, presentan uno o más átomos de nitrógeno formando parte de un heterociclo; se sintetizan de aminoácidos o de sus derivados inmediatos y son sustancias con cierta toxicidad, preferentemente activas sobre el sistema nervioso central (Azcón y Talón, 2000).

Compuestos fenólicos: Los componentes fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, que forman parte importante de la dieta humana. Hoy en día, existe un gran interés en el estudio de estos metabolitos secundarios, debido a sus propiedades antioxidantes, su participación en procesos sensoriales de los alimentos naturales y procesados, además de sus posibles aplicaciones benéficas para

la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio (Porras y López, 2009).

La presencia de compuestos fenólicos es una característica de todos los tejidos vegetales. Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. Entre los polifenoles vegetales, de los que actualmente se conocen más de 8000, figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos y los flavonoides. Además de las estructuras monoméricas y diméricas, existen importantes grupos de polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos. También se encuentran unidades fenólicas entre los compuestos nitrogenados, de los que un buen ejemplo es el aminoácido aromático tirosina (Azcón y Talón, 2000).

Terpenoides: los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en las estructuras de membranas). Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (cinco átomos de carbono). Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. Los terpenos constituyen uno de los tipos de compuestos volátiles

mayoritarios en olores y en frutos (Sierra, Barros, Gómez, Mejía y Suarez, 2018).

EXTRACTOS VEGETALES

El término extracción se refiere, a la separación de sustancias biológicamente activas de los materiales inertes o inactivos de una planta mediante la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado, donde generalmente se obtienen dos componentes; el extracto (solución extraída de un disolvente) y el residuo o bagazo (Valcarcel y Gómez, 1988).

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en (Voigt, 1982):

Extractos fluidos: son extractos de drogas que, con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación (Voigt, 1982).

Extractos secos: son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5 %. Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil

manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua (Voigt, 1982).

Extractos blandos: poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que su uso es limitado (Voigt, 1982).

Crioextractos: se obtienen por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que, dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70 °C. Los crioextractos resultan muy caros, pero son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies (Castillo y Martinez, 2007).

Métodos de extracción

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona (Sierra y cols., 2018). Las principales técnicas extractivas son:

Maceración: este es un método de extracción solido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. La planta seca y molida se pone en contacto con el

disolvente a temperatura ambiente, dejando la mezcla en reposo (aproximadamente de 3 a 10 días). Transcurrido el tiempo de maceración, se decanta el extracto y se elimina el residuo vegetal, es recomendable hacer una segunda extracción (Bonatti, 1991).

Percolación: el material vegetal se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte inferior. Constantemente es necesario agregar disolvente puro por la parte superior de la columna, y así lograr compensar la cantidad de disolvente que sale por la parte inferior (Valcarcel y Gómez, 1988).

Lixiviación: en este método de extracción se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido, este proceso se utiliza industrialmente para preparar elixires; el material vegetal fresco se coloca en un recipiente a temperatura ambiente, durante 3 días, con acetona o algún otro solvente o mezcla de solventes, sin ser necesario cortar en trozos dicho material. Después de este tiempo se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor (se puede emplear otro solvente o agua) (Walton y Brown, 1999).

Digestión: es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60° C". Al aumentar medianamente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Shelles, 1992). La digestión para evitar la pérdida del solvente por evaporación, se realiza con un refrigerante, por lo cual toma el nombre de digestión a reflujo y se realiza a la temperatura de ebullición del solvente

extractor. En el caso de principios activos termolábiles, la digestión se realiza con solvente de bajo punto de ebullición (Houghton y Raman, 1998).

Extracción por Soxhlet: Es un método de extracción equivalente a una digestión y a una percolación, es un sistema cerrado y que permite el flujo de solvente en ciclos. Los equipos de Soxhlet constan de tres partes: un reservorio de solvente en la parte interior, el cual es un balón donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición. La segunda parte es un soporte para el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro. Finalmente se tiene un refrigerante o condensador el cual recibe los vapores de solvente que vienen desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente sobre el material vegetal. Cuando el soporte que mantiene el material vegetal se llena de solvente recién destilado, se activa espontáneamente un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continúa en ebullición. Cada llenada de solvente en el soporte de muestra es un ciclo, y pueden repetirse varios ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra (Houghton y Raman, 1998).

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Aunque las técnicas de análisis instrumentales modernas han desplazado casi definitivamente el uso de las técnicas clásicas o convencionales utilizadas para la identificación de los metabolitos secundarios, para muchos propósitos se utilizan todavía los análisis fitoquímicos preliminares, también conocidos como marchas fitoquímicas. Estos procedimientos analíticos se han usado durante muchos años, para tratar de identificar en un solo proceso experimental y de manera preliminar en muestras vegetales, la presencia o no de diferentes metabolitos de interés farmacéutico como los alcaloides, los esteroides, los compuestos fenólicos, los flavonoides, las quinonas, etc. Los

más usados utilizan una secuencia de procedimientos experimentales relativamente simples, que incluyen técnicas como los ensayos de coloración con diferentes reactivos químicos, los cuales permiten el reconocimiento preliminar de diferentes sustancias naturales, y se fundamentan en las propiedades ácido-base, la solubilidad y la polaridad de las clases principales de compuestos (Martínez, Valencia y Jiménez, 2004).

El estudio basado en una marcha fitoquímica consiste en efectuar una extracción (del material previamente colectado, secado y molido) que permita obtener la mayor parte de los constituyentes químicos (extracto total o crudo o bruto). Por ello se debe utilizar un solvente universal que solubilice la mayoría de los compuestos. Posteriormente el extracto total se fracciona mediante un cambio de pH y partición con solvente de menor polaridad, obteniéndose una serie de fracciones sobre las que se realizan ensayos que permitirán obtener datos sobre los grupos fitoquímicos presentes (Palacios, 2013). A continuación, se presentan algunas pruebas que permiten la identificación cualitativa de algunos metabolitos secundarios:

Prueba de Shinoda (flavonoides): los flavonoides al ser tratados con magnesio metálico (Mg^{+2}) y ácido clorhídrico concentrado (HCl) dan complejos coloreados, dando lugar a diferentes coloraciones que dependen de la estructura del flavonoide presente. En la reacción de Shinoda, el Mg^{+2} metálico es oxidado por el HCl, dando como productos H_2 que es eliminado como gas y el $MgCl_2$, que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. Anaranjado para flavonas, rojo para dihidroflavonas, rojo azulado para flavonoles, violeta para dihidroflavonoles y xantonas (Rengifo, 2013).

Ensayo de Cloruro de Hierro (III) para compuestos fenólicos: Los fenoles dan prueba positiva en presencia de una solución de $FeCl_3$, al

cambiar el color de este que es amarillo-naranja a verde, violeta o pardo. El ion cloruro ataca al hidrógeno del grupo hidróxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al Fe (formación de un complejo) (Marcano y Hasegawa, 2002).

Prueba de gelatina (taninos): los taninos son polímeros de polifenoles, sustancias de alto peso molecular, al estar en contacto con una solución de gelatina producen la precipitación de las proteínas contenidas en la solución (González, 2011).

Ensayo de Borntrager (quinonas): La naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido de amonio forman complejos de color rojo cereza. Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Tamayo, Verdecía y Mojera 2011).

Ensayo de Hidróxido de Amonio (cumarinas): se basa en la apertura y solubilización en medio básico. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoniaco (Tamayo y cols., 2011).

Ensayo de Mayer, Dragendorff y Wagner (alcaloides): Se fundamenta generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. Se llevan a cabo en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular como el reactivo de Hager (solución saturada de ácido pícrico en agua) y reactivos yodados como Dragendorff (yodobismutato potásico, precipitado rojo-naranja), Wagner (yodo/yoduro potásico, precipitado marrón-rojizo), Mayer

(mercuriyoduro potásico, precipitado blanco-amarillento) y otros. La detección de los alcaloides mediante estas reacciones de precipitación puede dar falsos positivos y falsos negativos, por lo que conviene realizar varias reacciones de detección para confirmar los resultados (Palacios, 2013).

Ensayo de Lieberman-Bourchard (triterpenos y/o esteroides): Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por poseer ambos un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo β y en la posición 5-6. Esta prueba colorimétrica utiliza una mezcla compuesta ácido sulfúrico y anhídrido acético que producen sustancias cromóforas con el ciclopentano perhidrofenantreno, por el incremento de los dos dobles enlaces conjugados formados por la deshidratación e isomerizaciones en los terpenos y esteroides. Se considera positiva la prueba cuando aparecen coloraciones rojas, verde o azul (Martínez, Valencia y Jiménez, 2004).

ACEITES ESENCIALES

El término aceite esencial o esencia presenta muchas dificultades cuando se busca un término que generalice este concepto. Existen definiciones desde el punto de vista químico, botánico y desde una perspectiva industrial. Todas coinciden en aspectos tales como que son insolubles en agua, que pertenecen al metabolismo secundario de las plantas, que están formadas por varios compuestos químicos de estructura diferente y que todas poseen en su composición algún terpenoide (Ringuelet y Viña, 2013).

En general, se podría definir un aceite esencial como la fracción química de un vegetal que es arrastrada por vapor de agua, volátil, formada mayoritariamente por compuestos de naturaleza terpenoide y que generan el

olor característico de ese vegetal. En su composición también se encuentran compuestos aromáticos derivados de fenoles, alcoholes simples, cetonas y otras moléculas alifáticas. En ciertos ambientes industriales o técnicos se diferencian los términos aceite esencial y esencia, dejando este último término para los productos de síntesis y el término aceite esencial para los naturales, producidos por las plantas (Ringuelet y Viña, 2013).

Según Stashenko (2009), los aceites esenciales en las plantas pueden encontrarse en las diferentes células oleíferas (jengibre, cúrcuma, vainilla), en los canales secretorios (pino, artemisia, anís, angélica), estar presente en las glándulas (cítricos, eucaliptos) o en los tricomas (muchas plantas de las familias Labiadas, Asteráceas, Solanáceas, Geraniáceas). El material vegetal (planta aromática), al ser sometido a extracción, libera una mezcla odorífera líquida (aceite esencial) de una gran variedad de sustancias volátiles, que recuerdan el olor, en forma muy concentrada, de la misma planta. Esta mezcla puede tener desde 50 hasta más de 300 sustancias químicas y está compuesta por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como por éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados.

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (Martínez, 1996).

Clasificación de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza de los compuestos mayoritarios.

De acuerdo a su consistencia: los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las **Esencias fluidas** son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los **Bálsamos** son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. Las **Oleorresinas** tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.) (Martínez, 1996).

De acuerdo a su origen: los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los **naturales** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los **artificiales** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales **sintéticos** como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Martínez, 1996).

Desde el punto de vista químico: a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se

pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales **monoterpenoides** (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales **sesquiterpenoides** (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales **fenilpropanoides** (p.ej. clavo, canela, anís, etc.) (Martínez, 1996).

Métodos de obtención de aceite esenciales

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos, a continuación se presentan algunos de ellos:

Expresión: los métodos por expresión son utilizados casi exclusivamente para la producción de aceites esenciales provenientes de cáscaras de cítricos. En el mundo existe un destacado mercado de aceites de limón, naranja, bergamota, mandarina y otras especies. Se obtienen a partir de las cáscaras residuales en las industrias de jugos y concentrados. En estas metodologías, aplicadas actualmente sólo a gran escala, se utilizan equipos que comprimen las cáscaras para permitir la salida del aceite presente en las glándulas de las mismas. Hay distintos equipos que pueden procesar los frutos enteros o las cáscaras solamente. En todos los casos se obtiene una emulsión de aceite y agua, que debe separarse por centrifugación y/o decantación. De esta manera no se trabaja con las altas temperaturas presentes en los métodos antes citados y con ello se evita la alteración de componentes a veces minoritarios, pero que le otorgan el agradable aroma al producto buscado (Ringuelet y Viña, 2013).

Destilación por arrastre con vapor de agua: este método es quizás el más antiguo y más difundido, se usa en la actualidad para hierbas y frutos

secos. En este proceso el vapor de agua se genera en un lugar separado del material vegetal, se hace atravesar ese vapor por el material y así se arrastra el aceite volátil hasta un condensador, para recibir la mezcla líquida de agua y de aceite esencial en recipientes adecuados o “separadores”, que por diferencia de densidad permiten que se elimine el agua condensada y se retenga el aceite extraído (Peredo, Palou y López, 2009).

Hidrodestilación: consiste en colocar el material vegetal en contacto con el agua, se lleva a temperatura de ebullición y los vapores generados se condensan y reciben en un sistema separador que permite obtener el aceite por ser inmisible con el agua. Por este método en general se obtienen aceites esenciales con baja calidad, ya que el largo tiempo de contacto entre el vegetal y agua en ebullición puede producir polimerizaciones de algunos componentes monoterpénicos, hidrólisis de ésteres valiosos como los presentes en aceite esencial de lavandas y otras alteraciones no deseadas (Ringuelet y Viña, 2013).

Extracción con solventes volátiles: en este método la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias (Martínez, 1996).

Enfleurage: es un método antiguo de obtención de aceites esenciales que ha sido muy empleado sobre todo en la región de Grasse, al sur de Francia. Se basa en el hecho de que las grasas absorben sustancias aromáticas con facilidad. Este procedimiento se utiliza para flores cuyo

contenido en aceite esencial es tan bajo que se queda en el agua de destilación, o bien que tienen un aceite esencial sensible al calor y también para otras como el nardo o el jazmín que siguen produciendo aceite esencial después de la recolección, en esta metodología, la esencia se solubiliza en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla (concreto) de aceite esencial y grasa, la cual se separa posteriormente por otros medios físico-químicos. En general, se recurre al agregado de alcohol caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa (insoluble) y el extracto aromático (absoluto). Esta técnica se emplea para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Sierra y cols., 2018).

Extracción con fluidos supercríticos: es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo, bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Martínez, 1996).

Extracción por microondas: se coloca el material a procesar con un solvente que no es afectado por las microondas, como el tolueno, hexano o tetracloruro de carbono. Al aumentar la temperatura por efecto de las microondas se rompen las estructuras que contienen el aceite, se libera éste, se disuelve en el solvente y la mezcla gaseosa solvente-aceite se trata como en los métodos tradicionales. Pueden completarse extracciones muy rápidas, pero a un elevado costo si se realiza a escala industrial (Ringuelet y Viña, 2013).

FAMILIA PIPERACEAE

Características botánicas

La familia Piperaceae es una de las más antiguas e importantes en plantas, se encuentran en el grupo principal de Angiosperma, comprende cinco géneros y un número extenso de especies cerca de unas 3000-3600 (Plantlist, 2018; Niño y Dorr, 2018).

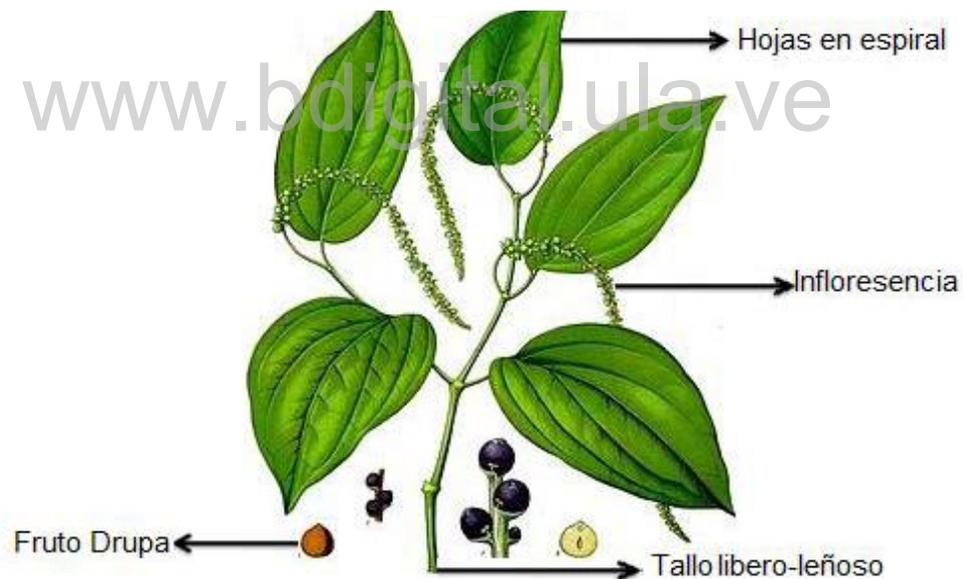
Se caracterizan por ser hierbas, arbustos, subarbustos, árboles pequeños; aromáticos con nudos prominentemente abultados; pueden presentar hojas alternas, algunas veces opuestas o verticiladas, simples, muy variables en forma y tamaño. Su fruto es carnoso que contiene varias semillas (Baya) o presenta una sola semilla (Drupa) y sus flores pueden estar unidas al eje de la inflorescencia (pedúnculo) o estar situadas en la base de la inflorescencia (bráctea), no presenta pétalo. Su reproducción puede ser bisexual o unisexual, presenta inflorescencia de tipo espiga con raras excepciones, terminal, axilares o frente a las hojas (figura 1) (Montero, 2017). A nivel de la sistemática botánica, las Piperaceae están ubicadas de la siguiente manera (tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía de la familia Piperaceae

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta (Plantas vasculares)
División	Magnoliophyta (Planta con flores)
Sub-división	Spermatophyta (Planta con semilla)
Clase	Magnoliopsida (Dicotyledonia)
Orden	Piperales
Familia	Piperaceae (Familia Pepper)

Tomado y modificado de <http://www.tropicos.org>

Figura 1. Ejemplar típico de la familia Piperaceae



Tomado de <http://conabio.inaturalist.org/taxa/71604-Piperaceae>

Distribución y hábitat

La familia Piperaceae se distribuye por todo el trópico y subtrópico del planeta tal como se muestra en la figura 2, en el neotrópico se encuentra especialmente bien representada en los bosques andinos de media a baja elevación y es poco común en la selva tropical de la Amazonia central; en América del Sur se encuentran en Ecuador donde este se distribuyen aproximadamente 4 géneros y 400 especies, en Argentina se cuenta con 2 géneros y 30 especies aproximadamente, en Perú se encuentran 3 géneros y alrededor de 830 especies, en Brasil hay 5 géneros y cerca de 500 especies, en Colombia existen cerca de 4 géneros y 2500 especies y en Venezuela se encuentran 3 géneros y 272 especies, 82 de ellas endémicas (Montero, 2017; Niño y Dorr, 2018).

Figura 2. Distribución geográfica de la familia Piperaceae



Leyenda: Los puntos amarillos, naranja y rojo hacen referencia a la distribución de la familia Piperaceae a nivel mundial.

Tomado y modificado de <https://www.tropicos.org/Name/42000020?tab=maps>

Taxonómicamente la familia Piperaceae se encuentra compuesta por más de 3500 especies en 3 sub-familias de distribución Pantropical y

agrupadas en 5 géneros: *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia*, *Pothomorphe* y *Manekia* (Trujillo y Hoyos, 2013). Filogenéticamente se ubica en el orden Piperales entre las Angiospermas Basales, según el sistema de clasificación APG III (APG, 2009). En Venezuela se encuentran los géneros *Manekia* Trel., *Peperomia* Ruiz & Pav. y *Piper* L., estudios fitoquímicos de ellas han demostrado que muchos de sus metabolitos secundarios presentan una gran variedad de actividades biológicas, la tabla 2 muestra las subfamilias que componen actualmente la familia Piperaceae (Reigada y cols., 2007).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de las subfamilias que conforman la familia Piperaceae

Subfamilia	Géneros	Número de especies	Distribución
Verhuellioideae	<i>Verhuellia</i>	Tres especies	Cuba y Hispaniola
Piperoideae	<i>Piper</i> spp	≥1000	Pantropical
	<i>Peperomia</i>	≥1000	
Zippelioideae	<i>Zippelia</i>	1	China, Indonesia y Malasia
	<i>Manekia</i>	6	América Central y Sur América

Tomado y modificado de Wanke y cols., 2007.

Usos etnobotánicos

La familia Piperaceae ha sido de gran utilidad en la vida cotidiana, por su importancia a nivel económico, comercial y medicinal, podemos encontrar que gran variedad de estas plantas cuenta con ciertas actividades como: antiinflamatoria, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, antiparasitaria, anticancerígena, analgésica, hipotensora, insecticida. Adicionalmente, varias especies de Piperáceae han presentado actividad contra protozoos del género *Leishmania* sp y antiplasmodial (Reigada y cols., 2007; Mesa y cols.,

2012; Jara, 2013; Montero, 2017; Rodriguez y cols., 2018); cabe destacar que en el ámbito económico y comercial las especies del género *Piper* son utilizadas como condimento por sus frutos aromáticos y picantes (*P. nigrum*), debido a sus diversos usos, es considerada, bien tolerada por el hombre. Lo cual se pone en evidencia que es una de las familias con mayor número de reportes en este tipo de actividad biológica es la Piperaceae, esto las convierte en una de las más importantes para la búsqueda de extractos o compuestos que tengan aplicaciones en la solución de problemas fitosanitarios (Jara, 2013).

Componentes químicos de la familia Piperaceae

Diversos estudios han mostrado que las fracciones volátiles de diferentes géneros de la familia Piperaceae contienen principalmente monoterpenos y sesquiterpenos; sin embargo, en algunas especies se encuentran un alto contenido de derivados fenilpropanoides, amidas de tipo piperidina, isobutilamina, y pirrolidina, lignanos, neolignanos, flavonoides, kawalactonas, butenólidos y epóxidos del ciclohexano entre otros (Celis y cols., 2008; Botías y cols., 2007).

GÉNERO *PIPER*

Características botánicas

El género *Piper* está conformado por aproximadamente 2000 especies, lo que lo hace único entre las Magnolita y uno de los mayores de las Angiospermas basales. Son comúnmente trepadoras, hierbas, árboles pequeños o arbustos. Hojas simples, alternas, generalmente enteras, membranaceas, rara veces peltadas, penninervias o palmatinervias, glabras o pubescentes con pelos simples o ramificados, superficie lisa o rugosa,

algunas veces punteado-pelúcidas o puntos glandulosos oscuros, presentes sobre las hojas, pecíolo o tallos jóvenes; pecioladas, pecíolo a veces alados o acanalados, nudos en los tallos generalmente engrosados; estipulas ausentes o adnatas del pecíolo. Influrencias espigas solitarias y opuestas a las hojas cilíndricas o rara vez globosas con el ápice estéril. Flores pequeñas hemafroditas, sésiles, sustentadas por una bractea glabra, pilosa o fimbriada. Perianto ausente. Estambres 2-5, ñibres; anteras dehiscentes longitudinalmente. Fruto sésil o pedicelado globoso, ovoide, obovoide, obpiramidal, subcilíndrico, a veces deprimido o comprimido; pericarpio liso o papiloso-puberulento. Semilla con endospermo nuclear; embrión poco diferenciado (Abreu y cols., 2012)

Distribución geográfica

El género *Piper* es ampliamente considerado uno de los más diversos de las Angiospermas basales, sus especies están distribuidas a lo largo de regiones tropicales y subtropicales del mundo (Quijano, Callejas y Miranda, 2006). Se distribuyen en 3 grandes regiones geográficas: Neotrópico (1300 sp), Asia tropical (600 sp) y al sur del Pacífico (100 sp) (Soltis, Soltis y Chases, 1999; Jaramillo y Manos, 2001; Quijano Callejas y Miranda, 2006; Trujillo y Hoyos, 2013).

La mayor abundancia y diversidad de especies de *Piper* se encuentran en bosques húmedos de zonas bajas en América Central y el norte de Latinoamérica; en el continente suramericano se encuentran principalmente en 5 áreas: la Costa Pacífica de Colombia y Ecuador, el oeste de la Amazonía del Perú y Ecuador, la Costa atlántica del Brasil, los Andes y Oriente de Venezuela (Quijano, Callejas y Miranda, 2006; Ordaz y cols., 2011; Montero, 2017). En Venezuela, se han identificado unas 150 especies de *Piper*, un reciente estudio del año 2018 según Niño y Door reportaron dos

nuevas especies la cuales fueron *Piper sotobosquense* y *Piper calvarii* las cuales crecen en bosques andinos de la Cordillera de Mérida y se extiende en su vertiente sur, hacia la gran Cuenca del Orinoco (Niño y Dorr, 2018).

Actividad biológica

Las especies del género *Piper* son económica y ecológicamente importantes dentro de la familia Piperaceae, algunas presentan interés etnobotánico (Colvard y cols., 2006; Cardona y cols., 2013), sus plantas son reconocidas por el sistema médico ayurvédico indio por sus propiedades medicinales y en medicina folclórica de América Latina y las Antillas (Parmar y cols., 1997). En la tabla 3 se describe la actividad biológica de algunas especies del genero *Piper*.

Tabla 3. Actividad biológica de algunas especies del genero *Piper*.

Especies	Extracto de la planta	Actividad biológica	Referencia
<i>P. catripense</i>	Extracto la fracción de acetato de etilo de las hojas	Antioxidante	(Montero,2017)
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	Percolación con hexano y extracto etanólico de los tallos y hojas.	Antiparasitaria contra amastigotes intracelulares de <i>Leishmania panamensis</i>	(Cardona y cols., 2013; Rodríguez y cols., 2018)
<i>P. holtonii</i>	Extracto etanólico de las hojas	Antiplasmódica	(Rojas, Garavito y Rincón, 2013)
<i>P. daniel-gonzalezii</i>	Extracto etanólico de tallos y hojas	Antioxidante	(Cardona y cols., 2013)
<i>P. hispidum</i>	Extracto etanólico de Inflorescencias	Anticancerígena	(Plazas y cols., 2008)
<i>P. acutifolium</i> <i>P. carpunya</i> <i>P. callosum</i> <i>P. amalago</i>	Aceites esenciales y extractos etanólicos de hojas	Antimicrobiana	(Salamanca y Galiano, 2016)

Tabla 3. Actividad biológica de algunas especies del genero *Piper*
(Continuación).

Especies	Parte de la planta	Actividad biológica	Referencia
<i>P. aborescens</i>	Extracto de cloroformo de los tallos.	Actividad contra sistema de cultivo celular y un sistema de leucemia linfocítica de P-388 en cultivo celular.	(Parmar y cols., 1997)
<i>P. tuberculatum</i>	Extractos acuoso de hojas, tallos y espigas maduras (con frutos y semillas)	Antifúngica	(Reigada y cols., 2007)
<i>P. marginatum</i>	Extracto de metanol de hojas.	Antifúngica	(Reigada y cols., 2007)
<i>P. hispidum</i>	Extracto etanólico de las inflorescencias	Antifúngico	(Navickiene, 2000)
<i>P. sarmentosum</i>	Extracto acuoso de hojas	Analgésico, antiinflamatorio, anticarcinógeno.	(Zakaira y cols., 2010)

Componentes químicos

La fitoquímica de diversas especies de *Piper*, han sido ampliamente investigadas a nivel mundial, permitiendo conocer la presencia de un gran numero de compuestos fisiológicamente activos tales como alcaloides, amidas, propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, esteroides, flavonoides, entre otros (Parmar y cols.,1997), reconociendo este género como el que presenta la mayor cantidad de metabolitos secundarios. A continuación, se menciona algunos de los componentes identificados:

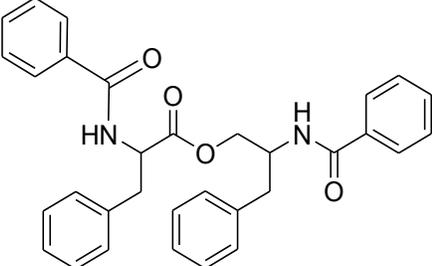
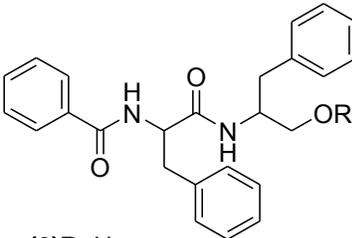
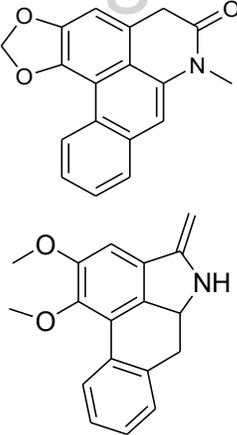
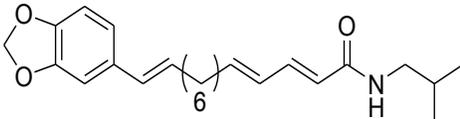
Alcaloides y amidas: Los alcaloides y las amidas del tipo piperamidas son compuestos característicos del género *Piper* y han mostrado diversas actividades biológicas (Marcano y Hasegawa, 2002; Jara,

2013). Varios alcaloides y amidas (**1-11**) que han sido aislados hasta ahora de las especies de *Piper* se muestran en la tabla 4 (Parmar y cols., 1997).

Tabla 4. Alcaloides y amidas reportados en especies del género *Piper*

Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. aduncum</i>		Aduncamida (1)
<i>P. guayaramun</i>		Alatamida (2)
<i>P. attenuatum</i> <i>P. boehimerifolium</i> <i>P. hamiltonii</i> <i>P. longum</i>		Aristolalam A II (3)
<i>P. futokadsura</i>		Futoamida (4)

Tabla 4. Alcaloides y amidas reportados en especies del género *Piper*
(Continuación).

Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. auratacum</i>		Auranamida (5)
<i>P. aurantiacum</i> <i>P. sylvaticum</i>	 <p data-bbox="630 982 781 1066">(6)R=H (7)R=COCH₃ (8) R=COPh</p>	Aurantiamida (6) Aurantiamida de acetato (7) Aurantiamida benzoatato (8)
<i>P. acutisleginum</i> <i>P. argyrophyllum</i> <i>P. attenuatum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. betle</i> <i>P. wightii</i>		Cefaradiona A (9) Cefaranone B (10)
<i>P. futokadsura</i> <i>P. hancei</i> <i>P. attenuatum</i> <i>P. guineense</i> <i>Piper hancei</i> <i>P. longum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. sylvaticum</i>		Gineensina (11)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997.

Fenilpropanos: son sustancias naturales ampliamente distribuidas en las plantas caracterizados por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikímico, la cadena lateral puede presentar varios estados de oxidación (grupos metilo, hidroxítileno, aldehído y carboxilo) e insaturación. El anillo aromático generalmente está sustituido en los carbonos 3, 4 y 5, siendo estos sustituyentes grupos hidroxilo, metoxilo o metiléndioxi, principalmente (Martínez, 2001).

Dentro del género *Piper* se han aislado fenilpropanoides (**12-18**), los cuales han presentado actividad fungicida y antiparasitaria significativa. Entre ellos destacan eugenol (**16**) que ha exhibido actividad antifúngica y el safrol (**18**) que muestra una fuerte actividad antimicrobiana; la mayoría de los compuestos fenilpropanoides han reportado mostrar actividades antimicrobianas (Parmar y cols., 1997; Jara, 2013; Rodríguez y cols., 2018). En la tabla 5 se muestran varios fenilpropanoides aislados de diferentes especies de *Piper*.

Tabla 5. Fenilpropanoides aislados de las especies de *Piper*

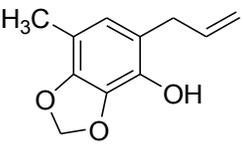
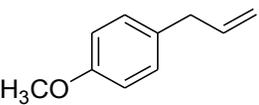
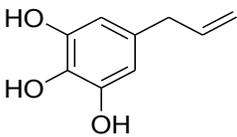
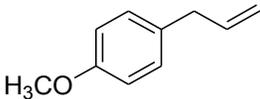
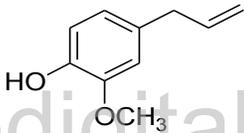
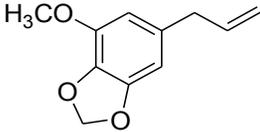
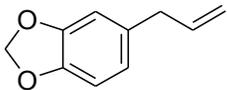
Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. argyrophyllum</i> <i>P. brachystachyum</i> <i>P. schmidtii</i> <i>P. marginatum</i>		Apinol (12)
<i>P. marginatum</i>		Anetol (13)

Tabla 5. Fenilpropanoides aislados de las especies de *Piper*
(Continuación).

Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. aduncum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. banksii</i> <i>P. guineense</i> <i>P. lenticellosum</i> <i>P. marginatum</i>		Elenicina (14)
<i>P. marginatum</i>		Estragol (15)
<i>P. auritum</i> <i>P. betle</i> <i>P. cavalcantei</i> <i>P. guineense</i> <i>P. nigrum</i>		Eugenol (16)
<i>P. aduncum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i>		Miristina (17)
<i>P. aduncum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. betle</i> <i>P. callosum</i> <i>P. cavalcantei</i> <i>P. guineense</i> <i>P. hispidinervium</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. sylvestre</i>		Safrol (18)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997; Botias y cols., 2007; Jara, 2013; Montero, 2017; Rodríguez y cols., 2018.

Lignanos y neolignanos: estos metabolitos secundarios son representativos de *Piper*, derivan biosintéticamente del ácido cinámico por acoplamiento oxidativo de dos unidades C₆-C₃ dependiendo de los carbonos que generen la unión se hace la diferenciación entre lignano y neolignano, forman una familia de productos vegetales ópticamente activos y poseen una amplitud de actividades biológicas, se han aislado varios de estos compuestos (**19-24**) de diferentes especies de *Piper* (tabla 6) (Parmar y cols., 1997; Rukachaisirikul y cols., 2004).

Tabla 6. Lignanos y neolignanos aislados de algunas especies de *Piper*.

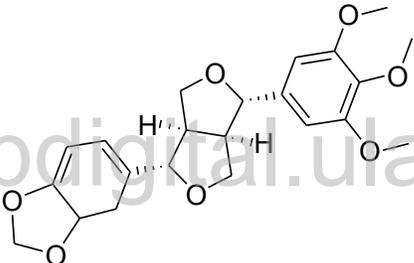
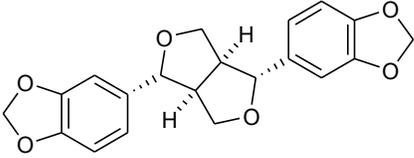
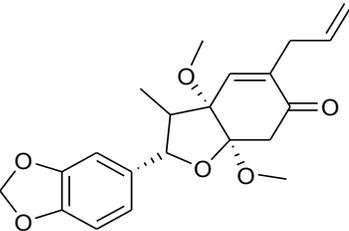
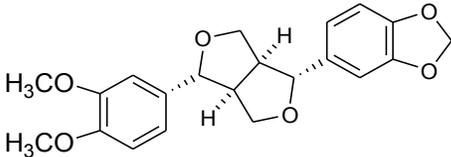
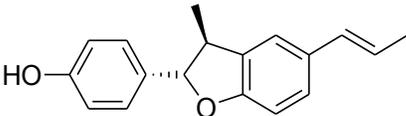
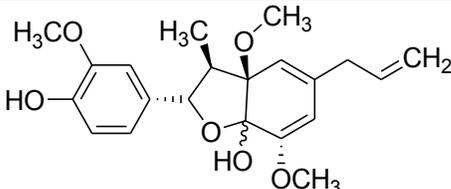
Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. sumatranum</i>		Andamanicina (19)
<i>P. austrosinense</i> <i>P. brachystachyum</i> <i>P. clusii</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. guineense</i> <i>P. longum</i> <i>P. lowong</i> <i>P. peepuloides</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. retrojiractum</i>		Sesamina (20)
<i>P. longum</i>		Kasurenona (21)

Tabla 6. Lignanós y neolignanós aislados de algunas especies *Piper*
(Continuación).

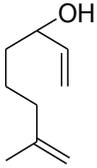
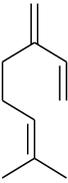
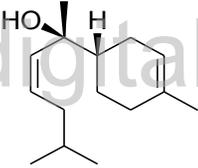
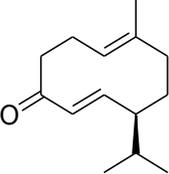
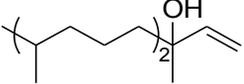
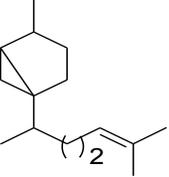
Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. austrosinense</i> <i>P. brachysrachyum</i> <i>P. longum</i>		Fargesina (22)
<i>P. cubeba</i> <i>P. guineense</i>		Conocorpan (23)
<i>P. cubeba</i> <i>P. guineense</i>		Cuneifolin (24)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997; Rukachaisirikul y cols., 2004 y Jara, 2013.

www.bdigital.ula.ve

Terpenos: la mayoría de los terpenos que han sido aislados de las especies de *Piper* (Parmar y cols., 1997) son monoterpenos **(25-26)** y sesquiterpenos **(27-30)** derivados biosintéticamente del geranilpírofosfato (GPP) y farnesilpírofosfato (FPP) respectivamente (Tabla 7) (Martínez, 2001).

Tabla 7. Terpenos aislados de especies *Piper*.

Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. auritum</i> <i>P. gaudichaudianum</i> <i>P. guineense</i> <i>P. hostmannianum</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i>		Linalool (25)
<i>P. argyrophyllum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. betle</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. guineense</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i>		Mirceno (26)
<i>P. attenuatum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. nigrum</i>		α -bisabolol (27)
<i>P. arboreumlatifolium</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. guineense</i> <i>P. kadsura</i>		Gernandreno D (28)
<i>Piper falconeri</i> <i>Piper marginatum</i> <i>Piper nigrum</i>		Nerolidol (29)
<i>Piper argyrophyllum</i> <i>Piper auritum</i> <i>Piper cubeba</i> <i>Piper marginatum</i> <i>Piper nigrum</i>		Sesquisabineno (30)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997; Botias y cols., 2007; Jara, 2013; Montero, 2017; Rodríguez y cols., 2018.

Esteroides y triterpenos: los esteroides son sustancias con el núcleo ciclopentano-perhidrofenantreno que puede o no tener cadena lateral C-17, así como metilos C-10 y C-13, los triterpenos son los terpenos de 30 carbonos, son por lo general generados por la unión cabeza- cabeza de dos cadenas laterales de 15 carbonos, cada una de ella formadas por unidades de isopreno unidas cabeza-cola (Marcano y Hasegawa, 2002). Algunos esteroides **(31-33)** y triterpenos **(34-36)** aislados de diferentes especies de *Piper* (Tabla 8).

Tabla 8. Esteroides y triterpenos aislados de especies de *Piper*

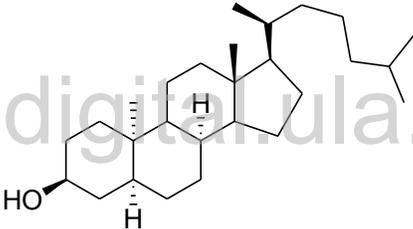
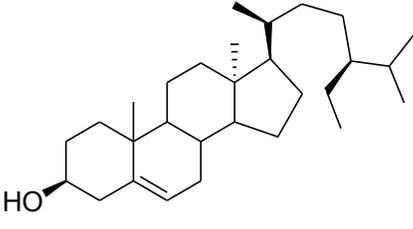
Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. aurantiacum</i>		Colestanol (31)
<i>P. aduncum</i>		
<i>P. acutisleginum</i>		
<i>P. amalago</i>		
<i>P. argyrophyllum</i>		
<i>P. attenuatum</i>		
<i>P. aurantiacum</i>		
<i>P. auritum</i>		
<i>P. austrosinense</i>		
<i>P. betle</i>		
<i>P. brachystachyum</i>		Sistosterol (32)
<i>P. callosum</i>		
<i>P. chiadoense</i>		
<i>P. nigrum</i>		

Tabla 8. Esteroides y triterpenos aislados de especies de *Piper*

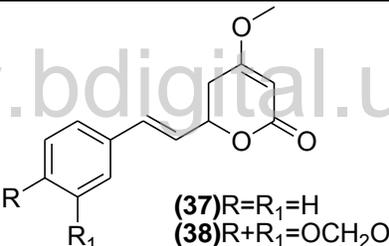
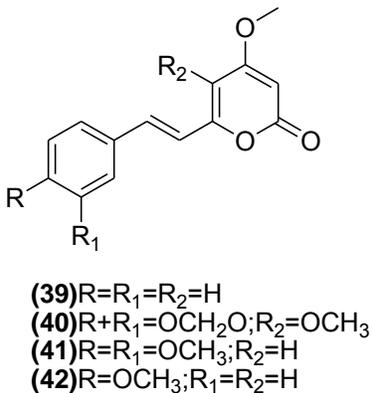
(Continuación).

Especie	Compuesto	Nombre Químico
<i>P. betle</i>		β -sistosteril palmitato (33)
<i>P. aurantiacum</i>		Epi-friedelanol (34)
<i>P. aurantiacum</i>		Fridelina (35)
<i>P. amalgo</i>		β -aurina (36)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997

Kavapironas: son compuestos de tipo α -pironas, (δ -lactonas tienen sustituyentes estiril y dihidroestiril), han sido principalmente aislados de *P. methysticum* (37-42). Estudios previos muestran que poseen actividades farmacológicas para el tratamiento de la ansiedad, tensión nerviosa, agitación e insomnio. La actividad farmacológica se asocia con un grupo de derivados δ -lactonas, denominados kavalactonas. Se creía que eran marcadores quimiotaxonómicos de la *P. methysticum*, sin embargo, se han encontrado también en *P. sanctum* (Tabla 9) (Parmar y cols., 1997; Dewick, 2002).

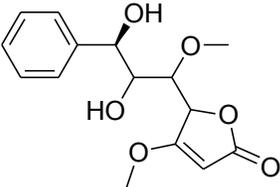
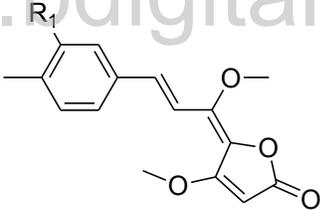
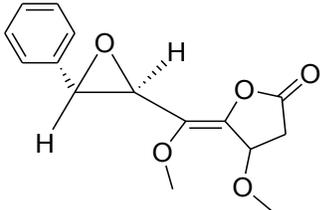
Tabla 9. Kavapironas aislados de especies *Piper*

Especies	Compuestos	Nombre Químico
	 <p>(37)R=R₁=H (38)R+R₁=OCH₂O</p>	<p>Kawain (37)</p> <p>Metisticina (38)</p>
<i>P. methysticum</i>		
<i>P. sanctum</i>	 <p>(39)R=R₁=R₂=H (40)R+R₁=OCH₂O; R₂=OCH₃ (41)R=R₁=OCH₃; R₂=H (42)R=OCH₃; R₁=R₂=H</p>	<p>Desmetoxiyangonina (39)</p> <p>5-metoxi-5,6- dehidromestiticina (40)</p> <p>11-metoxiyangonina (41)</p> <p>Yangonin (42)</p>

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997.

Piperolidas: este tipo de metabolitos junto con las kavapironas son exclusivos de la familia Piperaceae. Estos compuestos poseen en su estructura un anillo lactónico de 5 miembros α - β insaturado al grupo carbonilo, son derivados del ácido cinámico. Estos compuestos (**43-46**) son marcadores quimiotaxonómicos de *P. sanctum* (Tabla 10) (Parmar y cols., 1997; Mata y cols., 2004).

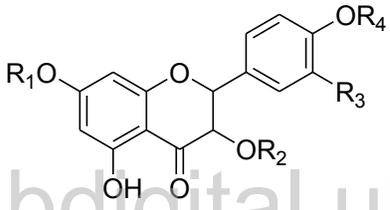
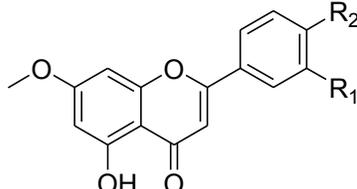
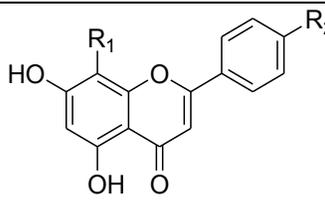
Tabla 10. Piperolidas aisladas del *Piper sanctum*

Especie	Compuestos	Nombre Químico
		(-)-Treo-(3Z)-5-(2,3-dihidroxi-1-metoxi-3-fenilpropilideno)-4-metoxi-2-(5H)-furanona (43)
<i>P. sanctum</i>	 <p data-bbox="686 1293 919 1352">(44) $R_1+R_2=OCH_2O$ (45) $R_1=R_2=H$</p>	Mtilenodioxipiperolida (44) Piperolida (45)
		7,8-Epoxipiperolida (46)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997.

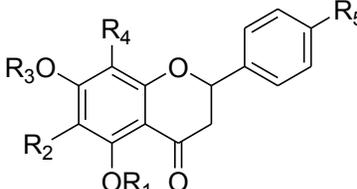
Flavonoides: los flavonoides están ampliamente distribuidos en el género *Piper* (47-60), dentro de los principales tipos que se han aislado, encontramos las flavonas (Tabla 11), flavanonas (Tabla 12) chalconas y dihidrochalconas (Tabla 13). Su actividad biológica es variada, ya que presenta actividad antibacteriana, antifúngica, destacándose su actividad antioxidante por los grupos hidroxilo de tipo fenólico presentes en la mayoría de sus estructuras (Masuoka y cols., 2003).

Tabla 11. Flavonas aisladas de algunas especies de *Piper*.

Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. nigrum</i>	 <p>R₁O, OH, OR₂, OR₄, R₃</p> <p>R₁=R₄=H; R₂=glicosil; R₃=OH</p>	Isoquercitina (47)
<i>P. clarkii</i>	 <p>OCH₃, OH, R₁, R₂</p> <p>R₁=OCH₃; R₂=OH</p>	Velutin (48)
<i>P. marginatum</i>	 <p>HO, OH, R₁, R₂</p> <p>(49)R₁=OH; R₂=O-glucosil (50)R₁=OCH₃; R₂=O-glucosil</p>	Marginatutosida (49) Vitexina (50)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997

Tabla 12. Flavononas aisladas de algunas especies de *Piper*

Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>P. hostmannianum</i> <i>P. steerni</i> <i>P. fadyenii</i> <i>P. hispidum</i> <i>P. aduncum</i>		5,7-Dihidroxi-5,7- (51)
		6-Hidroxi-5,7- dimetoxiflavonona (52)
		8-Hidroxi-5,7- dimetoxiflavonona (53)
	(51) R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =R ₅ =H	5-Hidroxi-7-metoxi-6,8- dimetilflavonona (54)
	(52) R ₁ =R ₃ =CH ₃ ; R ₂ =OH; R ₄ =R ₅ =H	Pinostrobrina (55)
	(53) R ₁ =R ₃ =CH ₃ ; R ₂ =R ₅ =H; R ₄ =OH	Sakuranetin (56)
	(54) R ₁ =R ₅ =H; R ₂ =R ₃ =R ₄ =CH ₃	5,7,8-Trimetoxiflavonona (57)
(55) R ₁ =R ₂ =R ₄ =R ₅ =H; R ₃ =CH ₃		
(56) R ₁ =R ₂ =R ₄ =H; R ₃ =CH ₃ ; R ₅ =OH		
(57) R ₁ =R ₃ =CH ₃ ; R ₂ =R ₅ =H; R ₄ =OCH ₃		

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997.

Tabla 13. Chalconas y dihidrochalconas aisladas de *Piper aduncum*

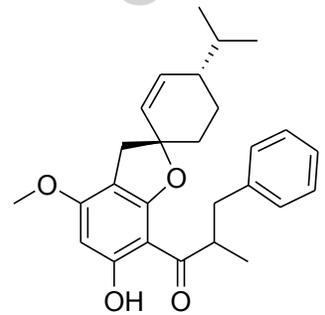
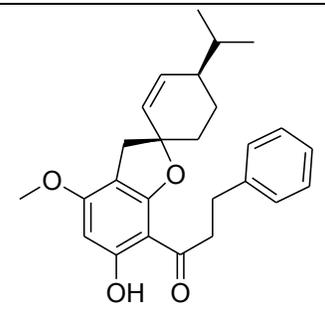
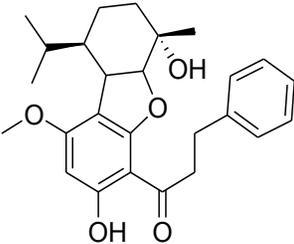
Especie	Compuestos	Nombre Químico
<i>Piper aduncum</i>		Aduntin D (58)
		Aduntin E (59)

Tabla 13. Chalconas y dihidrochalconas aisladas de *Piper aduncum*

(Continuación).

Especies	Compuestos	Nombre Químico
<i>Piper aduncum</i>		Asebogenin (60)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997.

***Piper marginatum* Jacq.**

Características botánicas

Piper marginatum Jacq., fue descrita por primera vez en 1781 por el botánico holandés Nikolaus Joseph Von Jacquin, las características botánicas se registraron como arbusto o pequeño árbol de 1,5-5 m de alto, hojas en forma de corazón, acuminadas, multivedadas y reticuladas, con un pecíolo marginal, ranurado y alado, flores solitarias y fruto globoso levemente apiculado (Bru y Guzmán, 2016; Biblioteca Digital, 2018). La clasificación taxonómica de la planta se presenta en la tabla 14.

Tabla 14. Clasificación taxonómica de especie *Piper marginatum* Jacq.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta (plantas vasculares)
División	Magnoliophyta (Planta con flores)
Sub-división	Spermatophyta (Planta con semilla)
Clase	Magnoliopsida (Dicotyledonia)

Tabla 14. Clasificación taxonómica de especie *Piper marginatum* Jacq.
(Continuación).

Orden	Piperales
Familia	Piperaceae (Familia Pepper)
Género	<i>Piper</i> (pimientas)
Especie	<i>Piper marginatum</i>

Tomado y modificado de

<http://www.tropicos.org/ReferencePage.aspx?referenceid=100018301&tab=distribution>

Distribución geográfica

Es una especie neotropical, localmente común, de amplia distribución; crece, con preferencia, en sitios perturbados y expuestos, entre los 50-800 m.s.n.m. Se encuentra naturalmente por toda Centroamérica desde México, se extiende por el Caribe hasta Colombia, Venezuela y Perú (Bru y Guzmán, 2016; Biblioteca Digital, 2018).

En Venezuela se encuentra ampliamente distribuida en Anzoátegui, Aragua, Bolívar, Carabobo, Delta Amacuro, Falcón, Lara, Mérida, Miranda, Portuguesa, Barinas, Sucre, Yaracuy, Zulia; principalmente en bosques secos o húmedos a través de todo el territorio nacional mayormente a elevaciones más bajas entre el nivel del mar y 800 metros, pero ascendiendo en el nivel de bosques nublados de la cordillera costanera hasta 1300 metros (Hokche, Berry y Huber, 2008; Lastres y cols., 2015).

En el estado Mérida se encuentra distribuida en el Municipio Campo Elías, Municipio el Morro entre el Quinó y la hacienda, 1250 m.s.m, distrito Arzobispo Chacón: rio Camburito, Santa María de Caparo 245 m.s.m, y Canagua 1500 m.s.n.m. (Hokche y cols., 2008).

Usos etnobotánicos

Piper marginatum es conocida con los vernáculos de «anisillo», «corazón de la Virgen», «cordoncillo» e «hinojo» (Biblioteca Digital, 2018). Las comunidades indígenas en Centroamérica, las Antillas y Sudamérica informaron repetidamente de usar *P. marginatum* Jacq., para el tratamiento de una variada gama de enfermedades y dolencias. La planta se emplea de forma recurrente, ya sea como una decocción o infusión por sus efectos tónicos, diuréticos y carminativos (Foungbe y cols., 1976; Johnson, 1998; Di Stasi y Hiruma-Lima, 2002; De Albuquerque y cols., 2007). También se usa para tratar los cálculos de vesícula biliar, enfermedades hepáticas (Pereira y cols., 2011; Yukes y Balick, 2011), disentería, hemostático (Sequeda y cols., 2015). En Centroamérica la especie se conoce como "Aniseto" y se emplea como Infusión para el tratamiento de trastornos de la flatulencia, por su forma similar al anís estrellado. Como analgésico es frecuente que se utilice para aliviar dolor de muelas, dolores de cabeza y dolor causado por la picazón, y como un analgésico general (Di Stasi y Hiruma-Lima, 2002; Pereira y cols., 2011).

La raíz de esta planta es empleada tópicamente es utilizada como cataplasma para aliviar el dolor de las extremidades o el abdomen hígado (Biblioteca Digital, 2018). La planta ha sido reportada para detener el sangrado y también presenta actividad antibacteriana y antifúngica (D'Angelo y cols., 1997; Reigada y cols., 2007; Sequeda y cols., 2015).

Compuestos químicos

Piper marginatum Jacq. presenta una fitoquímica de metabolitos secundarios distinta con otras especies *Piper*. Por ejemplo, es la única especie del género *Piper* que contiene anetol (**13**), estragole (**15**), isoeugenol metil éter (**61**), ácidos 3-farnesil-4-hidroxibenzoico (**62**) y 3-farnesil-4-metoxibenzoico (**63**) (Parmar y cols., 1997). Gran parte de las actividades

biológicas reportadas por el aceite esencial de esta especie se atribuye a la abundancia de compuestos terpenoides y bencenoides (Andrade y cols., 2008). De acuerdo a los estudios fitoquímicos realizados se han reportado una gran diversidad de metabolitos secundarios **(64-73)** (figura 3).

Figura 3. Componentes químicos de *Piper marginatum* Jacq.

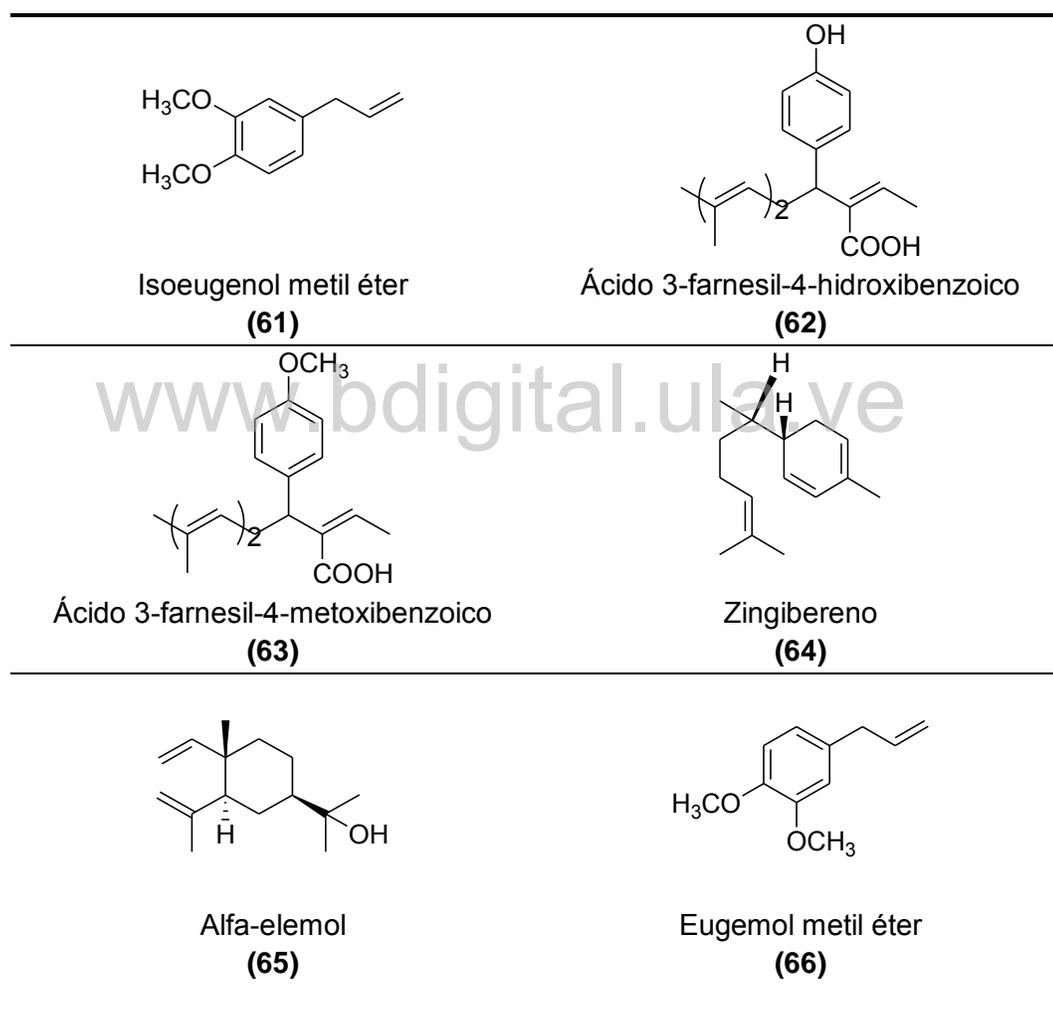
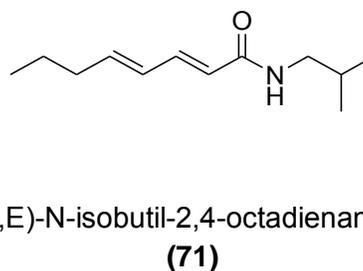
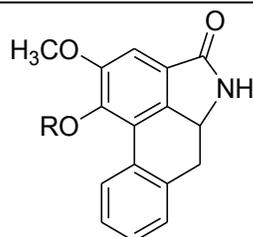
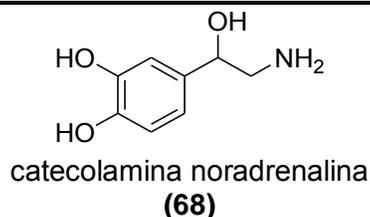
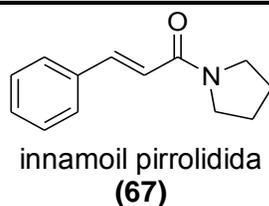
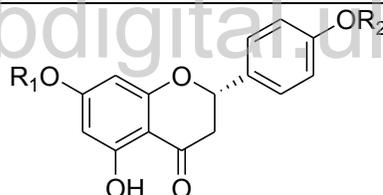


Figura 3. Componentes químicos de *Piper marginatum* Jacq.
(Continuación).



www.bdigital.ula.ve



R₁=CH₃, R₂= 5,4-dihidroxi-7-metoxiflavonona
(72)

R₁=H, R₂= CH₃ 5,4-dihidroxi-4-metoxiflavonona
(73)

Tomado y modificado de Parmar y cols., 1997; Jamarillo y cols., 2015; Bru y Guzmán, 2016; Rodríguez y cols., 2018.

Actividad biológica

La mayoría de los estudios que evalúan los aspectos biológicos y farmacológicos de las propiedades de *P. marginatum* se han centrado en el aceite esencial (AE) de sus partes aéreas. En relación con el estudio del aceite esencial de las hojas, este ha presentado una baja actividad

antimicrobiana frente a las cepas en estudio como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Candida albicans*., siendo así las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 400-800 µg/mL para *E. coli* y *S. aureus*. Los CMI de *P. aeruginosa* y *C. albicans* fue 800-1600 µg/mL y finalmente *E. faecalis* un CMI mayor a 6400 µg/mL (Duarte y cols., 2007; Guamán y Jaramillo, 2018). Asimismo se encontró un valor de CMI menor (120 µg/mL) contra la bacteria fitopatógica *Xanthomonas albilineans* (Sánchez y cols., 2012). También, el AE de las hojas se examinó para determinar la inhibición fúngica contra *Alternaria solanii* y *Fusarium oxysporum*, mostrando una actividad moderada en los ensayos de difusión en disco con una CMI de 500 µg/mL (Dos Santos y cols., 2011; Duarte y cols., 2013). Además, tanto el AE como el extracto etanólico de *P. marginatum* mostró ser inactivo contra *Candida albicans* con valores de CMI superiores a 2000 µg/mL (Duarte y cols., 2005).

Por otra parte, los aceites esenciales obtenidos de las hojas, tallos y flores fueron probados contra el mosquito *Aedes aegypti*, y se encontró que son unos potentes larvicidas (LC₅₀ que varía de 19,9 a 23,8 g/mL) siendo el AE del tallo y las flores ligeramente más activos que el AE de las hojas (Autran y cols., 2009).

De modo similar, el AE de *P. marginatum* de las Provincias de Turbaco y Acandí de Colombia mostraron una actividad antioxidante (DPPH) significativa con un valor de concentración inhibitoria media (IC₅₀) entre 1,2 y 1,5 µg/mL lo que representa una actividad del 73,7% y 90,0%, respectivamente; mientras que el ácido ascórbico de control mostró un valor de IC₅₀ de 1,0 µg/mL con un 97,0% (Jaramillo-Colorado y cols., 2015).

Tanto las hojas como la raíz de *P. marginatum* recolectadas en Yutaje, Venezuela se extrajeron con etanol y los extractos obtenidos se probaron para determinar su citotoxicidad contra una colección de líneas celulares cancerosas. El extracto de las hojas fue activo contra la línea de carcinoma

de colon humano HT-29 con una inhibición del crecimiento celular medio (GI_{50}) de 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pero inactivo contra las otras líneas de cáncer, mientras que el extracto de raíz se encontró activo contra el carcinoma pancreático humano PANC-1 (GI_{50} 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y moderadamente activo contra las líneas celulares de carcinoma HT-29 de colon (GI_{50} 298 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de pulmón A549 (GI_{50} 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Villasmil y cols., 2006).

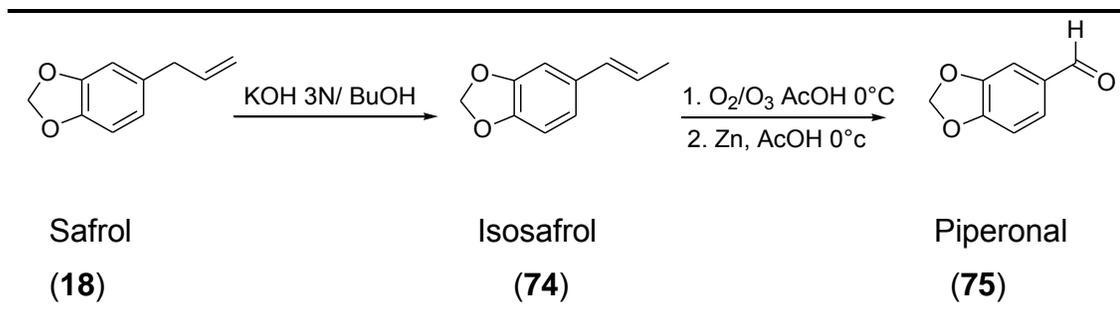
SAFROL

El safrol (**18**) es un alilbenceno natural de baja polaridad, de distribución amplia en el reino vegetal, es encontrado, en especies de las familias Aristolochiaceae, Lauraceae y Piperaceae (Costa, 2000).

Este producto natural se presenta especialmente en el aceite de sazafrán con un 80 % de abundancia, se ha utilizado durante mucho tiempo para tratamiento de algunas enfermedades como la gripe, problemas de digestión, estómago y artritis. Algunos derivados de safrol como la heliotropina preparada por oxidación de isosafrol constituye un perfume utilizado ampliamente en la industria cosmética (Van Loc y Van Sung, 2007).

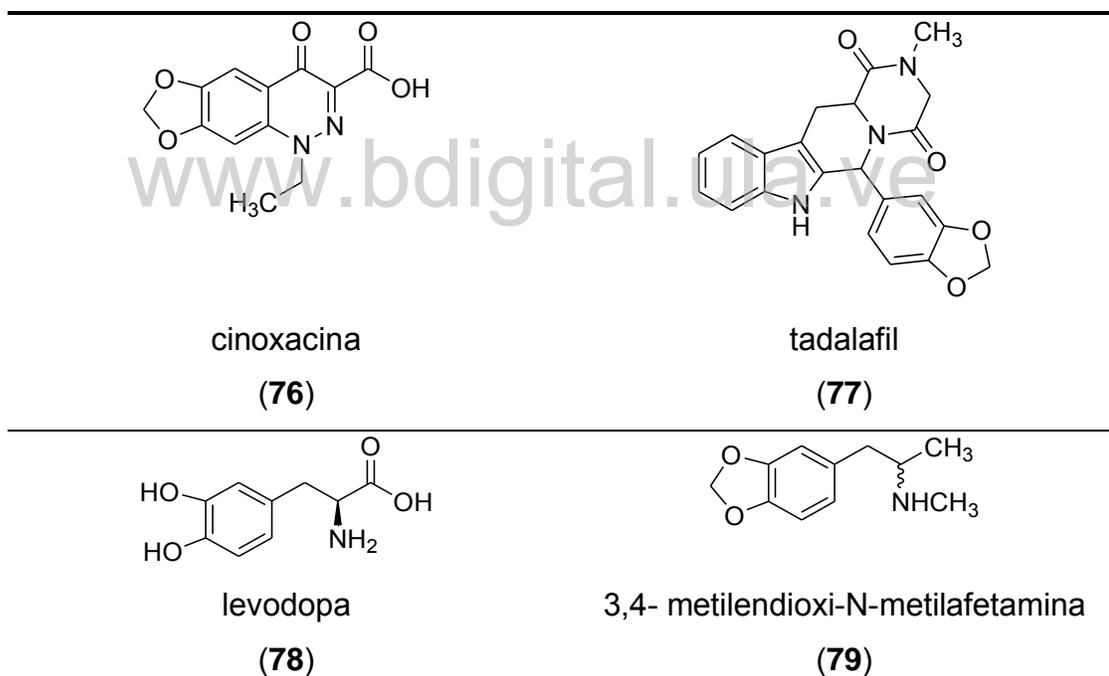
El hallazgo de la heliotropina o piperonal (**75**), fácilmente sintetizada a partir de safrol (**18**) e isosafrol (**74**) (Figura 4), ha permitido la síntesis de moléculas orgánicas complejas que han expandido su valor y su aplicación industrial. El safrol, puede usarse como material de partida de síntesis de varios compuestos biológicamente activos como la cinoxacina (**76**), tadalafil (**77**) y levodopa (**78**), utilizados como antibacteriano, en el tratamiento de la disfunción eréctil y de la enfermedad de Parkinson, respectivamente. El piperonal también se utiliza en la síntesis de drogas ilícitas como la 3,4-metilendioxi-N-metilafetamina (MDMA, éxtasis, **79**, Figura 5).

Figura 4. Hemisíntesis del piperonal



Tomado y modificado de Lima, 2015.

Figura 5. Derivados hemisintéticos de la Heliotropina



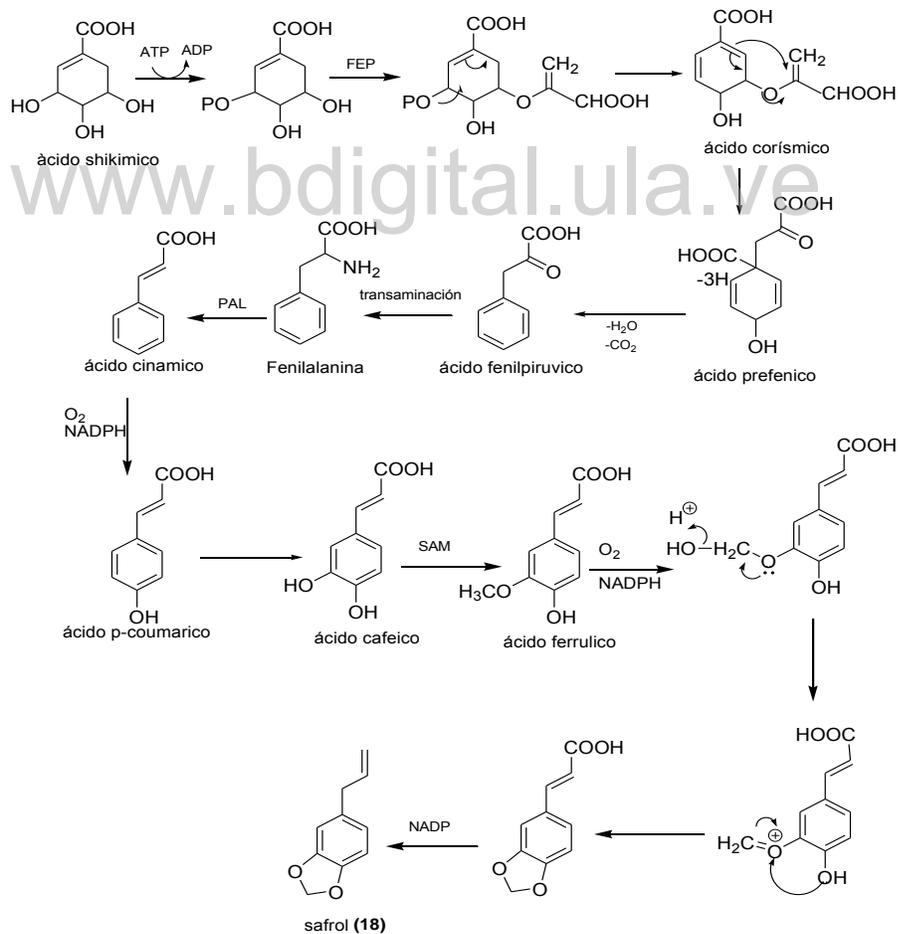
Tomado y modificado de Lima, 2015.

Se han realizado varios intentos para identificar fuentes naturales de safrol. Entre ellas, emergen las Piperaceae como una alternativa prometedora, Yunker en 1972, reportó que *Piper hispidinervium* (conocido como pimienta larga) es una planta rica en safrol, distribuida en toda América

del Sur y endémica en el estado de Acre en Brasil. Otras especies de *Piper* (*P. divaricatum*, *P. nigrum*, *P. callosum* y *P. aduncum*) también se consideran una eventual fuente sostenible de safrol (Rocha y Ming, 1999; Barbosa y cols., 2012).

En tal sentido, la biogénesis propuesta para la formación de safrol en las plantas, involucra la condensación de eritrosa 4-fosfato con fosfoenolpiruvato, adicionalmente, proveniente de la ruta del ácido shikímico (Esquema 1) (Vizcaíno, 2013; Dewick, 2002).

Esquema 1. Biogénesis del safrol



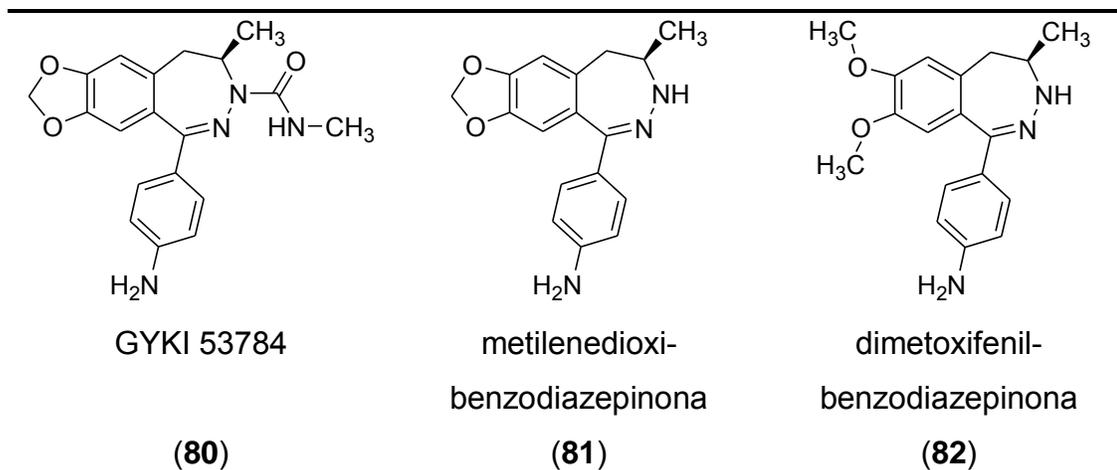
Tomado y modificado de Martínez, 2001; Dewick, 2002.

Actividad biológica del safrol y sus derivados

La peculiar reactividad del safrol ha permitido la modificación selectiva de cada grupo funcional que compone su estructura, convirtiéndolo en una materia prima atractiva para la síntesis de varios compuestos biológicos. Desde el punto de vista medicinal, el 1,3-benzodioxol es un bióforo versátil, que puede ser reconocido por diferentes biorreceptores, a través de enlaces de hidrógeno y/o interacción hidrofóbica. Estas características hacen del sistema 1,3-benzodioxol un fragmento molecular o andamio común en la estructura de varios compuestos sintéticos bioactivos, como se presenta a continuación en los siguientes ejemplos (Lima, 2015):

El GYKI 53784 (**80**) es un antagonista selectivo y no competitivo de los receptores alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiona (AMPA), perteneciente a la clase de 2,3-benzodiazepinas que contiene el núcleo de benzodioxol. Se considera un candidato a fármaco líder para el tratamiento de epilepsia, esquizofrenia y neurotrastornos degenerativos. Considerando que la interacción con el receptor AMPA permite que los antagonistas sirvan terapéuticamente como anticonvulsivantes y neuroprotectores útiles, varias metilendioxi-benzodiazepinonas han sido descritas como promesa neuroactiva (Ruel, Guitton y Puel, 2002). Entre ellas, el metilenedioxi-benzodiazepinona (**81**) resalta con $IC_{50} = 2,7 \mu M$ y buena actividad anticonvulsiva medida *in vivo*. El papel central de andamio de benzodioxol o subunidad de metilendioxifenilo en la actividad del compuesto (**81**) fue establecida por el intento de reemplazar este resto por una subunidad de dimetoxifenilo, lo que resultó en el compuesto análogo dimetoxifenil (**82**) (Figura 6) con gran disminución actividad antagonista con el receptor de AMPA (Wang y cols., 1998).

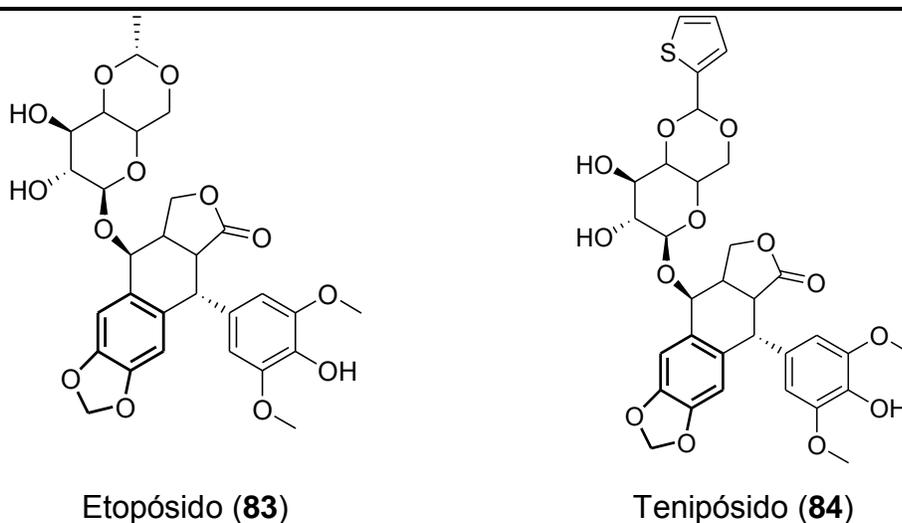
Figura 6. Antagonistas de receptores AMPA



Tomado y modificado de Wang y cols., 1998

Por otra parte, la unidad de metilendioxi, presente en safrol, puede identificarse en los agentes antitumorales clínicos etopósido (83) y tenipósido (84) resaltando la importancia de este núcleo en el safrol (figura 7) (Lima, Peixoto da Silva, De Souza, Araújo y Brondani, 2004).

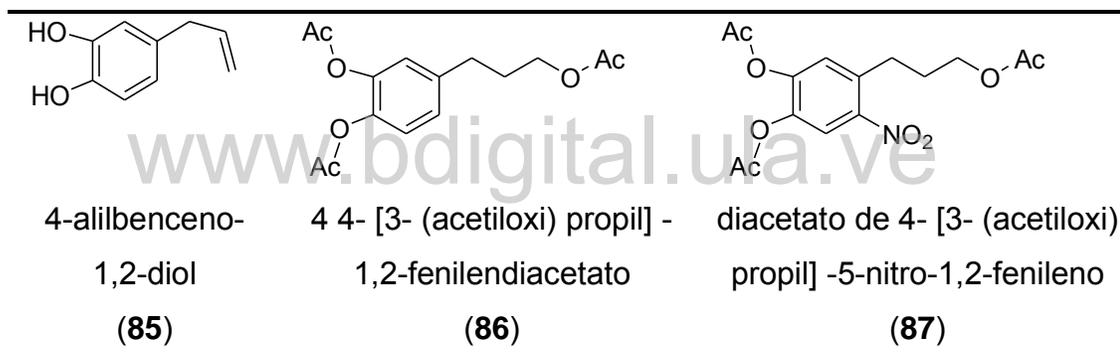
Figura 7. Agentes antitumorales clínicos



Tomado y modificado de Lima, Peixoto Da Silva, De Souza, Araújo y Brondani, 2004.

Asimismo, Madrid y cols (2011) sintetizaron catecoles a partir de safrol (Tabla 19) y evaluaron los efectos antiproliferativos utilizando diferentes líneas celulares humanas. Los derivados 4-alilbenceno-1,2-diol (**85**), 4 4- [3-(acetiloxi) propil] -1,2-fenilendiacetato (**86**) y el diacetato de 4-[3-(acetiloxi) propil] -5-nitro-1,2-fenileno (**87**) (figura 8) mostraron mayor citotoxicidad que el compuesto original en pruebas realizadas en dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231). Los valores IC₅₀ de 40,2 ± 6,9 µM, 5,9 ± 0,8 µM y se obtuvieron 33,8 ± 4,9 µM, respectivamente, sin toxicidad para fibroblastos dérmicos humanos (células DHF).

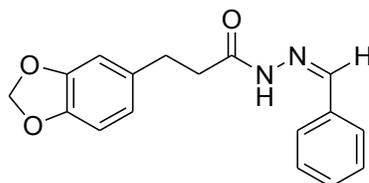
Figura 8. Catecoles bioactivos derivados del safrol



Tomado y modificado de Madrid y cols., 2011.

De igual modo, se han obtenido derivados con actividad analgésica a partir del safrol, en tal sentido, Lima y cols (2011), sintetizaron nuevas series de compuestos antinociceptivos pertenecientes a la clase N-acil-aril-hidrazonas (NAH) a partir del safrol y reportan que el derivado [(4'-N, N-dimetilaminobenciliden-3-(3', 4'-metilendioxfenilo)-propionilhidrazina] (**88**, figura 9) fue más potente que la dipirona y la indometacina usados como estándar.

Figura 9. Derivado del safrol con actividad analgésica



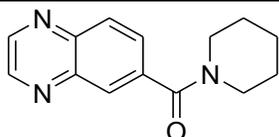
[(4'-N, N-dimetilaminobenciliden-3- (3', 4'-metilendioxfenilo) -
propionilhidrazina]

(88)

Tomado y modificado de Lima y cols., 2011

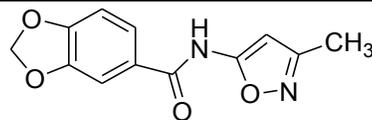
Adicionalmente, también ha sido reportada la síntesis a partir del safrol de moléculas análogas estructuralmente a la ampakina CX-516 (89), medicamento utilizado para tratar la enfermedad de Alzheimer, así los compuestos (90-96, figura 10) mostraron inhibición *in vitro* contra las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa incrementando la memoria en mamíferos, siendo este estudio una aproximación directa a un estudio clínico para explorar las probabilidades de convertirse en medicamentos para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras relacionadas como la enfermedad de Parkinson y la depresión (Cobar, 2008).

Figura 10. Análogos de la ampakina CX-516 a partir del safrol



ampakina CX-516

(89)

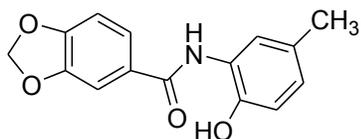


N-(5-metilisoxazol-3-yl)-1,3-
benzodioxol-5-carboxamida

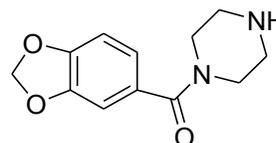
(90)

Figura 10. Análogos de la ampakina CX-516 a partir del safrol

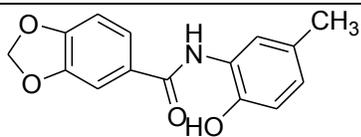
(Continuación).



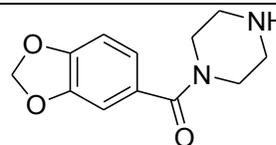
N-(2-hidroxi-4-metil-fenil) [benzo]-
[1,3]-dioxol-5-carboxamida
(91)



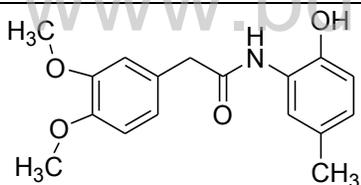
N-(3-metilisoxazol-5-yl)-1,3-
benzodioxol-5-carboxamida
(92)



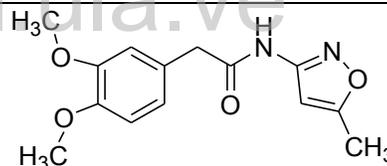
N-(2-hidroxi-5-metil-fenil) [benzo]-
[1,3]-dioxol-5-carboxamida
(93)



[benzo]-[1,3]-dioxol-5-yl-(piperazin-1-
yl)-metanona
(94)



2-(3,4-dimetoxifenil-N-(2-hidroxi-5-
metil-fenil)-acetamida
(95)



2-(3,4-dimetoxifenil-N-(5-
metilisoxazol-3-yl)-acetamida
(96)

Tomado y modificado de Cobar, 2008

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Los métodos cromatográficos se fundamentan en la separación de diferentes componentes de una mezcla, esto se logra a través del paso de una muestra por una fase estacionaria con la ayuda de la fase móvil, cada componente de la mezcla tiene propiedades particulares que permitirá su

interacción en forma diferente entre la fase estacionaria y móvil, de esta forma cada componente se retrasa en forma particular, las características de la fase estacionaria y móvil y la longitud de la columna deben ser adecuadas para una separación completa de todos los componentes de la muestra. En tal sentido las técnicas cromatográficas se pueden clasificar de la siguiente manera (Ettre, 1993; Sgariglia, Soberón, Sampietro y Vattuone, 2010; Braithwaite y Smith, 1999):

Según la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil

Cromatografía de líquidos (CL): Es una técnica de separación en la que la fase móvil es un líquido. La cromatografía de líquidos se puede realizar tanto en columna como en plano. Se divide en:

- **Cromatografía líquido-sólido (CL-S):** La fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.
- **Cromatografía líquido-líquido (CL-L):** La fase estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido.

Cromatografía de gases (CG): Es una técnica de separación en la que la fase móvil es un gas. La cromatografía de gases se lleva a cabo siempre en columna. Se divide en:

- **Cromatografía gas-sólido (CG-S):** La fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.
- **Cromatografía gas-líquido (CG-L):** La fase estacionaria es un líquido no volátil impregnado en un sólido y la fase móvil es un gas.

Según el tipo de interacción

Dependiendo de las interacciones que se establecen entre los componentes de la mezcla y la fase móvil y estacionaria los métodos cromatográficos se pueden clasificar en:

Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es un sólido polar capaz de adsorber a los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar.

Cromatografía de partición: La separación se basa en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en las fases estacionaria y móvil, que son ambas líquidas.

Cromatografía de intercambio iónico: La fase estacionaria es un sólido que lleva anclados grupos funcionales ionizables cuya carga se puede intercambiar por aquellos iones presentes en la fase móvil.

Cromatografía de exclusión: La separación se basa fundamentalmente en efectos de exclusión, tales como diferencias en el tamaño de las moléculas y /o en su forma o en su carga. El término cromatografía de exclusión por tamaño, se puede utilizar cuando la separación se basa en el tamaño molecular. Los términos cromatografía de filtración sobre gel o permeación sobre gel (CPG), se han utilizado con anterioridad para describir este proceso cuando la fase estacionaria es un gel hinchado.

Según la naturaleza del soporte en el que se aloja la fase estacionaria

Cromatografía en columna: Es una técnica de separación en la que el lecho estacionario está dentro de un tubo. Las partículas de la fase

estacionaria sólida, o del soporte recubierto con la fase estacionaria líquida, pueden llenar el volumen interno del tubo (columna rellena), o concentrarse sobre o a lo largo de la pared interna del tubo, dejando un camino abierto sin restricción, en la parte media, por el que circula la fase móvil (columna abierta).

Cromatografía plana: Es una técnica de separación en la que la fase estacionaria es un plano o está sobre un plano. Este plano puede ser un papel utilizado como tal, o impregnado con una sustancia a modo de lecho estacionario (cromatografía en papel, CP), o bien una capa de partículas sólidas que recubren un soporte, como por ejemplo una placa de vidrio (cromatografía en capa fina, CCF).

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

La espectroscopia es el estudio de la interacción de la luz con los átomos y las moléculas, lo cual permite medir la cantidad de radiación que absorbe una sustancia a diferentes longitudes de onda, proporcionando información sobre la naturaleza de los grupos funcionales, estructura del esqueleto carbonado, peso molecular, entre otros (Albornoz, 1980).

La energía absorbida por las moléculas puede provocar en los átomos varios tipos de excitación: traslación, rotación, vibración, todo depende de la radiación aplicada de acuerdo a esto las técnicas espectroscópicas pueden clasificarse en (Albornoz, 1980):

Espectroscopia Infrarrojo: Es una técnica que permite identificar grupos funcionales presentes en una molécula, en base a la longitud de onda de absorción, característica de cada grupo funcional. Mide los cambios en las vibraciones de tensión y flexión que ocurre cuando una molécula absorbe

energía electromagnética de la frecuencia infrarrojo. La región del infrarrojo está situada entre la zona de microondas y la luz visible, comprende la región IR cercano (14290 cm^{-1}), la región del IR fundamental ($4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) y la región del IR lejano ($600\text{-}200\text{ cm}^{-1}$) (Bellamy, 1975).

Espectroscopia Ultravioleta: Esta técnica mide las transiciones electrónicas de los átomos en las moléculas. Es decir, cuando se hace pasar un haz de radiación electromagnética de la región ultravioleta, a través de una sustancia, la energía absorbida por las moléculas produce transiciones de los electrones de valencia entre dos niveles de energía diferentes, provocando la promoción de un electrón de un orbital molecular ocupado de baja energía, a un orbital molecular vacío de alta energía. La región ultravioleta comprende la región ultravioleta lejano con longitudes de onda menores a 200 nm , y el ultravioleta cercano que van de 200 a 400 nm , esta última es la región de mayor interés (Albornoz, 1980).

Espectrometría de masas: Este método se fundamenta en la fragmentación que se produce cuando un compuesto orgánico se expone a una corriente de electrones de alta energía produciendo fragmentos con cargas positivas que son separados por el campo magnético y registrados en el espectro de masas según la unidad de masa por el número de cargas positivas. El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas (Davies, 1990):

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear: La espectroscopia de RMN es un método basado en la absorción de energía por cambio del espín nuclear de átomos sometidos a un campo magnético externo. El análisis del espectro de RMN ofrece evidencias sobre las características de los núcleos que conforman una molécula, puede utilizarse solo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o ambos) y los más frecuentemente analizados son ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , siendo los dos primeros utilizados en el análisis de rutina (Sanders y Hunter, 1993).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante se define como la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa. Varios mecanismos creen que su principal modo de acción está relacionado con la alta reactividad hacia radicales libres. Sin embargo, debe distinguirse entre capacidad antioxidante y reactividad. Mientras que la capacidad antioxidante da información acerca de la duración del efecto antioxidante, la reactividad caracteriza solo la dinámica de inicio del efecto antioxidante a una concentración fija de compuesto. La actividad antioxidante está determinada por la reactividad química del antioxidante, la capacidad del antioxidante para acceder hasta el sitio de reacción y la estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres (Londoño, 2004).

Radicales Libres

Los radicales libres se definen como cualquier especie química capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura, por lo tanto, son altamente reactivos; también son conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO) y especies reactivas del nitrógeno (ERN). A bajas concentraciones son

necesarios para el buen funcionamiento celular pueden actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como mediadores para la activación de las células, sin embargo, un exceso de los mismos puede acumularse hasta niveles tóxicos dando como resultado que se produzcan diversas acciones sobre el metabolismo primario, que pueden producir daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas. Estos participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, tales como: cáncer, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares o procesos neurodegenerativos. También están implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento, el daño causado por el ejercicio físico agotador y otros (Valko, Leibfritz, Moncola, Cronin, Mazura y Telser, 2007).

Los daños que los radicales libres pueden ocasionar en las células son: destrucción de las proteínas de la membrana ocasionando la pérdida de la identidad de la célula, fusión de los lípidos (grasas) y las proteínas de la membrana, endureciéndola, haciéndola más frágil y quebradiza, punción de la membrana celular permitiendo que las bacterias y virus puedan penetrar fácilmente, ruptura de la membrana nuclear abriendo el núcleo y dejándolo expuesto al material genético, mutación y destrucción del material genético, reimprimiendo y destruyendo la anterior información genética, y amenaza al sistema inmunológico mediante la debilitación de las células inmunes debido a tales daños. Como resultado, el daño de los radicales libres se ha relacionado con diferentes procesos patológicos, como la aterosclerosis, cáncer, catarata senil, insuficiencia renal aguda y crónica, diabetes mellitus, hipertensión arterial, cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica, distrofia muscular, artritis e inflamación, enfisema pulmonar e incluso el mismo proceso de envejecimiento (Rueda, 2010).

Los radicales libres no son completamente dañinos, ya que nuestro propio organismo los fabrica en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus. Los radicales libres producidos por el cuerpo para llevar a cabo determinadas funciones son neutralizados fácilmente por nuestro propio sistema antioxidante. El problema para nuestras células se produce cuando se da un exceso sostenido de radicales libres en nuestro sistema, a través de los años, situación en la cual nuestro sistema antioxidante requiere de los antioxidantes de la dieta. El incremento de los radicales libres por encima de la cantidad de sustancias antioxidantes, conduce al estrés oxidativo, lo que produce daño celular (Pereira y cols., 2012).

Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres. Podemos distinguir dos categorías: sintéticos y naturales. Los primeros son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquílica, mientras que los segundos pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides (Pastene, 2009)

Hay diferentes grupos de antioxidantes los cuales tienen una función principal en las células, protegiéndolas tanto en el exterior (extra-celular) como en el interior (intra-celular) dado que los radicales libres, pueden atacar la célula tanto por dentro como por fuera (Rueda, 2010).

Para contrarrestar el efecto nocivo de los radicales libres, los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante, que incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo. Los antioxidantes se pueden agrupar según su naturaleza química y su modo de acción (Sánchez y Méndez, 2013):

Enzimas: actúan específicamente sobre las ERO, degradándolas a moléculas menos nocivas mediante mecanismos bioquímicos específicos.

Antioxidantes preventivos: son moléculas encargadas de secuestrar a los iniciadores del proceso oxidativo, tales como hierro (Fe^{+2}) y cobre metálico (Cu^{+2}), los cuales aceleran la formación de ERO.

Antioxidantes secuestradores de ERO: inhiben la cadena de reacción y propagación en la formación de radicales libres.

Antioxidantes nutricionales: protegen a la célula en contra de los efectos de la oxidación, los sistemas de defensa antioxidante deben actuar en conjunto para formar un sistema íntegro en donde la dieta es la mayor fuente de antioxidantes y micro elementos para la síntesis de enzimas antioxidantes.

Métodos para la determinación de la actividad antioxidante

La importancia de los polifenoles en salud humana ha sido ampliamente revisada. No obstante, uno de los aspectos críticos de la investigación sobre la capacidad antioxidante de productos naturales se relaciona con la elección de las herramientas de medición. Cada vez es necesario contar con una batería de ensayos que nos permitan obtener información complementaria. El uso de radicales estables coloreados como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico (ABTS), o reactivos como el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ); se recomiendan como criterio preliminar para jerarquizar las distintas plantas, extractos o fracciones de éstos, de acuerdo a su poder antioxidante. Las medidas de la actividad antioxidante se pueden realizar mediante dos estrategias distintas, en función de la información que se desea obtener, en tal sentido se mencionan a continuación (Leos, Rivas y García, 2016):

Determinación directa: El radical se emplea como un factor de cuantificación (produce una señal analítica). La adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal. En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra y así, cuando se añade la sustancia antioxidante se produce un descenso en la señal debido a la disminución de la concentración del radical. En ensayos de inhibición, la muestra se añade a los sustratos de oxidación antes que sea generado el radical, la reacción comienza con la adición del oxidante (ABTS^{•+}, DPPH, entre otros) (Leos y cols., 2016).

Determinación indirecta: La presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo y, por tanto, en presencia de un antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal (Leos y cols., 2016).

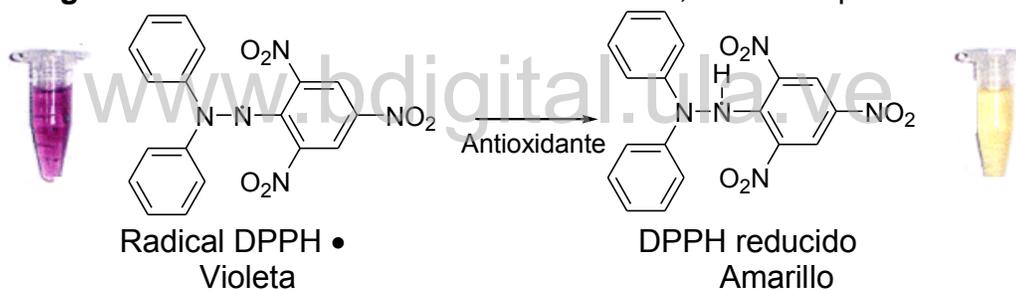
En relación a lo expuesto anteriormente, los métodos de medición de la actividad antioxidante muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno y fuentes de radicales libres (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald y Robards, 2002).

La evaluación de actividad la antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libre en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto, se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como los ensayos de ABTS (ácido

2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (Antolovich y cols., 2002).

Ensayo de decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]): El fundamento del método, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante (figura 11); la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Brand, Cuvelier y Berset, 1995; Molyneux, 2004).

Figura 11. Mecanismo de acción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo



Tomado y modificado de Brand, Cuvelier y Berset, 1995.

Ensayo de decoloración con el radical catiónico ácido 2,2', azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS): Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical $ABTS^{•+}$, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico $ABTS^{•+}$ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio (Re, Pellegrini, Proteggente, Yang y Rice 1999).

La ventaja de este ensayo es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado en cada

caso y que proporciona rápidamente los resultados más reproducibles empleando un equipo de laboratorio relativamente común como es el espectrofotómetro, ampliamente utilizado. Además, como la longitud de onda a la que se realizan las medidas de absorbancia no es común en los alimentos, hace que este método sea particularmente interesante para el estudio de extractos vegetales ya que elimina la posibilidad de interferencias de color (Re y col., 1999).

Ensayo FRAP (Reducción del hierro férrico a ferroso): Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que tuvo un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (Mesa, Gaviria, Cardona, Sáez, Trujillo y Rojano 2010).

www.bdigital.ula.ve

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Es la capacidad de una sustancia de matar, destruir, inactivar o impedir la proliferación o acción patógena de un determinado microorganismo. Dicha sustancia puede ser de origen natural o sintetizada químicamente en el laboratorio, en ambos casos es conocida con el nombre de antibiótico o antifúngico. Éstos últimos a su vez se clasifican en bactericidas o fungicidas que lisan o destruyen el microorganismo, y en bacteriostáticos o fungistáticos que inhiben la multiplicación microbiana y además poseen un efecto reversible, es decir, que al retirar el antibiótico el microorganismo se sigue multiplicando. La actividad antibacteriana es determinada mediante pruebas de susceptibilidad, en las cuales se evalúa la

respuesta de una bacteria u hongo frente a concentraciones preestablecidas de antibióticos o antifúngicos (Koneman, 2008).

Para determinar su correcta evaluación existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de valorar su actividad, en especial la antimicrobiana, a través de diferentes métodos *in vitro* principalmente desarrollados en el laboratorio y así establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran una resistencia ya sean a bacterias, hongos y protozoos (Ramirez y Marin, 2009).

Estas pruebas estandarizadas son de vital importancia, debido a que la actividad biológica de extractos de plantas o sus compuestos puros es evaluada en todo el mundo por diferentes grupos de investigación. Esto es relevante debido a que se pueden obtener diferentes beneficios de los métodos antes mencionados como son el establecer una terapia alterna, una vez que el extracto vegetal ha sido evaluado en diferentes concentraciones, considerando sus propiedades antimicrobianas, además de establecer el descubrimiento de nuevos mecanismos de acción y generar una base de datos que permitan seleccionar los diferentes extractos vegetales para el tratamiento de diversas afectaciones médicas, hasta desarrollar políticas de uso de los extractos vegetales estudiados (Taroco, Seija y Vignoli, 2006).

Bacterias

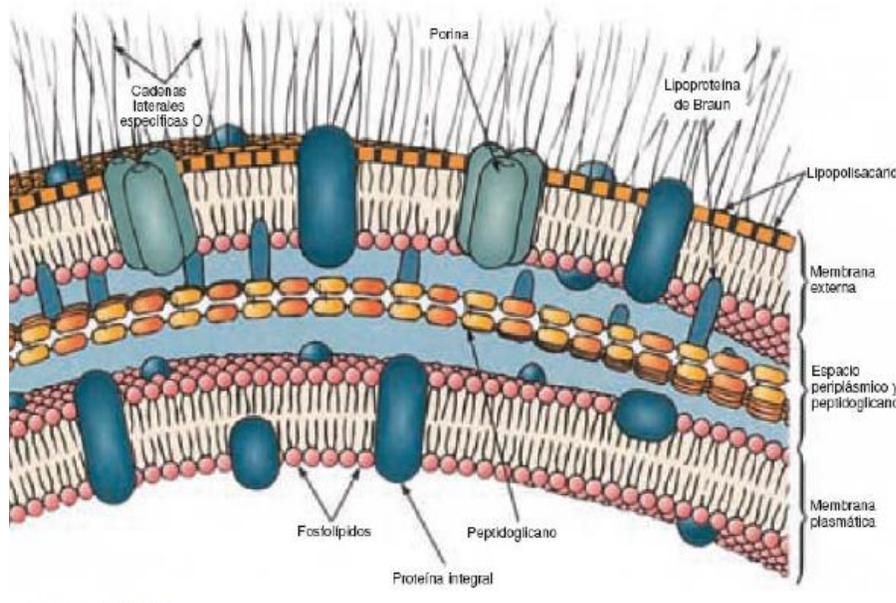
Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico, que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas; una pared grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una

membrana externa. El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas, mientras algunas mantienen una relación transitoria, otras habitan en el ser humano de manera permanente (Koneman, 2008). En microbiología, las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos según la estructura de la pared celular: las bacterias grampositivas y las bacterias gramnegativas (Spicer, 2009).

Bacterias gramnegativas: se denominan bacterias gramnegativas aquellas que no se tiñen de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue. La característica clave que diferencia una bacteria gramnegativa de una bacteria grampositiva, es la composición y estructura de la pared celular. Están formadas por dos membranas lipídicas, una interna (citoplasmática) y otra externa, con un espacio entre ellas denominado espacio periplasmático. En dicho espacio, se dispone una capa de una sustancia llamada peptidoglicano, la cual es más delgada en bacterias gramnegativas (Spicer, 2009).

El peptidoglucano está unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) de la membrana externa y se encuentra en el periplasma (espacio periplásmico), una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática. El periplasma contiene una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte. La pared celular de las bacterias gramnegativas no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que contenga una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica (Figura 12) (Tortora, Funke y Case, 2007).

Figura 12. Diagrama de la pared celular de las bacterias gramnegativas



Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.

Las cepas gramnegativas que se utilizaron para llevar a cabo esta investigación fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

***Klebsiella pneumoniae*:** es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, que además desempeña un papel importante como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. Es un bacilo que fermenta la lactosa, la mayoría produce colonias sumamente mucoides en placas, debido a la producción de polisacáridos abundantes. Todas son inmóviles e indol negativas y son característicamente resistentes a múltiples antibióticos. Además de la resistencia natural de este microorganismo a la ampicilina y a la carbenicilina (García, 2005).

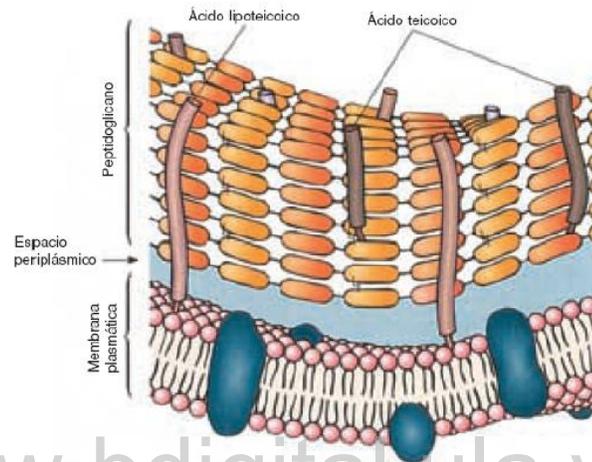
Pseudomonas aeruginosa: es un bacilo gramnegativo, oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C. Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de pigmentos piocianina, de color azul, y pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración. Es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales pueden ser encontrados en respiradores, humidificadores, verteros, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. Es un patógeno oportunista, responsable de una alta gama de infecciones, principalmente nosocomiales (Lujan, 2014).

Escherichia coli: es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, fermentadores y oxidasa negativa. Pueden ser móviles la mayoría o inmóviles, son parte de la familia Enterobacteriaceae. La mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano (García, 2005).

Bacterias grampositivas: son aquellas que poseen una pared celular interna y una pared de peptidoglucano, ésta última forma el exoesqueleto que da consistencia y forma esencial para la replicación y supervivencia a la bacteria. Se tiñen de color morado, ya que retienen el colorante. Estas bacterias son más sensibles a los antibióticos que las gramnegativas. En la mayoría de las células grampositivas, la pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglucano (hasta 25 capas) que conforman una estructura gruesa y rígida, representando hasta el 90 % de la pared celular, aunque también presentan embebidos en dicha estructura a los ácidos teicoicos, los cuales son polímeros de la pared celular, formados por unidades de ribitolfosfato o glicerolfosfato, siendo estos responsables de la

carga negativa de la superficie de las bacterias y pueden intervenir en el paso de iones a través de la pared celular (figura 13) (Tortora, Funke y Case, 2007; Murray, 2009).

Figura 13. Diagrama de la pared celular de las bacterias grampositivas



Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.

Las cepas grampositivas usadas en este estudio estuvieron representadas por *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

***Staphylococcus aureus*:** son cocos grampositivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm ; están agrupados formando racimos de uvas. Estas son bacterias inmóviles, no esporuladas, y no poseen cápsula, además son anaerobias facultativas. La especie *Staphylococcus aureus* produce catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre), característica que se utiliza para diferenciar éste género de los *Streptococcus* y *Enterococcus* los cuales son catalasa negativa (Cervantes, García y Paz, 2014).

Enterococcus faecalis: son células bacterianas esféricas y ovoides, de tamaño 0,6 a 2,5 μm . Son cocos grampositivos no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no móviles y anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Son más abundantes en el tracto gastrointestinal de los humanos, lo cual podría explicar su prevalencia en los aislamientos clínicos, además de su virulencia incrementada (Díaz, Rodríguez y Zhurbenko, 2010).

Hongos

Son un grupo diverso y ampliamente diseminado de eucariotas. Los hongos no contienen clorofila y la mayoría de las especies forman una pared celular rígida constituida por polisacáridos. Son organismos quimiorganotrofos que viven en ambientes bastantes diversos. Algunos son acuáticos, principalmente de aguas dulces, aunque se conocen unas pocas especies de hongos marinos. La mayoría de los hongos tienen hábitats terrestres, viven en el suelo o sobre materia vegetal muerta y juegan un papel primordial en la mineralización del carbono orgánico. Muchos hongos son parásitos de plantas y unos pocos son parásitos del hombre y de los animales. Existen hongos filamentosos (multicelulares), denominados setas y mohos, y hongos unicelulares. No todos los hongos son filamentosos; algunas formas acuáticas son unicelulares y las levaduras también lo son. Algunos hongos patógenos del reino animal pueden crecer en forma unicelular o filamentosa dependiendo de las condiciones ambientales y este fenómeno se conoce como dimorfismo (Murray, 2009).

Candida es un hongo que pertenece a la familia de las Cryptococcaceae. Las especies de *Candida* que producen infección en humanos más frecuentemente son: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.

Varias especies de *Candida* forman parte de la flora endógena y son comensales de las mucosas, del tracto digestivo y genitourinario del hombre, de la piel y las uñas. La colonización en piel y uñas es transitoria con predominio de las especies *C. parapsilosis* y *C. guilliermondii* (Bedout y Gomez, 2010).

Candida krusei: es una especie considerada emergente debido al uso profiláctico con fluconazol, está asociada a pacientes con neutropenia. La colonización por esta especie es un predictor de candidemia. Se trata de un microorganismo multidrogo-resistente debido a que tiene una resistencia intrínseca al fluconazol, una susceptibilidad disminuida a la anfotericina y la flucitocina que está además, asociada a alta mortalidad (80 %-40 %) (Bedout y Gomez, 2010).

En aproximadamente 95-97 % de las infecciones invasoras están implicadas cinco especies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*), de las cuales son verdaderamente nuevas y emergentes sólo *C. glabrata* y *C. krusei*, que tienen una resistencia intrínseca o adquirida a los azoles, así como a los antimicóticos utilizados comúnmente (Bedout y Gomez, 2010).

Resistencia a los Antimicrobianos

Algunos microorganismos son intrínsecamente resistentes a un antibiótico o a un grupo de antibióticos (resistencia natural); sin embargo, muchos de los casos de resistencia se deben al abuso y a la prescripción inapropiada e irracional de los antimicrobianos. La resistencia ocurre cuando el microorganismo evoluciona para combatir el mecanismo de acción del fármaco y se atribuye a la capacidad del ADN donde puede ocurrir lo siguiente (Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009):

Mutación espontánea: le confiere resistencia al microorganismo por la inserción, delección o sustitución de unos o más nucleótidos dentro de un genoma.

Trasladarse de un organismo a otro: el ADN que confiere resistencia al microorganismo está integrado en un plásmido que se transfiere a otras especies bacterianas en el proceso de conjugación.

Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos son estrategias que generan las bacterias para disminuir o inactivar la acción de dichos agentes ante el ataque de estos y así poder persistir dentro del hospedero. Estos mecanismos pueden ser intrínsecos, es decir, que los posee la bacteria en su interior de manera natural o extrínseca (Mendoza, 2008). A continuación, se mencionan los mecanismos básicos por medio de los cuales los microorganismos expresan su resistencia:

Destrucción o inactivación enzimática: es la perduración de β -lactamasas, que son enzimas que actúan rompiendo la unión amida, hidrolizando los agentes antimicrobianos (Rodríguez, Gamboa, Hernández y García, 2005).

Alteración de la membrana bacteriana: las bacterias gramnegativas pueden volverse resistentes a los antibióticos beta-lactámicos mediante el desarrollo de barreras de permeabilidad. Esto es usualmente provocado por porinas alteradas en la membrana externa que ya no permiten la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico dentro de la célula. Cuando los β -lactámicos no pueden alcanzar las PBPs, la célula es resistente (Rodríguez y cols., 2005).

Cambios en la permeabilidad de la membrana interna: es la alteración de la producción energética que no permite el paso del antibiótico de la capa externa a la interna de la membrana; este tránsito consume

energía y se efectúa mediante un transportador aniónico; al alterar la bacteria este mecanismo se defiende del ataque del antibiótico (Rodríguez y cols., 2005).

Alteración del blanco ribosomal: las PBPs tanto en bacterias grampositivas y gramnegativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los β -lactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto, la célula es resistente a agentes antimicrobianos. Los ribosomas, la metilación del ARN ribosómico confiere resistencia a los macrólidos. ADN girasa y topoisomerasa IV, mutaciones en los genes cromosómicos de ADN girasa y topoisomerasa IV confieren resistencia a las quinolonas (Rodríguez y cols., 2005).

Modificación enzimática: modifica los antibióticos aminoglucósidos; esta resistencia de las bacterias aeróbicas es debida al cambio enzimático codificado por el gen del plásmido o del cromosoma. Las bacterias gramnegativas pueden producir enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que modifican un aminoglucósido para inactivarlo (Rodríguez y cols., 2005).

Extracción activa del antibiótico: este mecanismo altera la producción de energía y disminuye así no solamente la entrada del antibiótico, sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y promueve la extracción activa del mismo y su efecto se reduce (Rodríguez y cols., 2005).

Alteraciones de los precursores de la pared: por este mecanismo de resistencia mediado por un gen cromosomal, el peptidoglucano precursor es cambiado al modificar la terminación D-alanina por D-alanina-D-lactato y de esta manera se logra que el antibiótico no se pueda unir al precursor de la membrana. Este mecanismo se ha estudiado con vancomicina y antibióticos glicopeptídicos (Rodríguez y cols., 2005).

Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana

Es un conjunto de procedimientos que permiten determinar el efecto antimicrobiano de los componentes químicos presentes en las plantas. La selección del método más apropiado depende de la composición química de la planta y del microorganismo objetivo (García, 1994). Los métodos para evaluar la actividad de extractos y compuestos puros sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación. Los métodos más utilizados en el análisis de productos naturales son el de difusión, dilución y bioautografía (Cowan, 1999).

Método de Difusión

Es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización y está indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido, está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y además presenta la ventaja de ser reproducible; se desarrolla en base a los fundamentos descritos por Bauer, Kirby, Sherris y Turck (1966) se puede realizar usando las técnicas de pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS, de los Estados Unidos (Ramírez y Marín, 2009).

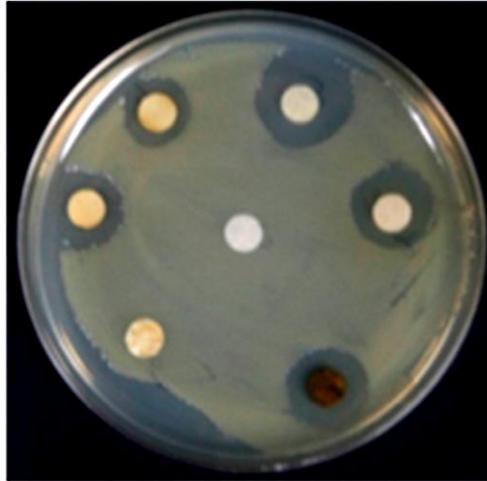
A través de este método se determina en forma cualitativa el efecto de ciertas sustancias a estudiar sobre cepas bacterianas las cuales pueden provenir de muestras aisladas de pacientes o bien ser de referencia (ATCC), se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el

microorganismo a estudiar y sobre el cual se coloca un papel filtro de 6 mm de diámetro o se deposita en un pozo en el agar de la placa una cantidad determinada de la sustancia a probar (Burgess, Jordan, Bregu, Mearns-Spragg y Boyd, 1999).

Una desventaja que se presenta cuando la sustancia a probar es un extracto natural es el papel filtro Whatman debido a que contiene celulosa y esta posee grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica actuando directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco impidiendo la difusión de estos en el agar; lo que explica por qué el método de pozo es más sensible (Burgess, Jordan, Bregu, Mearns-Spragg y Boyd, 1999).

Método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer): se realiza la inoculación y siembra sobre la superficie de los agares Mueller Hinton (bacterias) y Saboreaud-Dextrosa (levadura). Se impregnan de 10 a 25 μ L de los extractos, estándares y blancos en cada uno de los discos de papel filtro Whatma por triplicado y se colocan sobre la superficie de la placa de agar inoculada. Estas se incuban invertidas a 35 ± 2 °C por 24 h para bacterias y a 29 ± 2 °C por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos (Figura 14) (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Figura 14. Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en disco



Tomado y modificado de Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016.

El diámetro del anillo de inhibición dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo por probar, así como también de la solubilidad de la droga y de la tasa de difusión a través del agar. Por eso, es importante controlar muy bien el medio de cultivo, su espesor, el tiempo de incubación y la concentración de las bacterias inoculadas, entre otros factores. Si se presentan zonas de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los discos, la medición de esos diámetros de inhibición y su comparación con los valores de los cuadros de referencia, permite establecer si la cepa es resistente, intermedia o susceptible a esa droga (Gamboa y Rodríguez, 2005).

Método modificado de pozo en agar (Kirby Bauer): se deposita el inóculo y se siembra sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25 μ L de los extractos a evaluar, estándares

(control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), finalmente se incuba con la caja invertida a 35 ± 2 °C por 24 h para bacterias y a 29 ± 2 °C por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición (figura 15) (Rios, Recio y Villar, 1988).

Figura 15. Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante la técnica de difusión en pozo



Tomado y modificado de Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Método de dilución

Este método es apropiado para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana (Klančnik, Piskernik, Jeršek y Možina, 2010), se utiliza una cantidad de extracto de planta o compuesto activo mezclado con una cantidad de medio de cultivo. Puede ser llevado a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido. La concentración final deseada debe ser considerada en relación peso/volumen ó volumen/volumen con respecto al medio de cultivo (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Dilución en agar: el agar es mezclado con una cantidad de extracto de planta o compuesto activo para obtener una concentración final con el medio, posteriormente, se siembra por extensión en la superficie del agar 1 mL del cultivo microbiano incubándose por tiempo determinado para cada tipo de microorganismo. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo y por lo tanto no hay crecimiento visible (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Dilución en caldo: en el caso de dilución en medio de cultivo líquido, se procederá de la misma forma descrita en la sección anterior para obtener una concentración final del extracto en el medio, sin embargo, la interpretación de los resultados se realiza de manera diferente, por turbidimetría e indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana. Para esta técnica se requiere un espectrofotómetro en el cual se realizan lecturas a una densidad óptica (DO) de 600 nm para la determinación de crecimiento microbiano y de 540-570 nm cuando se utiliza REDOX. Las desventajas de la turbidimetría se presentan en aquellos compuestos no solubles que pudieran interferir con la lectura. Es por ello de suma importancia utilizar un control de crecimiento (medio de cultivo y microorganismo sin adición de compuesto o extracto) así como un blanco que contenga medio de cultivo y el compuesto en cuestión sin adición del microorganismo (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Estas dos técnicas del método de dilución pueden escalarse a micrométodos en donde los cultivos se realizan en placas de 96 pozos (microplacas), teniendo en cuenta las proporciones arriba mencionadas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se considera aquella concentración en

la que no haya viabilidad por lo tanto no hay cambio de color (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

El método de dilución en medio líquido permite también determinar efecto bacteriostático o bactericida. Para hacer esta determinación se debe realizar un conteo en placa antes y después de la incubación, mediante la utilización de diluciones seriadas (1:10) en tubos con 9 mL de solución salina al 0,85 %. Posteriormente se adiciona 1 mL del cultivo y se va diluyendo en serie pasando 1 mL del tubo anterior al tubo nuevo las veces que se desee (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Para determinar si el efecto del extracto o compuesto en cuestión es bacteriostático o bactericida, se toma en cuenta el conteo en placa obtenido. Para considerarse bactericida, no debe haber crecimiento en el cultivo, mientras que, al obtener un crecimiento igual al inóculo inicial, se considera bacteriostático. Los métodos de dilución en caldo son métodos que han permitido determinar la CMI de una gran cantidad de compuestos. Las ventajas sobre el método de difusión son la sensibilidad y reproducibilidad, además de ser utilizados para una gran cantidad de microorganismos. La concentración mínima bactericida, normalmente refiere aquella concentración que causa la muerte total del microorganismo, por lo que requiere un plaqueo del cultivo que corrobore este hecho (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Método de la bioautografía

Este método es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas, es colocado sobre una placa de cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto (Ncube, Afolayan, y Okoh, 2008). La CCF es un método ideal para la

separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el solvente, evitando así la posible actividad de el mismo (Cretu y Morlock, 2014; Jesionek, Choma, Majer-Dziedzic y Malinowska, 2014)

La bioautografía es empleada como una técnica preliminar de tamizaje fitoquímico, para detectar compuestos que afectan las tasas de crecimiento de microorganismos en mezclas y matrices complejas, como los extractos de plantas (Choma y Jesionek, 2015), se conoce como purificación guiada por bioensayos (Schmourlo, Mendonça-Filho, Alviano y Costa, 2005). Esta técnica tiene un gran número de ventajas ya que simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos a partir de extractos crudos, utiliza relativamente muy poca cantidad de muestra, lo cual es ideal cuando se trabaja con extractos de plantas, además da una idea precisa de la polaridad de los compuestos activos (Runyoro, Matee, Ngassapa, Joseph y Mbwambo, 2006); es un ensayo práctico, fácil de realizar y es sumamente reproducible, una vez que se ha estandarizado la técnica (Silva, Simas, Batista, Cardarelli y Tomassini, 2005).

HIPÓTESIS

Investigaciones previas reportan que varias especies del género *Piper* contienen metabolitos secundarios de interés biológico, por lo cual es de esperar que el aceite esencial y extractos de *Piper marginatum* Jacq posean actividad antimicrobiana y antioxidante.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial y extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum* Jacq.

Objetivos Específicos

- Obtener el aceite esencial de las hojas de la especie vegetal *Piper marginatum* Jacq, mediante la técnica de hidrodestilación empleando la trampa de Clevenger.
- Establecer la composición química del aceite esencial de *P. marginatum* a través de la técnica cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas (CG-EM).
- Aislar, purificar y caracterizar el safrol a partir del aceite esencial de *P. marginatum* Jacq, mediante técnicas cromatografías y métodos espectroscópicos.

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Piper marginatum*, a través de un sistema de extracción de digestión bajo reflujo.
- Identificar cualitativamente mediante pruebas químicas de coloración y/o precipitación los metabolitos secundarios presentes en los extractos mencionados anteriormente.
- Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial, safrol y extractos a través del método de actividad secuestrante del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) y el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), respectivamente.

www.bdigital.ula.ve

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y equipos

Cromatografía

Cromatografía en columna: para la cromatografía en columna (seca) se utilizó sílica gel 60 (0,04-0,06 mm), marca Merck. Las columnas se desarrollaron siguiendo las técnicas descritas en la literatura (Sánchez, Correa, Abreu y Pino, 2013; Coll y Bowden, 1986; Willis, 1991).

Cromatografía en capa fina: para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de aluminio cubiertas con sílica gel 60 con un espesor de 25 mm, marca Merck WF 254. Las placas se desarrollaron con diferentes mezclas de solventes y se revelaron rociándolas con reactivo de vainillina, posteriormente se calentaron en corriente de aire a unos 100 °C aproximadamente por varios minutos hasta observar las manchas sobre las placas (Wagner, Bladt y Zgainski, 1996).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM): se empleó un cromatógrafo de gases HP 6898 acoplado a un detector de masas Hewlett Packard modelo 5973 con potencial de 70 eV (ionización por IE). Como gas portador se usó Helio a razón de 0,9 mL/minuto.

Espectroscopia

Espectroscopia de RMN-¹H y RMN-¹³C: estos análisis se desarrollaron en el equipo de Resonancia Magnética Nuclear Bruker-UltraShieldTM 400. Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl₃) como solvente para todos los análisis de RMN-¹H y RMN-¹³C. Estos análisis se llevaron a

cabo en el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL).

Espectroscopia infrarrojo (IR): el espectro infrarrojo se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum versión 10.03.06. Modelo de instrumento: Spectrum two. Pastillas de Bromuro de Potasio (KBr) y celda de Cloruro de Sodio (NaCl).

Espectroscopia Ultravioleta (UV): el espectro ultravioleta fue obtenido de la base de datos on line del National Institute of Standards and Technology (NIST). Libro del Web de Química del NIST. Base de Datos de Referencia Estándar del NIST Número 69.

Espectrometría de masas: el espectro de masas se obtuvo de la base de datos on line del National Institute of Standards and Technology (NIST). Libro del Web de Química del NIST. Base de Datos de Referencia Estándar del NIST Número 69.

Análisis Fitoquímico

Reactivos: Reactivo de Dragendorff, de Wagner y de Mayer (Alcaloides), tricloruro férrico (FeCl_3), solución de gelatina, reactivo de Shinoda, hidróxido de amonio, ácido clorhídrico, virutas de magnesio, anhídrido acético.

Equipos: Lámpara ultravioleta, campana de extracción, Ultrasonic, manta eléctrica.

Cuantificación de Fenoles

Reactivos: Carbonato de sodio al 20 % y Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N marca Sigma Aldrich.

Equipo: las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-visible (Spectronic Genesystm 10 Bio) a 760 nm.

Actividad Antioxidante

Espectroscopia Ultravioleta (UV): las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro UV-visible (Spectronic Genesystm 10 Bio) a 517 nm.

Reactivo DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl): marca Sigma Aldrich. CAS 1898-66-4, Metanol destilado grado reactivo, Patrón de ácido ascórbico marca Merck.

Actividad Antimicrobiana.

Se utilizó la técnica de difusión en disco basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols., (método de Kirby-Bauer).

Cepas microbiológicas: para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias grampositivas y tres pertenecientes a las bacteria gramnegativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estos microorganismos fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Tabla 15).

Tabla 15. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

Bacterias Gram positivas (ATCC)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
Bacterias Gram negativas (ATCC)	
<i>Escherichia coli</i>	35218
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
Hongo (ATCC)	
<i>Cándida krusei</i>	6558

Fuente: Elaboración propia.

Reactivos: Solución Cloruro de Sodio estéril (NaCl 0,9 %), agar Müeller Hinton, estándar de Mcfarland, dimetilsulfóxido (DMSO), Fluconazol 100 mg, Eritromicina 15 µg, Ampicilina 10 µg, Piperacina 30 µg, agua destilada.

Equipos e instrumentación: campana de flujo laminar, esterilizador, refrigerador, mechero de bunsen, balanza analítica, agitador, vortex-mixer (Modelo VM-2000), asa de platino, gradilla, estufa, lámpara Ultravioleta, Material de vidrio estéril (tubos de ensayo, beakers, placas de petri, pipetas), pipetas automáticas, puntas estériles, pinzas estériles, propipeta automática, Placas de petri de vidrio y plásticas desechables.

Procedimiento de la Investigación

Recolección de la planta: las hojas frescas de la planta fueron recolectadas en el mes de Noviembre de 2019, en la población de San Juan de Lagunillas vía la Trampa por la entrada de la Galera del Municipio Sucre

del Mérida-Venezuela. La especie fue determinada como *Piper marginatum* Jacq (figura 16) por el Profesor Pablo Meléndez en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Mérida-Venezuela).

Preparación del Material Vegetal: las hojas de la planta fueron seleccionadas y separadas de los tallos e inflorescencias y se procedió como se indica a continuación:

Figura 16. *Piper marginatum* Jacq



Hojas por el haz



Hojas por el envés



Inflorescencia

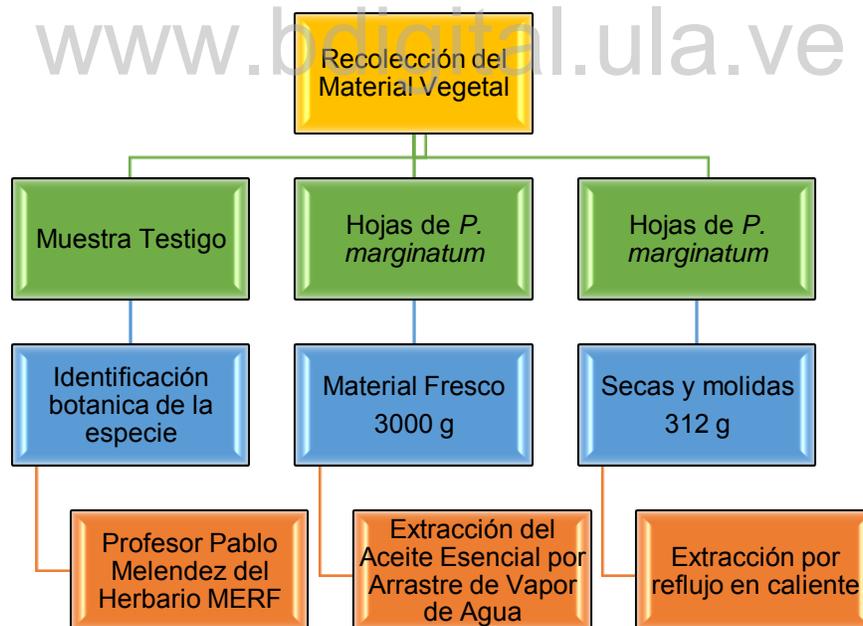
Fuente: Elaboración propia

Material vegetal fresco: para la extracción del aceite esencial de las hojas (3000,0 g) se procedió a licuar el material vegetal fresco, con la

finalidad de romper las células que contienen los compuestos volátiles y aumentar así el rendimiento de la extracción, según el procedimiento descrito en la bibliografía (Croteau, 1991), posteriormente se realizó la extracción del aceite esencial por hidrodestilación, usando la trampa de Clevenger (Borges y cols., 2006).

Material vegetal seco: las hojas (1885,0 g) fueron separadas del resto del material vegetal y secadas en estufa a 40 °C durante una semana, luego, fueron molidas obteniéndose 312,0 g de material seco y molido, el cual, fue extraído por la técnica de reflujo en caliente con hexano y etanol (Esquema 2).

Esquema 2. Recolección y preparación del material vegetal de *P. marginatum* Jacq



Fuente: Elaboración propia.

Obtención del aceite esencial: la extracción del aceite esencial a partir del material vegetal fresco, se realizó en un equipo de hidrodestilación,

empleando la trampa de Clevenger; el material troceado y licuado (hojas) en solución acuosa se colocó en un balón de 12 litros de capacidad y se sometió a una temperatura de 80 °C durante 2 horas. Los componentes volátiles obtenidos fueron almacenados a 4 °C en un envase de color ámbar, para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a masas (Esquema 3).

Esquema 3. Obtención del Aceite Esencial de las hojas de *P. marginatum*



Fuente: Elaboración propia.

Determinación e identificación de los componentes volátiles: el análisis de los componentes del aceite esencial obtenido de las hojas de *P. marginatum* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas, para lo cual se usó un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 6898, con columna capilar HP-5 de 30 metros de largo, el detector de masa utilizado fue marca Hewlett-Packard modelo 5973. Los espectros de masas mostraron información sobre el patrón de fragmentación de los componentes de la mezcla y su masa molecular. Para el análisis se preparó una solución de 20 μ L de aceite en 1 mL de *n*-heptano, de la cual, se inyectó 1 μ L bajo el siguiente programa de temperatura: se inició en 60 °C e inmediatamente se incrementó la temperatura a razón de 4 °C/min hasta 260 °C. El inyector se mantuvo a 200 °C. La relación de reparto fue de 1:100, el potencial utilizado por el detector fue de 70 eV. La identificación de los componentes se realizó por medio de las bases de datos computarizadas Wiley275, Nist05 y HPCH2205 y determinación de los índices de Kováts (Alencar y cols., 1984).

Cálculo de los Índices de Kováts: el cálculo de los índices de Kováts se realizó en el cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo Autosystem. Se compararon los tiempos de retención de los componentes del aceite esencial con una serie de *n*-parafinas (C₇-C₂₂), los valores obtenidos se compararon con los valores publicados en la literatura (Adams, 1995, 2007).

Aislamiento y purificación del safrol: El análisis por CG/EM del aceite esencial de *P. marginatum* demostró la presencia de un compuesto mayoritario, el cual fue identificado mediante la comparación de su espectro de masas con las bases de datos Wiley275, Nist05 y HPCH2205 como safrol.

Debido al interés biológico que representa esta sustancia se procedió a su aislamiento y purificación, para lo cual el aceite esencial de *P. marginatum* (3,1 mL) fue sometido a una separación cromatográfica en columna seca con un soporte de policloruro de vinilo (PVC), utilizando como

fase estacionaria 100 g de silica gel 60 dispuesta sobre el soporte plástico, la elución se llevó a cabo a gravedad usando como fase móvil el hexano (100 %), el seguimiento de la separación se efectuó mediante la utilización de una lámpara de luz ultravioleta para irradiar la columna, al visualizarse la separación del compuesto de interés se procedió a recortar el soporte (plástico) de la columna y se realizó la disolución de las tres fracciones (F1, F2 y F3) en hexano (tabla 16). Por medio de la cromatografía de capa fina se logró identificar en la segunda fracción (F2) una sustancia aceitosa de color amarillenta con un peso de 24,19 mg que posteriormente fue caracterizada mediante técnicas espectroscópicas de RMN-¹H y RMN-¹³C.

Tabla 16. Resultados de la Cromatografía Seca del Aceite Esencial de *Piper marginatum*.

Fracciones	Masa (g)	Eluyente	Productos
1	0,0250	Hexano 100 %	Mezcla de compuestos
2	0,0241	Hexano 100 %	Compuesto 1
3	0,0196	Hexano 100 %	Mezcla de compuestos

Fuente: Elaboración propia.

Obtención de los extractos: la preparación de los extractos se realizó por medio de la técnica de digestión o reflujo, para lo cual se tomó el material vegetal seco (312,0 g) y fue sometido a extracción con 1800 mL de hexano a una temperatura de 40 °C durante 1 hora, el líquido obtenido se filtró, luego el mismo material vegetal fue sometido nuevamente al proceso de extracción utilizando etanol (1800 mL), posteriormente cada uno de los extractos se concentró utilizando el rotavapor a una temperatura de 50 °C hasta la sequedad, obteniéndose de esta manera un extracto hexánico (182,86 g) y un extracto etanólico (253,06 g), los cuales fueron almacenados

en frascos color ámbar a temperatura ambiente hasta el momento de utilizarlos.

Análisis fitoquímico: para determinar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de las hojas de *P. marginatum* se efectuó una secuencia de pruebas químicas cualitativas que se mencionan a continuación:

Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner: permite determinar la presencia de alcaloides, se procedió a evaporar el extracto en baño maría, luego el residuo se disolvió en 1 mL de ácido clorhídrico al 10 % y se colocó en baño de María por 10 min, la solución se filtró y se dividió en 3 tubos. A uno de los tubos se le añadió de 0,5 mL del reactivo de Dragendorff, la prueba es positiva si se observa la formación de un precipitado naranja. Al segundo tubo se le adicionó 0,5 mL de la solución reactiva de Mayer, la presencia de opalescencia o un precipitado blanco es indicio de alcaloides en la muestra analizada. De igual modo, al tercer tubo se le agregó 0,5 mL del reactivo de Wagner, la aparición de turbidez señala la positividad del ensayo (Martínez, 2020).

Ensayo de Liebermann-Burchard: se utilizó para la identificación de triterpenos y esteroides, para ello el solvente de cada extracto se evaporó en baño maría y el residuo se redisolvió en 1 mL de cloroformo, luego se añadió 1 mL de anhídrido acético y por la pared del tubo de ensayo se añadió de 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. El ensayo se considera positivo cuando hay un cambio rápido de coloración a rojo (triterpenos) ó verde (esteroides) (Martínez, 2020).

Ensayo de Cloruro Férrico (FeCl_3): se usa para establecer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos. A la muestra del extracto disuelta en agua se le colocan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico, cuando la coloración es roja-vino identificamos los compuestos fenólicos en general, una coloración verde intensa identifica taninos del tipo pirocatecólicos y una coloración azul identifica taninos del tipo pirogalotánicos (Martínez, 2005).

Ensayo de Shinoda: se usa para determinar la presencia de flavonoides. A cada extracto se le añadió 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y virutas de magnesio. El ensayo se considera positivo, cuando la solución se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo (Martínez, 2020).

Ensayo de la Espuma: Permite identificar en un extracto la presencia de saponinas. En un tubo de ensayo se coloca 1,0 mL de cada extracto disuelto en agua, luego se agita vigorosamente y observa la altura de la espuma. Se considera positivo si la espuma alcanza una altura de 8 a 10 mm y se mantiene por 30 min (Domínguez, 1990).

Ensayo de Borntrager: permite determinar la presencia de quinonas. El extracto etanólico seco se disuelve en 1 mL de cloroformo, luego se añade 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 %, se agita mezclando las fases, luego se deja en reposo para que se separen las fases. El ensayo se considera positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo el ensayo se considera positivo.

Ensayo con Hidróxido de Amonio (NH₄OH): se utiliza para determinar cumarinas, se disuelven 2 mg de cada extracto en el solvente de origen y se adicionan 0,5 mL de hidróxido de amonio concentrado en ambos tubos, luego se visualizan bajo la lámpara de luz ultravioleta (UV), la fluorescencia azul indica la presencia de estos metabolitos.

Ensayo de Sesquiterpenlactonas: Se agrega una porción del extracto a una cápsula de porcelana o en tubo de ensayo disolver una porción del extracto en etanol o diclorometano, luego se le adicionan una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Calentar la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, enfriar y llevar a pH de 1 con ácido clorhídrico 0,5 N. Se adiciona una gota de cloruro férrico 1 %. Las coloraciones roja, violeta o rosa indican que la prueba es positiva para este metabolito.

Cuantificación de Fenoles

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu que mide la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo (VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro, a continuación se indica el procedimiento:

Preparación del patrón: Se utilizó una solución patrón de ácido gálico de 1 mg/mL a partir de la cual se hicieron las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL para la preparación de la curva de calibración.

Posteriormente se tomó 0,5 mL de cada dilución y se le adicionó 0,75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se agitó durante 5 min, luego se añadió 0,75 mL de la disolución de carbonato de sodio al 20 % y se llevó a un volumen final de 2 mL con agua destilada, se dejó reposar por 2 h. También se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico.

Preparación de las muestras: las muestras fueron evaluadas a una concentración 0,5 mg/mL. Luego, se tomó 0,5 mL de cada una y se mezcló con 0,75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a temperatura ambiente por 5 min, después se agregó 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 %. Se agitó fuertemente y se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 760 nm. Este procedimiento se realizó con cada extracto objeto de estudio por triplicado.

Para determinar el valor del contenido de fenoles totales se procedió a realizar una regresión lineal con las absorbancias obtenidas, de tal manera que se obtuvo la siguiente ecuación: $y=bx+a$, donde “a” es la intersección y “b” pendiente, para calcular el contenido de fenoles totales se reemplazó en el valor correspondiente en el eje “Y” (absorbancia) y en el eje “X” (concentración $\mu\text{g/mL}$).

El contenido de fenoles de cada extracto se expresó en $\mu\text{g/mg}$ basándose en la curva de calibración del material de referencia de ácido gálico, de ahí que se utilice el término «Unidades de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto o materia vegetal desecada».

Determinación de la Actividad Antioxidante

Se han propuesto diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, en general se basan en la capacidad de los antioxidantes para

captar radicales libres, sin embargo el modelo de captura del radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), es uno de los más usados, por lo cual se seleccionó para llevar a cabo esta investigación.

Actividad inhibitoria del DPPH: el efecto de los extractos sobre el radical DPPH[•], fue estimado usando el método experimental descrito por Díaz y cols (2011); en tal sentido, se tomó 3 mL de solución metanólica de DPPH[•] a 6×10^{-2} mM se mezcló con 1 mL de la muestra a ensayar (1000 µg/mL). Esta solución se dejó reposar en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Luego se realizaron las lecturas de las absorbancias en un espectrofotómetro UV-visible (Spectronic Genesystem 10 Bio) a 517 nm. Una solución de 3 mL de DPPH[•] a 6×10^{-2} mM y 1 mL de metanol fue usada como control negativo, mientras que el control positivo fue ácido ascórbico a la concentración de 1 mM. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición (% Inh) lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH[•] neutralizado por el extracto a una determinada concentración y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (figura 17).

Figura 17. Ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición (%Inh) del radical DPPH.

$$\% \text{ Inh} = \frac{A \text{ DPPH} - A \text{ M}}{A \text{ DPPH}} \times 100$$

Leyenda: Porcentaje de Inhibición (%Inh), Absorbancia del DPPH (ADPPH), Absorbancia de la muestra (AM).

Fuente: Elaboración propia.

Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀): aquellas muestras que alcanzaron un % Inh \geq al 50% se les determinó la concentración inhibitoria

media (CI_{50}), que indica la mínima concentración necesaria de un antioxidante capaz de reducir en un 50 % la cantidad de radicales libres presentes en el medio (Goupy y cols, 1999). Con las absorbancias obtenidas y la concentración de cada solución ensayada, se obtuvo por regresión lineal una ecuación que nos permitió obtener el CI_{50} .

Por ejemplo, $y=mx+b$; $y=50$, $x=CI_{50}$ = expresado en $\mu\text{g/mL}$.

De esta forma se comparó la capacidad antioxidante entre el ácido ascórbico y el extracto de la especie vegetal. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación de la Actividad Antibacteriana

Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Producción de Vacunas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de la Ingeniera Zulay Araque.

Bacterias estudiadas: para el estudio de la actividad antibacteriana con el uso de las cepas ATCC ensayadas, se tomó en cuenta para la elección de los grupos controles positivos, las recomendaciones que establece el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos sus siglas en inglés NCCL 1997, lo que nos permitió determinar qué tipo de antibiótico debe usarse con cada especie de las cepas (tabla 17).

Tabla 17. Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.

Cepas bacterianas ATCC	Halos de inhibición en mm					
	E (15 µg)		AMP (10 µg)		PIP (100 µg)	
	NCCL	CE	NCCL	CE	NCCL	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 23	26	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	≥ 17	10	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	-	-	-	-	≥ 21	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	≥ 21	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	≥ 21	18

Leyenda: Lectura de los halos de la inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a cepas ATCC: Eritromicina (**E**), Ampicilina (**AMP**), Piperacilina (**PIP**),. Milímetros (**mm**), Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos (**CLSI**), Halos de Cepas ensayadas obtenidos (**CE**).

Fuente: Elaboración propia.

Preparación de placas: en las placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose aproximadamente 10 mL de Agar Müller Hinton (Merck®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de pre-inóculos bacterianos: las cepas a ensayar se incubaron en agar Müller Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003).

Preparación de los inóculos bacterianos: una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,9 % hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán (10^{6-8} UFC/mL).

Inoculación de las placas: luego de preparar las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los discos: se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 μ L de la muestra en estudio a una concentración comprendida 1000 ppm. También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo (Tabla 17) y como control negativo discos impregnados con 10 μ L del solvente dimetil sulfóxido (DMSO).

Pre-incubación e incubación de las placas: después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inoculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para posteriormente llevarlas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

Lectura de las placas: luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas (h) estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm).

Determinación de la Actividad Antifúngica

Se utilizó la técnica de difusión en pozo basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols., (método de Kirby-Bauer). Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Clínico Santa Filomena, Sector Los Próceres-Mérida.

Cepa: Para la estimación de la actividad antifúngica se usó una especie de *Candida krusei* ATCC 6558.

Preparación del inóculo fúngico: a partir de la cepa fresca y purificada de *C. krusei*, se preparó una suspensión ajustada al patrón de McFarland ($1 \times 10^{6-8}$ UFC/mL), para ello se tomó una asada de la cepa que luego se agregó en Solución Cloruro de Sodio (NaCl al 0,9 %).

Preparación de las placas e inoculación: se prepararon las placas con 20 mL de agar Müeller-Hinton. Se mezcló el inóculo preparado con el medio de cultivo, y se agregó a la placa. Se dejó solidificar el medio para luego abrir los pozos con una pipeta pasteur invertida. Luego se colocaron

10 µL de los extractos a analizar (1000 ppm) y del aceite puro, los solventes (controles negativos) y el disco de fluconazol como control positivo.

Pre-incubación e Incubación: las placas de agar Müeller-Hinton se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y se incubaron a 4 °C por 24 horas, para permitir la difusión de las muestras. Luego a 37 °C por 24 horas más, en una estufa con temperatura regulable para permitir el crecimiento fúngico.

Lectura del Ensayo: transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a examinar la placa, de acuerdo a la sensibilidad o resistencia de la cepa. Se consideró como resultado positivo (actividad antifúngica) cuando un halo de inhibición de crecimiento fúngico se observó alrededor del disco. En el caso contrario, la ausencia de halo se interpreta como resultado negativo o resistente (sin actividad antifúngica). El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antifúngica de las muestras se expresó en milímetros (mm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

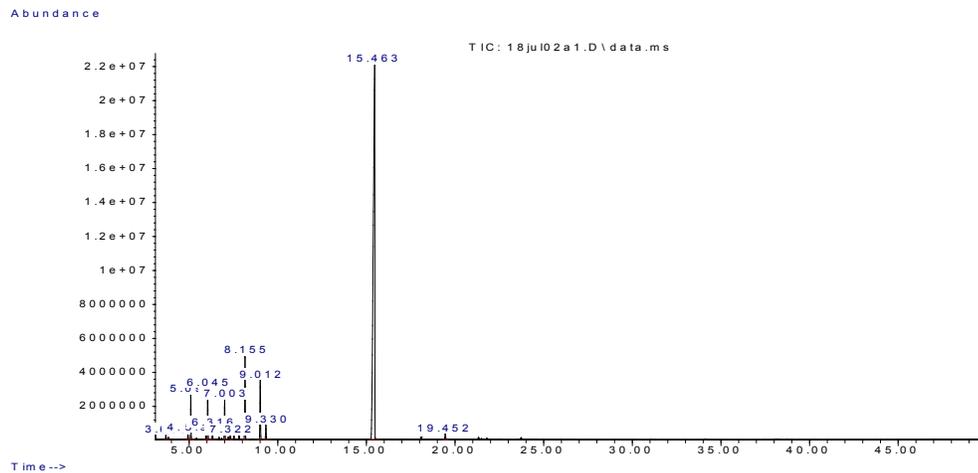
Obtención del aceite esencial de las hojas de *Piper marginatum*

Las hojas frescas de *P. marginatum* (3000,0 g) fueron licuadas y extraídas por hidrodestilación usando la trampa de Clevenger, obteniéndose un volumen de 3,1 mL del aceite esencial con un rendimiento de 0,10 %, siendo importante mencionar que este resultado fue inferior si lo comparamos con los reportados por Sánchez y cols, 2011, quienes obtuvieron un rendimiento del aceite aislado de las hojas *P. marginatum* Jacq. recolectado en la provincia de Guantánamo en Cuba de 2,18 % (v/p), pero casi similar con el reportado por Jaramillo y cols., 2015 quienes analizaron dos especies de *P. marginatum* recolectado en Colombia en las Provincias de Acandí y Turbaco dando como resultado un rendimiento de 0,67% y 0,15 %, respectivamente.

Identificación de los componentes del aceite esencial de *Piper marginatum*

El análisis químico del aceite esencial de *P. marginatum*, se realizó por medio de un equipo de CG/EM, el cual permitió conocer la composición química y abundancia relativa de los principales componentes, identificándose exitosamente el 99,82 % de la muestra, representado por 20 compuestos (figura 18, tabla 18). Siendo los componentes mayoritarios el safrol un monoterpeno oxigenado que representa el 74,33 %; seguido de γ -terpineno (6,49 %), terpinoleno (4,60 %), β -pineno (3,54 %), α -pineno (2,67 %) y linalool (1,13 %). Los compuestos identificados fueron clasificados como monoterpenos oxigenados (98,78 %) y sesquiterpenos (1,22 %) (figura 19).

Figura 18. Cromatograma del Aceite Esencial de *Piper marginatum*



Fuente: Cromatógrafo de gases HP6890

Tabla 18. Identificación de los Componentes del Aceites Esencial de *Piper*

N°	T.R	%	Compuesto	IKtab	IKcalc
1	3,68	0,29	3-Hexen-1-ol	853	849
2	4,93	0,36	α -Tujeno	930	928
3	5,09	2,67	α-Pineno	932	936
4	5,94	0,43	Sabineno	969	974
5	6,04	3,54	β-Pineno	974	978
6	6,31	0,74	Mirceno	988	989
7	6,69	0,17	α -Fellandreno	1002	1003
8	7,00	2,78	α-Terpineno	1014	1016
9	7,20	0,16	<i>p</i> -Cimeno	1020	1024
10	7,32	0,35	Limoneno	1024	1029
11	7,52	0,26	<i>cis</i> -Ocimeno	1032	1036
12	7,81	0,30	<i>trans</i> -Ocimeno	1044	1047
13	8,15	6,49	γ-Terpineno	1054	1059,72

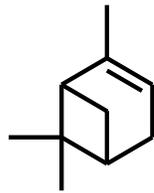
Tabla 18. Identificación de los Componentes del Aceites Esencial de *Piper marginatum* (Continuación)

N°	T.R	%	Compuesto	IKtab	IKcalc
14	9,00	4,60	Terpinoleno	1086	1088
15	9,33	1,13	Linalool	1095	1098
16	15,46	74,33	Safrol	1285	1299
17	18,09	0,27	α -Cubebeno	1345	1348
18	19,45	0,54	<i>trans</i> -Cariofileno	1417	1417
19	21,33	0,22	Germacreno-D	1488	1480
20	23,72	0,19	<i>E</i> -Nerolidol	1561	1561
Monoterpenos oxigenados		98,78 %			
Sesquiterpenos		1,22 %			
Total		99,82 %			

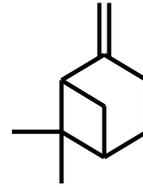
Leyenda: Número de compuestos (N°), Tiempo de Retención de Compuestos (TR), Porcentaje de área (%), **IKtab:** Índice de Kovats tabulado, **IKcal:** Índice de Kovats calculado.

Fuente: Cromatógrafo de gases HP6890 y Elaboracion propia.

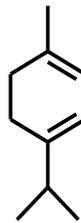
Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos mayoritarios identificados del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq.



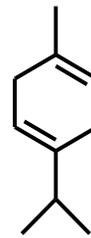
α -Pinoeno



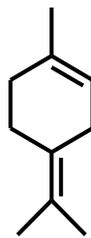
β -Pinoeno



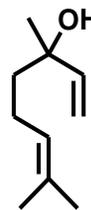
α -Terpinoeno



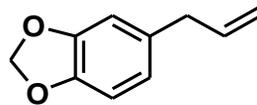
γ -Terpinoeno



Terpinoeno



Linalool



Safrol

Fuente: Elaboración propia

Estudios previos acerca de la composición química de varios aceites esenciales del género *Piper*, han encontrado como constituyentes principales fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides (Oliveira y cols., 2004; Delgado y Cuca, 2007; Bottia y cols., 2007). Tal es la investigación realizada por Sanchez y cols (2009), quienes determinaron la composición química del aceite esencial de las hojas de la especie *Piper auritum* (Caisimón de anís) donde lograron identificar 24 compuestos que representan el 99,45 % de la composición relativa; de ellos, 12 constituyen hidrocarburos monoterpénicos (20,17 %), siete hidrocarburos sesquiterpénicos (3,54 %) y cinco monoterpenos oxigenados (75,73 %), los que representan la mayor proporción desde el punto de vista cuantitativo en el aceite esencial. El componente mayoritario fue el monoterpeno oxigenado safrol (74,29 %) y se puede considerar la presencia de γ -terpineno (6,21 %), α -terpinoleno (4,96 %), β -pineno (2,99 %), α -terpineno (2,65 %), α -pineno (1,79 %) y trans-cariofileno (1,43 %), siendos estos resultados semejantes con el aceite esencial obtenido en la especie *Piper marginatum* Jacq, en estudio.

Asimismo, los resultados obtenidos en la presente investigación se asemejan a los reportados por Sanchez y cols (2011) quienes analizaron la composición química del aceite esencial de las hojas de *P. marginatum* recolectado en la provincia de Guantánamo Cuba, logrando identificar 28 compuestos que constituyen un 99,90 % del total, además este aceite muestra un porcentaje de compuestos oxigenados de un 98,28 % y el resto corresponde a hidrocarburos sesquiterpénicos, siendos esta composición similar a la especie *P. marginatum* estudiado. Es importante mencionar, que dentro de esta cantidad considerable de compuestos oxigenados los principales desde el punto de vista de cantidades relativas fueron el isosafrol (37,31 %) y el safrol (7,02 %), este último compuesto varia en un porcentaje

mucho menor al compararlo con el obtenido en el aceite esencial de las hojas de *P. marginatum* recolectado en Merida-Venezuela (safrol: 74,33 %).

Más recientemente en un artículo efectuado con diferentes quimiotipos de la especie indicaron que el safrol y el 3,4-metileno-dioxi propiofenona son los principales constituyentes del quimiotipo I. En el quimiotipo II predomina 3,4-metileno-dioxi propiofenona y *p*-menta-1,8 dieno. Los mayores componentes identificados en el quimiotipo III fueron 3,4-metileno-dioxi propiofenona, miristicina, E- β -ocimeno y γ -terpineno. En el quimiotipo IV los principales constituyentes fueron β -cariofileno, α -copaeno y 3,4-metileno-dioxi propiofenona; por su parte, en el quimiotipo V predominó E-isosmorizol y E-anetol; en el quimiotipo VI se encontró fundamentalmente 2-metoxi-4,5-metileno-dioxi propiofenona y E-isosmorizol, mientras que en el quimiotipo VII se identificó como componentes mayoritarios β -cariofileno, biciclogermacreno y E-asarona (Andrade y cols., 2008). Los resultados obtenidos coinciden con los informados por estos autores en cuanto a la presencia de algunos de los componentes separados e identificados, aunque difieren en las cantidades relativas; sin embargo, el perfil químico del aceite esencial evaluado no puede ser asociado con ninguno de estos quimiotipos.

Las diferencias encontradas en cuanto a la composición del aceite esencial estudiado y la reportada por otros autores para *P. marginatum*, pueden estar asociadas a varios factores, entre ellos: las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, precipitaciones, etc), método de cultivo, época de recolección y parte de la planta recolectada, manejo y almacenamiento del material vegetal (seco, fresco, etc), edad y estado fenológico de la planta, así como el método de obtención del aceite (Durán y cols., 2007 y Mesa y cols., 2007).

Obtención e Identificación del safrol

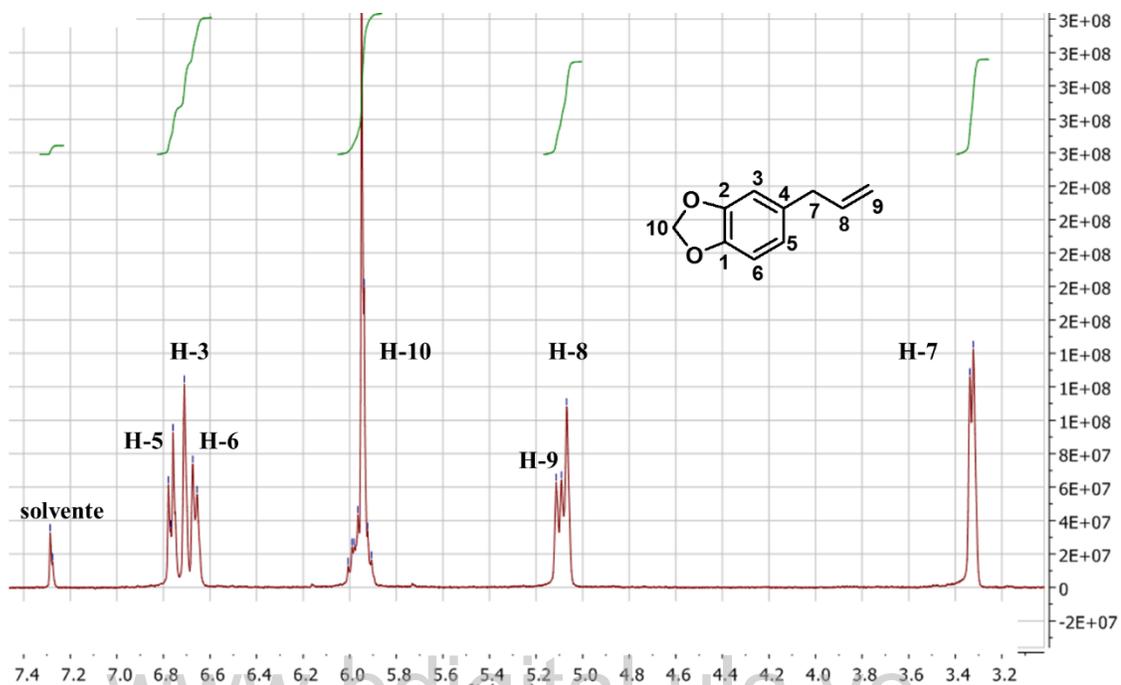
El aceite esencial de las hojas de *P. marginatum* (3,1 mL) fue sometido a una separación cromatográfica con la finalidad de aislar el componente mayoritario, en tal sentido, se obtuvo un líquido aceitoso amarillo claro (24,9 mg) que originó una sola mancha al ser analizado por cromatografía por capa fina, por lo cual se realizaron los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN-¹H, RMN-¹³C APT), al tomar en cuenta los datos de dichos análisis espectroscópicos se visualizaron las señales de una cadena alílica, un anillo aromático y un sistema metilendioxi, correspondiente a un derivado monoterpénico oxigenado (fenilpropanoide) el cual fue caracterizado de la siguiente manera:

1. El espectro de RMN-¹H (figura 20, tabla 19) presentó señales correspondientes a hidrógenos aromáticos: se observaron dos dobletes con un desplazamiento de δ_{H5} : 6,80 (*d*, *J*=7,8 Hz, 1H) y δ_{H6} : 6,66 (*d*, *J*=7,8 Hz, 1H) y un singulete δ_{H3} : 6,76 (*s*, 1H) lo cual indicó la presencia de un anillo aromático trisustituido. De igual modo se visualizó un singulete que integró para dos protones con un desplazamiento de δ_{H10} : 5,95 (*s*, 2H) característico de un grupo metilendioxi sustituyente de un anillo aromático. Adicionalmente, se identificaron las tres señales de una cadena vinílica en δ_{H7} : 3,34 (*m*, 2H); δ_{H8} : 5,99 (*m*, 1H) y δ_{H9} : 5,09 (*m*, 2H).
2. En el espectro de RMN-¹³C APT (figura 21, tabla 20) se observaron diez señales entre las cuales destacan seis características de carbonos aromáticos: tres son de grupos metinos (>CH-) con un desplazamiento de δ : 124,3 (C₅); δ : 109,1 (C₆) δ : 108,1 (C₃); las tres restantes señales corresponden a carbonos cuaternarios (>C<) δ : 148,9 (C₂); δ : 147,6 (C₁) y 133,8 (C₄). Por otra parte, se

visualizó una señal en 100,9 ppm correspondiente al metileno (-O-CH₂-O-) del grupo metilendioxi (C₁₀). Asimismo, se evidenció la presencia de un sistema de carbonos con hibridación Sp² (HC=CH₂) cuyos desplazamientos fueron de 115,7 ppm (C₉) y 137,6 (C₈) ppm. Otra señal se encuentra en 39,9 ppm que según el espectro APT corresponde a un grupo metileno de la cadena alílica (C₇).

3. El espectro IR (figura 22, tabla 21) presentó bandas de absorción a 3081 y 2980 cm⁻¹ que fueron asignadas a las vibraciones de tensión C-H Sp² y Sp³ respectivamente. De igual modo se distinguieron los sobretonos que genera el anillo aromático en 2600 cm⁻¹ aproximadamente. Asimismo se observó la señal producida por las vibraciones de tensión -C=C- de la cadena lateral del safrol en 1639 cm⁻¹ y las vibraciones C-O en 1502 cm⁻¹.

Figura 20. Espectro RMN-¹H (CDCl₃) del safrol



Fuente: Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Bruker-UltraShieldTM 400.

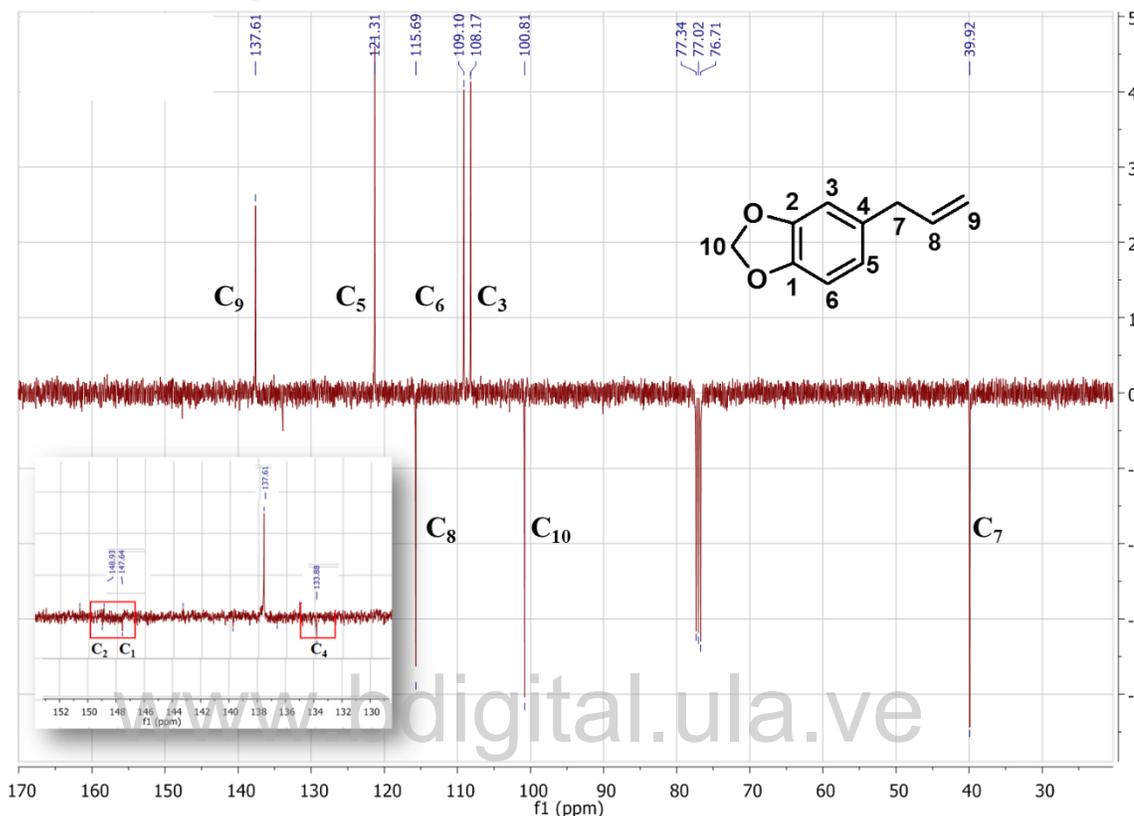
Tabla 19. Desplazamientos Químicos en el RMN-¹H (CDCl₃) del safrol

H	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7
δ (ppm)	-	-	6,76	-	6,80	6,66	3,34
m	-	-	<i>s</i>	-	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>m</i>
J (Hz)	-	-	-	-	7,8	7,8	-
H	H-8	H-9	H-10				
δ (ppm)	5,99	5,09	5,95				
m	<i>m</i>	<i>m</i>	<i>s</i>				
J (Hz)	-	-	-				

Legenda: Desplazamiento químico (**δ**), partes por millón (**ppm**), multiplicidad (**m**), singulete (**s**), doblete (**d**), multiplete (**m**).

Fuente: Elaboración propia

Figura 21. Espectro RMN-¹³C (CDCl₃) del safrol



Fuente: Equipo de Resonancia Magnética Nuclear Bruker-UltraShieldTM 400.

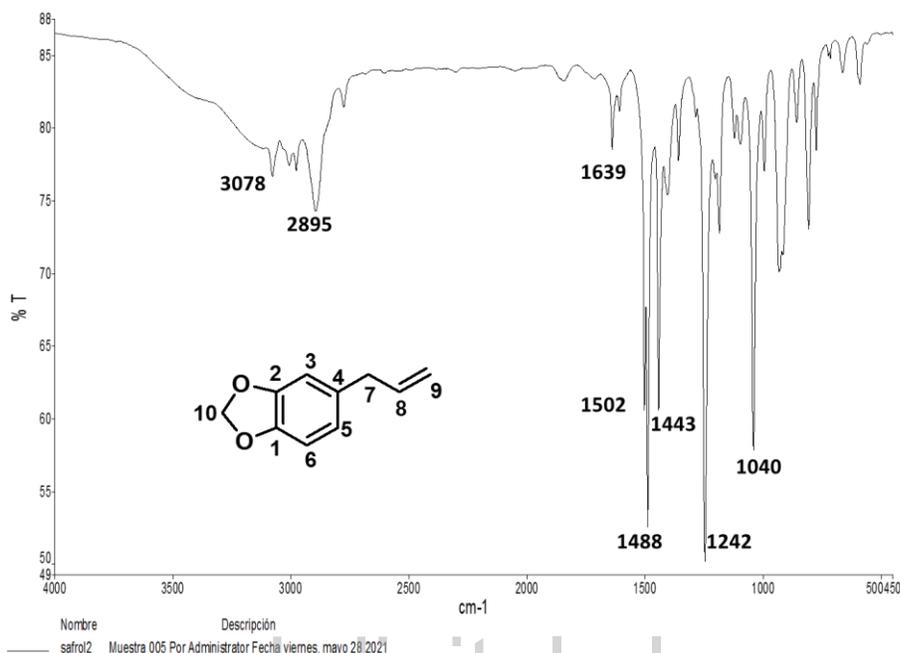
Tabla 20. Desplazamientos Químicos en el RMN-¹³C (CDCl₃) del safrol

C	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7
δ (ppm)	147,6	148,9	108,1	133,8	124,3	109,1	39,9
Tipo	>C<	>C<	>CH-	>C<	>CH-	>CH-	-CH ₂
C	C-8	C-9	C-10				
δ (ppm)	137,6	115,7	100,9				
Tipo	-CH=	=CH ₂	-O-CH ₂ -O-				

Leyenda: Desplazamiento químico (δ), partes por millón (ppm).

Fuente: Elaboración propia.

Figura 22. Espectro Infrarrojo del safrol



Fuente: Espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum versión 10.03.06. Modelo de instrumento: Spectrum two.

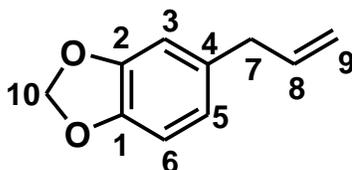
Tabla 21. Bandas Observadas en el Espectro IR del safrol

ν_{\max} (cm^{-1})	3078	2895	1639	1502
Asignación	=CH ₂	-CH ₃	-C=C-	C-O

Fuente: Elaboración propia.

El análisis espectroscópico realizado anteriormente y en comparación con los datos publicados conllevó a identificar el compuesto 1 como 4-aliil-1,2-metilen-dioxi-benceno (figura 23). Esta sustancia es conocida como safrol y ha sido reportada previamente en otras especies de *Piper* (*P. divaricatum*, *P. nigrum*, *P. callosum* y *P. aduncum*) (Rocha y Ming, 1999; Barbosa, Câmara, Ramos, Nascimento, Lima-Filho y Guimarães, 2012), sin embargo es el primer reporte en *P. marginatum* en Venezuela.

Figura 23. Compuesto obtenido del aceite esencial de las hojas de *P. marginatum*



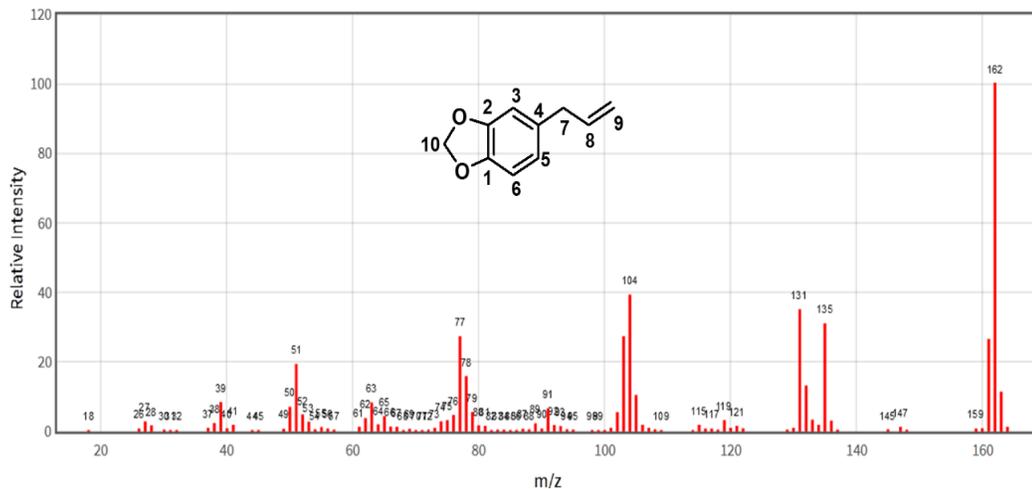
4-allyl-1,2-metilen-dioxi-benceno (Safrol)

Fuente: Elaboración propia.

Adicionalmente se obtuvieron de la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST) los espectros de masas (EM) y ultravioleta (UV) los cuales sirvieron de herramientas para que la autora de la presente investigación pusiera en práctica los conocimientos adquiridos para el análisis e interpretación de dichos espectros, a continuación se realizó una breve descripción de los mismos:

1. El espectro de masas (IE, 70 eV) (figura 24, tabla 22) mostró un ion molecular a m/z : 162 con una abundancia del 100 % y el fragmento mayoritario de m/z = 135 que corresponde a la pérdida de parte de la cadena lateral cuyo ion es posteriormente estabilizado por efecto de resonancia del anillo aromático (figura 25), al tomar en cuenta los datos derivados de los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , resulta congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (tabla 23).
2. El espectro UV presentó un máximo de absorción en 286 nm (figura 26).

Figura 24. Espectro de Masas del Safrol.



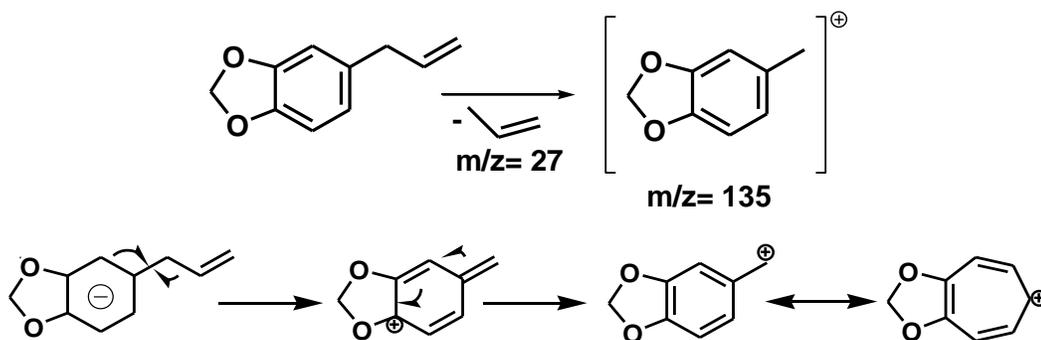
Fuente: Tomado y modificado de National Institute of Standards and Technology (NIST).

Tabla 22. Fragmentos (m/z) más notables en el Espectro de Masas del Safrol

Masa/carga	162	135
Abundancia Relativa (%)	100	30

Fuente: Elaboración propia.

Figura 25. Patrón de Fraccionamiento del Safrol



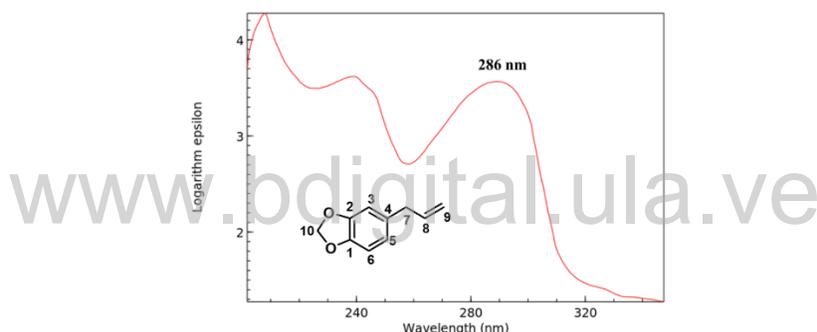
Fuente: Tomado y modificado de National Institute of Standards and Technology (NIST).

Tabla 23. Determinación de la Formula Molecular del Safrol

Grupos Estructurales		Composición Elemental		
Números de Grupos	Tipos de Grupos	Número de Carbonos	Número de Hidrógenos	Número de Oxígenos
1	-CH ₂	1	2	-
4	=CH	4	4	-
3	>C=	3	-	-
1	=CH ₂	1	2	-
1	O-CH ₂ -O	1	2	2
Formula Molecular		C ₁₀	H ₁₀	O ₂

Fuente: Elaboración propia.

Figura 26. Espectro Ultravioleta del Safrol



Fuente: Tomado y modificado de National Institute of Standards and Technology (NIST).

Analisis Fitoquimico

El análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las hojas secas y molidas de *Piper marginatum* Jacq., se realizó cualitativamente mediante pruebas químicas. Los mismos se colocaron en contacto con diversos reactivos químicos y se observaron las reacciones de coloración, fluorescencia y/o precipitación que determinaron la presencia de ciertos metabolitos secundarios.

A través de pruebas químicas se comprobó la presencia de esteroides en los extractos de hexano y etanol de las hojas *P. marginatum*; sin embargo, es necesario resaltar, que solo en el extracto etanolico se encontró

la presencia de compuestos fenolicos presentando una abundancia significativa (tabla 24; figura 27). Estos resultados concuerdan con los reportados por Parmar y cols (1997), donde se evidencia la presencia de una gran variedad de terpenoides y compuestos fenolicos en diferentes especies del genero *Piper*.

Tabla 24. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum* Jacq.

Metabolitos	Ensayo	Resultados	EHH	EEH
Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner	Precipitado Naranja, Blanco y Amarillo	ND	— — —
Flavonoides	Shinoda	Coloración a rojiza	—	—
	NaOH al 10%	Coloración amarillo café, naranja a rojo	—	—
Cumarinas	Hidróxido de amonio concentrado	No hubo fluorescencia bajo la luz UV	—	—
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ al 3 %	Coloraciones verdes	—	++
Taninos	Gelatina 1 %	No se formó precipitado	ND	-
Tripertenos y Esteroles	Liebermann- Burchard	Cambio a verde (hexano, acetona) Cambio a rojizo (etanol)	+ Verde	+ Verde
Saponinas	Espuma	Formación de espuma que desaparece rápidamente	ND	—
Antraquinonas	Hidroxido de Amonio []	Formación de color rojo	—	—
Quinonas	Ácido Sulfurico	Formación de color rojo	—	—
Sesquiterpen- Lactonas	Hidroximato férrico	Coloraciones roja, violeta o rosa	—	—

Leyenda: Extracto de Hexano de Hojas (**EHH**), Extracto de Etanol de Hojas (**EEH**), Presencia (**+**), Abundante (**++**), Ausencia (**-**), No determinado (**ND**).

Fuente: Elaboración propia.

Figura 27. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum* Jacq.

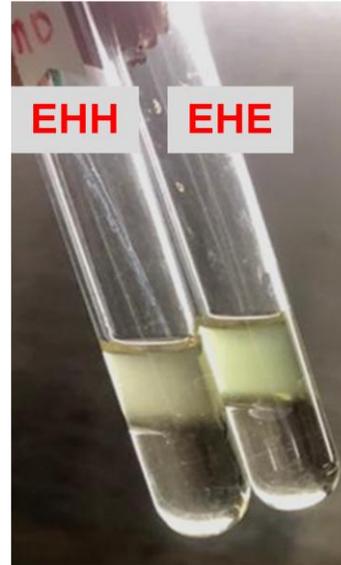


Ensayo de Alcaloides

Prueba: Dragendorff, Mayer, Wagner.

Reporte: negativo (no hay formación de precipitado).

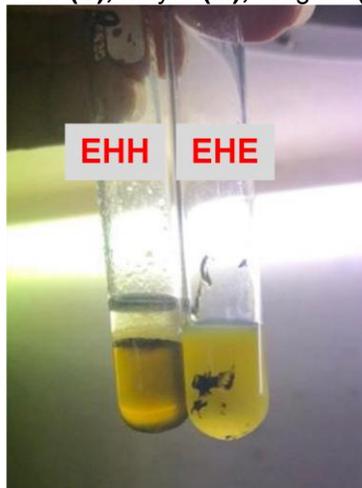
Leyenda: Extracto Hojas Etanolico (EHE), Dragendorff (D), Mayer (M), Wagner (W).



Ensayo de Liebermann-Burchard

Reporte: positivo para esteroides (verde).

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanolico (EHE).



**Ensayo de Flavonoides
(NaOH al 10%)**

Reporte: negativo para los extractos analizados.

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanolico (EHE).



**Ensayo de Flavonoides
(Shinoda)**

Reporte: negativo para los extractos analizados.

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanolico (EHE).

Figura 27. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum* Jacq.
(Continuación)



Ensayo para cumarinas

Prueba: Fluorescencia UV.

Reporte: negativo para el extracto analizado.

Leyenda: Patrón (Cumarina), Extracto Hojas Etanólico (EHE).



Ensayo de Compuestos fenolicos

Prueba: Tricloruro Ferrico ($FeCl_3$)

Reporte: positivo aparición de un color azul-negro.

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanólico (EHE).



Ensayo para Taninos

Prueba: Gelatina.

Reporte: positivo en el extracto etanólico.

Leyenda: Extracto Hojas Etanólico (EHE).



Ensayo para Saponinas.

Prueba: Formación de espuma.

Reporte: negativo para los extractos analizados.

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanólico (EHE).

Figura 27. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum* Jacq.

(Continuación)



Ensayo de Quinonas

Prueba: H₂SO₄ [].

Reporte: negativo para los extractos analizados.

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanolico (EHE).



Ensayo de Antraquinonas

Prueba: NH₄OH [].

Reporte: negativo para los extractos analizados.

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanolico (EHE).



Ensayo para Sesquiterpenlactonas.

Prueba: Hidroximato férrico.

Reporte: negativo para los extractos analizados.

Leyenda: Extracto Hojas Hexano, (EHH), Extracto Hojas Etanolico (EHE).

Fuente: Elaboración propia.

Análisis Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Se realizó un análisis comparativo mediante la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) para comprobar primeramente si el

compuesto aislado del aceite esencial (F2) e identificado como Safrol, se encontraba presente en los extractos de hexano y etanol obtenidos de las hojas secas y molidas del *Piper marginatum*, además de observar que otros metabolitos secundarios se encuentran en estos. Para la visualización del Safrol en las muestras analizadas se procedió a sembrar el Aceite Esencial puro, el Safrol puro (F2) y los extractos de hexano y etanol, se uso como fase móvil hexano (100 %) y como reveladores la luz ultravioleta (UV) y el reactivo de ácido sulfúrico y vainillina al 1%.

Este análisis cromatográfico permitió evidenciar que el safrol (F2) no se encuentra presente en los extractos de hexano y etanol obtenidos de las hojas secas y molidas de *Piper marginatum*, pero se puede percibir la presencia de otros metabolitos secundarios; tales como los compuestos fenolicos que eluyeron muy poco con esta fase móvil y se encuentran en el extracto de etanol, siendo estos identificados previamente el ensayo fitoquímico mediante el reactivo de cloruro ferrico (figura 28).

Figura 28. Comparación de las Capas de Cromatografías de Capa Fina de las muestras analizadas.



Revelado físico lámpara UV



Revelado químico con solución de ácido sulfúrico y vainillina al 1%

Leyenda: Aceite Esencial puro (AE), Safrol (S), Extracto de Hojas de Hexano (EHH), Extracto de Hojas de Etanol (EHE).

Fuente: Elaboración propia.

Cuantificación de Fenoles

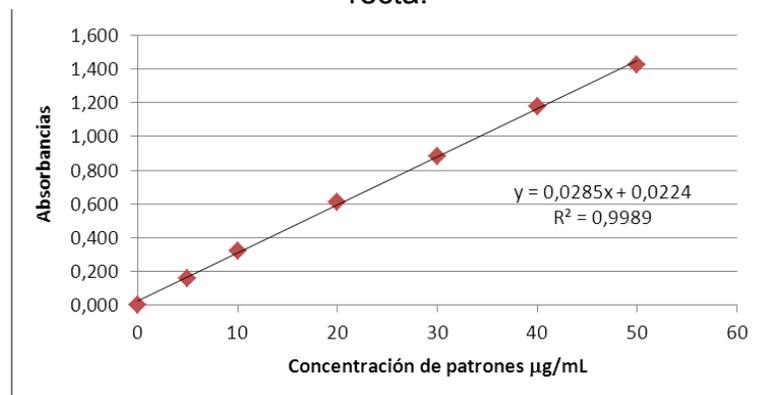
La determinación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración con ácido gálico (AG) como patrón (tabla 25, figura 29) obteniendo que el extracto etanólico de las hojas de *P. marginatum* contiene 51,87 µg AG/mg extracto (tabla 26, figura 30).

Tabla 25. Datos para Curva de Calibración con Ácido Gálico

Patrón	Concentración Ácido Gálico (µg/mL)	Absorbancias Promedio	Desviación Estándar
Ácido Gálico	5	0,159	0,00
	10	0,322	0,01
	20	0,612	0,00
	30	0,881	0,01
	40	1,175	0,01
	50	1,424	0,00

Fuente: Elaboración propia.

Figura 29. Curva de Calibración del Acido Galico con su ecuación de la recta.



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 26. Resultados obtenidos del Contenido Total de Compuestos Fenólicos del extracto etanólico de las hojas de *Piper marginatum*.

Mustra analizada	Concentración muestras (mg/mL)	Absorbancias promedio	Concentración en μg Ácido gálico/mg Muestra \pm DE
EEPM	0,5		51,87 \pm 0,64

Leyenda: Extracto etanólico *Piper marginatum* (EEPM), Concentración en microgramos (μg) de Ácido gálico por miligramos (mg) de muestra \pm Desviación Estándar (DE). Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado las muestras ensayadas.
Fuente: Elaboración propia.

Figura 30. Determinación del Contenido Total de Compuestos Fenólicos del extracto etanólico de las hojas de *Piper marginatum*



EEPM: Extracto etanólico *Piper marginatum*

Fuente: Elaboración propia.

El extracto etanólico de las hojas de *P. marginatum* presentó 51,87 μg AG/mg extracto en su composición de derivados fenólicos, dichos resultados

se asemejan a los reportados por Ovalle y cols (2012) quienes cuantificaron los fenoles totales de cuatro especies del genero *Piper*: *P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum*, obteniendo 23,47; 104,52; 20,31 y 107,06 μg equivalente de AG/mg, respectivamente.

Actividad Antioxidante

Para determinar la actividad antioxidante se preparó una curva de calibración con el patrón ácido ascórbico (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), luego se realizó un barrido inicial con el aceite esencial, extracto etanólico y el safrol, obtenidos de las hojas de *P. marginatum* a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para determinar si poseían actividad antioxidante y se comparó con el ácido ascórbico (sustancia antioxidante utilizada como referencia, tabla 27, figura 31) obteniendo como resultado un porcentaje de inhibición frente al radical DPPH de 38,61 % y 38,06 % para el aceite esencial y safrol respectivamente, por otra parte, el extracto etanólico presentó 77,56 % de inhibición y el control positivo fue de 97,080 % (tabla 28, figura 32, figura 33).

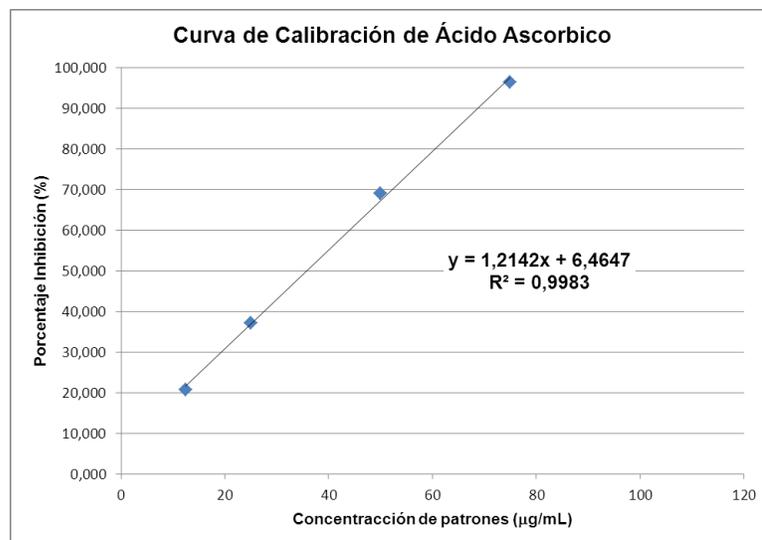
Tabla 27. Resultados obtenidos Curva de Calibración con Ácido Ascórbico

Muestras	Concentración de Patrones	Absorbancias Promedio	% Inh \pm DE
Patrón Ácido Ascórbico	12,5	0,552	20,678 \pm 0,473
($\mu\text{g}/\text{mL}$)	25	0,438	37,098 \pm 0,430
	50	0,216	69,028 \pm 0,187
	75	0,025	96,362 \pm 0,264
	100	0,020	97,080 \pm 0,078
DPPH (mM)	0,06	0,696	0,000 \pm 0,000

Leyenda: Reactivo 2,2-difenil-1-picril-hidrácilo (DPPH), Milimolar (mM), Porcentaje de Inhibición (% Inh) \pm Desviación Estándar (DE) de los patrones analizados.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 31. Grafico de curva de calibración del Patrón Ácido Ascórbico



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 28. Resultados obtenidos de la actividad antioxidante *in vitro* por el método de secuestro del radical 2,2-difenil-1-picril-hidracilo (DPPH).

Hojas de <i>Piper marginatum</i>	Concentración de las muestras y patrón referencia (µg/mL)	Absorbancias promedios	% Inh ± DE
AEPM	1000	0,368	38,61 ± 0,39
Safrol		0,372	38,06 ± 0,39
EETM		0,174	77,56 ± 0,34
Patrón	Ácido Ascórbico	0,020	97,08 ± 0,00

Leyenda: Aceite Esencial *Piper marginatum* (**AEPM**), Extracto etanolico *Piper marginatum* (**EETM**). Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado del Porcentaje de Inhibición (% Inh) ± Desviación Estándar (DE) de los extractos etanólicos ensayados.

Fuente: Elaboración propia.

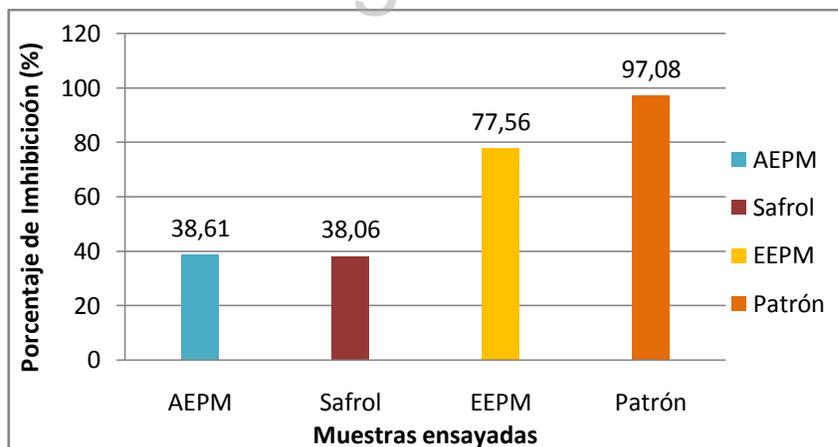
Figura 32. Muestras analizadas para determinar la actividad antioxidante.



Leyenda: Reactivo de 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (**DPPH**), Aceite Esencial *Piper marginatum* (**AEPM**), Extracto Etanólico *Piper marginatum* (**EEPM**), Parte por millón (**ppm**).

Fuente: Elaboración propia.

Figura 33. Grafico comparativo de los porcentajes de inhibición obtenidos en la Actividad antioxidante de los muestras ensayadas y el ácido ascórbico



Leyenda: Aceite Esencial *Piper marginatum* (**AEPM**), Extracto etanólico *Piper marginatum* (**EEPM**), Ácido ascórbico (**Patrón**).

Fuente: Elaboración propia.

Concentración inhibitoria media (IC₅₀)

Se procedió a determinar la concentración inhibitoria media (CI₅₀) del extracto etanólico debido a que en el barrido inicial el % Inh fue \geq al 50 %.

Para ello, se preparó una curva de calibración con ácido ascórbico (12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 75 µg/mL; 100 µg/mL) cuyos resultados analíticos se reflejan en la tabla 25 y figura 29. Adicionalmente se prepararon una serie de diluciones del extracto (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL y 125 µg/mL) para determinar la CI_{50} (tabla 29, figura 34).

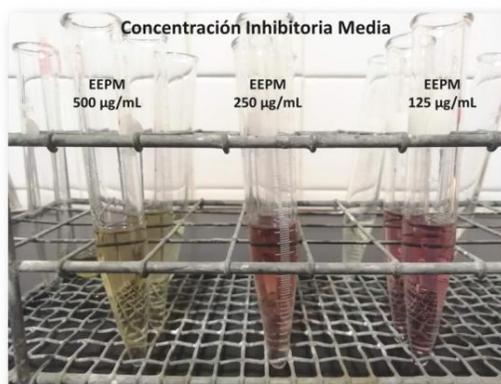
Tabla 29. Valores de obtenidos de Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) del extracto etanólico de hojas de *Piper marginatum*

Muestra	Concentraciones (µg/mL)	Absorbancias promedios	% Inh ± DE	CI_{50} (µg/mL)
EEPM	125	0,312	48,05 ± 0,77	148,45 ± 7,05
	250	0,258	57,00 ± 0,13	
	500	0,178	70,33 ± 0,68	
	1000	0,174	77,56 ± 0,34	

Leyenda: Extracto etanólico *Piper marginatum* (EEPM), Porcentaje de Inhibición (% Inh) ± Desviación Estándar (DE) y Concentración Inhibitoria Media (CI_{50} expresada en µg/mL). Los resultados son el promedio de tres mediciones por separado de las muestras ensayadas.

Fuente: Elaboración propia.

Figura 34. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) del extracto etanólico de hojas de *Piper marginatum*



Leyenda: Diluciones del Extracto etanólico *Piper marginatum* (EEPM) a 500, 250 y 125 µg/mL.

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos para el aceite esencial (AE) y el safrol son congruentes con los obtenidos por García, Leyva, Martínez, Stashenko (2007), quienes obtuvieron el AE de las hojas e inflorescencia de *Piper auritum* Kunth, el rendimiento de la 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) 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).

Por otra parte, los estudios realizados por Jaramillo-Colorado, Julio-Torres, Duarte-Restrepo, Gonzalez-Coloma, Julio-Torres (2015) sobre la actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. de las localidades de Acandí Chocó y Turbaco Bolívar reportan los compuestos mayoritarios anetol (46,3 %), estragol (28,8 %) y safrol (9,0 %) en el AE de *P. marginatum* de Acandí, mientras que, en el aceite esencial de *P. marginatum* recolectado en Turbaco los componentes fueron β -elemeno (24,8 %), Germacreno-B (12,4 %), germacrenol (36,6 %), trans- α -guaieno (3,2 %). Siendo, el aceite esencial de *P. marginatum* procedente de Turbaco el que presentó un porcentaje de inhibición del DPPH de 90,0 % a una concentración de 2,0 μ g/mL, ligeramente inferior, comparado con el del ácido ascórbico (96,4%).

En tal sentido, se evidencia que los AE que contienen un bajo contenido de safrol presentan una elevada actividad antioxidante y al relacionar con los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico (CG/EM) que reveló la ausencia de compuestos de tipo fenólico (principales responsables de la actividad antioxidante de los aceites esenciales) se presume que en la presente investigación la actividad antioxidante se debe a la presencia de hidrógenos arílicos y no se puede atribuir al safrol, por lo cual se justifica el bajo porcentaje de actividad antioxidante del aceite esencial

obtenido de las hojas de *P. marginatum* en estudio ya que posee un elevado % de safrol en su composición (74,33 %).

En relación a lo expuesto anteriormente, se presume que la actividad antioxidante del extracto de etanol de *P. marginatum* Jacq., se debe a la presencia de compuestos fenólicos que fueron detectados y cuantificados previamente (tabla 24, 25), estos compuestos son activos debido a la combinación de sus propiedades quelantes de hierro y sequestradoras de radicales libres, gracias a su capacidad de donar electrones, generando radicales fenoxilo estables.

Los resultados obtenidos muestran que el extracto etanólico posee una concentración inhibitoria media de 148,45 µg/mL. Esta información se correlaciona con el análisis fitoquímico, que indica que el extracto etanólico posee mayor concentración de compuestos fenólicos, es decir, que se necesita menor cantidad del extracto de etanol para inhibir el 50 % de radicales libres presentes en la solución estudiada ya que posee mayor concentración de metabolitos secundarios que neutralizan o desactivan los radicales DPPH.

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos es de gran interés tecnológico, farmacológico y nutricional, debido a su origen vegetal estos contribuyen a la disminución del uso de antioxidantes sintéticos que podrían traer consecuencias a futuro; además estas sustancias juegan un papel preventivo en diversas enfermedades crónicas no transmisibles como las enfermedades cardio-vasculares, cáncer entre otras patologías, así como en el proceso normal y patológico de envejecimiento (Gonzales, Muñiz y Valls, 2009). Existe evidencia de que los compuestos con actividad antioxidante están relacionados con la actividad antiproliferativa de células tumorales y cancerígenas (Bonofiglio, Giordano, De Amicis, Lanzino y Ando, 2016; Caselli, Cirri, Santi y Paoli, 2016; Formagio y cols., 2015; Jahanban-

Esfahlan, Modaeinama, Abasi, Abbasi y Jahanban-Esfahlan, 2015; Salim, Abd El-Magid, Farara y Maria, 2015).

Actividad Antibacteriana

El estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas *Piper marginatum*, las fracciones obtenidas por la separación cromatográfica del mismo (F2 y F3), además de los extractos hexano y etanol; se realizó por la técnica de difusión en agar en disco (Método de Kirby-Bauer), utilizando cepas de referencia internacional ATCC. De esta manera, la actividad biológica de las muestras a una concentración de 1000 µg/mL, fue probada frente a dos bacterias grampositivas y tres gramnegativas, mostrando efecto inhibitorio sobre los microorganismos ensayados (Tabla 30, Figura 35). Los controles positivos se emplearon según lo establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), el cuál indica el tipo de antibiótico a usar para cada una de las especies estudiadas.

Tras el ensayo, se obtuvieron halos de inhibición superiores al tamaño del disco (6 mm) e inferiores los controles positivos. Por otra parte, es importante mencionar, que el aceite esencial mostró halos de inhibición contra todas las cepas de estudio, donde se puede observar un halo de 11 mm para *K. pneumoniae* y de 13 mm para las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. coli* mientras que para *P. aeruginosa* se visualizó un halo de inhibición de 19 mm (Tabla 30, Figura 35).

Con respecto al análisis de las fracciones obtenidas de la separación cromatográfica realizada al aceite esencial, se obtuvo que F2 y F3, fueron activas frente a las cepas estudiadas, F1 no pudo ser analizada debido a que se obtuvo una baja cantidad. La fracción denominada F2 corresponde al Safrol presentó halos de inhibición contra *S. aureus* (10 mm), *E. faecalis* (11 mm), *P. aeruginosa* (9 mm) y *K. pneumoniae* (9 mm). De igual modo, la

fracción F3 fue activa frente *S. aerues* y *E. faecalis* con un halo de inhibición de 13 mm, respectivamente, mientras que para *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* los halos de inhibición fueron de 9 mm. Con ambas fracciones la cepa gramnegativa *E.coli* fue resistente.

En relación a los resultados obtenidos de los extractos de hexano y etanol (E1 y E2) se visualizó que E1 presentó un halo de inhibición de 11 mm contra *E. faecalis*, y de 8 mm frente a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Las cepas de *E.coli* y *S. aerues* mostraron resistencia. Por otra parte, E2 fue inactivo frente a todas las bacterias ensayadas.

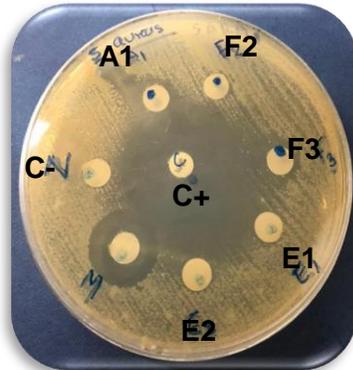
Tabla 30. Resultados de la Actividad antibacteriana del aceite esencial, fracciones y extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum*

Muestras ensayadas	Halos de inhibición (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
A1	13	13	13	19	11
F1	ND	ND	ND	ND	ND
F2	10	11	R	9	9
F3	13	13	R	9	9
E1	R	11	R	8	8
E2	R	R	R	R	R
DMSO (C-)	0	0	0	0	0

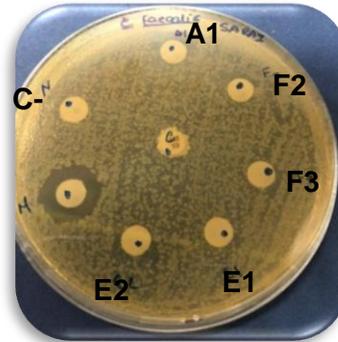
Leyenda: Aceite puro (A1), Fracción 1 (F1), Safrol puro (F2), Fracción 3 (F3), Extracto Hexano (E1), Extarcto Etanol (E2), No determinada (ND), Resistente (R), Dimetilsulfoxido (DMSO), Control negativo (C-), milímetros (mm).

Fuente: Elaboración propia.

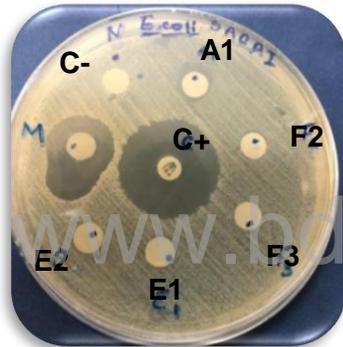
Figura 35. Resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de *Piper marginatum* Jacq.



Staphylococcus aureus



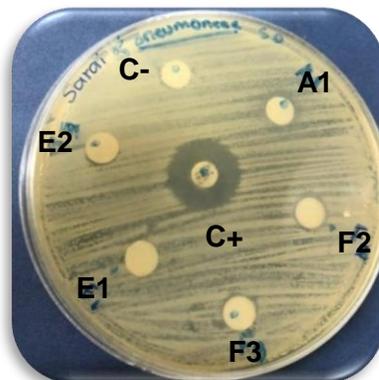
Enterococcus faecalis



Escherichia coli



Pseudomonas aeruginosa



Klebsiella pneumoniae

Leyenda: Aceite puro (A1), Fracción 1 (F1), Safrol puro (F2), Fracción 3 (F3), Extracto Hexano (E1), Extracto Etanol (E2), Dimetilsulfóxido (DMSO), Control negativo (C-).

Fuente: Elaboración propia.

El aceite esencial de *P. marginatum* fue activo frente a todas las cepas ensayadas, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Duarte y cols (2007) y Guamán y Jaramillo (2018), donde analizaron la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Piper marginatum* contra las mismas bacterias evaluadas en el presente estudio obteniendo las siguientes CMI: *Staphylococcus aureus* (400-800 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (6400 µg/mL), *Escherichia coli* (400-800 µg/mL) y *Pseudomonas aeruginosa* (800-1600 µg/mL), Asimismo, Benítez, Melendez y Stashenko (2009) reportaron que el aceite esencial de *P. lanceaefolium* fue activo contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* a una concentración de 20 mg/mL.

Con respecto a los resultados de la actividad de E1 y E2 evaluados a una concentración de 1000 ppm, en los cuales E1 fue activo frente *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* y E2 no presentó actividad, se presume que se debe que la concentración usada fue muy baja debido a que estudios realizados por Benítez en 2008 con los extractos etanólicos de varias especies del género *Piper* reportan que fueron activos a concentraciones 40000 ppm contra *S. aureus*, *B. subtilis* y *E. coli*. Adicionalmente, se puede atribuir que estos resultados se deben a la composición química de los extractos, que reportaron compuestos fenólicos, los cuales pudieron quedar retenidos en los discos de papel usados para el ensayo de actividad antibacteriana.

En relación a lo expuesto anteriormente, varios estudios han revelado principalmente la presencia de monoterpenos, sesquiterpenos y arilpropanoides que muestran interesantes propiedades biológicas. Muchas Piperaceae son usadas en la medicina tradicional en el tratamiento de diversas enfermedades incluida las infecciosas. Es por ello que los resultados de actividad antibacteriana de *P. marginatum* contribuyen a la validación del uso tradicional de esta planta para tratar afecciones de origen

bacteriano, aportando valor a dicha especie convirtiendola en un potencial promisorio la continuidad de estudios posteriores.

Actividad antifúngica

El estudio de la actividad antifungica del aceite esencial de las hojas *Piper marginatum* (puro), del safrol (100 ppm) y de los extractos hexano y etanol (1000 ppm); se realizó por la técnica de difusión en agar en pozo (Método de Kirby-Bauer), utilizando una cepa de referencia internacional ATCC de *Candida krusei* (ATCC 6558). En la tabla 31 y figura 36 se observan los resultados obtenidos durante el ensayo. El aceite esencial presentó actividad al inhibir el desarrollo de la cepa de *Candida krusei*. La inhibición del desarrollo del hongo está representada por un halo de inhibición de 16 mm, el resto de las muestras ensayadas no presentaron actividad antifúngica.

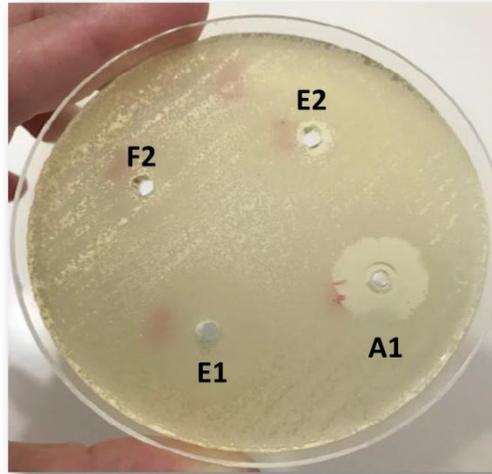
Tabla 31. Resultados de la actividad antifungica del aceite esencial, safrol y extractos obtenidos de las hojas de *Piper marginatum*

Muestras ensayadas	Halos de inhibición (mm) <i>K. crusei</i>
A1	13
F2	R
E1	R
E2	R
DMSO (C-)	0

Leyenda: Aceite puro (A1). Safrol puro (F2). Extracto Hexano (E1), Extracto Etanol (E2). Resistente (R), Dimetilsulfoxido (DMSO), Control negativo (C-), milímetros (mm).

Fuente: Elaboración propia.

Figura 36. Resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de *Piper marginatum* Jacq



Leyenda: Aceite puro (A1). Safrol puro (F2). Extracto Hexano (E1), Extracto Etanol (E2).
Fuente: Elaboración propia.

www.bdigital.ula.ve

En este estudio se encontró que el aceite esencial (AE) extraído de *P. marginatum* posee una actividad importante frente a *C. krusei*, estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Moncayo y cols (2021) quienes evaluaron la actividad antimicrobiana del AE de *P. marginatum* y *P. tuberculatum* de Ecuador y reportan actividad antimicótica moderada frente a *C. albicans* con una CMI de 0,8 y 1,6 mg/mL, respectivamente. De igual modo, Mesa y cols (2007) analizaron la actividades de los aceites esenciales de *P. sanctifelisis* y *Piper* spp, contra *C. krusei* obteniendo una CMI de 0,125 mg/mL. Asimismo, Morandim y cols (2010) evaluaron la actividad antifúngica frente *C. krusei* y reportan que el AE de *P. gaudichaudianum* presentó una CMI de 31,25 mg/mL.

En la presente investigación, también se visualizó que el safrol aislado del aceite esencial de *P. marginatum* no presentó actividad frente a la cepa

C. krusei, indicando que la actividad del aceite se debe al efecto sinérgico de sus componentes y no al compuesto mayoritario (safrol).

Por otra parte, los extractos de hexano y etanol de las hojas de *P. marginatum* no fueron activos frente a *C. krusei*, estos resultados no son congruentes con los obtenidos por Soares y cols (2015) que reportan que el extracto etanólico de *P. tuberculatum* presentó actividad frente a *Candida spp* a una concentración de 10 mg/mL por el método de difusión en agar en disco. De modo similar, un estudio realizado por Nanayakkara y cols (2014) donde determinaron la actividad antifúngica del extracto acuoso de *P. betle* frente a varias cepas de *Candida* (*C. albicans*, *c. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) establecieron una CMI comprendida entre 0,64-3,2 mg/mL para *C. krusei* por el método de difusión en agar en pozo.

En tal sentido, se presume que los extractos fueron inactivos debido a la concentración evaluada (1,0 mg/mL) ya que la composición química de los mismos según el tamizaje fitoquímico determinó que poseían esteroides y compuestos fenólicos y se ha reportado que este tipo de metabolitos secundarios son importantes en las respuestas de defensa pasiva y activa de las plantas. Los compuestos fenólicos atacan las paredes celulares y las membranas de los hongos fitopatógenos, afectando la permeabilidad y liberando los constituyentes intracelulares (Nicholson y Hammerschmidt, 1992), por lo cual se recomienda evaluar la actividad antifúngica a concentraciones más elevadas.

CONCLUSIONES

- De las hojas frescas (3000 g) de la especie *Piper marginatum* Jacq., se logró obtener un volumen de 3,1 mL del aceite esencial con un rendimiento de 0,10 %.
- El aceite esencial fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) logrando cuantificar e identificar 20 compuestos que representan el 99,82 % del total del aceite.
- Los compuestos identificados fueron clasificados como monoterpenos oxigenados (98,78 %) y sesquiterpenos (1,22 %). Siendo los componentes mayoritarios el safrol un monoterpeno oxigenado que representa el 74,33 %; seguido de γ -terpineno (6,49 %), terpinoleno (4,60 %), β -pineno (3,54 %), α -pineno (2,67 %) y linalool (1,13 %).
- Del aceite esencial de las hojas de *P. marginatum* (3,1 mL) se logró aislar e identificar mediante el análisis de los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C APT el 4-alil-1,2-metilen-dioxi-benceno (safrol).
- El análisis fitoquímico de los extractos de hexano y etanol permitió determinar la presencia de esteroides en ambos extractos y de compuestos fenólicos en el etanólico.
- El análisis realizado por cromatografía de capa fina del aceite esencial, safrol, extracto de hexano y extracto de etanol evidenció que el safrol no está presente en los extractos de hexano y etanol obtenidos de las hojas secas y molidas de *Piper marginatum*, pero se puede percibir la presencia de otros metabolitos secundarios.
- La actividad antioxidante frente al radical DPPH fue de 38,61 % y 38,06 % y 77, 56 % para el aceite esencial, el safrol y el extracto etanólico. La concentración inhibitoria media (CI₅₀) del extracto etanólico fue de 148,45 μ g/mL.

- El contenido de fenoles totales mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu estableció que el extracto etanólico de las hojas de *P. marginatum* contiene 51,87 µg AG/mg extracto.
- En relación a la actividad antibacteriana, el aceite esencial fue activo contra *K. pneumoniae* (11 mm), *S. aureus* (13 mm), *E. faecalis* (13 mm), *E. coli* (13 mm) y *P. aeruginosa* (19 mm). El safrol presentó halos de inhibición frente a *S. aureus* (10 mm), *E. faecalis* (11 mm), *P. aeruginosa* (9 mm) y *K. pneumoniae* (9 mm) y fue inactivo frente a *E. coli*. El extracto de hexano fue activo contra *E. faecalis* (11 mm), *P. aeruginosa* (9 mm) y *K. pneumoniae* (9 mm). El extracto etanólico no mostró actividad contra las bacterias evaluadas.
- Por otra parte, el aceite esencial presentó actividad antifúngica al inhibir desarrollo de la cepa de *Candida krusei*, presentando un halo de inhibición de 16 mm, el resto de las muestras ensayadas no presentaron actividad antifúngica. Asimismo se visualizó que el safrol aislado del aceite esencial de *P. marginatum* no presentó actividad frente a la cepa *C. krusei*, indicando que la actividad del aceite se debe al efecto sinérgico de sus componentes y no al compuesto mayoritario (safrol).
- Según la revisión bibliográfica realizada, este es el primer estudio sobre la composición química y actividad antioxidante y microbiológica de *P. marginatum* de Venezuela, lo cual constituye un aporte para la fitoquímica y actividad biológica de esta especie, permitiendo validar el uso medicinal de esta planta en la medicina popular de nuestro país.

RECOMENDACIONES

- Aislar y caracterizar espectroscópicamente los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas de *P. marginatum*.
- Determinar la actividad antimicrobiana a concentraciones más elevadas a las utilizadas en el presente estudio.
- Evaluar otras actividades biológicas del aceite esencial y hojas de *P. marginatum*.
- Obtener derivados hemisintéticos a partir del safrol.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOGRAFIA

- Abreu, O., Rodríguez, A., Morgado, M., y Cao, L. (2012). Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacoeitimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(2), 181-193.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales. Sustancias y Drogas Extraídas de las Plantas*. Universidad Central de Venezuela. Venezuela.
- Andrade, E., Carreira, L., Da Silva, M., Da Silva, J., Bastos, C., Sousa, P. (2008). Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum* sensu lato. *Chemistry Biodiversity*, 5(1): 197-208.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S., y Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry*, 127:183-198.
- Autran, E., Neves, I., Da Silva, C., Santos, G., Câmara C., y Navarro, D., 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource Technology*. 100, 2284-2288.
- Azcón, J., y Talón, M. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Editorial McGraw Hill S.A. Interamericana. 851.
- Barbosa, Q., Câmara, C., Ramos, C., Nascimento, D., Lima-Filho, J., y Guimarães, E. (2012). Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. *Química Nova*, 35(9), 1806-1808.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496. [http://doi.org/10.1016/S0305-4179\(78\)80006-0](http://doi.org/10.1016/S0305-4179(78)80006-0).

- Bedout, C., Gomez, B. (2010). Candida y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infectio*. 14(2), 159-171.
- Bellamy, L. (1975). *The Infra-Red Spectra of complex*. Molecules. (Chapman and Hall. London).
- Benitez, N. (2008). Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género *Piper* L. (Piperaceae). *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Choco*. 27 (1), 67-75.
- Benítez, N., Melendez, E., Stashenko, E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8 (4), 301-304.
- Bonatti, A. (1991). *Formulation of plant extracts into dosage form*. En R. O. B. Wijesekera (Ed.). *The Medicinal Plant Industry* (pp. 106-107). London: CRC Press.
- Bonofiglio, D., Giordano, C., De Amicis, F., Lanzino, M., y Ando, S. (2016). Natural Products as Promising Antitumoral Agents in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(8), 596-604.
- Botias, E., Díaz, O., Mendivelso, D., Martínez, J., y Stashenko, E. (2007). Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación-extracción simultánea. *Scientia et Technica*, 33(1), 122-130.
- Braithwaite, A., y Smith, F. (1999). *Chromatographic methods*. Kluwer Academic Publishers. Quinta edición. USA. 559 p.
- Brand, W., Cuvelier M., y Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*., 28, 25-30.

- Bru, J., y Guzmán, J. (2016). Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Revista Brasileña de farmacognosia*, 26, 767-779.
- Burgess, J., Jordan, E., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., y Boyd, K. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Journal of Biotechnology*, 70(1), 27-32. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00054-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00054-1).
- Burke, M., Berger, E., y Schreiber, S. (2003). Generating diverse skeletons of small molecules combinatorially. *Science*. 302(5645), 613-618.
- Carrasco, H., Raimondi, M., Svetaz, Di Liberto, M., Rodríguez, M., Espinoza, L., Madrid, A., y Zacchino, S. (2012). Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. *Molecules*, 17(1), 1002-1024.
- Carrión, A., y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica (Tesis de Pregrado) Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Castillo, E. y Martínez, I. (2015). *Manual de Fitoterapia*. Elsevier, España. 2da Edición. 1116 p.
- Caselli, A., Cirri, P., Santi, A., y Paoli, P. (2016). Morin: A Promising Natural Drug. *Current Medicinal Chemistry*, 23(8), 774-791. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666160106150821>.
- Cervantes, E., García, R., y Paz, S. (2014). Características generales del *Staphylococcus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Choma, I., y Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography*, 2(2), 225-238. <http://doi.org/10.3390/chromatography2020225>.

- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-82. [http://doi.org/0893-8512/99/\\$04.0010](http://doi.org/0893-8512/99/$04.0010).
- Cobar, O. (2008). *Síntesis de análogos del medicamento Ampakacina CX-516 a partir del producto natural safrol*. Proyecto FODECYT N°20-2006. Informe final. Guatemala.
- Colvard, M., Cordell, R., Villalobos, G., Sancho, D., Soejarto, W., Pestle, T., Lobo Echeverri, K., y Michel, J. (2006). Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. *Journal of Ethnopharmacology.*, 107(1), 134-142.
- Costa, P. (2000). Safrol e Eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados centro. *Quimica Nova*, 23(3), 357-369.
- Cretu, G., y Morlock, G. (2014). Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 146, 104-112. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.038>.
- Davies, N. (1990). Gas Chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silica and carbowax 20 M. Phases. *Journal of Chromatography*, 50, 1.
- D' Angelo, L., Xavier, H., Torres, L., y cols., (1997). Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. A folk medicinal plant used as an analgesic, antiinflammatory and hemostatic. *Phytomedicine*, 4(1), 33-40.
- De Albuquerque, U., Monteiro, J., Ramos, M., y De Amorim, E. (2007). Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol*, 110(1), 76-91.
- Delgado, A., y Cuca, S. (2007). Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum*. *Revistas de Productos Naturales*. 1(1):5-8.

- Dewick, P. (2002). *Medicinal natural products*. Second edition. John Wiley & son's Ltd. England.
- Díaz, M., Rodríguez, C., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Di Stasi, L., y Hiruma C. (2002). *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. Editor UNESP, São Paulo. 125-126.
- Dos Santos, M., Lima, R., de Freitas Fernandes, C., Silva, A., y Facundo, V., 2011. Atividade fungicida do óleo essencial de *Piper marginatum* L. (Piperaceae) sobre *Fusarium oxysporum* (Schlecht) *in vitro*. *Saude Pesq.* 4.
- Duarte, M., Figueira, G., Sartoratto, A., Rehder, V., y Delarmelina, C., 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 97, 305–311.
- Duarte, M., Leme, E., Delarmelina, C., Soares, A., Figueira, G., y Sartoratto, A., 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 197–20.
- Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sánchez, Y., Travieso, M., Martínez, B., 2013. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *La Revista de Protección Vegetal*. 28, 54–59.
- Durán, D., Monsalve, L., Martínez, J., Stashenko, E. (2007). Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Técnica.*; 33: 435-437.
- Elgendy, E., y Khayyat, S. (2008). Oxidation reactions of some natural volatile aromatic compounds: anethole and eugenol. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 44(6), 823-829.

- Ettre L. (1993). *Nomenclatura para cromatografía (recomendaciones de la IUPAC, 1993)*. International Union of Pure and Applied Chemistry. FARESO, S.A. España. 84 p.
- Formagio, A., Ramos, D., Vieira, M., Ramalho, S., Silva, M., Zarate, N., y cols. (2015). Phenolic compounds of Hibiscus sabdariffa and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 75(1), 69-76. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.07413>.
- Foungbe, S., Tillequin, F., y Paris, M., Jacquemin, H. (1976). Sur une Pipéracée de Guyane, le *Piper marginatum* Jacq. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 34, 339-343.
- García, V. (2005). *Introducción a la Microbiología*. Madrid: Editorial EUNED.
- García, A., Leyva, M., Martínez, J., Stashenko, E. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) difundida en la Costa Colombiana. *Scientia et Technica*, (33), 439-442.
- García, P. (1994). *Microbiología Clínica Práctica*. Cádiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- Gamboa, M., y Rodríguez, E. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- González, Y. (2011) Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. *Revista Cubana de Investigación, Biomedica*. (20), 16-20.
- Gonzales, M., Muñiz, P., y Valls, V. (2009). Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de información: Cerveza y Salud. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos. Universidad de Burgos Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia. Universidad de Valencia. 1(8): 1-53.

- Gutiérrez A y Estévez A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(2), 409-419.
- Guamán, W., y Jaramillo, S. (2018). Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la especie *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) de Ecuador frente a cepas de interés clínico. Proyecto de Investigación, Riobamba-Ecuador.
- Heim, K., Tagliaferro, A., y Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Houghton, P., y Raman, A. (1998). *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Springer, Boston, MA, 185 p.
- Hokche, O., Berry, P. y Huber. (2008). *Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela*. Fundación Instituto botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas Venezuela.
- Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M., y Jahaban-Esfahlan, R. (2015). Anti Proliferative Properties of *Melissa officinalis* in Different Human Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(14), 5703-5707. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5703>.
- Jara, A. (2013). Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae). (Tesis Doctoral). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Colombia.
- Jaramillo-Colorado, B., Julio-Torres, J., Duarte-Restrepo, E., Gonzalez-Coloma, A., Julio-Torres, L. (2015). Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. Colombiano. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14, 343-354.

- Jaramillo, M., y Manos, P. (2001). Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *Am. J. Bot.*, 88, 706-716.
- Jesionek, W., Choma, I., Majer-Dziedzic, B., y Malinowska, I. (2014). Screening bacterial and radical scavenging properties of chosen plant extracts using thin-layer chromatography-direct bioautography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(20), 2882-2891. <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2014.907103>.
- Johnson, T. (1998). *CRC Ethnobotany Desk Reference*. Taylor & Francis. CRC Press. Boca Raton. Washington.
- Kaya, I., Yigit, N., y Benli, M. (2008). Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(4), 363-369.
- Khayyat, A., y Al-Zahrani, S. (2002). Thermal, photosynthesis and antibacterial studies of bioactive safrole derivative as precursor for natural flavor and fragrance. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(5), 800-804.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., y Možina, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121-126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.
- Koneman, E. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Lastres, M., Ruiz, T., Castro, M., Torrecilla, P., Lapp, M., Hernández, L., y Muñoz, D. (2015). Conocimiento y uso de las plantas medicinales de la comunidad Valle de la Cruz, Estado Aragua. *Revista Pittieria*, 39, 59-89.
- Leos, C., Rivas, C., y García, D. (2016). *Actividad antioxidante y toxicidad*. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J.

- (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 41-76.
- Lima, A., Peixoto Da Silva, K., De Souza, I., Araújo, J., y Brondani, D. (2004). Synthesis, antitumour and antimicrobial activities of new peptidyl derivatives containing the 1,3-benzodioxole system. *Eur J Med Chem*, 39(12), 1059-1065.
- Lima, P., Lima, L., Da Silva, K., Léda, P., Miranda, A., Fraga, C., Barreiro, E. (2000). Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *Eur J Med Chem*, 35(2), 187-203.
- Lima, L. (2015). Safrole and the versatility of a natural biophore. *Revista Virtual de Química*, 7(2), 495-538.
- Londoño, J. 2004. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Corporación Universitaria Lasallista. 9: 129-162.
- Lujan, D. (2014). Pseudomonas aeruginosa: Un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*, 48(4), 465-474.
- Madrid, A., Espinoza, L., Montenegro, I., Villena, J., y Carrasco, H. (2011). New catechol derivatives of safrole and their antiproliferative activity towards breast cancer cells. *Molecules*, 16(6), 4632-4641.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas-Venezuela.Torino.
- Martínez, A. (2001). *Áceites Esenciales*. Colombia: Facultad Química Farmacéutica Medellín. Recuperado de http://www.academia.edu/21291310/UNIVERSIDAD_DE_ANTIOQUIA_ACEITES_ESENCIALES.
- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *Journal of Natural Products*, 59(1), 77-79.

- Martínez, A., Valencia, G., y Jiménez, M. (2004). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Departamento de Farmacia. Universidad de Antioquía, Medellín. Colombia.
- Masuoka, C., Ito, Y., Ono, M., y Nohara, T. (2003) Antioxidative, antihyaluronidase and antityrosinase activities of some constituents from the aerial part of *Piper elongatum* Vahl. *Food Science and Technology Research*, 9(2), 197-201.
- Mata, R., Morales, I., Pérez, O., Rivero-Cruz, I., Acevedo, L y Mendoza, E. (2004). Antimycobacterial compounds from *Piper sanctum*. *Journal of Natural Products*, 67(12),1961-1968.
- Mesa, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez, J., Trujillo, S., y Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 1-18.
- Mesa, A., Toro, J., Cardona, F., y Blair, S. (2012). Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género *Piper*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11(2),154-162. Microbes and disease. Microbiology recuperado de. <http://microbiologyonline.org/about-microbiology/microbes-and-the-humanbody/microbes-and-disease>.
- Mesa, A., Montiel, J., Martínez, C., Zapata, B., Pino, N., Bueno, J., y Stashenko, E. (2007). Actividad *in vitro* anticándida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia *Piperaceae*. *Scientia et Técnica*. Abr; XIII (033): 247-249.
- Moncayo, S., Rondón, M., Araujo, Liliana., Rojas, L., Cornejo, Xavier., Guamán, Walter., Jaramillo, Soraya. (2021). Composición química y actividad biológica de los aceites esenciales de *Piper marginatum* Jacq. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Ecuador. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 63(1), 14-24.

- Montero, A. (2017). *Estudio fitoquímico de hojas de la especie vegetal Piper catripense* (Piperaceae) y evaluación de su capacidad antioxidante. (Proyecto de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de: Licenciado en Química), Universidad Distrital Francisco José De Caldas. Colombia.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-232.
- Morandim, A., Pin, A., Santo, N., Oliveira, H., Mendes, M., Alecio, A., Kato, M., Oliveira, J., Furla, M. (2010). Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(17), 1810-1814.
- Murray, P. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: Editorial Elsevier.
- Nanayakkara, B., Abayasekara, C., Panagoda, G., Kanatiwela, H., Senanayake, M. (2014). Anti-candidal activity of *Piper betle* (L.), *Vitex negundo* (L.) and *Jasminum grandiflorum* (L.). *African Journal of Microbiology Research*. 8(23), 23107-2314.
- Navickiene, H. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. NCBI. *Phytochemistry*, 55, 621.
- National Committee for Clinical Laboratory. (1997). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. National Committee for Clinical Laboratory standards, Villanova ,17 (1).
- Ncube, N., Afolayan, A., y Okoh, A. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797-1806. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb07.613>.

- Newman, D., Cragg, G., y Snader, K. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022-1037.
- Newman, D., Cragg, G., y Snader, K. (2000) The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17(3), 215-234.
- Nicholson, R., Hammerschmidt, R. (1992) Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 30, 369-389.
- Niño, S., y Dorr, L. (2018). Dos nuevas especies de *Piper* (Piperaceae) de los Andes de Venezuela. *Harvard Papers in Botany*, 23(1), 9-13.
- Nunes, J. (1987). *Estudo sintético de derivados do Óleo de Sassafrãs* (Tesis de Maestría). Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina. Brasil.
- Oliveira, L., Ehringhausm, Ch., Yoshio, P. (2004). Genetic diversity of *Pimenta longa* genotypes (*Piper* sp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. *Genetics and Molecular Biology*. 27(1):74-82.
- Ordaz, G., D'Armas, H., Yáñez, D., y Moreno, S. (2011). Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 585-595.
- Ovalle, A., Palacios, E., Abdalla, K., y Juárez, L. (2012). Fraccionamiento Bioguiado de Cuatro Especies Nativas del Género *Piper* con actividad demostrada en modelos *in vitro*. Tesis para optar al título de Químico Biólogo. Guatemala.

- Parmar, V., Jain, S., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O., Prasad, A., Wengel, J., Olsen, C., y Boll, P. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *ScienceDirect*, 46(4), 591-673.
- Pastene, E. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6), 449-455.
- Pedrozo, J. (2004). Productos Naturales Vegetales: Generalidades Químicas, Papel Biológico, Importancia Industrial y Métodos de uso común en fitoquímica en cuadernillos No 1 y No 3. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Peredo, H., Palou, E., y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 24-32.
- Pereira, L., Barboza, G., Bovini, M., De Almeida, M., y Guimarães, E. (2011). Caracterización y uso de pimientas en una comunidad Quilombola de la Amazonía Oriental (Brasil). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 5, 255–272. Planlist (2018). Recuperado de <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Piperaceae/>.
- Pereira, M., Steffens, R., Jablonski, A., Hertz, P., Ríos, A., Vizzotto, M., Flores, A. (2012). Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3061-3067.
- Pérez, N., y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4).
- Plazas, G., Erika A., Cuca, S., Luis, E., Delgado, A., y Wilman, A. (2008). Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) y derivados acetilados. *Rev. Colomb. Quim*, 37(2), 135-144.
- Porras, A., y López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-124.

- Quijano, M., Callejas, R., y Miranda, D. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography*, 33, 1266-1278.
- Ramirez, L., y Marin, D. (2009). Metodología para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.
- Ramos, L, Da Silva, M., Luz, A., Zoghbi, M., Maia, J. (1986). Essential Oil of *Piper marginatum*. J., *Natural Products.*; 49(4): 712-713.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 3(5) 1231-1237.
- Reigada, J., Tcacenco, A., Andrade, L., Kato, M., Portob, A., y Lagoc, J. (2007). Chemical constituents from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae) antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida antarctica* lipase (Novozym 435). *Tetrahedron-Asymmetry*, 18(9), 1054-1058.
- Rengifo, R. (2013). Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Pharmaciencia*, 1, 51-56.
- Rios, J., Recio, M., y Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*, 23(2), 127-149. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(88\)90001-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(88)90001-3).
- Ringuele, J., y Viña S. (2013). Productos naturales vegetales. 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata. 261 p.
- Rocha, S., y Ming, L. (1999). *Piper hispidinervum*: A sustainable source of safrole, p.479. In: J. Janick (ed) Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press: Alexandria.

- Rodrigo, R., y Gil-Becerra, D. (2014). Implications of polyphenols on endogenous antioxidant defense systems in human diseases. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1, 201-217.
- Rodríguez, D., Bagnarello, V., Alpizar, J., Calvo, A., Cordero, M., Chinchilla, M., Valerio, I., y Sánchez, R. (2018). Actividad *in vitro* anti-leishmania (Trypanosomatidae) del epóxido trans-Z-A-bisaboleno y del safrol, en frutos de *Piper Auritum* (Piperaceae). *Revista de Biología Tropical*, 66 (2), 826-835.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F. y García, J. (2005). Bacteriología general: Principios y Prácticas de Laboratorio. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rojas, M., Garavito, G., y Rincón, J. (2013). Actividad antiplasmódica *in vitro* de *Piper holtonii* (cordoncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 69-75.
- Rueda, C. (2010). *Antioxidantes naturales: Cómo reducir el riesgo de cáncer, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares*. 1era ed. Madrid: Ediciones Nowtilus S.L.
- Runyoro, D., Matee, M., Ngassapa, O., Joseph, C., y Mbwambo, Z. (2006). Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 11. <http://doi.org/10.1186/1472-6882-6-11>.
- Ruel, J., Guitton, M., y Puel, J. (2002). Negative allosteric modulation of AMPA-preferring receptors by the selective isomer GYKI 53784 (LY303070), a specific non-competitive AMPA antagonist. *CNS Drug Reviews*, 8(3), 235-254.
- Rukachaisirikul, T., Siriwattanakit, P., Sukcharoenphol, K., Wongvein, C., Ruttanawiang, P., Wongwattanavuch, P., y Suksamrarn, A., (2004). Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 173-176.

- Salamanca, S., y Galiano, M. (2016). Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Piper* y elucidación estructural de sus aceites esenciales (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima – Perú.
- Salim, E., Abd El-Magid, A., Farara, K., y Maria, D. (2015). Antitumoral and Antioxidant Potential of Egyptian Propolis Against the PC3 Prostate Cancer Cell Line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(17), 7641-7651. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7641>
- Sánchez, V., y Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de Investigación Médica Sur*, 20(3), 161-168.
- Sánchez, Y., Correa, T., Abreu Y., y Pino O. (2012). Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson. *Revista de protección vegetal*, 27(1), 39-44.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E., e Iglesia, A. (2009). Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de anís). *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 39-46.
- Sánchez, Y., Correa, T., Abreu, Y., Martínez, B., Duarte, Y., e Pino, O. (2011). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Revista de protección vegetal*, 26(3), 170-176.
- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S., y García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: *OmniaScience*. 77-100.
- Sanders, J., y Hunter, B. (1993). *Modern NMR Spectroscopy*. Oxford University Press New York.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R., Alviano, C., y Costa, S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and

- bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 563-568. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.007>.
- Sequeda, L., Celis, C., Gutiérrez, S., y Gamboa, F. (2015). *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae): Phytochemical. Therapeutic, botanical insecticidal and phytosanitary uses. *Pharmacologyonline*, 3, 136-145.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3).
- Sgariglia, A., Soberón, J., Sampietro, D., y Vattuone M. (2010). Cromatografía: conceptos y aplicaciones. *Revista Arakuku*, 2(1). 1-6. www.csnat.unt.edu.ar/academica/publicaciones/revista-arakuku.
- Shelles F. (1992). Farmacia galénica. Madrid, Selsa.
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., y Suarez, D. (2018). Productos Naturales: Metabólicos Secundarios y Aceites Esenciales by Fundación Universitaria Agraria de Colombia –UNIAGRARIA. 56 p.
- Silva, M., Simas, S., Batista, T., Cardarelli, P., y Tomassini, T. (2005). Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L.(Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 779-782. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000700018>.
- Soares, B., Morais, S., Fontenelle, R., Brito, E., Queiroz, V., Castro, C., Vilanova, N., Cavalcante, C., Rocha, M. (2015). Antifungal activity of plant extracts against *Microsporum canis* and *Candida* spp. Strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 14 (4), 263 - 272

- Soltis, P., Soltis, D., y Chases, M. (1999). Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. *Nature*, 402(6760), 402-4.
- Stashenko, E. (2009). Aceites esenciales. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander.
- Spicer, J. (2009). *Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*. Australia: Editorial Elsevier.
- Tamayo R, Verdecia A, Mojera I. (2011). Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 15(3), 68-74.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Secondary Metabolites and Plant Defense*. United States: Sinauer Associates.
- Taroco, R., Seija, V., y Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de bacteriología y Virología Médica*, (Cim), 663-672.
- The plantlist. (2019). Recuperado de: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2568889>.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, Ch. (2007). *Introducción a la Microbiología*. 9° edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Tropicos . Recuperado Enero (2019). de <http://WWW.TROPICOS.ORG/NAME/25001136?TAB=IMAGE>.
- Trujillo, W., y Hoyos, F. (2013). El género *Piper* (Piperaceae) en la reserva natural Las Dalias, municipio de La Montañita-Caquetá. *Momentos de Ciencia*, 10(2), 88-96.
- Trujillo, W., y Gonzales, V. (2011). Plantas medicinales utilizadas por tres comunidades indígenas en el noroccidente de la Amazonia colombiana. *Mundo Amazon*, 2, 283-306.

- Valcarcel, M., y Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. 1era edición. Barcelona. Editorial reverté.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M., Mazura, M., y Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84
- Valencia, E. (2013). *Validación y actualización del uso de plantas medicinales presentes en la selva valdiviana*. Universidad Austral de Chile.
- Van Loc, T., y Van Sung, T. (2007). Synthesis of new safrol derivatives by modifying the side chain. *Journal of Chemistry*, 45(3), 353–355.
- Vargas, L. (2017). *Potencialidad del género Piper como fuente de sustancias para el control de hongos fitopatógenos*. (Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias-Química). Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Colombia.
- Villasmil, J., Abad, M., Arsenak, M., Fernández, A., Ruiz, M., Williams, B., Michelangeli, F., Herrera, F., Taylor, P. (2006). Cytotoxic and antitumor activities of Venezuelan plant extracts *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacology Online* 3, 808–816.
- Vizcaíno, S. (2013). Safrol y Apiol: metabolismo, preparación de derivados y actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Botryodiplodia theobroma* (Tesis de Magister). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Voigt, R. (1982). *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España : Acriba.
- Walton, N., y Brown, D. (1999). *Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products*. Imperial College Press.
<http://dx.doi.org/10.1142/3203>.

- Wanke, S., M. Jaramillo, T., Borsch, M., Samain, D., y Einhuis, C. (2007). Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Mol. Phylogenetics Evol*, 42, 477-497.
- Wang, Y., Konkoy, C., Ilyin, V., Vanover, K., Carter, R., Weber, E., Keana, J., Woodward, R., y Cai, S. (1998). Synthesis of 7,8-(methylenedioxy)-1-phenyl- 3,5-dihydro-4H-2, 3-benzodiazepin-4-ones as novel and potent noncompetitive AMPA receptor antagonists. *J. Med. Chem*, 41(14), 2621-2625.
- Yukes, J., y Balick, M. (2011). *Dominican Medicinal Plants: A Guide for Health Care Providers*. The New York Botanical Garden. New York.
- Yunker, T. (1972). The Piperaceae of Brazil I: Piper-Group I, II, III, IV. *Hoehnea*, 2, 19.
- Zakaira, Z., Patahuddin, H., Mohamad, A., Israf, D., y Sulaiman, M. (2010). *In vivo* antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the leaves of *Piper sarmentosum*. *J. Ethnopharmacol*, 128(1), 42-48.
- Zwenger, S., y Basu, Ch. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Plant terpenoids: applications and future potentials. Biotechnol. Mol. Biol. Rev*, 3(1), 1-7.