

Estudio químico semicuantitativo y comparativo de la fracción volátil destilada desde la especie ecuatoriana *Piper subscutatum* (Miq.) C. DC. (*Piperaciae*)

Carlomagno Solórzano López^{1-2*}, Daniela Andrade², Jorge Ramírez², Gianluca Gilardoni²

¹Universidad Técnica Particular de Loja, Maestría de Investigación en Química Aplicada, Ecuador

²Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), Departamento de Química, Ecuador

*Autor para correspondencia: slcarlomagno@utpl.edu.ec

Recibido: 2021/09/29

Aprobado: 2022/05/31

DOI: <https://doi.org/10.26621/ra.v1i26.758>

RESUMEN

El presente trabajo de investigación compara dos análisis químicos realizados por separado en dos fechas del mismo año, a las fracciones volátiles destiladas desde hojas de la especie *Piper subscutatum*, recolectadas en Numbani, Zamora Chinchipe, Ecuador. El primero de ellos, cuantitativo, con la fracción volátil destilada mediante arrastre de vapor, analizado con un detector de ionización de flama FID y publicado previamente bajo el tema "Essential Oil and Major Non-Volatile Secondary Metabolites from the Leaves of Amazonian *Piper subscutatum*"; y el segundo, objeto de este trabajo, semicuantitativo, mediante micro-hidrodestilación y analizado con un detector de espectrometría de masas (MSD), en ambos se utilizó cromatografía de gases con columnas polares y apolares, lográndose constatar 45 compuestos comunes entre ambos estudios, los mayoritarios fueron sesquiterpenos hidrocarburos (55,65% y 41,68%), sesquiterpenos oxigenados (8,55% y 8,75%) monoterpenos hidrocarburos (8,25% y 28,72%), y minoritarios: monoterpenos oxigenados (1,25% y 3,96%) y otros (2,5% y 3,58%), también se determinó la desviación estándar para cada compuesto en ambos análisis y un perfil químico cualitativo-cuantitativo del aceite esencial. En ambos estudios el compuesto más abundante fue el sesquiterpeno (*E*)-cariofileno, seguido por β -chamigreno y *E*-nerolidol, que tienen usos farmacológicos, en el segundo y tercer lugar respectivamente para el primer estudio, mientras que en el segundo estudio fueron los monoterpenos: α -pineno, y β -pineno los que ocuparon esos lugares, desplazando a β -chamigreno y *E*-nerolidol del segundo al noveno lugar y de tercer al cuarto lugar respectivamente, al final se realizó una breve revisión de las actividades registradas para los terpenos mayoritarios más significativos, los cuales podrían tener potenciales e interesantes aplicaciones farmacológicas y agroquímicas.

Palabras clave: *Piper subscutatum*, terpenos, cromatografía de gases

ABSTRACT


This research work presents the comparison of two chemical analyzes carried out separately on two dates of the same year, to the volatile fractions distilled from leaves of the *Piper subscutatum* species, collected in Numbani, Zamora Chinchipe, Ecuador. The first of them was quantitative, distilling a volatile fraction by vapor drag, and analyzed with a flame ionization detector (FID). This analysis was previously published as "Essential Oil and Major Non-Volatile Secondary Metabolites from the Leaves of Amazonian *Piper Subscutatum*". We are now introducing the second analysis, which was semi-quantitative, made by micro-hydrodistillation and analyzed with an mass spectrometry detector (MSD), and a gas chromatographer with polar and apolar columns. We found 45 common compounds between both studies, most of them hydrocarbon sesquiterpenes (55.65% and 41.68%), oxygenated sesquiterpenes (8.55% and 8.75%), hydrocarbon monoterpenes (8.25% and 28.72%). Also, there were, in lesser proportions, monoterpenes oxygenated (1.25% and 3.96%) and others (2.5% and 3.58%). Standard deviation was also compared. In both studies, the most abundant compound was the sesquiterpene *E*-caryophyllene. For the first study, the second and third places there were β -chamigreno and *E*-nerolidol, which have pharmacological uses. In the second study, there were monoterpenes: α -pinene, and β -pinene in second and third place, displacing β -chamigreno and *E*-nerolidol from second to ninth place and from third to fourth place respectively. We also made a review of the terpenes' activities to think about their pharmacological and agrochemical applications.

Keywords: *Piper subscutatum*, triterpenes, gas chromatographer

Carlomagno Solórzano López  orcid.org/0000-0001-8405-0491

Daniela Andrade  orcid.org/0000-0001-6887-0318

Jorge Ramírez  orcid.org/0000-0002-8839-7457

Gianluca Gilardoni  orcid.org/0000-0003-0915-9416



INTRODUCCIÓN

Piperaceae es una familia vegetal de las más extendidas en el planeta, algunos investigadores le han datado más de 3500 especies, cinco géneros y tres subfamilias registradas en la actualidad (Jaramillo & Callejas, 2004; Trujillo & Hoyos, 2013), mientras que al género *Piper*, el mayor género de la familia, le atribuyen alrededor de 2000 especies (Quijano et al., 2006). Ya que algunos autores sitúan la aparición de este género en Laurasia y otros en Gondwana (Gentry, 1982; Raven & Axelrod, 1974; Quijano et al., 2006). No sería descabellado inferir que, un género tan antiguo y prolífico en especies haya desarrollado en su evolución diferentes mecanismos de sobrevivencia para defenderse, reproducirse, adaptarse y pervivir, pues en la actualidad algunos son frutíferos y una gran parte paleo hierbas (Bottia et al., 2007; Guerrini et al., 2009), muchos de estos mecanismos existen gracias a metabolitos secundarios.

En Ecuador *Piper subscutatum* (Miq.) C.DC es conocida en castellano popular como hoja de veneno, mientras que en francés se llama *poivrier subpelté* (Grandtner & Chevrette, 2014), lo primero posiblemente por la observación empírica de alguna actividad toxicológica, por parte de pobladores del sur de Ecuador y norte de Perú, mientras que lo segundo se traduciría como pimienta escudada, parece hacer referencia a la forma de las brácteas que presenta la *Piper subscutatum*, semejando pequeños escudos.

Desde un punto de vista cualitativo, los aceites esenciales son a menudo mezclas de compuestos conocidos; sin embargo, su composición cuantitativa puede ser muy diferente de una especie a otra. La composición cualitativa de un aceite esencial es responsable de sus propiedades sensoriales y biológicas (Gilardoni et al., 2018). Está sujeta, principalmente, al tipo de planta, método de extracción y variables como condiciones geobotánicas, tipo de suelo, época de recolección y edad de la planta, los cuales pueden afectar la concentración de los compuestos que constituyen el aceite esencial (Pino et al., 2009). Conviene entonces conocer cuáles moléculas estarían más constantes y en cuales proporciones en la mezcla, sobre todo si se desea hacer uso de las virtudes de dichas moléculas utilizando una especie botánica determinada como materia prima para extracción.

MÉTODOS

Información general

Para la obtención de las fracciones volátiles en el primer análisis, se utilizó un equipo destilador por arrastre de vapor Clevenger, mientras que para el segundo análisis se utilizaron un par de micro destiladores, todos con capacidad de cohobación, los sistemas se enfriaron por circulación forzada de agua, a temperatura de 2-3°C. (Bicchi et al., 1983; Gilardoniet al., 2020). Se utilizó un cromatógrafo de gases GC-MS Agilent Technologies (Wilmington, EE.UU.) serie 6890N, acoplado a un detector de masas Agilent Technologies serie 5073 Inert que cuenta con un inyector automático split/splitless serie 7683. Para los análisis cualitativo y cuantitativo se utilizaron dos tipos de columnas capilares de dimensiones 30m x 0,25mm DE x 0,25µm DI: la columna apolar DB5MS (5%-fenilmetilpolisiloxano) y la columna polar HP-Innowax (Polietilenglicol). Para realizar el análisis cualitativo y semicuantitativo se utilizó el detector de masas (MSD), mientras que, para los análisis cuantitativos, un detector de ionización de llama (FID). La obtención de cromatogramas y la determinación de espectros cromatográficos se realizó utilizando el software MSD-Chemstation D.01.00 SP1. Como

solventes se utilizaron agua destilada y ciclohexano para la destilación y para la separación del aceite esencial respectivamente, mientras que como estándar interno se utilizó una solución de nonano.

Recolección del material vegetal

Las hojas de la planta *Piper subscutatum* (Miq.) C. DC. (*Piperaceae*), fueron colectadas en: Numbani - Zamora Chinchipe – Ecuador, con coordenadas geográficas de 4°, 09', 24.9", S y 78°, 56', 38.9", O, con una altitud de 1000 m.s.n.m, en los meses de abril y octubre de 2018 e identificados por comparación con ejemplares depositados en el herbario de la UTPL, con voucher número PPN-pi-011. Las muestras fueron extraídas de un total de 10 arbustos considerados como adultos que se encontraban en un área de 500 m alrededor de las coordenadas indicadas, se seleccionaron las hojas más frescas y limpias, las mismas que fueron mezcladas para obtener así una muestra promedio.

Obtención de la fracción volátil

El material de muestra fue previamente sometido a una cámara de secado para eliminar humedad, se pesaron 3g de material de muestra por cada matraz (4 matraces en total), se agregó agua destilada hasta llenar la mitad del contenido de cada matraz (50 ml y se sometió a micro destilación por un periodo de 4 horas cada par de destilaciones. Los productos obtenidos en cada destilador fueron nombrados como PS1, PS2, PS3 y PS4 para el aceite esencial obtenido con los micro destiladores, de estos últimos se escogieron 3 al azar para su análisis cromatográfico.

Preparación de estándar

Se preparó una solución con 6,9 mg de estándar interno (nonano) y luego se aforó en un matraz hasta 10ml de ciclohexano. Se agregó un volumen de solución de 500 µl con estándar interno (0,69 mg/ml) en la burbuja de recolección de aceite esencial del micro destilador. Concluido el proceso de destilación, la fracción volátil fue depositada en viales de vidrio color ámbar, en algunos de ellos se utilizó un inserto para optimizar la altura de líquido, y se almacenó a -4°C en un equipo de refrigeración para posteriormente ser analizada en el cromatógrafo de gases.

Análisis químico de la fracción volátil

Para los análisis cualitativo y cuantitativo de la fracción volátil se prepararon muestras de hidrocarburos (C9-C25) que fueron inyectadas en el cromatógrafo previamente a las inyecciones del aceite esencial para cada columna, con los datos de esta muestra de hidrocarburos alcanos, se desarrolló una curva estadística por cada columna con sus respectivas ecuaciones de curvas parciales, contra las que se contrastaron los datos de las muestras de aceite esencial en las columnas respectivas.

Inyección de las muestras de aceite esencial

Las muestras de la fracción volátil en solución con estándar interno obtenidas destilaciones se inyectaron directamente al cromatógrafo de gases en el modo split para los análisis cualitativo, cuantitativo y semicuantitativo.

Análisis cualitativo de compuestos

Una vez obtenidos los cromatogramas, se utilizaron las ecuaciones de curva parciales de cada alcano para determinar los Índices de Retención Lineal (IRL), para luego comparar con ellos a cada componente que tuviese el mismo o cercano, y el peso molecular correspondiente a ese

alcano, así después se comparan con los espectros cromatográficos en las bibliografías, pudiendo así determinar cada uno de los compuestos dentro de la fracción volátil que se mencionan en el presente trabajo.

Análisis cuantitativo de compuestos

Para el análisis cuantitativo, se realizó con el detector de ionización de llama (FID) en las columnas DB-5Ms y HP-Innowax, obteniéndose las medias aritméticas y desviaciones estándares para cada componente identificado, utilizando para ello las áreas de pico de cada compuesto, por ser estos datos los de mayor precisión en los reportes de análisis cromatográficos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados del análisis cualitativo

Se detectaron para la columna apolar DB-5MS cualitativamente: 54 compuestos, de estos se pudo identificar 47 componentes y 7 no determinados. De los 47 compuestos, 31 son coincidentes con los componentes en los cromatogramas del primer estudio, donde la técnica de extracción es arrastre de vapor (Ramírez et al., 2021). Lo que equivale al 66% de los compuestos identificados, además también con esta columna, se pudo identificar en el aceite esencial, 4 componentes que aparecen en el hidrolato de *P. subscutatum* realizado en el primer estudio.

Para la columna polar HP-Innowax, se identificó 40 compuestos, de los cuales 32 pudieron ser identificados y 8 no determinados; de los 32 identificados, 29 coinciden con los identificados en el primer análisis (Ramírez et al., 2021). Es decir, el 90,6%, también se pudo identificar con esta columna, 1 componente que aparece en el hidrolato de *P. subscutatum* del primer análisis.

Resultados del primer análisis (cuantitativo)

Para el primer análisis, respecto a los compuestos coincidentes, la composición química cuantitativa es como grupos mayoritarios:

sesquiterpenos hidrocarburos (55,65%), sesquiterpenos oxigenados (8,55%) y monoterpenos hidrocarburos (8,25%), y como minoritarios: monoterpenos oxigenados (1,25%) y otros (2,5%) (véase tablas 1, 2 y 3).

En la tabla 1, para el primer análisis, los compuestos mayoritarios (con valores superiores a 0,5%) son solo 18, pero constituyen en promedio el 71,4% de toda la masa de la fracción volátil. Sumado a estos, los 4 compuestos minoritarios (igual o inferiores a 0,5%) que constituyen el 1,5% de la masa, alcanzarían el 72,9% del total cuantitativo del aceite esencial de la destilación por arrastre de vapor con el equipo Clavenger del primer análisis, mientras que los otros 20 componentes (10 de ellos trazas) identificados en por lo menos una de las dos columnas y coincidentes en ambas destilaciones, representan tan solo el 3,3%. Basado en las proporciones registradas en el primer análisis, los 42 compuestos coincidentes representan en promedio el 76,2% de toda la masa del aceite esencial.

Resultados del segundo análisis (semicuantitativo)

Para el segundo análisis, respecto a los compuestos coincidentes, la composición química cuantitativa es como grupos mayoritarios: sesquiterpenos hidrocarburos (41,68%), monoterpenos hidrocarburos (28,72%) y sesquiterpenos oxigenados (8,75%), y como minoritarios: monoterpenos oxigenados (3,16%) y otros (3,11%) (véase tabla 1).

Nótese que, los compuestos mayoritarios son 21, es decir tres compuestos más que en el primer estudio donde estos aparecen como minoritarios y constituyen en promedio el 80,8% de la masa de la fracción volátil. Sumando a estos, los 4 minoritarios que constituyen el 1,43% de la masa, alcanzarían el 82,2% del total semicuantitativo en la destilación por micro-hidrodestilación, mientras que los otros 17 componentes identificados en por lo menos una de las dos columnas representan tan solo el 3,8%. Basado en las proporciones registradas en el segundo análisis, los 42 compuestos coincidentes representan en promedio el 86% de toda la masa del aceite esencial.

Tabla 1. Composición química coincidente de los análisis de la fracción volátil de *Piper subscutatum* (Miq.) C. DC. (*Piperaceae*) para las columnas apolar y polar

N.	Compuesto	Primer análisis						Segundo análisis							
		DB-5MS		HP-INNOWAX		IR ^{cal}	IR ^{ref} (Adams, 2017)	DB-5MS		HP-INNOWAX		IR ^{cal}	IR ^{ref}	%	σ
		%	σ	%	σ			%	σ	%	σ				
1	α-Pineno	1,6	0,28	2,1	0,32	932	932	10,8	1,87	1019	1025 ⁱ	8,8	1,36		
2	Canfeno	Traza	--	Traza	--	947	946	0,3	0,06	1060	1075 ⁱ	0,3	0,06		
3	β-Pineno	2,6	0,43	3,4	0,58	977	974	14,3	2,38	1108	1118 ⁱ	12,6	2,14		
4	6-metil-5-hepten-2-ona	2,1	0,51	2,9	0,8	986	981	3,1	0,76	1342	1323 ^j	4,1	1,12		
5	Mirceno	0,2	0,06	0,6	0,19	990	988	0,4	0,10	1165	1166 ^g	0,4	0,13		
6	α-Felandreno	0,3	0,13	0,3	0,13	1005	1002	0,9	0,42	1162	1162	0,9	0,41		
7	δ-3-Careno	0,2	0,14	Traza	--	1007	1008	0,4	0,02	1145	1135	0,4	0,11		
8	α-Terpineno	Traza	--	Traza	--	1011	1014	Traza	--	--	--	--	--		
9	p-Cimeno	Traza	--	Traza	--	1024	1920	0,4	0,11	1270	1281	0,3	0,13		
10	Limoneno	0,6	0,17	0,7	0,2	1028	1024	1,3	0,35	1198	1196	1,1	0,31		
11	γ-Terpineno	Traza	--	Traza	--	1057	1054	0,1	--	--	--	--	--		

N.	Compuesto	Primer análisis						Segundo análisis						
		DB-5MS		HP-INNOWAX		IR ^{cal}	IR ^{ref} (Adams, 2017)	DB-5MS		HP-INNOWAX		IR ^{cal}	IR ^{ref}	% σ
		%	σ	%	σ			%	σ	%	σ			
12	Terpinoleno	1,8	0,98	2,1	1,28	1084	1086	1,5	0,84	1282	--	2,1	1,28	
13	oxido trans-Linalool (furanoid)	Traza	--	--	--	1086	1084	Traza	--	--	--	--	--	
14	Linalool	1,1	0,25	1,4	0,46	1101	1095	3,2	0,70	1557	1554	3,3	1,11	
15	β -Yanlgeno	--	--	Traza	--	--	--	--	--	1563	1576	Traza	--	
16	1,3,8-ρ Mentatrieno	Traza	--	--	--	1126	1108	Traza	--	--	--	--	--	
17	δ-Elemento	0,2	0,03	--	--	1334	1335	0,2	0,02	--	--	--	--	
18	α-cubebeno	0,3	0,03	--	--	1346	1348	0,2	0,02	--	--	--	--	
19	α- copaeno	0,9	0,24	1	0,4	1374	1374	0,6	0,15	1484	1493	0,5	0,21	
20	β -Elemento	1,6	0,58	0,2	0,16	1388	1389	0,6	0,23	1588	1580	2,8	2,27	
21	Sibireno	--	--	0,3	0,14	--	--	--	--	1597	--	0,6	0,27	
22	α-Gurjuneno	0,2	0,1	--	--	1405	1409	0,2	0,02	--	--	--	--	
23	(E)-Cariofileno	25,3	5,8	25,2	6,73	1420	1417	14,9	3,41	1590	1598	15,7	4,19	
24	β-Gurjuneno	--	--	Traza	--	--	--	--	--	1601	1596	Traza	--	
25	α-Guaieno	1,9	0,9	0,2	0,07	1434	1437	0,1	0,01	1630	1652	2,7	0,91	
26	α-Humuleno	1,8	0,49	0,4	0,17	1454	1452	1,3	0,34	1660	1666	1,2	0,51	
27	Ishwarano	1,2	0,21	0,3	0,14	1467	1466	2,6	0,45	1668	--	0,5	0,25	
28	α-neo-cloveno	--	--	1,7	0,76	--	--	--	--	1687	--	0,4	0,19	
29	cis-Muurolo-4(14),5dieno	--	--	Traza	--	--	--	--	--	1651	1643	Traza	--	
30	Selina-3,7(11)-dieno	--	--	Traza	--	--	--	--	--	1769	1783	3,1	1,28	
31	trans-Muurolo-4(14),-5dieno	0,3	0,29	0,6	0,48	1489	1493	0,4	0,42	1699	--	1,0	0,81	
32	β-Selineno	7,2	2,3	7,7	3,58	1487	1489	3,4	1,10	1708	1716	3,4	1,59	
33	β-chamigreno	10,3	5,06	7,8	3,59	1471	1476	1,1	0,53	1715	1723	4,0	1,85	
34	Bicyclgermacreno	--	--	2,4	1,07	--	--	--	--	1725	1734	1,7	0,74	
35	γ -Cadineno	0,7	0,27	--	--	1513	1513	0,2	0,09	--	--	--	--	
36	δ-Cadineno	2,7	0,84	3,9	1,78	1517	1521	1,9	0,58	1752	1755	2,7	1,21	
37	trans-Calameneno	1,1	0,56	0,7	0,37	1520	1522	0,6	0,30	1826	1823	0,5	0,29	
38	β Germacreno	1,8	0,44	1,4	0,54	1558	1559	6,7	1,65	1819	1823	7,5	2,87	
39	(E)-Nerolidol	8,1	3,33	7,7	4,23	1563	1561	7,0	2,87	2050	2036	8,1	4,46	
40	Oxido de Cariofileno	0,2	0,09	0,5	0,31	1580	1582	0,8	0,34	1968	1986	0,9	0,54	
41	1-epi-cubenol	0,4	0,33	Traza	--	1626	1627	0,4	0,15	--	--	--	--	
42	α-Muurolo (=Torreyol)	0,2	0,16	Traza	--	1640	1644	0,3	0,11	--	--	--	--	
43	Borneol	--	--	--	--	1171	1165	0,4	0,10	1701	--	0,7	0,02	
44	α-Terpineol	--	--	--	--	1194	1186	0,2	ND	--	--	--	--	
45	Nerol	--	--	--	--	1225	1227	0,2	0,02	--	--	--	--	

Nota: Los compuestos de 43 al 45 no fueron identificados en el aceite esencial de primer análisis, pero sí en el hidrolato del mismo, mientras que en el segundo estudio son compuestos minoritarios del aceite esencial.

Comparación de resultados de análisis

En ambos estudios, los compuestos mayoritarios fueron los sesquiterpenos hidrocarburos (55,65% y 41,68%), sesquiterpenos oxigenados (8,55% y 8,75%) y monoterpenos hidrocarburos (8,25% y 28,72%), y minoritarios:

monoterpenos oxigenados (1,25% y 3,96%) y otros (2,5% y 3,58%). Los sesquiterpenos superan el 50% de la fracción volátil en ambos estudios expuestos, aunque en el segundo los monoterpenos hidrocarburos ascienden al segundo lugar, desplazando los sesquiterpenos oxigenados al tercer lugar entre los mayoritarios (véase tablas 2 y 3).

Tabla 2. Composición química coincidente del primer análisis por grupos terpenos para las columnas apolar DB-5MS

Columnas	DB-5MS					
	Primer análisis			Segundo análisis		
Tipo de Terpenos	Total de Compuestos Coincidentes	Total Cualitativo (%)	Total Cuantitativo (%)	Total de Compuestos Coincidentes	Total Cualitativo (%)	Total Cuantitativo (%)
Monoterpenos hidrocarburos	7	24,1	7,3	10	31,3	30,5
Monoterpenos oxigenados	1	3,5	1,1	1	3,1	3,2
Sesquiterpenos hidrocarburos	16	55,2	57,5	16	50,0	35,0
Sesquiterpenos oxigenados	4	13,8	8,9	4	12,5	8,5
Otros	1	3,5	2,1	1	3,1	3,1
Total	29		76,9	32		80,2

Tabla 3. Composición química coincidente del primer análisis por grupos terpenos para las columnas polar HP-INNOWAX

Columnas	HP-INNOWAX					
	Primer análisis			Segundo análisis		
Tipo de Terpenos	Total de Compuestos Coincidentes	Total Cualitativo (%)	Total Cuantitativo (%)	Total de Compuestos Coincidentes	Total Cualitativo (%)	Total Cuantitativo (%)
Monoterpenos hidrocarburos	6	24,0	9,2	9	30,0	27,0
Monoterpenos oxigenados	1	4,0	1,4	2	6,7	3,3
Sesquiterpenos hidrocarburos	15	60,0	53,8	16	53,3	48,3
Sesquiterpenos oxigenados	2	8,0	8,2	2	6,7	9,0
Otros	1	4,0	2,9	1	3,3	4,1
Total	25		75,5	30		91,7

Siendo los sesquiterpenos hidrocarburos los más abundantes de todos los compuestos en ambos estudios, la mayor parte de estos la forman: E-cariofileno (25,25% y 15,3% respectivamente) el más abundante de todos; E-nerolidol (7,9% y 7,54%) aun cuando fue desplazado del tercer al cuarto lugar en abundancia total, cuantitativamente su variación no fue significativa; β-chamigreno (9,05% y 2,55%) que ocupa el segundo lugar en abundancia en el primer análisis y el noveno en el segundo estudio; β-selineno (7,45% y 3,43% respectivamente) que ocupó el cuarto puesto de abundancia en el primer análisis y el séptimo lugar en el segundo, disminuyendo significativamente su proporción, y β-germacreno (1,6% y 7,1%) que hizo exactamente lo contrario al compuesto anterior, es decir, aumentó significativamente su proporción (véase tabla 4).

Tabla 4. Comparación de proporciones de compuestos coincidentes de los dos análisis

Primer Análisis (Arrastre de Vapor)			Segundo Análisis (Micro-Hidrodestilación)		
Mayores Promedios en Orden Descendente			Mayores Promedios en Orden Descendente		
1	(E)-Cariofileno	25,3%	1	(E)-Cariofileno	15,3%
2	β-Chamigreno	9,1%	2	β-Pineno	13,5%
3	(E)-Nerolidol	7,9%	3	α-Pineno	9,9%
4	β-Selineno	7,5%	4	(E)-Nerolidol	7,5%
5	δ-Cadineno	3,3%	5	β Germacreno	7,1%
6	β-Pineno	3,0%	6	6-metil-5-hepten-2-ona	3,6%
7	6-metil-5-hepten-2-ona	2,5%	7	β-Selineno	3,4%
8	Terpinoleno	2,0%	8	Linalool	3,3%
9	α-Pineno	1,9%	9	β-chamigreno	2,6%
10	β Germacreno	1,6%	10	δ-Cadineno	2,3%
11	Linalool	1,3%	11	Terpinoleno	1,8%
12	α-Humuleno	1,1%	12	β-Elemento	1,7%
13	α-Guaieno	1,1%	13	Ishwarano	1,6%
14	α-Copaeno	1,0%	14	α-Guaieno	1,4%
15	β-Elemento	0,9%	15	α-Humuleno	1,2%
16	Trans - Calameno	0,9%	16	Limoneno	1,2%
17	Ishwarano	0,8%	17	α-Felandreno	0,94%
18	Limoneno	0,7%	18	Óxido de Cariofileno	0,82%
	Total	71,40%	19	trans-Muuro-la-4(14),-5dieno	0,7%
			20	Calameno < trans->	0,6%
			21	α-copaeno	0,6%
			Total	80,81%	

Primer Análisis (Arrastre de Vapor)			Segundo Análisis (Micro-Hidrodestilación)		
Menores Promedios en Orden Descendente			Menores Promedios en Orden Descendente		
1	trans-Muuro-la-4(14),5dieno	0,45%	1	Mirceno	0,39%
2	Mirceno	0,40%	2	δ-3-Careno	0,37%
3	Óxido de Cariofileno	0,35%	3	p-Cimeno	0,35%
4	α-Felandreno	0,30%	4	Canfeno	0,32%
	Total	1,50%	Total	1,43%	

En el segundo estudio los monoterpenos β-pineno y α-pineno ocuparon el segundo y tercer lugar en abundancia total respectivamente, es decir, β-pineno incrementó 4,5 veces su proporción (de 3,00% a 13,49%) y α-Pineno incrementó más de 5 veces su proporción (de 1,85% a 9,81%) en relación al primer análisis. De la misma forma en el primer estudio realizado, el monoterpeno α-Felandreno, y los sesquiterpenos óxido

de cariofileno y trans-muuro-la-4(14),5dieno, se encontraron entre los minoritarios (con valores inferiores a 0,5%) mientras que en el segundo alcanzan a clasificar como mayoritarios, aunque a concentraciones relativamente bajas (menores a 1%). Así mismo los monoterpenos hidrocarburos *p*-cimeno y canfeno en el primer estudio se encuentran en calidad de traza (con valores inferiores a 0,1%), pero su proporción es más elevada en el segundo análisis, constituyéndose en compuestos minoritarios (véase tabla 4).

Los 25 compuestos mostrados en el segundo análisis en la tabla 4, más los 3 compuestos presentes en el aceite esencial del segundo análisis y en el hidrolato del primero: borneol, α -terpineol y nerol, son los compuestos que podríamos encontrar normalmente en un análisis cromatográfico aleatorio, y por ende estos conformarían el perfil químico cualitativo-cuantitativo del aceite esencial de la especie ecuatoriana *Piper subscutatum*.

Revisión e inferencia científica

De acuerdo con el perfil químico cualitativo-cuantitativo de la fracción volátil de la especie ecuatoriana *Piper subscutatum* (Miq.) C. DC. (*Piperaceae*) se puede hacer inferencia científica acerca de posibles aplicaciones, para ello en la presente discusión se hace una revisión a investigaciones llevadas a cabo en especies del género *Piper* que arrojaron resultados que señalan que estas plantas producen en su metabolismo, sustancias como vitaminas y antibióticos, así como también, poseen la capacidad de almacenar varios minerales (Navickiene et al., 2000). Muchas especies de *Piper* son usadas por sociedades tradicionales en países tropicales de todo el mundo por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas; como tales, pueden tener un inmenso potencial para la industria farmacéutica (Ehringhaus, 1997; Jaramillo & Callejas, 2004), así por ejemplo, las hojas de algunas especies como *Piper obliquum* (anis de Oriente), se utilizan como analgésicos o antiartríticos por aplicación tópica en la parte del cuerpo afectada en Guyana y Ecuador (Guerrini et al., 2009).

El primer estudio fitoquímico datado de *Piper subscutatum* fue realizado por Ramírez y colaboradores, con muestras colectadas en el mismo sector donde se colectaron las muestras del presente trabajo (Numbani - Zamora Chinchipe) en agosto de 2007, y en el mismo se pudo aislar y caracterizar cinco lignanos, uno de los cuales fue la (-) grandisina que, en estudios previos *in-vitro*, mostró evidencias de propiedades antitumorales (Ramírez, y otros, 2013).

En estudios comparativos como el realizado en Colombia a aceites esenciales de 4 especies del género *Piper* (*Piper marginatum* Jacq, *P. aduncum* L., *P. hispidum* Sw. y *Pothomorphe peltata* L.), se identificó un alto contenido de monoterpenos como: α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, también estuvieron presentes sesquiterpenos como: α -copaeno, biciclogermacreno, trans-muuro-la-4(14)-5-dieno y dilapiol como derivados fenilpropanoides (Bottiaet al., 2007). En otro estudio, donde se analizaron 10 *Piperáceas* de la foresta atlántica de Brasil, se descubrió que la composición de los aceites esenciales de las siete especies de *Piper* analizadas en el grupo, eran principalmente sesquiterpenos, en el mismo, los sesquiterpenos hidrocarburos se identificaron como los principales compuestos del aceite esencial de, *P. goesii* (gemacrene D: 28,87%) y *P. hispidum* var. *hispidum* (α -cariofileno: 9,21%). Se encontraron sesquiterpenos oxigenados en gran cantidad en los aceites de *P. mollicomum* (E-nerolidol: 23,20%), *P. arboreum* var. *arboreum* (γ -eudesmol: 14,61%) y *P. hoffmansegianum* (hinesol: 19,33%). Mientras que los monoterpenos se encontraron como los principales

compuestos en los esenciales de *P. amplum* (α -Pineno: 16,78%) y *P. dilatatum* (mirreno: 41,77%). Los compuestos más frecuentes identificados en todos los aceites también fueron sesquiterpenos. Sin embargo, los monoterpenos hidrocarburos: (Z) -b-ocimeno (5/10), α -Pineno (6/10) y β -pineno (6/10) estuvieron bien representados (Dias dos Santos et al., 2001). Los autores concluyeron que existe, no solo en *Piper*, sino en toda la familia *Piperaceae*, la tendencia a sintetizar mayoritariamente sesquiterpenos y se podría inferir, que los sesquiterpenos hidrocarburos serán los mayoritarios para fracciones volátiles del género *Piper*, con base en lo expuesto por Pino Benítez en relación al análisis de *P. lanceaeifolium*, aunque como hemos dicho aquí y concluyen estos últimos autores (Pino Benítez, Melendez, & Stashenko, 2009), aquello podría estar influenciado por variables o factores como época del año, el clima, los componentes del suelo, la edad de la planta, la alelopatía con otras especies del entorno, etc.

En una prueba de tamizaje preliminar realizada por Perdomo Cedeño, para determinar actividad fumigante sobre *Tribolium castaneum* adultos de 49 compuestos entre los que se encontraban 11 componentes registrados en los cromatogramas de la fracción volátil de *Piper subscutatum*, se determinó que dentro de los compuestos menos activos se encontraron principalmente el monoterpeno linalool, aunque quedó demostrado el efecto de disuasión alimentaria que este compuesto posee, y sesquiterpenos como nerolidol y E-cariofileno los cuales presentaron porcentajes de mortalidad menores al 10% en la concentración utilizada en el tamizaje (100ppm), se atribuyó la baja actividad insecticida de estos dos compuestos a que presentan mayores pesos moleculares y puntos de ebullición, y al tener menor volatilidad no pueden ejercer el efecto fumigante esperado, ya que no logran ingresar por inhalación a las tráqueas del insecto (Perdomo, 2020). Los compuestos que sí presentaron gran actividad insecticida (mayor a 60%) y presentes también en el aceite esencial de *Piper subscutatum* fueron: α -pineno, β -pineno, α -felandreno, δ -3-careno, *p*-cimeno, limoneno, γ -terpineno y terpinoleno. De Morais y colaboradores, determinaron actividad larvicida contra *Aedes aegypti* de los compuestos ishwaranol, β -selineno y viridiflorol, identificados en el aceite esencial de *Piper gaudichanum* (de Morais et al., 2007).

Basado en los mencionados estudios y los análisis cromatográficos del presente estudio, por lo menos el 51,45% de la composición cuantitativa del aceite esencial de *Piper subscutatum* (9% de monoterpenos y 42,45% de sesquiterpenos), presentaría actividad insecticida, larvicida y repelente, esto podría inferir un potencial de uso del aceite esencial de *P. subscutatum* como insecticida con efecto larvicida y repelente para tratamiento de granos postcosechas (almacén) y como plaguicida pre-emergente en semillas. Por otro lado, los dos sesquiterpenos que presentaron baja actividad fumigante, pero que en proporción ocupan el primer y tercer lugar (entre los dos el 33,15% de la fracción volátil): E-cariofileno y E-nerolidol, tienen demostradas y efectivas actividades farmacológicas, así E-cariofileno ha demostrado ser citoprotector gástrico (Tambe et al., 1996; Kratz et al., 2018; Martínez, 2003), antiinflamatorio (Basile et al., 1988; Kratz et al., 2018; Martínez, 2003) y debido a sus propiedades antioxidantes y citotóxicas, sugiere su uso potencial para el tratamiento del cáncer (Kubo et al., 1996; Martínez, 2003). El E-nerolidol, posee actividad anti caries (Kubo et al., 1993; Martínez, 2003). Efecto sedante y antiinflamatorio (Binet et al., 1972; Kratz et al., 2018). De dermo absorción (Cornwell & Barry, 1994). Anti-leshmaniasis (Arruda et al., 2005; Kratz et al., 2018). A su vez, β -chamigreno, el segundo compuesto en abundancia en el aceite esencial de *Piper subscutatum* (9,05%), ha sido encontrado, aunque relativamente minoritario, en aceites esenciales utilizados para tratar infecciones microbiológicas y

cáncer (Lin et al., 2012). Aunque su bioactividad individual ha sido poco investigada. Una actividad farmacológica interesante a tener en cuenta es la acción complementaria y/o sinérgica (efecto séquito) en efectos como el antiinflamatorio, ansiolítico o analgésico, que ejercen monoterpenos como: pineno, limoneno, linalol y mirceno y el sesquiterpeno cariofileno (Peñalver, 2019; Lorenzetti et al., 1991) los que en el aceite esencial de *Piper subscutatum* equivaldrían en promedio al 32,4% de la composición cuantitativa. También se ha determinado, además de las actividades antiinflamatorias y analgésicas, actividades anticonceptivas en algunos terpenos presentes en la fracción volátil de *Piper subscutatum*, tales como E-nerolidol (Fonseca, 2012) y mirceno (Peñalver, 2019). Como podemos apreciar, el 46,35% de la masa del aceite esencial de *P. subscutatum* tendría potencial aplicación farmacológica combinada.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró constatar 45 compuestos comunes en dos estudios a la fracción volátil de *Piper subscutatum*, realizados por separado en dos fechas del mismo año, determinándose que los compuestos mayoritarios fueron, sesquiterpenos hidrocarburos, sesquiterpenos oxigenados y monoterpenos hidrocarburos y minoritarios: monoterpenos oxigenados y otros. El perfil químico cualitativo-cuantitativo del aceite esencial de la especie ecuatoriana *Piper subscutatum* (Miq.) C. DC. (*Piperaceae*) estaría conformado por 28 compuestos bien determinados, en su mayoría sesquiterpenos, que podríamos encontrar con gran certeza en un análisis cromatográfico aleatorio.

Las *Piperaceae* parecen ser excelentes productoras de sesquiterpenos y *P. subscutatum* no sería la excepción, pues los sesquiterpenos superan el 50% de la fracción volátil, siendo el compuesto más abundante el sesquiterpeno E-cariofileno y predominando también entre los sesquiterpenos E-nerolidol, β -chamigreno, constituyendo entre los tres alrededor del 34% de la fracción volátil promedio, los tres componentes tienen aplicaciones farmacológicas, siendo E-cariofileno y E-nerolidol antiinflamatorios muy reconocidos, por lo que la especie botánica podría tener gran potencial como fuente de dichos compuestos activos.

En el segundo estudio, cuyas muestras fueron colectadas 5 meses después del primero, los monoterpenos β -pineno y α -pineno incrementaron alrededor de 5 veces su proporción, también se observó esto para el monoterpeno α -felandreno, y los sesquiterpenos óxido de cariofileno y trans-muurolo-4(14), 5dieno, aunque a concentraciones relativamente bajas. Así mismo los monoterpenos hidrocarburos *p*-cimeno y canfeno pasaron de traza a constituirse en compuestos minoritarios, esto posiblemente debido a cambios de estación, así como la aparición de insectos u otros estímulos estacionales, pues los compuestos mencionados en este párrafo tienen actividad insecticida y repelente probada.

Los sesquiterpenos con actividad insecticida, larvicida y repelente probada encontrados en el perfil del aceite esencial de *P. subscutatum* fueron: β -selineno, ishwarano, α -humuleno, E-cariofileno y E-nerolidol; así también los monoterpenos encontrados: α -pineno, β -pineno, limoneno, *p*-cimeno, α -felandreno, γ -terpineno, terpinoleno, δ -3-careno, linalool y α -terpineol, tienen la misma actividad. En promedio el 56% de la composición cuantitativa del aceite esencial de *Piper subscutatum*, presentaría actividad insecticida, larvicida y repelente, lo que podría implicar un alto potencial del aceite esencial como fuente de insecticidas con efecto larvicida y repelente con énfasis en tratamiento de granos postcosechas (almacén) y como plaguicida pre-emergente en semillas.

Agradecimientos: Agradecemos a la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) por apoyar esta publicación de acceso abierto.

Contribución de los autores: Investigación, C. Solórzano y D. Andrade; Redacción, C. Solórzano; Conceptualización, G. Gilardoni; Curación de datos: G. Gilardoni; Revisión, C. Solórzano y J. Ramírez; Supervisión, J. Ramírez. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del documento.

Declaración de disponibilidad de datos: Los datos sin procesar están disponibles con los autores C. Solórzano y D. Andrade.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Adams, R. P. (2017). *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry*. Allured publishing. doi:ISBN 978-1-932633-21-4
- Arruda, D., D'Alexandri, F., Katzin, A., & Uliana, S. (2005). Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1679-1687. doi:10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005
- Basile, A., Sertié, J., Freitas, P., & Zanini, A. (1988). Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian Copaifera. *Journal Ethnopharmacology* (22), 101 -109.
- Bicchi, C., D'Amato, A., & Frattini, C. (1983). Improved method for the analysis of small amounts of essential oils by microdistillation followed by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 8 (279), 409 - 416.
- Binet, L., Binet, P., Miocque, M., Rouz, M., & Berni, A. (1972). Pharmacodynamic properties (sedative action and spasmolytic action) of several aliphatic terpene alcohols. *Ann Pharm*(9).
- Bottia, E., Díaz, O., Mendivelso, D., Martínez, J. R., & Stashenko, E. (2007, abril). 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*, XIII (33), 193-195.
- Cornwell, P., & Barry, B. (1994). Sesquiterpene Components of Volatile Oils as Skin Penetration Enhancers for the Hydrophilic Permeant 5-Fluorouracil. *Journal Pharmacology*, 261-269.
- de Morais, S. M., Alves, V., Medeiros, L., Barreira, E. S., dos Anjos J, J. F., Aparecida, S., Alves de Souza, M. (2007). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 670 - 675.
- Dias dos Santos, P. R., de Lima, D., Franklin, E., & Coelho, M. A. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry* (58), 547-551.
- Ehringhaus, C. (1997). *Medicinal Uses of Piper spp. (Piperaceae) in an Indigenous Kaxinawa Community in Acre, Brazil*. Miami: Department of Anthropology, Florida International University.
- Fonseca, D. V. (2012). *Atividade Anticonceptiva e Anti-inflamatória do sesquiterpeno Nerolidol em Camundongos*. Joao Pessoa: Universidade Federal Da Paraíba.
- Gentry, A. (1982). Neotropical Floristic Diversity: Phytogeographical Connections Between Central and South America, Pleistocene Climatic Fluctuations, or an Accident of the Andean Orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 69, 557-593. <http://www.jstor.org/stable/2399084>

- Gilardoni, G., Matute, Y. B., & Ramírez, J. (2020). Chemical and Enantioselective Analysis of the Leaf Essential Oil from *Piper coruscans* Kunth (Piperaceae), a Costal and Amazonian Native Species of Ecuador. *Plants*, 9 (6), 791. doi:10.3390/plants9060791
- Gilardoni, G., Ramírez, J., Montalván, M., Quinche, W., León, J., Benítez, L., . . . Bicchi, C. (2018, Diciembre 20). Phytochemistry of Three Ecuadorian Lamiaceae: *Lepechinia heteromorpha* (Briq.) Epling, *Lepechinia radula* (Benth.) Epling and *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling. *Plants*. doi: 10.3390 / plants8010001
- Grandtner, M. M., & Chevrette, J. F. (2014). *Dictionary of trees* (Vol. Volume 2). Quebec, Canada: Elsevier BV. doi:ISBN : 978-0-12-396490-8
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Bruni, R. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (27), 39–48.
- Jaramillo, A., & Callejas, R. (2004). Current Perspectives on the Classification and Phylogenetics of the Genus *Piper* L. *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*, 179 -182.
- Kubo, I., Chaudhuri, S., Kubo, Y., Sanchez, Y., Ogura, T., Saito, T., Hara-guchi, H. (1996). Cytotoxic and Antioxidative Sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med*(62).
- Kubo, I., Muroi, H., & Himejima, M. (1993). Antibacterial Activity against *Streptococcus mutans* of Mate Tea Flavor Components. *J. AM. Food Chem*, 41 (1), 107-111.
- Lin, J., Dou, J., Xu, J., & Aisa, H. (2012). Chemical Composition, Antimicrobial and Antitumor Activities of the Essential Oils and Crude Extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. *Molecules*(17), 5030-5039. doi:10.3390/molecules17055030
- Lorenzetti, B., Souza, G., Sarti, S., David, S., & Ferreira, S. (1991). Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *Journal of Ethnopharmacology* (34), 43-48.
- Martínez, A. (2003). *Aceite Esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Navickiene, H., Alcício, A., Kato, M., Bolzani, V., Young, M., Cavalheiro, A., & Furlan, M. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 55 (6), 621–626.
- Peñalver, B. (2019). *Act ualización farmacoterapéutica de los cannabinoides*. Madrid: Universidad Complutense.
- Perdomo, L. F. (2020). *Determinación del potencial insecticida y repelente de mezclas de constituyentes químicos bioactivos presentes en aceites esenciales para el control de Tribolium castaneum*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Pino, N., Melendez, E., & Stashenko, E. E. (2009, Julio 22). 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. www.blacpma.org
- Quijano-Abril, M. A., Callejas-Posada, R., & Miranda-Esquivel, D. R. (2006). Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* (33), 1266–1278. Retrieved 2019
- Ramírez, J. Y., Andrade, M. D., Vidari, G., & Gilardoni, G. (2021, Junio 9). Essential Oil and Major Non-Volatile Secondary Metabolites from the Leaves of Amazonian *Piper subscutatum*. *Plants*, 10, 1186. doi:10.3390/plants10061168
- Ramírez, J., Gilardoni, G., Gozzini, D., Boiocchi, M., Malagón, O., Vita Finzi, P., & Vidari, G. (2013). Estudio fitoquímico de las plantas ecuatorianas: *Piper subscutatum* C.DC. Y *Lepechinia mutica* BENTH. *Fitoquímica*, 143 - 144.
- Raven, P., & Axelrod, D. (1974). Angiosperm Biogeography and Past Continental Movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61 (3), 539-673.
- Tambe, Y., Tsujiuchi, H., Honda, G., Ikeshiro, Y., & Tanaka, S. (1996). Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene, β -Caryophyllene. *Planta Med* (62), 469-470.
- Trujillo, W., & Hoyos, F. (2013). El género *Piper* (Piperaceae) en la reserva natural Las Dalias, municipio de La Montañita-Caquetá. *Momentos de Ciencia*, 88-96.
- Kratz, J., García, M., & Peguero, B. (2018). *Manual Sobre Cannabis Medicinal*. Barcelona, España: Kalapa Clinic S.L.