

ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MADERA DE *Piper eriopodon* (Piperaceae)

PHYTOCHEMICAL STUDY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WOOD OF *Piper eriopodon* (Piperaceae)

Jenny Lizarazo¹, Diego Muñoz², Luis Díaz³

¹Química, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U. D. C. A. Calle 222 N°55-37 Bogotá D. C., Colombia. E-mail: jelizarazoc@gmail.com. ²Químico, M. Sc, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U. D. C. A. Calle 222 N°55-37 Bogotá D. C., Colombia. E-mail: diemunoz@udca.edu.co. ³Químico, Ph. D, Universidad de la Sabana. Autopista Norte Km 7 Chía, Colombia. E-mail: luisdb@unisabana.edu.co

RESUMEN

A partir del extracto etanolico de madera de la especie *Piper eriopodon* se encontraron, en las pruebas fitoquímicas preliminares, compuestos de tipo esteroide, nafto y/o antraquinonas y cumarinas. Los resultados obtenidos para la evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanolico de la madera de *Piper eriopodon* muestra un comportamiento similar con respecto al estándar de trolox, presentando una IC₅₀ de 48,13 μg/mL reaccionando de manera similar al trolox y disminuyendo al 50% la absorbancia inicial del DPPH (0,004% en metanol). Se determinó la presencia de diez esteroides de ácidos grasos y tres compuestos de tipo esteroide presentes en una mezcla de los cuales se logró identificar uno mediante técnicas de análisis instrumental como RMN¹H, espectrometría de masas por impacto electrónico, comparando con bases de datos y lo reportado en la literatura como el 3-ceto, 4-metil, 22- estigmasteno.

palabras clave: *Piper eriopodon*, esteroides, esteroides de ácidos grasos, antioxidante. (CAB Thesaurus).

ABSTRACT

From the ethanolic extract of specie *Piper eriopodon*'s wood were found in preliminary phytochemical tests, compounds steroid type, naphtho and/or anthraquinones and coumarins. The results for the evaluation of the antioxidant activity of the ethanol extract of *Piper eriopodon*'s wood shows a similar behavior with respect to standard trolox, presenting an IC₅₀ of 48.13 μg / mL reacting similarly to trolox and decreasing to 50% the initial absorbance of DPPH (0.004% in methanol). We determined the presence of ten esters of fatty acids and three steroidal-type compounds in a mixture of which one was identified by instrumental analysis techniques such as

RMN¹H, mass spectrometry for electron impact, comparing with the database and reported literature as 3-keto, 4-methyl, 22 - estigmasteno.

keywords: *Piper eriopodon*, sterols, fatty acid esters, antioxidant. (CAB Thesaurus).

INTRODUCCIÓN

Especies del género *Piper* son ampliamente utilizadas en la medicina etnobotánica en Colombia y América Latina como *P. sanctum*, utilizada como estimulante digestivo y *P. aduncum*, (Grijalva, 2006) utilizada como analgésico, entre otras. Colombia por presentar una gran riqueza forestal, posee algunas especies de la familia Piperaceae las cuales usadas en forma de infusiones, decocciones, entre otros preparados como jugos y lociones, son usadas para el tratamiento de algunas enfermedades o malestares sin demostrarse aun su efectividad a nivel científico. Según investigaciones previas el género *Piper* presenta variados compuestos como los lignanos, neolignanos, propenilfenoles, kawapironas, flavonas, flavanonas, entre otros, los cuales ameritan seguir investigándose. (Parmar, *et al*, 1997; Martínez, 2009)

Se busca contribuir al desarrollo de una solución para algunos de los problemas que afronta el ser humano, donde se ve perjudicado por enfermedades que con el paso de los años aumentan, como la resistencia que ciertos microorganismos patógenos generan a los medicamentos convencionales. También enfermedades generadas por la formación de radicales libres en el estado de estrés oxidativo, que por su alta inestabilidad atómica colisionan con una biomolécula como lípidos, proteínas o ADN, ocasionando la pérdida de su función específica en la célula, alteraciones en el metabolismo celular y muerte celular, mutaciones en el gen, carcinogénesis, entre otras (Ibarra, 2010). Sin

embargo, gracias al contenido de algunos compuestos presentes en las plantas que han sido muy poco estudiados se pueden encontrar alternativas para su tratamiento.

La investigación en productos naturales permite obtener nuevas moléculas las cuales pueden servir como plantillas para la obtención de nuevos medicamentos a partir de productos naturales, minimizando el impacto de la síntesis que en algunos casos implican grandes costos y largos procesos de producción.

Esta investigación se lleva a cabo mediante el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanolico de la madera de la especie *Piper eriopodon*, determinando cualitativamente y de forma preliminar los compuestos presentes, realizando fraccionamientos y purificaciones para finalmente identificar un compuesto utilizando técnicas instrumentales como RMN¹H, ¹³C y espectrometría de masas.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

El material vegetal fue colectado por el profesor Diego Muñoz, en el “Santuario de Fauna y Flora Guanenta Alto Río Fonce”, ubicado en la Cordillera Oriental en la Región Andina entre los departamentos de Boyacá y Santander sobre las cercanías del municipio de Charalá en la vereda de Biorlín. Una muestra del espécimen vegetal, fue enviada al Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia para confirmar su clasificación.

Extracción

El material vegetal limpio, seco y molido, se sometió a un proceso de extracción por maceración con etanol al 96% a temperatura ambiente. Los extractos fueron concentrados a presión reducida en rotavapor a temperatura de 40 °C.

Pruebas fitoquímicas preliminares

La metodología para realizar las pruebas fitoquímicas preliminares es la recomendada por el profesor Antonio Sanabria de la facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (Sanabria, 1983).

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante se determinó utilizando el método de radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH). Se preparó una solución de DPPH al 0,004% (m/v) en metanol con una

absorbancia menor a 1. La solución estándar utilizada es el Trolox (ácido(S)-(-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) preparada en diluciones junto con el extracto etanolico de la madera de la especie *Piper eriopodon*.

La reacción se llevó a cabo en las celdas del espectrofotometro con 0,1 mL de cada una de las muestras mencionadas anteriormente a sus diferentes concentraciones y 3 mL de solución de DPPH, el blanco corresponde a DPPH al 0,004% (m/v) en metanol. El tiempo de reacción es de 30 minutos antes de realizar la lectura de absorbancia en el espectrofotometro y el ensayo se realizó por triplicado (Chen, *et al*, 2010).

Fraccionamiento

Mediante cromatografía de capa delgada CCD con cromatofolios de silica gel 60GF 254 de 20 x 20 cm y 0.2mm de espesor (marca Merck) y reveladores universales de vapores de yodo y luz UV con λ de 254 y 365nm, se determinó la fase móvil más apropiada para llevar a cabo el fraccionamiento, se utilizaron diferentes mezclas de solventes entre ellos Eter de petroleo/ Acetato de etilo, Cl₂CH₂/Acetato de etilo. Para la cromatografía en columna CC se utilizó como fase estacionaria sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm Merck) y los mismos sistemas de solventes de la CCD. Se obtienen 3 fracciones, fracción 1 (28,2mg), fracción 2 (10mg) y fracción 3 (7mg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encuentra en el extracto total compuestos de tipo esteroide y/o triterpenoides, nafto y/o antraquinonas y cumarinas.

El extracto etanolico de madera de *P. eriopodon* presenta un comportamiento similar como antioxidante con respecto al estándar de trolox (figura 1) ya que a una concentración de 62,5 μ g/mL logro una inhibición de radicales libres del 87% y este porcentaje se mantuvo constante a mayores concentraciones, con el trolox alcanzo el mismo porcentaje de inhibición a una concentración superior a 75 μ g/mL.

La concentración IC₅₀ para el extracto etanolico de madera de *P. eriopodon* es de 48,13 μ g/mL y para el trolox es de 49,08 μ g/mL por lo tanto el extracto etanolico de madera reacciona de forma similar pues en una concentración de 48,13 μ g/mL logra disminuir al 50% la absorbancia inicial del DPPH (0,004% en metanol). Según la literatura otras especies del género (Díaz, *et al*, 2012) han presentado actividad antioxidante con valores por debajo del hallado para el extracto etanolico de madera de *P. eriopodon*, sin embargo no se cuenta con estudios previos de la actividad antioxidante de esta especie.

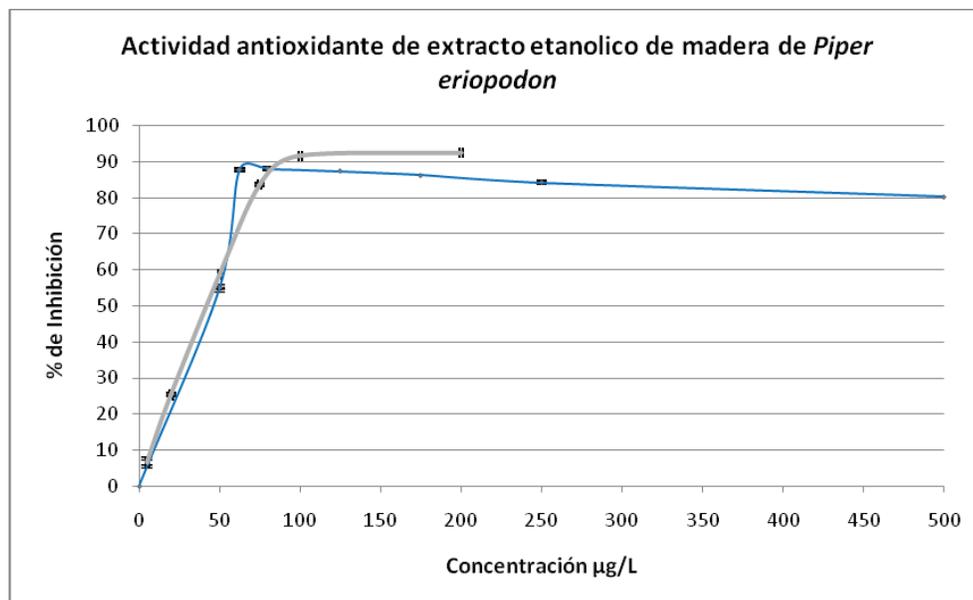


Figura 1 Resultados porcentaje de inhibición de radicales libres vs. Concentración de extracto (línea gris: Trolox, línea azul: Extracto)

Esta inhibición se traduce en eliminación de radicales libres, que en condiciones patológicas son producidos en el ser humano debido al estado de estrés oxidativo por factores químicos como el aumento de metales pesados, o físicos como radiaciones ultravioleta, o metabólicos como una dieta hipercalórica o deficiente en antioxidantes, entre otros. Estos radicales libres se generan por la reducción de la molécula de O_2 , que en su mayoría es reducida a agua por el complejo citocromo-oxidasa y que en condiciones normales estos radicales quedan unidos al sitio activo de la enzima y no se difunden al resto de la célula, las especies reactivas son radicales hidroxilo ($OH\cdot$), anión superóxido ($O_2\cdot^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por su capacidad de generar hidroxilos. El antioxidante actúa colisionando el radical libre cediéndole un electrón, este antioxidante se oxida a su vez, transformándose en un radical libre débil no tóxico, que en algunas ocasiones, dependiendo del compuesto antioxidante, puede regenerarse gracias a otro antioxidante. Hay otros antioxidantes que actúan catalizando reacciones químicas que utilizan sustratos o biomoléculas que reaccionan con los radicales libres. (Rodríguez, *et al*, 2001)

La fracción 1 fue analizada por CG según su perfil cromatográfico (figura 2) corresponde a una mezcla cuya composición química relativa fue determinada por CG-MS y se encontraron ésteres de ácidos grasos.

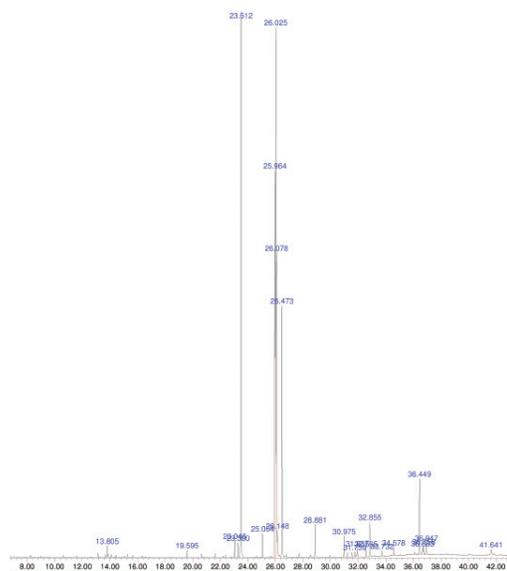


Figura 2 Perfil cromatográfico de la fracción 1

Se determinaron diez ésteres de ácidos grasos en comparación con la base de datos (tabla 1):

Tabla 1 Resultados del perfil cromatográfico y compuestos determinados en la fracción 1

Compuesto	Tiempo de retención (min)	% Área
Ácido hexadecanoico, metilester	23,512	25,55
Ácido heptadecanoico, etilester	25,064	0,93
Ácido linoleico, etilester	25,961	19,07
Ácido 9,12-octadecadienoico, etilester	25,961	19,07
Ácido 9,12,15- octadecatrienoico, etilester	26,025	20,53
9,12,15-octadecatrienoato de etilo	26,025	20,53
Oleato de etilo	26,078	10,70
Ácido 9-octadecanoico, etilester	26,078	10,70
Ácido octadecanoico, etilester	26,474	9,55
17-metil octadecanoato de metilo	26,474	9,55

En los espectros de RMN¹H de las fracciones 2 y 3 se observan señales características de compuestos tipo esteroidal en la región de δ 0,68 a δ 2,35 con protones correspondientes a metilos y metilenos, además de una clara señal de un metilo en δ 1,25. También hay señales en δ 5,15 y δ 5,03 y que corresponden a protones vinílicos sobre los carbonos 22 y 23 de un compuesto de núcleo esteroidal (Parra, 2011). En la fracción 2 una señal en δ 5.79 corresponde a un protón vinílico y la señal en δ 4.31 que posiblemente pertenece a un protón de un hidroxilo de un carbono terciario. Y en el

espectro de la fracción 3 la señal en δ 6,17 pertenece a un protón vinílico y las señales en δ 4,35 y δ 4,31 muestran posiblemente los protones de hidroxilos o metoxilos.

Debido a que las integraciones para el espectro de RMN¹H están desproporcionadas, los espectros no son de un compuesto puro por esta razón las fracciones 2 y 3 se analizaron por CG-MS, donde se confirmó que se tenía una mezcla de tres compuestos como se muestra en los cromatogramas (figura 3 y 4) y las tablas 2 y 3.

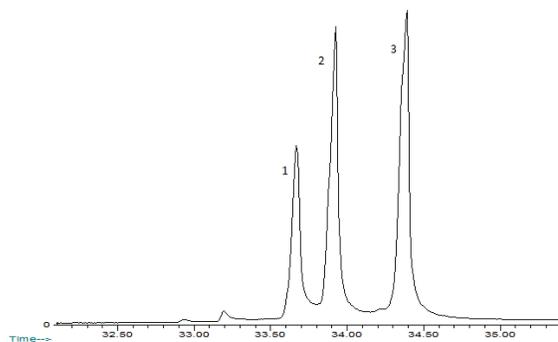
**Figura 3** Perfil cromatográfico de la fracción 2

Tabla 2 Resultados perfil cromatográfico fracción 2

Tiempo de retención (min)	% Área
33,669 (1)	20,511
33,915 (2)	35,529
34,375 (3)	43,024

Tabla 3 Resultados perfil cromatográfico fracción 3

Tiempo de retención (min)	% Área
33,635 (1)	11,186
33,881 (2)	41,905
34,354 (3)	46,909

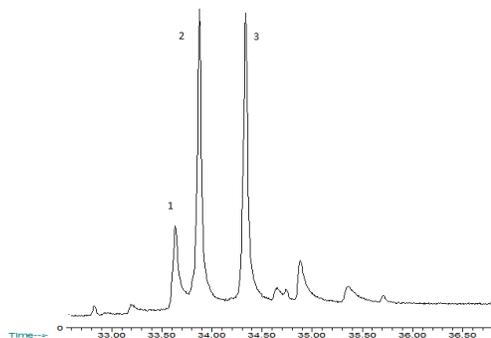
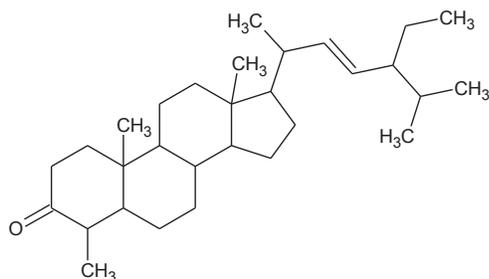


Figura 4 Perfil cromatográfico de la fracción 3

En los espectros de masas obtenidos se presentan picos de ion molecular a m/z 414, m/z 426 y m/z 428, estos se compararon con bases de datos, siendo el espectro de m/z 426 compatible con la fórmula $C_{30}H_{50}O$ del 3-ceto, 4-metil, 22-estigmasteno en un 93%, este compuesto tiene un tiempo de retención de 33,915 y 33,881min en cada una de las fracciones. En general los tiempos de retención al ser similares en las dos fracciones sugieren que se puede tratar de la misma mezcla y por lo tanto de los mismos compuestos.



Las fragmentaciones características para el núcleo esteroidal incluyen pérdidas de masa de m/z 15 que coinciden con la pérdida de un metilo (CH_3^{\cdot}), para una pérdida de m/z 18

coincide con la salida de una molécula de agua (H_2O), y para una pérdida de m/z 29, se sugiere la salida de un etileno ($CH_3-CH_2^{\cdot}$). Pérdidas de m/z 30 coincide con la pérdida de dos metilenos ($2x CH_2^{\cdot}$). (Martínez, 2002)

Del extracto etanolico de la madera de la especie *Piper eriopodon* se obtuvieron tres fracciones, de las cuales, en la primera se encontraron ester de ácidos grasos y en las otras dos se determinó la presencia de una mezcla de tres ester de ácidos grasos, mediante técnicas de análisis instrumental como RMN 1H y CG-EM, finalmente se lograron identificar diez ester de ácidos grasos y el esterol 3-ceto, 4-metil, 22-estigmasteno.

Los resultados obtenidos para la evaluación de la actividad antioxidante del extracto etanolico de la madera de *Piper eriopodon* muestran un comportamiento similar con respecto al estándar de trolox, presentando una IC_{50} de $48,13\mu g/mL$ por lo tanto el extracto etanolico de la madera reacciona de manera similar al trolox y logra disminuir al 50% la absorbancia inicial del DPPH (0,004% en metanol).

En las pruebas fitoquímicas preliminares se obtuvieron pruebas positivas para la presencia de compuestos tipo esteroides y/o triterpenoides, nafto y/o antraquinonas y cumarinas, los que finalmente se lograron extraer e

identificar mediante técnicas de análisis instrumental fueron los compuestos tipo esteroide, una mezcla de esteroides que incluye el 3-ceto, 4-metil, 22- estigmasteno.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses en este trabajo.

Financiación: este trabajo fue financiado por la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U. D. C. A. dentro del marco del proyecto “Química, actividad citotóxica y antioxidante de *G. gracile* y *Piper sp*”.

BIBLIOGRAFÍA

- CHEN, X.; YUAN, K.; LIU, H. 2010. Phenolic contents and antioxidant activities in ethanol extracts of *Citrus reticulata* Blanco cv. Ougan fruit. *J.Rev. Food, Agriculture & Environment*. (Finland)8(2): 150-155.
- DIAZ, L.; MUÑOZ, D.; PRIETO, R.; CUERVO, S.; GONZALEZ, D.; GÚZMAN, J.; BHAKTA, S. 2012. Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of *Piper imperiale*. *Rev.Molecules*. (Switzerland)17: 4142-4157.
- GRIJALVA, A. 2006. Familia Piperaceae. En: MARENA-ARAUCARIA, Flora útil etnobotánica de Nicaragua. 1 ed. (Nicaragua) pp. 32-35.
- IBARRA, P. Determinación del contenido Fenólico de extractos naturales mediante sensores enzimáticos. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. [En línea] Agosto 2010 [citado 2013-11-18]. Disponible en internet: tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp_uam/presenta_tesis.php?recno=14721&docs=UAMI14721.pdf
- MARTINEZ, A. Esteroides. [En línea] Medellín (Colombia): Universidad de Antioquia. Abril 2002 [citado octubre 27 2013]. Disponible en internet: farmacia.udea.edu.co/~ff/esteroides2001.pdf
- MARTÍNEZ, J. Caracterización morfológica, ecológica, genética y química de 3 especies de *Piper* (*Piper jacquemontianum*, *Piper donnellsmithii* y *Piper oradendron*) con fines de conservación y mejoramiento para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales en Guatemala. [En línea] Guatemala: Universidad de San Carlos. Facultad de Agronomía y Ciencias Químicas y Farmacia. Febrero 2009 [citado octubre 27 2013]. Disponible en internet: glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.114.pdf
- PARMAR, V.; JAIN, S.; BISHT, K.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O.; PRASAD, K.; WENGEL, J.; OLSEN, E.; BOLL, M. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Rev.Phytochemistry*. (Great Britain)46(4): 597-663.
- PARRA, J. Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). [En línea] Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 2011. [Citado octubre 27 2013]. Disponible en internet: www.bdigital.unal.edu.co/8097/1/197504.2011.pdf
- RODRÍGUEZ, J.; MENÉNDEZ J.; TRUJILLO Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Revista Cubana de Medicina Militar*.30(1): 15-20.
- SANABRIA, A. 1983. Análisis preliminar y Parte experimental. En: Análisis fitoquímico preliminar metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia *Compositae*. 1 ed. Universidad Nacional de Colombia. p. 12- 86.