

## **Aislamiento y caracterización de compuestos bioactivos de *Piper aduncum*.**

### **Isolation and Characterization of *Piper aduncum* Bioactive Compounds**

Abraham Lemus-Palacios<sup>1\*</sup>

#### **Resumen**

*Piper aduncum* es una planta con distribución pantropical perteneciente al orden de los piperales y a la familia *Piperaceae* conocida comúnmente como Matico o Hierba del soldado que ha sido utilizada de manera tradicional en varios países para tratar distintas enfermedades de carácter infeccioso y/o inflamatorio. Por esta razón se buscó evaluar la presencia de diferentes tipos de metabolitos secundarios por medio de una marcha fitoquímica, al igual que caracterizar los compuestos con actividad antioxidante, valiéndose de métodos como cromatografía de columna, TLC y revelación por DPPH. Se obtuvieron 19 fracciones, de las cuales 9 presentaban actividad antioxidante y se discutió un método LC-MS con el fin de caracterizarlas en estudios posteriores. Concluyendo que la actividad antioxidante de la planta puede deberse a los compuestos de carácter fenólico que son mayoritarios debido a que se encuentran en fracciones consecutivas.

**Palabras clave:** Antioxidante, DPPH, LC-MS, *Piperaceae*.

#### **Abstract**

*Piper aduncum* is a plant with a pantropical distribution belonging to the piperal order and *Piperaceae* family, commonly known as “Matico” or “Hierba del soldado”. It has been traditionally used in several countries to treat different diseases of infectious or inflammatory nature. For this reason, we sought to evaluate the presence of different types of secondary metabolites using a phytochemical analysis methodology. As well as to characterize the compounds with antioxidant activity, using methods such as column chromatography, TLC, and DPPH as TLC revealing agent. 19 fractions were obtained and 9 of them had antioxidant activity. Then an LC-MS method was discussed to characterize them in subsequent studies. Finally, antioxidant activity could be due to majority compounds with phenolic characteristics founded in consecutive fractions.

**Keywords:** Antioxidant, DPPH, LC-MS, *Piperaceae*.

---

**1. Programa de Química farmacéutica, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES.**

**\*Autor de correspondencia <lemus.abraham@uces.edu.co>**

## INTRODUCCIÓN

*Piper aduncum* es una planta de la familia *Piperaceae* Giseke, conocida vulgarmente como “Matico o hierba del soldado” en países de Suramérica y como “Platanillo de Cuba” en ese país, que tiene una distribución es pantropical y subtropical (da Silva et al., 2017) (Guirado & Montes, s. f.). Según distintas fuentes, *Piper spp* han sido utilizadas desde tiempos prehistóricos para actividades culturales y medicina tradicional con el fin de tratar una amplia variedad de enfermedades de carácter infeccioso y/o inflamatorio. Esto puede relacionarse con una diversidad de compuestos químicos asociados a sus diferentes actividades biológicas. (Durant-Archibold et al., 2018) (Souza et al., 2016) (Alves et al., 2008) (Delgado-Paredes et al., 2012).

Sin embargo, hay que tener en consideración que la producción de metabolitos tanto primarios como secundarios de la planta es afectada por las condiciones ambientales y de nutrientes presentes en el suelo, debido a que muchos de estos metabolitos son en respuesta a diferentes tipos de estrés a los que puede estar sometida. (Negreiros & Miqueloni, 2015) (de Almeida et al., 2009). (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011) En un estudio llevado a cabo en Perú se encontraron metabolitos altamente polares a partir del extracto etanólico de *P. Aduncum* y se determinaron como marcadores fitoquímicos de la planta los alcaloides y los compuestos fenólicos. (Arroyo et al., 2011). En otro estudio se llevó a cabo la identificación de fenoles por medio de HPLC y fueron posteriormente caracterizados por espectrometría de masas obteniendo quercetina, floridicina y epicatequina como compuestos predominantes, que adicionalmente presentan actividad antioxidante. (Escudero et al., 2008). La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los mismos; de allí que las actividades terapéuticas han sido reportadas en diversas investigaciones. (Gimeno Creus, 2004) Además, la actividad antioxidante es una de las actividades terapéuticas más comprometedoras para *Piper aduncum* debido a la baja genotoxicidad y citotoxicidad reportada para el extracto etanólico crudo () (Miranda Cabanillas & Mori Zuta, 2009) (Cseke et al., 2016).

Debido a la abundancia fitoquímica de la planta en cuanto a metabolitos secundarios se refiere, el presente estudio busca identificarlos en el extracto etanólico de *Piper aduncum*. Además, dado que los compuestos antioxidantes vegetales se han convertido en un área de investigación activa (Escudero et al., 2008), tiene como objetivo adicional el obtener, elucidar y caracterizar los compuestos mayoritarios que presenten esa bioactividad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolección y obtención de extracto de *Piper aduncum*.** La recolección de hojas y tallos de *Piper aduncum* se llevó a cabo en la vereda “La Elvira” municipio de Santa Bárbara a 1510 msnm con la ayuda de un profesional en este campo; con el fin de garantizar que el

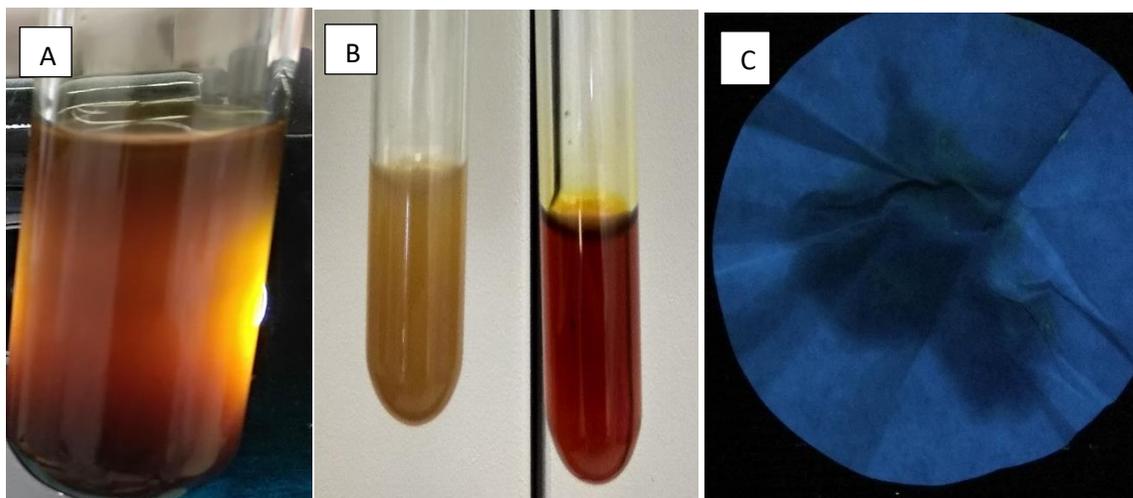
extracto obtenido tuviera una composición similar al encontrarse bajo las mismas condiciones ambientales. Se separaron las hojas para triturarlas y se descartaron los tallos obteniendo un peso del material seco de 192.8g. Posteriormente se maceraron 60g el material triturado en etanol y se separó del solvente por rotaevaporación a 40°C y 337mbar (González, s.f.), obteniendo el extracto total de la planta almacenado a 20°C. Este proceso de rotaevaporación se llevó a cabo 3 veces a partir del mismo material macerado para garantizar mayor extracción de metabolitos.

**Perfil químico de la planta.** Se realizó una marcha fitoquímica basada en la práctica de identificación de metabolitos secundarios del curso de análisis instrumental de la Universidad CES, con el fin de encontrar los posibles marcadores fitoquímicos del extracto obtenido de los especímenes seleccionados para el presente estudio (González, s.f.).(Hurtado & Pérez, 2014).(Ríos, 2013).

**Separación y evaluación de actividad antioxidante.** Se sometieron 5ml del extracto etanólico de *Piper aduncum* a cromatografía de columna utilizando Sephadex como fase estacionaria y una fase móvil de hexano: diclorometano: metanol con una proporción 2:1:1. Después se llevó a cabo una TLC para poder caracterizar las fracciones previamente obtenidas, con una fase móvil determinada experimentalmente compuesta por acetato de etilo: metanol: hexano con una proporción 1.5:1:1.5. Posteriormente, se realizó un revelado de las cromatoplasmas con DPPH al 0.05% en metanol, preparado al pesar 0.03g de DPPH y disolverlo en 60ml de metanol(Puertas Miguel & Gómez, s. f.). (Jesionek et al., 2015). Con el fin de evaluar actividad antioxidante se observaron las cromatoplasmas antes y después de revelarlas con DPPH bajo luz natural y bajo una lámpara UV a una longitud de onda de 254nm para confirmar la presencia de compuestos con potencial actividad antioxidante.

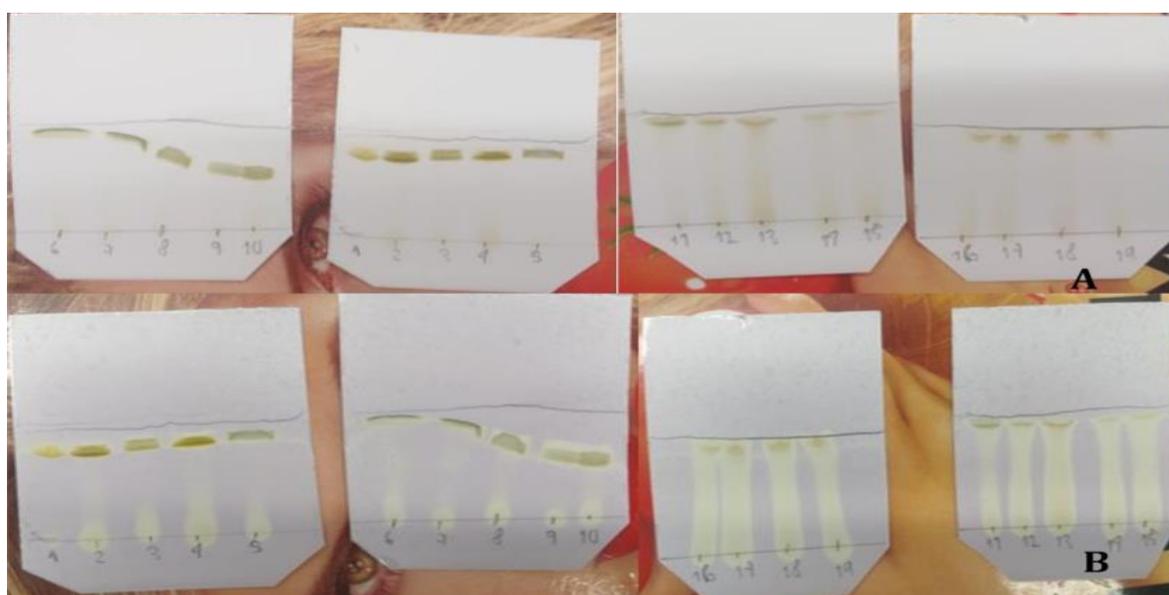
## RESULTADOS

A partir de la marcha fitoquímica se pudo confirmar la presencia de alcaloides en el extracto etanólico total, debido a la aparición de turbidez y formación de un precipitado (Figura 1.A). Además, el cambio de coloración al someter el extracto a diferentes pHs indica presencia de antocianinas (Figura 1.B) y la aparición de una coloración fluorescente, que en este caso es de color verde, bajo una luz ultravioleta a 365nm, es prueba de que el extracto etanólico contiene cumarinas (Figura 1.C). Por otra parte, la aspersion de cromatoplasmas por tricloruro férrico revela que también tiene flavonoides.

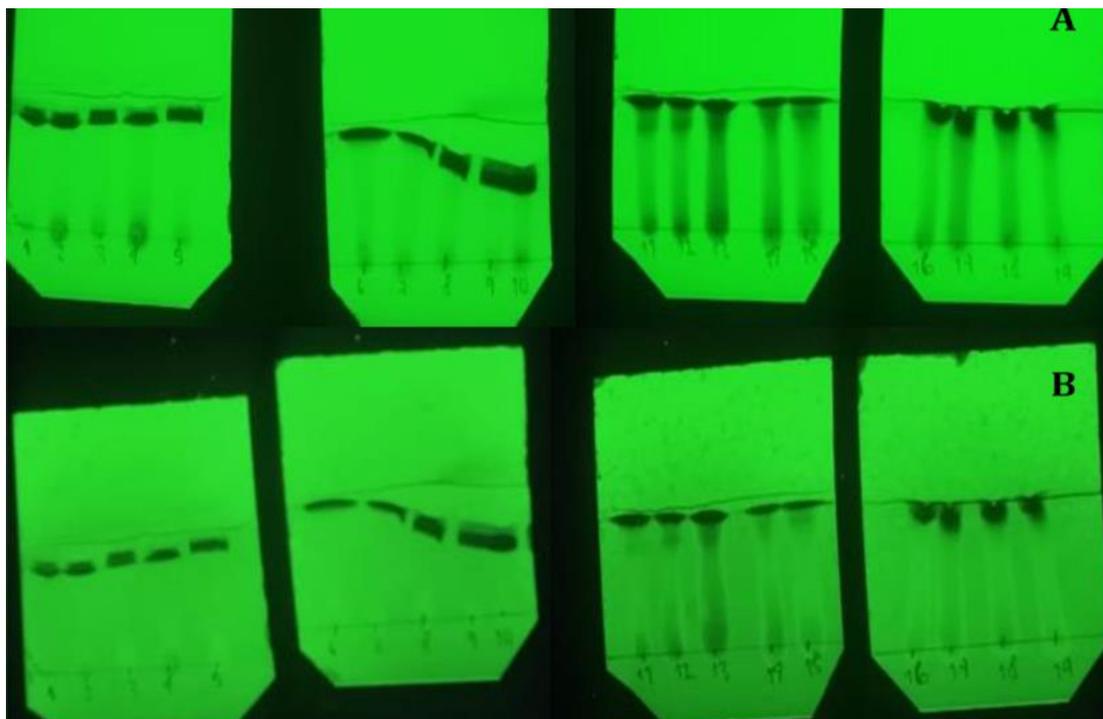


**Figura 1. Marcha fitoquímica de extracto etanólico total de *Piper aduncum*. A. Prueba Dragendorff para alcaloides. B. Prueba de antocianinas por cambio de pH. C. Prueba de cumarinas.**

Por otra parte, se obtuvieron 19 fracciones del extracto etanólico total por cromatografía de columna, de las cuales 18 fueron obtenidas con la fase móvil anteriormente mencionada y la última corresponde a la fracción metanólica obtenida en la reconstitución de la columna. Después de llevar a cabo los corridos con TLC y su revelación con DPPH se evidencia una actividad antioxidante en las fracciones de la 11 a la 19, debido a que al ser sometidas a DPPH pasaron de un color café oscuro a un amarillo brillante (Figura 2). De manera confirmatoria se aprecia el cambio de un color oscuro de las mismas fracciones a uno mucho más claro al visualizar las cromatoplasacas a una longitud de onda de 254nm (Figura 3).



**Figura 2. Cromatoplasmas antes(A) y después(B) de revelar con DPPH bajo luz natural.**



**Figura 3. Cromatoplasmas antes(A) y después(B) de revelar con DPPH bajo lámpara uv a una longitud de onda de 254nm.**

## DISCUSIÓN

La marcha fitoquímica reveló que el extracto etanólico presentaba distintos tipos de compuestos, entre ellos flavonoides, que según la literatura son responsables en gran medida de la actividad antioxidante de la planta (Guerrini et al., 2009) (Arroyo et al., 2010). (Hurtado & Pérez, 2014) Por otra parte, cabe resaltar la importancia de haber encontrado que las fracciones que presentan actividad antioxidante son consecutivas, lo cual indica que hay posibles compuestos relacionados respondiendo al objetivo de encontrar compuestos mayoritarios que sean responsables de dicha actividad. Esta hipótesis es reforzada por el descubrimiento de compuestos con actividades análogas en otras especies de la familia de las piperáceas (Nahak & Sahu, s. f.). (Mesa et al., s. f.). Es importante agregar que el presente estudio permitió cumplir parcialmente los objetivos esperados de manera experimental, donde fue posible identificar los metabolitos secundarios de la planta por medio de la marcha fitoquímica y a su vez la obtención de metabolitos secundarios mayoritarios de la planta, quedando por resolver la parte de la elucidación y caracterización de estos, para la cual se plantea el realizar corridos HPLC basados en sistemas reportados para piperáceas ya que a la fecha no se encontró uno para la especie particular para la que se está desarrollando el estudio:

*Piper aduncum*. Pese a lo anterior, es importante resaltar la posible validez de estos estudios debido a que los perfiles fitoquímicos de las piperáceas son bastante similares (Guerrini et al., 2009). (Negreiros & Miqueloni, 2015). Debido a la variedad de compuestos de características tanto polares como no polares, un sistema cromatográfico ideal sería aquel donde se separen y purifiquen metabolitos con actividad antioxidante, congruente con las características de las fracciones de la 11 a 19 que se planean purificar e incluso más específicamente los sistemas para aislar flavonoides, cuya presencia fue confirmada por la marcha fitoquímica llevada a cabo en el presente estudio. En ese orden de ideas se plantean como válidos los sistemas reportados en (Reyes-Solís et al., 2018). (Meissner & Häberlein, 2005). (Abdullah & Mohamad Hussain, 2015). Los tres sistemas tienen en común el utilizar una columna C18. Sin embargo, el método 1 según (Meissner & Häberlein, 2005) se prefiere por encima de los demás, por su amplio tiempo de corrido. Lo anterior debido a que, a pesar de conocer el tipo de compuestos presentes en varias de las fracciones, puede que tengan distintos tiempos de retención, y puede que algunos puedan encontrarse bastante separados de los otros. Además, al correr las fracciones seleccionadas con un gradiente y luego con una elución lineal, puede aumentar la resolución del método. Además, al tener los cromatogramas se pueden comparar con los estándares de algunos metabolitos secundarios de carácter fenólico reportados en estudios anteriores. Con el fin de mayor especificidad y facilidad para la identificación, caracterización y elucidación de estos compuestos puede ser la utilización de un sistema acoplado LC-MS que cuenta con mayor sensibilidad (Gu et al., 2018) (Escudero et al., 2008).

En conclusión, la presente investigación es importante porque permitió caracterizar fitoquímicamente una especie de las piperáceas, que ha sido de las menos estudiadas en el país, pese a que está presente en el mismo. Además de que se encontraron fracciones específicas responsables de la actividad antioxidante, lo cual es un avance porque en evaluaciones anteriores las pruebas se habían llevado a cabo con extractos totales. También hay que resaltar que la actividad antioxidante se encuentra en fracciones consecutivas por lo que se presume comparando la marcha fitoquímica con lo reportado en la literatura, que son compuestos mayoritarios de carácter fenólico o sus interacciones con otros compuestos polares. Finalmente, se deja la posibilidad de que se desarrollen nuevas investigaciones que no se encarguen de encontrar de manera exclusiva metabolitos secundarios, sino que los extraigan de las fracciones con actividad antioxidante probada, lo que deja abierta una posibilidad para aprovechamiento de estos en el mercado.

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor agradece a la Facultad de Ciencias y Biotecnología de la Universidad CES por facilitar sus laboratorios para el desarrollo de la parte experimental del proyecto. A el profesor Erick Alejandro Meneses por su disposición y aportes en el manejo correcto de las técnicas empleadas para la consecución de los objetivos del proyecto y a la profesora Julie Benavides por su asesoría en cuanto al manejo del material instrumental.

## **CONFLICTO DE INTERESES**

El autor declara no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Abdullah, N. F., & Mohamad Hussain, R. (2015). Isolation of Allylpyrocatechol from *Piper betle* L. Leaves by Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(2), 289-293.  
<https://doi.org/10.1080/10826076.2014.908782>
- Alves, E. O., Mota, J. H., Soares, T. S., Vieira, M. do C., & Silva, C. B. da. (2008). Levantamento etnobotânico e caracterização de plantas medicinais em fragmentos florestais de Dourados-MS. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(2), 651-658.  
<https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000200048>
- Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Brielmann, H. L. (2016). *Natural Products from Plants*. CRC Press.
- da Silva, J., da Trindade, R., Alves, N., Figueiredo, P., Maia, J., & Setzer, W. (2017). Essential Oils from Neotropical Piper Species and Their Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2571.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18122571>
- de Almeida, R. R. P., Souto, R. N. P., Bastos, C. N., da Silva, M. H. L., & Maia, J. G. S. (2009). Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. *Chemistry & Biodiversity*, 6(9), 1427-1434.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200800212>
- Delgado-Paredes, G. E., Kato, M. J., Vásquez-Dueñas, N., Minchala-Patiño, J., & Rojas-Idrogo, C. (2012). *Tissue culture of Piper sp. (Piperaceae): In vitro propagation, organogenesis and germplasm conservation*. 2, 12.

- Durant-Archibold, A. A., Santana, A. I., & Gupta, M. P. (2018). Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus Piper in Panama: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 217, 63-82.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.008>
- Escudero, M. R., Fernando Ramos Escudero, D., Remsberg, C. M., Takemoto, J. K., Davies, N. M., & Yáñez, J. A. (2008). Identification of Polyphenols and Anti-Oxidant Capacity of Piper aduncum L. *The Open Bioactive Compounds Journal*, 1, 18-21. <https://doi.org/10.2174/1874847300801010018>
- Gimeno Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*, 23(6), 80-84.
- Gu, F., Wu, G., Fang, Y., & Zhu, H. (2018). Nontargeted Metabolomics for Phenolic and Polyhydroxy Compounds Profile of Pepper (*Piper nigrum* L.) Products Based on LC-MS/MS Analysis. *Molecules*, 23(8), 1985.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23081985>
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M. 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(1), 39-48.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.08.002>
- Guirado, O. A. A., & Montes, M. M. (s. f.). *Farmacognosia, farmacobotánica, farmacogeografía y farmacotimología del platanillo de Cuba (Piper aduncum subespecie ossanum)*. 13.
- Hurtado, N. H., & Pérez, M. (2014). Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante de las Antocianinas Aisladas de la Cáscara del Fruto de Capulí (*Prunus serótina* spp

capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). *Información tecnológica*, 25(4), 131-140.

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000400015>

Jesionek, W., Majer-Dziedzic, B., & Choma, I. M. (2015). Separation, Identification, and Investigation of Antioxidant Ability of Plant Extract Components Using TLC, LC–MS, and TLC–DPPH<sup>•</sup>. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(11), 1147-1153. <https://doi.org/10.1080/10826076.2015.1028295>

Meissner, O., & Häberlein, H. (2005). HPLC analysis of flavokavins and kavapyrones from *Piper methysticum* Forst. *Journal of Chromatography B*, 826(1-2), 46-49. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.08.003>

Mesa, A. M., Rincón, D. C., Toro, J. F., Tamayo, A., Blair, S., & Rojano, B. A. (s. f.).

*ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PIPER PIEDECUESTANUM TREL. & YUNCK. Y PIPER SUBPEDALE TREL. & YUNCK. 9.*

Miranda Cabanillas, N. E., & Mori Zuta, M. (2009). Cuantificación por el método espectrofotométrico de flavonoides totales en extracto hidroalcohólico de hojas de *piper aduncum*”. *Universidad Nacional de Trujillo*. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4946>

Negreiros, J. R. da S., & Miqueloni, D. P. (2015). Morphological and phytochemical characterization of *Piper hispidinervum* DC. and *Piper aduncum* L. populations in the state of Acre. *Revista Ceres*, 62(1), 78-86. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562010010>

Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 11(4), Article 4. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255>

Puertas Miguel, & Gómez, L. (s. f.). *Capacidad Antioxidante in vitro en fracciones de hojas de Piper Peltatum*. 11.

Reyes-Solís, L. M., Restrepo, J., & Sánchez, R. A. (2018). Encapsulación de la piperine presente en la especie *Piper tuberculatum* utilizando vesículas multilamelares y determinación de su poder antioxidante. *Revista de Ciencias*, 21(2), 11.  
<https://doi.org/10.25100/rc.v21i2.6696>

Ríos, J. M. (2013). *Detección de alcaloides en semillas de plantas herbáceas nativas*. 5.

Souza, L. F., Dias, R. F., Guilherme, F. A. G., & Coelho, C. P. (2016). Plantas medicinais referenciadas por raizeiros no município de Jataí, estado de Goiás. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18(2), 451-461. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_173](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_173)