

Caracterización química y evaluación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y extractos
obtenidos de diferentes partes de plantas del género *Piper*

Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO

Trabajo de grado para optar por el título de Química

Directora:

Elena E. STASHENKO, Química, *PhD*.

Codirectores:

Rogelio Alejandro Sebastian SAAVEDRA BARRERA, Químico, *M.Sc.*

Lady Johanna SIERRA PRADA, Química, *PhD*.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga, Colombia

2023

Agradecimientos

A mis padres y familia, por su dedicación, amor y apoyo constante a lo largo de este camino. A los profesores Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez, quienes no solo compartieron valiosos conocimientos, sino que también brindaron un acompañamiento indispensable para el desarrollo de este trabajo. A mis coordinadores, los estimados Rogerio Saavedra y Lady Sierra, les agradezco por su orientación y valiosa compañía. A mis amigos y compañeros del laboratorio por todo el apoyo brindado

Al proyecto “Constelación biodiversa: confluencia de saberes en el Jardín Botánico Experimental Consentido”, financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la UIS [N° 3736].

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018. Programa Bio-Reto XXI-15:50.

Al Centro de Investigación en Biomoléculas UIS, CIBIMOL, CROM-MASS y CENIVAM, a la Universidad Industrial de Santander, Vicerrectoría de Investigación y Extensión, Facultad de Ciencias y Escuela de Química, por su apoyo.

Tabla de contenido

Introducción.....	22
1. Estado del arte.....	25
2. Marco teórico.....	30
2.1. Familia Piperaceae.....	30
2.2. Género <i>Piper</i>	31
2.2.1. <i>Piper aduncum</i> L.....	32
2.2.2. <i>Piper dilatatum</i> Rich.....	34
2.2.3. <i>Piper peltatum</i> L.....	36
2.3. Aceites esenciales.....	38
2.3.1. Terpenos.....	39
2.3.2. Fenilpropanoides.....	40
2.3.3. Destilación de aceites esenciales.....	41
2.3.4. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.....	42
2.4. Extractos vegetales.....	42
2.4.1. Flavonoides.....	43
2.4.2. Extracción con solvente.....	44
2.5. Técnicas analíticas.....	45
2.5.1. Cromatografía de gases.....	45
2.5.2. Cromatografía líquida.....	46
2.5.3. Detector selectivo de masas.....	46

ESTUDIO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>PIPER</i> SPP.	4
2.5.4. Detector de ionización de llama	47
2.5.5. Analizador de espectrometría de masas <i>Orbitrap</i>	47
2.6. Antioxidantes.....	48
2.6.1. Actividad antioxidante medida por el método ABTS ⁺	50
3. OBJETIVOS.....	51
3.1. Objetivo general.....	51
3.2. Objetivos específicos	51
4. METODOLOGÍA.....	52
4.1. Reactivos y solventes.....	52
4.2 Recolección y clasificación de las especies vegetales	53
4.3. Destilación de aceites esenciales asistida por la radiación de microondas.....	54
4.4. Obtención de extractos con solvente	55
4.5. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	55
4.6. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama	57
4.7. Análisis de extractos con solvente por cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución UHPLC/ESI ⁺ / <i>Orbitrap</i> -HRMS	58
4.8. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS ⁺	61
5. Resultados y discusión.....	63
5.1. Identificación botánica.....	63
5.2. Caracterización química de los aceites esenciales de las especies <i>Piper</i> spp.	64

5.2.1. <i>Piper aduncum</i>	65
5.2.2. <i>Piper peltatum</i>	75
5.2.3. <i>Piper dilatatum</i>	80
5.3. Caracterización química de extractos, obtenidos con solvente de <i>Piper</i> spp.....	87
5.4. Actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos aislados de <i>Piper</i> spp....	100
6. Conclusiones	103
Referencias bibliográficas	104
Anexos	116

Lista de tablas

Tabla 1. Número de publicaciones relacionadas con aceites esenciales, actividad antioxidante y extractos etanólicos de <i>P. aduncum</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. dilatatum</i>	30
Tabla 2. Especies identificadas <i>P. aduncum</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. dilatatum</i>	63
Tabla 3. Rendimientos de los aceites esenciales de <i>P. aduncum</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. dilatatum</i>	65
Tabla 4. Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los aceites esenciales destilados de <i>P. aduncum</i>	68
Tabla 5. Composición química obtenida por GC/MS y GC/FID del aceite esencial destilado de partes aéreas de <i>P. peltatum</i>	77
Tabla 6. Composiciones químicas obtenidas por GC/MS y GC/FID de los aceites esenciales destilados de <i>P. dilatatum</i>	82
Tabla 7. Rendimientos de extractos obtenidos con solvente de <i>P. aduncum</i> , <i>P. peltatum</i> y <i>P. dilatatum</i>	87
Tabla 8. Composiciones químicas determinadas por UHPLC/ESI ⁺ /Orbitrap-HRMS de moléculas protonadas [M+H] ⁺ y deprotonadas [M-H] ⁻ presentes en los extractos hidroalcohólicos de <i>Piper</i> spp.	92
Tabla 9. Relaciones de áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno ($A_i/A_{i\text{std}}$) de moléculas protonadas [M+H] ⁺ o deprotonadas [M-H] ⁻ detectadas por UHPLC/ESI-Q-	

Orbitrap-HRMS en extractos obtenidos de *Piper* spp. en modo *full scan*. 99

Tabla 10. Valores de actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales y extractos de *Piper* spp. 102

Lista de figuras

- Figura 1.** Número de publicaciones sobre plantas del género *Piper*. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY*“*Piper*” AND “*Chemical composition*”. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1995-2023. Fecha de consulta: 26 de marzo de 2023. 25
- Figura 2.** Áreas de investigación relacionadas con el estudio de plantas del género *Piper*. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY*: "*Piper*" AND "*Piper spp.*". Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 2000-2023. Fecha de consulta: 11 de mayo de 2023. . 26
- Figura 3.** Inflorescencias de **A.** *P. dilatatifolium* y **B.** *P. aduncum*. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, el 18 de noviembre de 2022..... 31
- Figura 4.** Partes aéreas de *P. aduncum*. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, el 24 de noviembre de 2022..... 33
- Figura 5.** Estructura química del dilapiol. 34
- Figura 6.** Inflorescencias y partes aéreas de *P. dilatatum*. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, el 25 de noviembre de 2022..... 35
- Figura 7.** Estructura química del apiol. 36
- Figura 8.** Inflorescencias y partes aéreas de *P. peltatum*. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS,

Bucaramanga, el 23 de noviembre de 2022.....	37
Figura 9. Estructura química del 4-nerolidilcatecol.	38
Figura 10. Estructura química del isopreno.	39
Figura 11. Formación del ácido <i>trans</i> -cinámico, unidad estructural para la biosíntesis de los fenilpropanoides.	40
Figura 12. Estructura química básica de la 2-fenil- γ -cromona (flavonoide).	44
Figura 13. Diagrama de flujo de la metodología del estudio presente.	53
Figura 14. Cromatógrafo de gases <i>AT 6890 Plus</i> , equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network. Fotografía tomada por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO, en el Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS de la UIS, Bucaramanga, 10 de mayo de 2023.....	56
Figura 15. Cromatógrafo de gases <i>AT 6890N</i> , acoplado a un detector de ionización en llama (FID). Fotografía tomada por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO, en el Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS de la UIS, Bucaramanga, 10 de mayo de 2023.	58
Figura 16. Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia <i>VanquishTM</i> acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución <i>Q-Exactive</i> . Fotografía por Darlyng Fernanda Poveda Carreño, Laboratorio Alexander MAKÀROV de CROM-MASS, UIS, Bucaramanga, 10 de mayo de 2023.....	60
Figura 17. Espectrofotómetro <i>Varioskan LUX VL0000D0</i> . Fotografía tomada por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el complejo CENIVAM-UIS, Bucaramanga, 23 de mayo	

de 2023..... 61

Figura 18. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los aceites esenciales de *P. aduncum* **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI 70 eV). Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la **Tabla 4.**; **Error! Marcador no definido.** 68

Figura 19. Espectro de masas del compuesto dilapiol $C_{12}H_{14}O_4$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en el aceite esencial de *P. aduncum*. $[M^+ \cdot]$ m/z 222; $[M-CH_3]^+$ m/z 207, $[M-CH_3O]^+$ m/z 191, $[M-CH_3-CH_2O]^+$ m/z 177. Véase pico cromatográfico N°61 en la **Tabla 4.** 72

Figura 20. Espectro de masas del compuesto miristicina $C_{11}H_{12}O_3$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de *P. aduncum*. $[M^+ \cdot]$ m/z 192; $[M-CH_3]^+$ m/z 177; $[M-C_2H_3]^+$ m/z 165, $[M-CH_3O]^+$ m/z 161, $C_7H_7^+$ m/z 91. Véase pico cromatográfico N°51 en la **Tabla 4.** 73

Figura 21. Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de material vegetal seco de *P. peltatum* obtenidos por: **A.** GC/MS; **B.** GC/FID. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de picos cromatográficos en la **Tabla 5.** 76

Figura 22. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los aceites esenciales de *P. dilatatum* **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la **Tabla 6.** 81

Figura 23. Espectro de masas obtenido por GC/MS del compuesto no identificado $C_{15}H_{24}O$, en los aceites esenciales de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). $[M^+ \cdot]$ m/z 220; $[M-H_2O]^+$ m/z 202; $[M-$

$C_3H_7^+$ m/z 159, $[M-C_3H_5]^+$ m/z 118, $C_7H_7^+$ m/z 91, $C_5H_9^+$ m/z 69, $C_4H_7^+$ m/z 55 y $C_3H_5^+$ m/z

41. Véase pico cromatográfico N°41 en la **Tabla 6**. 867

Figura 24. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ obtenidas por UHPLC/ESI-*Q-Orbitrap*-HRMS en modo *full scan* Columna *Zorbax Eclipse* C₁₈. Los extractos de *P. aduncum*: **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 8**. 890

Figura 25. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ obtenidas por UHPLC/ESI-*Q-Orbitrap*-HRMS en modo *full scan* Columna *Zorbax Eclipse* C₁₈. Los extractos de *P. dilatatum*: **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 8**. 90

Figura 26. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ obtenidas por UHPLC/ESI-*Q-Orbitrap*-HRMS en modo *full scan* Columna *Zorbax Eclipse* C₁₈. Los extractos de *P. peltatum*: **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 8**. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 27. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-*Q-Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de dihidroxi-metoxi-dihidrochalcona $[M+H]^+$ en m/z 273.11191, obtenido en el modo SIM y HCD 50 eV..... 95

Figura 28. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-*Q-Orbitrap*-HRMS de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 254.11734, obtenido en el modo SIM y HCD a 20 eV..... 96

- Figura 29.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS de la molécula protonada de hidroxí-dimetoxiflavona $[M+H]^+$ en m/z 299.09122, obtenido en el modo SIM y HCD a 50 eV. 98
- Figura 30.** Estructuras químicas: de **A.** Coclorina, **B.** Norcoclorina. 1001
- Figura 31.** Curva de calibración de Trolox[®], utilizada para expresar los resultados de actividad antioxidante por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺. 101

Lista de anexos

Figura A 1. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de <i>P. aduncum</i> A. Partes aéreas; B. Hojas, y C. Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV).	¡Error! Marcador no definido.
Tabla A 1. Composiciones químicas obtenidas por GC/ FID de los aceites esenciales destilados de <i>P. aduncum</i>	117
Tabla A 2. Composición química obtenida por GC/MS de los aceites esenciales destilados de las raíces de <i>Piper aduncum</i>	121
Figura A 2. Perfiles cromatográficos del aceite esencial de las raíces de <i>P. aduncum</i> obtenidos por: A. GC/MS y B. GC/FID. Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV).	122
Tabla A 3. Composición química obtenida por GC/FID del aceite esencial destilado de partes aéreas de <i>P. peltatum</i>	123
Tabla A 4. Composición química obtenida por GC/FID de los aceites esenciales destilado de <i>P. dilatatum</i>	125
Figura A 3. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de <i>P. dilatatum</i> A. Partes aéreas; B. Hojas y C. Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV).	128
Figura A 4. Espectro de masas obtenido por GC/MS del monoterpenol no identificado C ₁₀ H ₁₆ O, en el AE de <i>P. aduncum</i> (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°26 en la Tabla 4.	129

- Figura A 5.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°39 en la **Tabla 4.** 129
- Figura A 6.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°48 en la **Tabla 4.** 130
- Figura A 7.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°52 en la **Tabla 4.** 130
- Figura A 8.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°54 en la **Tabla 4.** 131
- Figura A 9.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°58 en la **Tabla 4.** 131
- Figura A 10.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°62 en la **Tabla 4.** 132
- Figura A 11.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°66 en la **Tabla 4.** 132
- Figura A 12.** Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado,

en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°20 en la **Tabla 6.** ... 133

Figura A 13. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°29 en la **Tabla 6.** 133

Figura A 14. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°30 en la **Tabla 6.** 134

Figura A 15. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°32 en la **Tabla 6.** 134

Figura A 16. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°35 en la **Tabla 6.** 135

Figura A 17. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenol no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°37 en la **Tabla 6.** 135

Figura A 18. Espectro de masas obtenido por GC/MS del compuesto no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV, 250 °C, 5×10^{-5} Torr). Véase pico cromatográfico N°40 en la **Tabla 6.** 136

Figura A 19. Espectro de masas obtenido por GC/MS del compuesto no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV, 250 °C, 5×10^{-5} Torr). Véase pico

cromatográfico N°42 en la **Tabla 6**. 136

Figura A 20. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS de la molécula protonada de norcoclaurina $[M+H]^+$ en m/z 272.12775 obtenido en el modo SIM y HCD a 40 eV. 137

Figura A 21. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 314.13837, obtenido en el modo SIM y HCD 40 eV. 137

Figura A 22. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de coclaurina $[M+H]^+$ en m/z 286.14349, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV. 138

Figura A 23. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de magnoflorina M^+ en m/z 342.16946 obtenido en el modo SIM y HCD 30 eV. 138

Figura A 24. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de apigenina-C.C-dihexosido $[M+H]^+$ en m/z 595.16541 obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV. 139

Figura A 25. Espectros de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS de la molécula deprotonada de ácido *p*-cumarico $[M-H]^-$ en m/z 163.03941 A. En el extracto hidroalcohólico de *P. dilatatum*, B. Sustancia-patrón adquirida de *Sigma-Aldrich*. Modo SIM y HCD a 10 eV. 140

Figura A 26. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la

molécula protonada de luteolina-6-C-glucósido $[M+H]^+$ en m/z 449.10751, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV..... 141

Figura A 27. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de tembamida $[M+H]^+$ en m/z 272.12766, obtenido en el modo SIM y HCD 40 eV..... 141

Figura A 28. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de N-feruloiltramina $[M+H]^+$ en m/z 314.13855, obtenido en el modo SIM y HCD 40 eV..... 142

Figura A 29. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 254.11734, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV..... 142

Figura A 30. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 286.14346, obtenido en el modo SIM y HCD 10 eV..... 143

Figura A 31. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-HRMS, de la molécula protonada del compuesto no identificado $[M+H]^+$ en m/z 289.10684, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV..... 143

Abreviaturas, siglas y acrónimos

ABTS ⁺	Catión-radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AE	Aceites esenciales
AT	<i>Agilent Technologies</i>
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
CA	California
<i>ca.</i>	<i>Circa</i> (Aproximadamente)
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
D.I.	Diámetro interno
d_f	Espesor de la fase estacionaria
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
EI	<i>Electronic Ionization</i> (Ionización electrónica).
ESI	<i>Electrospray Ionitation</i> (Ionización por electronebulización)
<i>et al.</i>	<i>Et alli</i> (y otros)
eV	Electrón-voltio
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización de llama)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
HCD	<i>Higher-Energy Collision Dissociation Cell</i> (Celda de colisiones activadas de alta energía)
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de alta resolución)
IRL	Índice(s) de retención lineal(es)

ISTD	<i>Internal Standard</i> (estándar interno)
LC/MS	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas o espectro de masas, según el contexto)
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
<i>Orbitrap-MS</i>	<i>Orbitrap Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas <i>Orbitrap</i>)
t_R	Tiempo de retención
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia).

Resumen

Título: Caracterización química y evaluación de la capacidad antioxidante de los aceites esenciales y extractos obtenidos de diferentes partes de plantas del género *Piper* *

Autora: Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO **

Palabras clave: *Piper*, aceite esencial, extracto vegetal, antioxidante.

Descripción: las plantas del género *Piper* tienen importancia comercial, económica y medicinal, contienen una gran variedad de metabolitos secundarios con diversas propiedades biológicas, *e.g.*, antibacteriana, antiinflamatoria, antioxidante y antiviral. En este estudio, se destilaron aceites esenciales de partes aéreas, inflorescencias y hojas de *Piper* spp. Por hidrodestilación asistida por la radiación microondas y se caracterizaron por GC/MS y GC/FID. Los extractos de *Piper* spp. se obtuvieron por extracción con solvente asistido por ultrasonido y la caracterización química se llevó a cabo por UHPLC/ESI⁺/Orbitrap-HRMS. La actividad antioxidante de AE y extractos se determinó por el ensayo de decoloración de ABTS⁺.

Los rendimientos de *P. aduncum*, *P. dilatatum* y *P. peltatum* fueron desde 0.14% a 0.27% (p/p). En los AE de *Piper* spp. se encontraron compuestos monoterpénicos y monoterpenos oxigenados. Los extractos de *Piper* spp. tuvieron rendimientos entre 4.95% y 13% (p/p), y contenían flavonas, alcaloides y amidas substituidas del ácido benzoico, con propiedad antioxidante. Los resultados de esta investigación contribuyen al estudio fitoquímico de plantas de *Piper* spp., a su vez, podrían ser útiles para la búsqueda de nuevos compuestos naturales con potencial farmacológico.

*Trabajo de investigación

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química, *Ph.D.*
Codirectores: Rogerio A. Saavedra Químico, *M.Sc*; Lady J. Sierra Química, *PhD.*

Abstract

Title: Chemical characterization and evaluation of the antioxidant capacity of essential oils and extracts obtained from different parts of plants of the *Piper* genus*.

Author: Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO**

Keywords: *Piper*, essential oil, vegetable extract, antioxidant.

Description: Plants of the *Piper* genus are of commercial, economic and medicinal importance, containing a wide variety of secondary metabolites with diverse biological properties, *e.g.*, antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant and antiviral. In this study, essential oils from aerial parts, inflorescences and leaves of *Piper* spp. were distilled by microwave assisted hydro-distillation and characterized by GC/MS and GC/FID. *Piper* spp. extracts were obtained by ultrasound-assisted solvent extraction and chemical characterization was carried out by UHPLC/ESI⁺/Orbitrap-HRMS. Antioxidant activity of EO and extracts was determined by ABTS⁺ decolorization assay.

The yields of *P. aduncum*, *P. dilatatum* and *P. peltatum* ranged from 0.14% to 0.27% (w/w). Monoterpene compounds and oxygenated monoterpenes were found in *Piper* spp. EOs. *Piper* spp. extracts had yields between 4.95% and 13% (w/w), and contained flavones, alkaloids and benzoic acid substituted amides, with antioxidant properties. The results of this research contribute to the phytochemical study of *Piper* spp. plants, and could be useful in the search for new natural compounds with pharmacological potential.

* Research Work

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Elena E. Stashenko, Chemist, *Ph.D.* Co-directors: Rogerio A. Saavedra, Chemist, *M.Sc.*; Lady J. Sierra, Chemist, *Ph.D.*

Introducción

Brasil, Costa Rica y Colombia son los países que tienen un número muy alto de especies vegetales que han sido reportadas (Bandoni, 2003). En el género *Piper* existen ca. 1200 plantas de las cuales existen algunos estudios que documentan composiciones químicas de aceites esenciales, extractos y sus actividades biológicas para el uso comercial de *Piper* spp. (Salehi *et al.*, 2019).

Estudiar las composiciones químicas y las actividades biológicas de AE y extractos vegetales permite contribuir a la conservación tanto de la diversidad genética como la diversidad cultural ya que, respaldar el conocimiento etnobotánico con estudios científicos, fomenta el uso sostenible y la protección de la biodiversidad. Por ejemplo, algunos lignoides identificados en plantas del género *Piper* tienen varias actividades biológicas: antitumoral, antifúngica, bactericida, anti-FAP (factor activador de plaquetas) y anti-VIH (virus de inmunodeficiencia humana) (Salehi *et al.*, 2019).

El objetivo principal de este trabajo fue determinar las composiciones químicas y las actividades antioxidantes de los AE y los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las partes aéreas, las inflorescencias y las hojas de *P. aduncum*, *P. dilatatum* y *P. peltatum*. La investigación constó de tres etapas: en la primera, se realizó la obtención de los AE por hidrodestilación asistida por la radiación microondas, y su análisis se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC/FID). En las composiciones química de los AE de *P. aduncum* se detectaron 58 compuestos (>0.1%), entre los cuales figuran dilapiol, miristicina y apiol; compuestos del tipo fenilpropanoide que poseen actividades antibacterianas e insecticidas (Lock & Rojas, 2004). En el AE de plantas secas de *P. peltatum*

se registraron 27 compuestos (>0.1%) siendo el *trans*- β -cariofileno el mayoritario y más destacado por sus actividades antimicrobiana, antioxidante, anestésica y antiinflamatoria (Soares *et al.*, 2013). Los AE de *P. dilatatum* son del tipo sesquiterpenoide, en ellos se detectaron 34 compuestos (>0.1%).

En la segunda etapa, se obtuvieron extractos con solvente de etanol:agua (70:30% v/v) se analizaron por UHPLC-ESI-*Orbitrap*-MS. En los extractos de *Piper* se detectaron 15 compuestos, uno de ellos, se identificó confirmatoriamente como el ácido-*p*-cumárico, usando la sustancia-patrón. Las amidas substituidas del ácido benzoico fueron los compuestos más abundantes en el extracto de inflorescencias de *P. dilatatum* ($220 \pm 24 A_i/A_{istd}$); estos compuestos se han usado para aliviar dolores musculares, dentales y articulares (Sambaiah *et al.*, 2021).

En la tercera etapa, se evaluó la capacidad antioxidante de los AE y los extractos hidroalcohólicos por el método de decoloración de ABTS⁺. El extracto con la capacidad antioxidante más alta fue obtenido de las inflorescencias de *P. aduncum* ($890 \pm 17 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra), su actividad, se debe entre la sinergia entre compuestos fenólicos presentes en el extracto, entre ellos, amidas substituidas del ácido benzoico. Lee *et al.* (2015) en su estudio demuestran el potencial antioxidante y antiinflamatorio de quince amidas, que pueden ser usadas para desarrollar fármacos, por su acción antiinflamatoria.

Los resultados parciales de esta investigación se presentaron en el 3rd *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, realizado del 10 al 15 de diciembre de 2022 en Rio de Janeiro, Brasil. El trabajo se expresó bajo la modalidad póster, titulado *GC/MS study of essential oils distilled from different parts of Piper aduncum species*.

Este proyecto de grado hizo parte del estudio “La constelación biodiversa: confluencia de saberes en el Jardín Botánico Experimental Consentido”, financiado por la

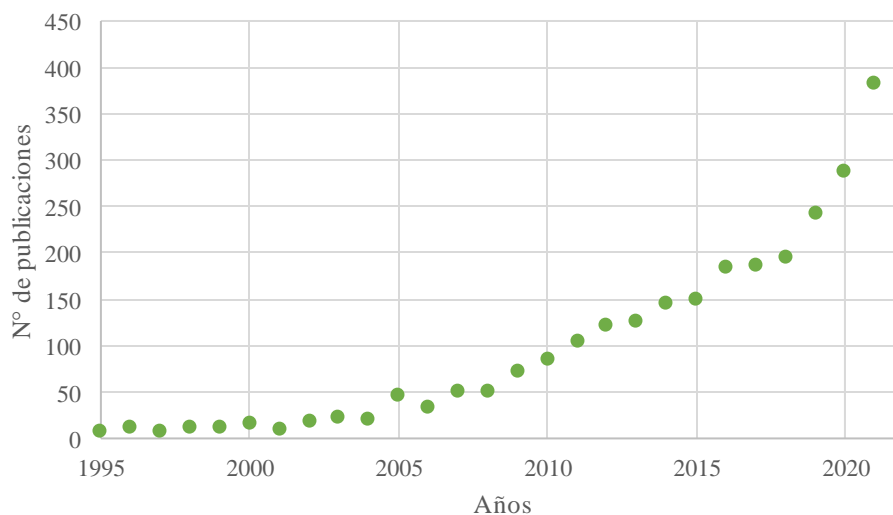
Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la UIS [N° 3736] y del Programa “Bio-Reto XXI 15:50”, financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación e ICETEX. El permiso de colecta fue otorgado a través del contrato N° 270, que permite acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección, suscrito por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander.

1. Estado del arte

Para estimar el número de investigaciones que se han desarrollado e indagar sobre el interés que se ha tenido por el estudio de las composiciones químicas de AE y de extractos de plantas del género *Piper*, se realizó una búsqueda bibliográfica de las publicaciones, utilizando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), usando la ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY "Piper" AND "Chemical composition"*. El periodo de búsqueda fue de 1995-2023 (**Figura 1**).

Figura 1.

Número de publicaciones sobre plantas del género *Piper*. Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY "Piper" AND "Chemical composition"*. Fuente: *Scopus* (*Elsevier*). Periodo de observación: 1995-2023. Fecha de consulta: 26 de marzo de 2023.

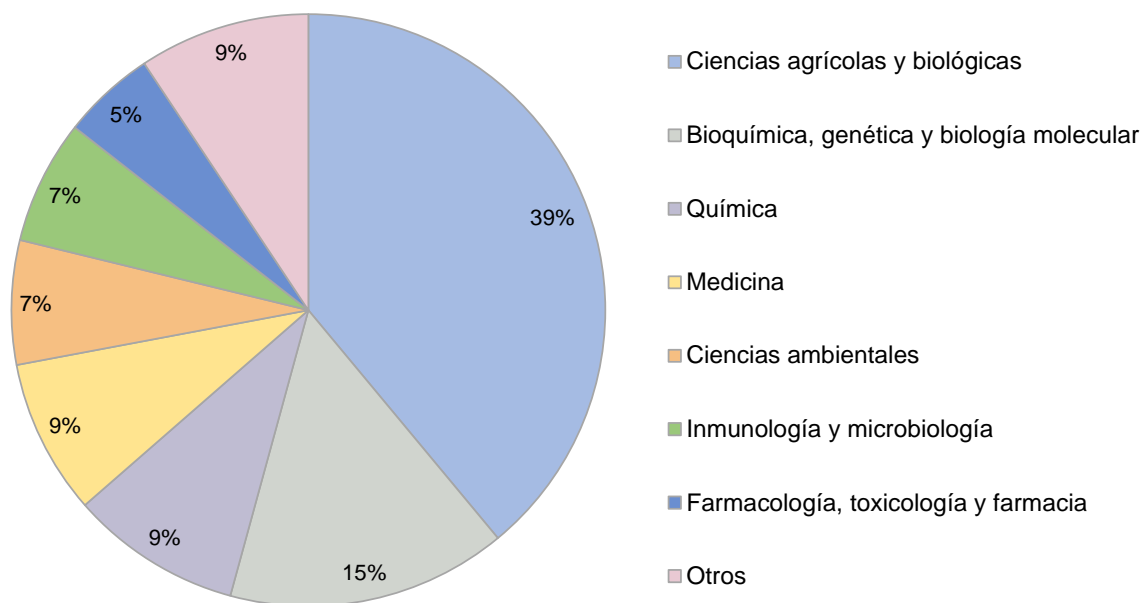


En la **Figura 1** se observa que a partir del año 2000 aumentaron las publicaciones sobre la composición química de las plantas del género *Piper*, siendo el 2021 el año con el mayor número de publicaciones (384 publicaciones). Se han registrado 42 publicaciones

científicas sobre *Piper* spp. relacionadas con las áreas de la agricultura y ciencias biológicas (39%), bioquímica (15%), química (9%), medicina (9%) y ciencias ambientales (7%) (Figura 2).

Figura 2.

Áreas de investigación relacionadas con el estudio de plantas del género *Piper*. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY: "Piper" AND "Piper spp.". Fuente: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 2000-2023. Fecha de consulta: 11 de mayo de 2023.



La mayoría de las publicaciones hacen referencia al estudio fitoquímico de las especies del género *Piper*, las composiciones químicas de los AE y las actividades biológicas como: citotóxica y antifúngica, entre otras. En el campo de la química, se han publicado 55 investigaciones sobre *Piper* spp en el año 2022. Un estudio realizado por Muñoz *et al.* (2023) en Colombia determinó las composiciones químicas de los AE obtenidos de partes diferentes de *P. eriopodon* y evaluó *in vitro* las actividades citotóxicas (en modelos de células

humanas), antibacteriana (en tres cepas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*), antioxidante y de repelencia contra *Sitophilus zeamais*. Los investigadores concluyeron que los AE de *P. eriopodon* podrían ser usados como conservantes de alimentos y se resalta su potencial como agentes terapéuticos (anticancerígeno/antiproliferativo) contra el adenocarcinoma de cérvix.

Dias *et al.* (2001) estudiaron los AE destilados de diez especies de la familia Piperaceae, de las cuales, siete pertenecían al género *Piper*. Los compuestos más abundantes fueron los sesquiterpenos y, en una cantidad menor, los monoterpenos. En los AE se encontró que la mayoría de los sesquiterpenos tienen como el precursor el *E-E*-farnesil-PP (difosfato de farsenilo).

Fazolin *et al.* (2022) destilaron el AE de las hojas de *P. aduncum*, obtenidos por arrastre con vapor y determinaron que el metabolito secundario más abundante era el dilapiol (31.5–91.1%). Los AE se analizaron por GC/MS y GC/FID. Se estudió la variación química, las actividades y el efecto insecticidas por contacto tópico y residual contra *Spodoptera frugiperda* de los AE almacenados en viales durante cuatro años bajo cuatro condiciones: (a) con exposición a radiación ultravioleta en una cámara UV; (b) con exposición directa a la luz solar; (c) en un cuarto a temperatura ambiente y (d) en un refrigerador doméstico. Los autores concluyeron que el AE de *P. aduncum* era estable bajo todas las condiciones de almacenamiento y que podría usarse para el control de larvas e insectos de *S. frugiperda*.

De la especie *P. peltatum* solo se encontró un artículo del 2004 de Pino *et al.* (2004) quienes caracterizaron por GC/MS el AE de hojas y reportaron como compuestos mayoritarios el óxido de cariofileno (22.9%), espatulenol (9.0%), *trans*-calameneno (5.4%) y α -copaeno (5.2%).

Modificando la ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY "Piper peltatum", AND*

“*Extract*” se encontraron 17 artículos publicados del 2005 al 2023. Acosta *et al.* (2020) obtuvieron el extracto de las raíces de *P. peltatum*, usando maceración en etanol al 70%, y estudiaron el efecto diurético sobre *Rattus norvegicus*, empleando dosis del extracto de 25, 100 y 200 mg/kg en controles normal (CMC, 0,5% p/v, dosis 10 mL/kg) y estándar (furosemida, dosis 10 mg/kg). Las ratas tratadas con extractos de *P. peltatum* aumentaron considerablemente el volumen de orina y electrolitos excretados en comparación con las ratas tratadas con furosemida (control). Los autores sugirieron que la actividad diurética puede estar relacionada con la presencia de compuestos fenólicos en *P. peltatum* y, que esta especie podría ser considerada como fuente de compuestos diuréticos, una vez se realicen los estudios fitoquímicos, tóxicos y clínicos pertinentes.

Para *P. dilatatum* (syn. *P. dilatatifolium*), solo se encontraron tres artículos. Jaramillo *et al.* (2015) estudiaron las composiciones químicas por GC/MS de los AE de diferentes *Piper* spp. entre éstas *P. dilatatum*, y su actividad repelente contra el escarabajo de grano almacenado *Tribolium castaneum*. Los componentes mayoritarios identificados en el AE destilado de *P. dilatatum* fueron apiol (89.0%) y *trans*- β -cariofileno (8.3%). Los autores reportaron actividad repelente del AE de *P. dilatatum* de 66% contra *T. castaneum*, a una concentración de 1 μ L/cm².

Solo se encontraron cuatro artículos desde 1998 hasta 2018, usando la ecuación de búsqueda *TITLE-ABS-KEY* “*Piper dilatatum*”, *AND* “*Extract*”. En el artículo de Yoshida *et al.* (2018) caracterizaron el extracto de hojas de *P. dilatatum* y reportaron ácidos benzoicos prenilados con actividad antifúngica comparable con la del control positivo de nistatina, al ser evaluados sobre cepas de *Cladosporium cucumerinum*. Los autores aislaron y caracterizaron el alquenilfenol 4-[(3'*E*)-hexadec-3'-en-1-il]fenol del extracto de raíces de *P. dilatatum*. Silva *et al.* (2014) evaluaron la actividad antioxidante por el método de

atrapamiento de radicales libres (DPPH) de los AE y extractos etanólicos de tres especies de *Piper*, entre ellos, de *P. dilatatum*, para la cual determinaron los valores de concentración efectiva (CE₅₀) y el índice de actividad antioxidante (IAA), se encontraron los siguientes valores de CE₅₀ y AAI: 226.84 µg/mL y 5.30 para el ácido ascórbico (utilizado como referencia), y 367.70 y 3.20 µg/mL para el extracto de *P. dilatatum*, respectivamente. Los autores concluyeron que la actividad antioxidante era mayor para los extractos etanólicos que para los AE.

Es importante destacar, que previamente se ha investigado por separado la composición química de diversas partes de las plantas del género *Piper*: Varughese *et al.* (2016) obtuvieron AE del material vegetal fresco de la raíz, el tallo, el fruto y la hoja de *Piper longum*, los rendimientos de los AE de los frutos y las hojas fueron superiores a los de los AE de la raíz y el tallo. En las composiciones de AE de la raíz, el fruto y el tallo predominaron la presencia de hidrocarburos monoterpénicos (62, 71 y 69%, respectivamente), mientras que en el AE de las hojas se detectaron los hidrocarburos sesquiterpénicos (69%) como componentes principales. Los investigadores llegaron a la conclusión de que los monoterpenos como α -pineno y β -pineno aparecieron en cantidades apreciables en los AE del tallo, fruto y raíz de *P. longum*; estos compuestos se comercializan ampliamente para la producción de perfumes.

Otra ecuación de búsqueda se usó para conocer el número total de publicaciones sobre AE, actividad antioxidante y extractos etanólicos (Véase **Tabla 1**), *TITLE-ABS-KEY* “*Piper species*”, *AND* “*Essential oil*” *AND* “*Antioxidant activity*” *AND* “*Ethanollic extract*”.

Tabla 1.

Número de publicaciones relacionadas con aceites esenciales, actividad antioxidante y extractos etanólicos de *P. aduncum*, *P. peltatum* y *P. dilatatum*.

Especie	Nº publicaciones	AE	AAO*	Extracto etanólico
<i>Piper aduncum</i>	714	489	241	86
<i>P. peltatum</i>	60	25	28	22
<i>P. dilatatum</i> syn. (<i>P. dilatatifolium</i>)	86	59	44	13

*Actividad antioxidante.

Nota. Periodo de consulta: 1999-2023. Fecha de consulta: 24 de abril de 2023. Fuente: *Scopus* (Elsevier). Ecuación de búsqueda: *TITLE-ABS-KEY* “*Piper species*”, *AND* “*Essential oil*” *AND* “*Antioxidant activity*” *AND* “*Ethanollic extract*”.

2. Marco teórico

2.1. Familia Piperaceae

Las regiones tropicales y subtropicales presentan una diversidad biológica grande, en estas áreas se albergan aproximadamente 2.000 especies que pertenecen a los géneros de la familia Piperaceae: *Piper*, *Peperomia*, *Zippelia*, *Manekia* y *Verhuellia* (Kato & Furlan, 2007). El término "Piperaceae" tiene su origen en el sánscrito "pippali", que posteriormente se derivó en palabras como "*peperi*" en griego, "*piper*" en latín y "*pepper*" en inglés, son angiospermas, es decir, plantas con flores, que se sitúan en el orden Piperales junto con otras tres familias, a saber, Aristolochiaceae, Hydnoraceae y Saururaceae. La especie *Piper longum*, que se usa en su estado seco como especia o condimento, se conoce como la pimienta

larga de la India, es un pariente cercano de la *Piper nigrum* (pimienta negra) y comparte un sabor similar, aunque un poco más picante (Flowering, 1998). En la actualidad, la especie más reconocido de esta familia es *Piper nigrum*, que es la fuente de las especias de pimienta negra y blanca (Kato & Furlan, 2007).

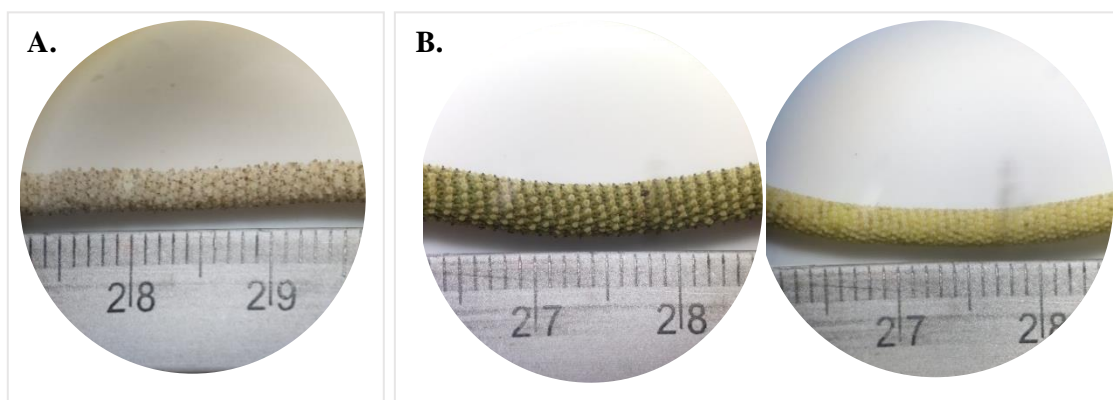
2.2. Género *Piper*

Las plantas del género *Piper* tienen importancia tanto en la ecología como en la medicina, son alimento de muchas especies frugívoras, también se usan como insecticidas. Muchas plantas del género poseen efecto antiinflamatorio, además, en la etnobotánica diversas especies se utilizan para tratamientos renales, hepáticos, *etc.* (Hurtado, 2018).

Las inflorescencias son características de las Piperáceas (**Figura 3**), se pueden describir como una espiga compacta de diminutas flores muy cercanas entre sí y diferentes entre especies. En el caso de algunas especies, se caracterizan por tener flores bisexuales (Semple, 1974).

Figura 3.

Inflorescencias de A. P. dilatatum y B. P. aduncum.



Nota. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín

experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, el 18 de noviembre de 2022.

Los AE de las plantas del género *Piper* son distintivos para cada especie. Sobre la composición química de AE se encontró que los principales constituyentes son fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides (Nigam & Purohit, 1962).

En un estudio realizado por Arciniegas *et al.* (2002) obtuvieron extractos etanólicos crudos a partir de diferentes partes de las plantas pertenecientes a trece familias, entre las que se encontraba la familia Piperaceae. Los extractos fueron sometidos a pruebas *in vitro* para medir la actividad antifúngica contra *Mycosphaerella fijiensis*, el hongo causante de la sigatoka negra que afecta principalmente a plantas del género *Musa*, plátanos y bananos. De los veinte extractos etanólicos evaluados, solo ocho (*Commelina difussa*, *Momordica charantia*, *Pavonea* sp., *Plenas* sp., *Sida rhombifolia*, *Syzygium aromaticum*, *Piper hispidum* y *Piper peltatum*) mostraron actividad antifúngica, tanto en la germinación de esporas como en el desarrollo de colonias de *M. fijiensis*. En algunos casos, estos extractos fueron incluso más efectivos que el fungicida comercial, por lo tanto, estos extractos fueron considerados promisorios naturales y se sugirió su fraccionamiento mediante diclorometano para aislar los componentes antifúngicos activos y utilizarlos como sustancias para el control de la sigatoka negra (Celis *et al.* 2008).

2.2.1. *Piper aduncum* L

Esta planta es común en tierras cálidas o húmedas, crece a lo largo de las carreteras, en pastos y en terrenos abandonados, a veces formando malezas, y se puede encontrar normalmente en Brasil, Ecuador, Colombia, Perú y Centroamérica hasta el centro de México. Es un árbol pequeño o arbusto de 6-8 m de alto (**Figura 4**), con un tronco de 8-20 cm de

diámetro, a menudo ramificado cerca a la base. Es característico por sus racimos florales (espigas), pues son curvos, nacen solitarios, de color amarillento, pero tornan a color verde gris en el fruto (Gupta *et al.* 2013a).

Figura 4.

Partes aéreas de P. aduncum



Nota. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, el 24 de noviembre de 2022.

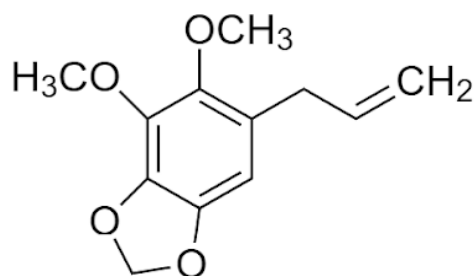
En Colombia se le conoce comúnmente como “hierba del soldado” o “matico” y, en Brasil, se le dice “pimienta de fruto ganchoso”, “pimienta de macaco” y “tapa hueco”. En el uso etnomédico, las hojas se utilizan como infusión, cocimiento, tintura, para problemas estomacales, para detener hemorragias, para hinchazón en el área de la boca y la garganta, para el tratamiento de la sífilis terciaria, reumatismo, gota y antiulceroso (Gupta *et al.* 2013a).

El extracto metanólico de *P. aduncum* tiene actividad antioxidante alta, efectos antiinflamatorio y citoprotector contra sustancias mutagénicas como el fluoruro de sodio y

presenta concentración alta de flavonoides y polifenoles (Herrera *et al.* 2019). En el AE destilado de las hojas, se destaca como componente mayoritario el dilapiol (**Figura 5**) con >80%, que es un fenilpropanoide utilizado como antibacteriano, molusquicida, insecticida, pesticida y sedante; también, se detectaron componentes como el 1,8-cineol y la piperitona (Lock & Rojas, 2004).

Figura 5.

Estructura química del dilapiol.



2.2.2. *Piper dilatatum* Rich

La planta es un arbusto que crece hasta los 2 m de altura, los frutos alcanzan los 4-5 cm de largo y 0.2 cm de diámetro (**Figura 6**). Esta especie es abundante en el Amazonas y se encuentra muy difundida en diferentes partes de Brasil (Christ *et al.* 2016).

Figura 6.

Inflorescencias y partes aéreas de P. dilatatum.

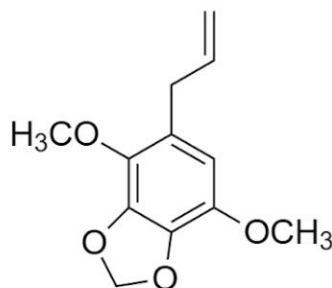


Nota. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, el 25 de noviembre de 2022.

En el AE de partes aéreas de *P. dilatatum*, se han reportado como compuestos mayoritarios el apiol (79.0%) (**Figura 7**), *trans*-cariofileno (8.3%), espatulenol (4.2%) y γ -cadineno (1.7%). Se evidenció que el AE de *P. dilatatifolium* tiene efecto antialimentario en diversas especies de insecto, *e.g.*, *Rhopalosiphum padi* (98%), *Myzus persicae* (84%) y en *Spodoptera littoralis* (65%); posee efecto fitotóxico en plantas de *Lolium perenne* y *Lactuca sativa* con 31-27% y 100-55% de inhibición, afectó el crecimiento de las raíces y las hojas, respectivamente, en la dosis correspondiente (100% de inhibición, 0.2 mg/mL) con el AE de *P. dilatatum* (Jaramillo *et al.*, 2019).

Figura 7.

Estructura química del apiol.

**2.2.3. *Piper peltatum* L**

Esta planta crece en lugares cálidos, en barbechos o en zonas abiertas, es una especie muy aromática, sobre todo, sus raíces. Es una herbácea sub-arbustiva que puede llegar solo hasta 1 m de altura. Los frutos nacen en racimos de espigas que pueden medir de 8 a 13 cm (**Figura 8**). Se le puede encontrar desde México, Centro América, Las Antillas, hasta Sudamérica. *P. peltatum* tiene usos etnomédicos como hepatoprotector, sirve para tratamientos de úlceras, para estimular el apetito, es antiinflamatoria, repelente, antibacterial, también, se toma en infusiones como antimalárico en Brasil, sin especificar el órgano de la planta que se utiliza (Gupta *et al.* 2013a; 2013b).

Figura 8.

Inflorescencias y partes aéreas de P. peltatum.

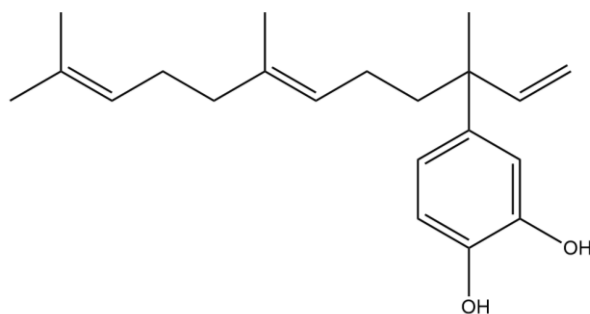


Nota. Fotografías tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, el 23 de noviembre de 2022.

Los extractos de *P. peltatum* tienen actividad diurética, que fue evaluada en ratas usando dosis de 25, 100 y 200 mg/kg (Acosta *et al.* 2020). Además, se ha estudiado el efecto del 4-nerolidilcatecol (**Figura 9**), aislado de sus extractos, sobre la inhibición de la toxicidad de dos fosfolipasas que hacen parte de venenos de serpientes (Núñez *et al.* 2005).

Figura 9.

Estructura química del 4-nerolidilcatecol.

**2.3. Aceites esenciales**

El aceite esencial es una fracción aromática y volátil característica de una planta, que se destila de las hojas, tallo, corteza o raíces, *etc.*, por medio de hidrodestilación, arrastre con vapor o destilación con agua-vapor. Los AE están compuestos por metabolitos secundarios, “encargados” en la planta de su supervivencia, es cuando la planta está expuesta a diversos factores que ponen en peligro su desarrollo normal (Stashenko, 2009a). Las variaciones en las composiciones químicas de los AE, destilados de plantas de la misma especie, son el resultado, entre otras, de las diferencias en las condiciones edafoclimáticas en las que ellas se desarrollan. Las sustancias químicas que componen los AE son principalmente, los terpenos y sus derivados oxigenados, algunos de los cuales son responsables de la actividad biológica de los AE (antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, insecticida, entre otras) (Ríos, 2016; Singh *et al.* 2022). Es por esto por lo que los AE suelen usarse como agentes protectores de las plantas contra bacterias, virus, hongos, insectos y, en algunos casos, herbívoros. Algunos AE atraen insectos que repelen a aquellos que pueden tener efectos indeseables sobre la planta (Usano *et al.* 2014).

En la actualidad, los AE también se utilizan como alternativas naturales a los

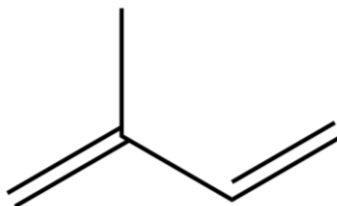
antioxidantes sintéticos, ya que los últimos pueden resultar tóxicos y estar relacionados con diversos tipos de cáncer. El uso de los AE como antioxidantes naturales ha despertado mucho interés, especialmente, en áreas como la ciencia de los alimentos y la medicina complementaria (Amorati *et al.* 2013).

2.3.1. Terpenos

Los terpenos o terpenoides hacen parte de un grupo amplio de compuestos que se encuentran normalmente en los AE. Son productos de la unión de varias moléculas de isopreno, que es un hidrocarburo insaturado de fórmula condensada C_5H_8 (**Figura 10**). Las moléculas de isopreno se pueden unir de diferentes maneras y formar diversos isómeros, ya sean ópticos, geométricos o estereoisómeros. Dependiendo de las unidades de isopreno acopladas, hay monoterpenos (dos unidades de isopreno $C_{10}H_{16}$) o sesquiterpenos (tres unidades de isopreno, $C_{15}H_{24}$). Los AE también se componen por derivados oxigenados de terpenos, entre ellos, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres (Stashenko, 2009a).

Figura 10.

Estructura química del isopreno.



Noriega (2020) reportó que los terpenos, como el carvacrol, carvona, eugenol, geraniol y timol, tienen propiedad antimicrobiana contra bacterias susceptibles y resistentes

a los antibióticos, como el *Staphylococcus aureus*, microorganismo común en humanos y animales. Estos terpenos han demostrado capacidad para inducir la ruptura celular y bloquear la síntesis de proteínas y ADN. Los AE desempeñan un papel importante como agentes antibacterianos.

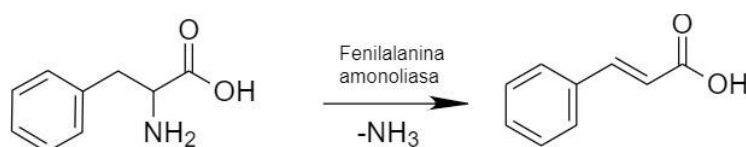
2.3.2. Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides desempeñan un papel fundamental en el metabolismo secundario de las plantas. Entre ellos, fitoalexinas como los estilbenos, las cumarinas y los isoflavonoides, los flavonoides protegen contra los rayos UV, y las antocianinas son responsables de los colores de las flores. Los fenilpropanoides son de vital importancia para la resistencia de las plantas frente a los ataques de patógenos, ya que algunos se acumulan en cantidades significativas, actuando como fitoalexinas o presentando otras actividades como la antimicrobiana (La Camera *et al.* 2004).

El metabolismo de los fenilpropanoides es un paso transitorio entre el metabolismo primario y secundario en las plantas, su ruta biosintética comienza con la desaminación del aminoácido fenilalanina hacia el ácido *trans*-cinámico, reacción que cataliza la fenilalanina amoniaco-liasa (**Figura 11**) (Herrera *et al.* 2016).

Figura 11.

Formación del ácido trans-cinámico, unidad estructural para la biosíntesis de los fenilpropanoides.



2.3.3. Destilación de aceites esenciales

Existen tres técnicas destilativas principales para obtener los AE: (1) arrastre con vapor, (2) destilación con agua-vapor e (3) hidrodestilación. En la destilación por arrastre con vapor, se utiliza una fuente (*e.g.*, la caldera) donde se genera vapor sobrecalentado y seco que atraviesa el material vegetal con una presión más alta que la atmosférica haciendo que se rompan las células o canales oleíferos de la planta, arrastrando la mezcla volátil que se condensa al pasar por un refrigerante (Stashenko, 2009a). En la destilación con agua-vapor, se tiene el material vegetal suspendido apoyado sobre una malla o rejilla y el vapor que pasa a través del material vegetal se genera por agua llevada a temperatura de ebullición, la cual al entrar en contacto con la muestra transporta los volátiles al condensador para su recolección (Stashenko, 2009a). En la hidrodestilación la planta se sumerge directamente al agua que se lleva a ebullición, así los vapores que se generan se condensan para su separación por decantación. Por tal razón, esta técnica se recomienda cuando se usa el material vegetal delicado, por ejemplo, flores (Stashenko, 2009a). Algunos AE, como los obtenidos de las cáscaras de cítricos, se pueden extraer a través de procesos de presión en frío (Cerón & Cardona, 2011).

Los factores que influyen sobre los rendimientos de los AE son el estado del material vegetal (parte de la planta, estado fenológico, *etc*), la temperatura, el tiempo de destilación, tamaño de partícula del material vegetal, la técnica destilativa empleada, entre otros; estos factores pueden influir también en la calidad del AE que se obtiene (Figueiredo *et al.* 2008).

2.3.4. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

La hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD, por sus siglas en inglés), se utiliza a escala de laboratorio, en ella, el material vegetal se sumerge directamente al agua, que se calienta para alcanzar el punto de ebullición, la mezcla de agua y compuestos volátiles se evapora, luego, se condensa y se separa por decantación (Golmakani & Rezaei, 2008). En la MWHD, el calentamiento se realiza en un horno microondas que opera a 2.45 GHz, dentro del cual se encuentra un balón redondo con el material vegetal, éste se conecta por un orificio a un aparato tipo *Clevenger* con una trampa *Dean-Stark*, donde ocurre la condensación y se lleva a cabo la separación. Trazas de agua (humedad) en el AE se retiran utilizando Na_2SO_4 anhidro, evitando posibles procesos de hidrólisis. La MWHD tiene dentro de sus ventajas los tiempos de destilación mucho más cortos, cantidades de material vegetal y temperaturas de calentamiento menores que la destilación por arrastre con vapor (Stashenko *et al.* 2004; Kaufmann & Christen, 2002).

2.4. Extractos vegetales

Las especies vegetales poseen diversos metabolitos secundarios importantes para su desarrollo, crecimiento y mantenimiento, que se utilizan debido a sus propiedades biológicas, entre ellos, encuentran alcaloides, flavonoides, tocoferoles, ácidos fenólicos, *etc.* Estos compuestos presentan diversas actividades entre ellas, citotóxica, analgésica, inmunoestimulante, antiespasmódica y antibacteriana, algunos de las cuales se aprovechan en preparaciones farmacológicas con propiedades antiapoptótica, antienvjecimiento, antiinflamatoria, cardioprotectora, inmunomoduladora y antiangiogénica (Bandoni, 2003;

Bižanov *et al.* 2018).

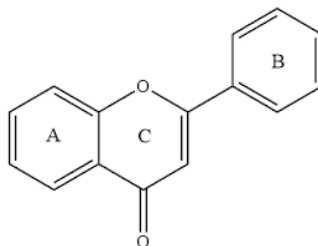
Entre los diferentes métodos para extraer metabolitos secundarios figuran los siguientes: extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés), extracción con fluido supercrítico (SFE) y extracción Soxhlet (Bižanov *et al.* 2018). La elección del solvente depende de la polaridad, temperatura, agitación y la diferencia de solubilidad entre los analitos, que permiten lograr la separación de los compuestos de la mezcla durante el proceso de extracción (Azuola & Vargas, 2007)

2.4.1. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de las plantas por medio de una ruta biosintética mixta, la del ácido shikímico y la de los policétidos (Dewick, 2003). La estructura general de flavonoides es de tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de tres carbonos ciclada por medio de un oxígeno, lo que los convierte en compuestos fenólicos diaril-propánicos (**Figura 12**). Los flavonoides se pueden clasificar dependiendo de la estructura de su esqueleto base, en flavanonas, dihidroflavonoles, flavonoles, *etc.* Los flavonoides son ampliamente distribuidos en las plantas, *e.g.*; en las partes aéreas, hojas, flores, frutos, forman más de 2000 estructuras distintas. En los humanos, el consumo de alimentos que contienen flavonoides puede generar efectos diuréticos, antiespasmódicos, antiinflamatorios, antiulcerosos gástricos y antioxidantes. En la industria, los flavonoides se usan como conservantes, saborizantes y fotoprotectores. La actividad antioxidante de flavonoides se basa en la capacidad para neutralizar radicales libres y quelar metales (Stashenko & Martínez, 2011; Luengo, 2002).

Figura 12.

Estructura química básica de la 2-fenil- γ -cromona (flavonoide).

**2.4.2. Extracción con solvente**

La extracción con solvente es un método clásico y se recomienda para su realización escoger correctamente el solvente teniendo en cuenta sus propiedades físicas, el costo y la disponibilidad. La extracción con solvente se escoge dependiendo del estado de la matriz, puede ser una extracción sólido-líquido o una extracción líquido-líquido. Las extracciones pueden realizarse en procesos continuos o por lotes. Entre los métodos de extracción más utilizados están la maceración y la percolación o lixiviación. En la maceración, el material previamente triturado, se pone en contacto con una cantidad suficiente de solvente en un sistema cerrado a temperatura ambiente, hasta lograr una extracción completa (Alguacil, 1998). En la percolación o lixiviación, el material se pone en contacto con un solvente en un recipiente cerrado, permitiendo el paso lento de los analitos a través de materiales porosos separando los analitos de interés desde el sólido a la fase líquida, y al final de la extracción, se concentra el extracto donde se encuentra el analito de interés (Reyes *et al.* 2017; Benítez *et al.* 2019).

Una vez obtenido el extracto, se realizan procesos de limpieza y concentración para eliminar el exceso de solvente orgánico y obtener las sustancias de interés. Algunas desventajas de este método son la formación de emulsiones, su alto costo, tiempo de

extracción prolongado, posibilidad de contaminación cruzada, entre otras (Stashenko & Martínez, 2011).

2.5. Técnicas analíticas

2.5.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación en la que los analitos de interés entran en contacto con dos fases: una fase estacionaria, que puede ser líquida o sólida, y una fase móvil, que consiste en un gas de arrastre (Stashenko & Martínez, 2009b).

En GC la fase móvil no interacciona con los analitos, sino que los transporta a través de la columna cromatográfica. Un compuesto, que puede analizarse por cromatografía de gases, debe ser volátil o volatilizable, termoestable y tener peso molecular bajo (<500 Da). Existen dos tipos de cromatografía de gases: cromatografía gas-sólido y cromatografía gas-líquido (Stashenko & Martínez, 2009b).

Debido a la composición compleja de los AE y al rango de volatilidades y polaridad al cual pertenecen sus componentes, la GC es la herramienta analítica perfecta para su análisis (Marriott *et al.* 2001). El objetivo general, al aplicar GC, es lograr una resolución completa de los compuestos de interés, en el menor tiempo posible (Marriott *et al.* 2001; Baser & Buchbauer, 2009). Sin embargo, la complejidad de los AE, que incluyen isómeros y una gran cantidad de estructuras derivadas de los terpenos, implica que la separación y determinación de sus componentes resulte ser una tarea extensa y difícil (Marriott *et al.* 2001). El análisis por GC de un AE requiere el uso de columnas cromatográficas con fases estacionarias que posean polaridades diferentes. En las columnas polares, el mecanismo de separación se fundamenta en la diferencia del momento dipolar de las moléculas, mientras que en columnas

apolares, está relacionado con el punto de ebullición de los constituyentes (Stashenko, 2009a; 2009b; Baser & Buchbauer, 2009).

2.5.2. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida se basa en el paso de una mezcla de compuestos mediante el flujo de una fase móvil, a través de una fase estacionaria, que rellena una columna cromatográfica (Skoog, 2015). La separación se fundamenta en la diferencia de velocidades de migración que existe entre los analitos y la interacción de éstos con la fase estacionaria (Pássaro *et al.* 2016). La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) no es una técnica destructiva y es uno de los métodos más utilizados en las áreas de la química farmacéutica, bioquímica, alimentos y forense, debido a su amplio rango de aplicaciones y precisión alta (Snyder *et al.* 2010). Entre los detectores más comunes para este tipo de cromatografía, se encuentran UV-Vis y acoplamientos con detectores de espectrometría de masas (Donato *et al.* 2012).

2.5.3. Detector selectivo de masas

El detector selectivo de masas (MSD, por sus siglas en inglés) permite la separación de iones con diferentes relaciones de masa-carga (m/z), generando una señal eléctrica que se procesa en función del tiempo a lo que se llama espectro de masas. Los analizadores de masas se dividen en dos grupos grandes: de barrido (*Scanning Analyzers*) y de transmisión simultánea de iones. Se diferencian por sus propiedades o especificaciones técnicas y alcances analíticos, entre estos parámetros figuran la resolución, el rango de masas que pueden medir, la velocidad y la eficiencia en la transmisión de iones (Stashenko & Martínez, 2010). La selectividad de un detector depende de la respuesta que tiene a una sustancia con

átomos o fragmentos estructurales específicos, en el caso del detector selectivo de masas (MSD) responde a las sustancias que poseen en sus espectros de masas iones característicos. Los detectores se diferencian por la sensibilidad, los niveles mínimos de detección y cuantificación (Stashenko & Martínez, 2009b).

2.5.4. Detector de ionización de llama

El detector de ionización en llama (FID, por sus siglas en inglés) es el detector quizás más utilizado en cromatografía de gases. El efluente de la columna se mezcla con H₂ y aire en un quemador para formar una llama. La señal eléctrica que se genera depende del número de átomos de carbono que tiene la sustancia que entra al detector por unidad de tiempo, es un detector sensible al cambio de masa del analito. Una de las ventajas que ofrece FID es que no da respuesta a los gases no combustibles, tales como H₂O, CO₂, SO₂ y NO₂ (Poole, 2015). El FID posee una sensibilidad elevada, un rango lineal de respuesta amplio y un ruido bajo, podría considerarse detector casi-universal, ya que es “transparente” solo al agua y a los gases permanentes (Stashenko & Martínez, 2009b).

2.5.5. Analizador de espectrometría de masas *Orbitrap*

Es un analizador de masas con trampa de iones que consta de dos electrodos externos y uno central, que le permite actuar como analizador y detector. Por medio de compresión electrodinámica, los iones ingresan al *Orbitrap* para después oscilar, a frecuencias distintas, que se miden y pueden ser sometidas al proceso de deconvolución por medio de la transformada de Fourier (Scigelova & Makarov, 2006). Midiendo las frecuencias de oscilación inducidas por los iones en los electrodos externos, los espectros de masas se

reconstituyen por medio de la detección de corriente de imagen. Este analizador es de gran ayuda para identificar compuestos que se encuentran en una concentración muy baja, inclusive inferior a ppb. Tiene la capacidad de detectar compuestos a nivel de traza, es útil para el análisis de mezclas complejas, alimentos, bebidas, productos naturales, drogas, *etc.* (*ThermoFisher Scientific*, 2022).

2.6. Antioxidantes

Los antioxidantes se definen como “especies químicas que, aun estando en concentraciones bajas, comparadas con las de un sustrato oxidable, reducen significativamente, previenen o reparan la oxidación de ese sustrato” (Halliwell, 1995). Los antioxidantes se dividen en dos grupos grandes, a saber:

- Antioxidantes directos: son aquellos capaces de disminuir o detener la reacción en cadena radicalaria.
- Antioxidantes indirectos: los que no tienen un efecto directo en la protección de las moléculas, pero estimulan el incremento en las defensas antioxidantes de los sistemas vivos, induciendo la expresión de enzimas con actividad antioxidante (Amorati *et al.* 2013).

Los antioxidantes directos se dividen en cuatro grupos. Los antioxidantes preventivos, que intervienen en el paso de iniciación de la reacción radicalaria retardando la formación inicial de especies radicales. Los antioxidantes por ruptura de cadena o “*chainbreaking*”, que poseen una velocidad alta de reacción con los radicales peroxilo, mayor que la que posee el sustrato oxidable, y forman productos que no propagan la reacción de oxidación. Los antioxidantes por mejora en el paso de terminación o “*termination-enhancing*”, que sufren reacciones de autooxidación, sin embargo, se caracterizan por tener un proceso de

terminación bastante rápido, al mezclarlos con un sustrato oxidable, disminuyen la eficiencia total de la reacción de oxidación (Hallywell, 1995, Panchawat *et al.* 2010;). Los antioxidantes de reparación o enzimas *de-novo* consisten en complejos enzimáticos encargados de la reparación de daños en el ADN, proteínas, lípidos y peróxidos, y detienen la cadena de propagación de la reacción oxidativa (Macheix *et al.* 1990).

Algunos, que se utilizan frecuentemente como antioxidante, son carotenoides, fosfolípidos, tocoferoles (vitamina E), vitamina C, compuestos fenólicos, pigmentos, y sistemas enzimáticos como el superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Las vitaminas E, C, carotenos y los cofactores (Cu, Zn, Mn, Fe y Se) son antioxidantes importantes que funcionan de manera sinérgica inhibiendo la formación de radicales libres. Los compuestos fenólicos participan en el proceso de oxidación al reaccionar con radicales libres, quelan metales catalíticos y capturan el oxígeno. Estos compuestos se dividen en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Panchawat *et al.* 2010). Los polifenoles o compuestos fenólicos ayudan a prevenir el riesgo de enfermedades como cáncer, degeneración neuronal relacionada con la edad y enfermedades cardiovasculares. Las plantas contienen una gran variedad de compuestos fenólicos como fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, taninos y ligninas (Macheix *et al.* 1990). Los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles y taninos condensados, funcionan como quelantes de metales, atrapan radicales libres, inhiben la xantina-oxidasa asociada a la formación de especies reactivas de oxígeno y la proliferación de células cancerígenas en el cuerpo, además, previenen enfermedades coronarias. En general, la actividad antioxidante aumenta cuando existen grupos hidroxilo o grupos donadores de hidrógeno en la estructura molecular del compuesto (Wang *et al.* 1996).

2.6.1. Actividad antioxidante medida por el método ABTS^{•+}

La generación del catión-radical ABTS^{•+} [ácido 2,2'-azino-*bis*-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico] de color verde, estable, y que absorbe radiación a longitud de onda larga ($\lambda=734$ nm) (Re *et al.* 1999; Wolfenden & Willson, 1982), constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que se aplican para medir la actividad antioxidante *in vitro* de sustancias puras o acuosas (Rice *et al.* 1996; Miller *et al.* 1996). Esta técnica espectrofotométrica se basa en la medida de la disminución de la absorbancia del cromóforo catión-radical ABTS^{•+}, a razón de la reducción producida por la donación de electrones de los antioxidantes presentes en la muestra. Para el cálculo de la actividad antioxidante se usa la **Ecuación 1** (Rojano *et al.*, 2008):

$$\text{Porcentaje de inhibición: } \left[\frac{1-(A. \text{ muestra} - A. \text{ blanco})}{A.R.} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

A. muestra = Es la absorbancia de la muestra (con el catión-radical presente).

A. blanco = Es la absorbancia del blanco (con etanol adicionado).

A.R. = Absorbancia de referencia (que contiene el catión-radical y el solvente de la muestra).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Realizar un estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos de diferentes partes de plantas del género *Piper*, usando técnicas cromatográficas y ensayos de actividad antioxidante *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

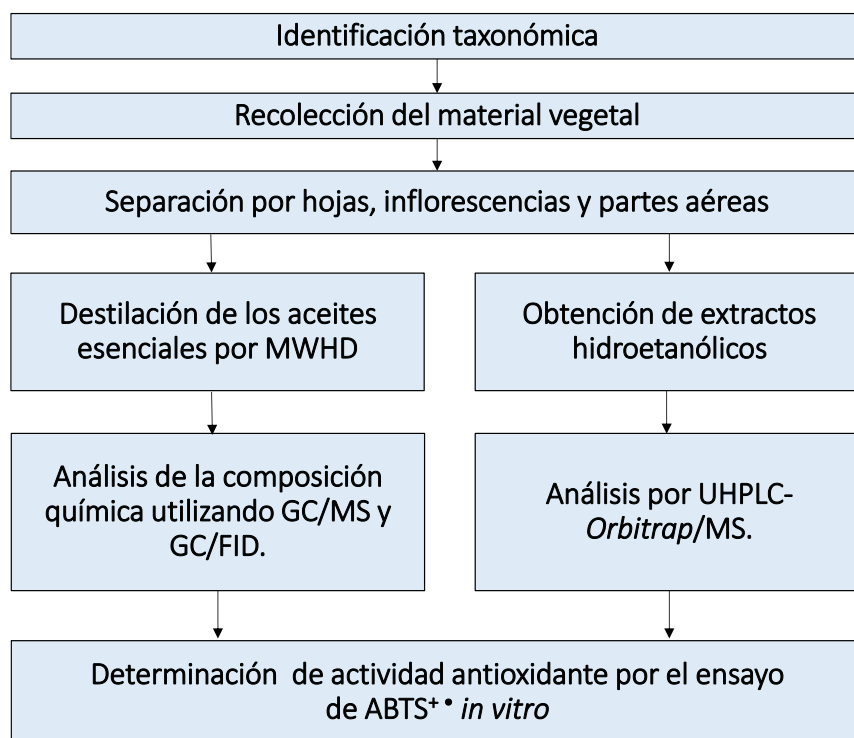
- ✓ Comparar las composiciones químicas de los aceites esenciales destilados de inflorescencias, hojas y partes aéreas (hojas, inflorescencias y tallos) de plantas del género *Piper*.
- ✓ Comparar las composiciones químicas de los extractos hidroalcohólicos de diferentes partes de plantas del género *Piper*, usando las técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas.
- ✓ Evaluar y comparar las actividades antioxidantes de aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos obtenidos de diferentes partes de plantas del género *Piper*.

4. Metodología

El objetivo de este proyecto de grado fue en realizar un análisis comparativo de las composiciones químicas de aceites esenciales y extractos obtenidos de las inflorescencias, partes aéreas y hojas de las especies *P. aduncum*, *P. peltatum* y *P. dilatatum*, y evaluar su capacidad antioxidante. En la **Figura 13**, se muestra la estructura general de la metodología.

Figura 13.

Diagrama de flujo de la metodología del estudio presente.



4.1. Reactivos y solventes

Para el desarrollo de este trabajo, se emplearon α -pineno (98%), canfeno (95%), sabineno (95%), β -mirceno (94%), α -felandreno (98%), α -terpineno (97%), *p*-cimeno (99%),

limoneno (97%), 1,8-cineol (99%), γ -terpineno (96%), linalol (97%), terpinen-4-ol (95%), α -terpineol (90%), *trans*- β -cariofileno (98.5%), aromadendreno (99%), α -humuleno (96%), germacreno D (90%), óxido de cariofileno (95%), dilapiol (95%), ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico, 98%), Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, 97%), α -tocoferol (97%) y BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol, 99%), todos adquiridos a *Sigma-Aldrich* (SA, St. Louis, MO, EE. UU.). La miricetina (≥ 99), adquirida por *PhytoLab* GmbH (Vestenbergsgreuth, Baviera, Alemania). *iso*-Propanol (98%), formiato de amonio (≥ 99 %), metanol grado LC/MS y agua Tipo I (sistema de purificación Millipore DirectQTM) se obtuvieron de *Merck* (Darmstadt, Alemania). El sulfato de sodio anhidro (> 99 %) se compró a *Mallinckrodt Baker Inc.* (Phillisburg, NJ, EE. UU.). La mezcla de *n*-alcanos C₆-C₂₅ y el *n*-tetradecano se obtuvieron de *AccuStandard Inc.* (New Haven, CT, EE. UU.). Los gases helio, aire, hidrógeno y nitrógeno (99.995%) se adquirieron en la empresa Messer (Bucaramanga, Colombia). El etanol comercial (96%) se compró a SUQUIN (Bucaramanga, Colombia).

4.2 Recolección y clasificación de las especies vegetales

La identificación taxonómica de las especies *P. aduncum*, *P. peltatum* y *P. dilatatum*, se realizó en el herbario de la Universidad Industrial de Santander, por el profesor Andrés Felipe CASTAÑO de la Escuela de Biología. El material vegetal fue proporcionado por el estado colombiano a través del contrato N° 270 de acceso a recursos genéticos y productos derivados entre la UIS y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Las plantas bajo estudio se cultivaron y se recolectaron en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas

y Medicinales Tropicales, CENIVAM, en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Santander, Colombia, N 07°08,422' W 073°06,960'). De cada especie, se seleccionaron al azar tres plantas, se separaron en las inflorescencias, las hojas y las partes aéreas (hojas inflorescencias y tallos) se obtuvieron los aceites esenciales y extractos hidroalcohólicos, cada uno por triplicado.

4.3. Destilación de aceites esenciales asistida por la radiación de microondas

La destilación del AE se llevó a cabo según descrito por Stashenko & Martínez (2010). Para ello, se utilizó un equipo *Clevenger*, con reservorio de destilación *Dean-Stark*. Como sistema de calentamiento, se usó un horno doméstico *Samsung*, modelo MS32J5133AG, con una potencia de salida de 1200 W y una frecuencia de radiación de 2.45 GHz. Se usaron entre 100 y 200 g de material vegetal por destilación, que se picaron y depositaron en un balón de fondo redondo de 2 L, al cual se agregó agua destilada (100-200 mL). La relación de material vegetal:solvente fue 1:1.

El horno de microondas se programó para trabajar a un 60% de su potencia de salida durante 60 min, en intervalos de 15 min x4 dejando un tiempo de reposo de 5 min entre intervalos. Para evitar el daño causado por humedad, los AE obtenidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro (Craveiro *et al.* 1989), luego, se mantuvieron en una atmósfera inerte con gas de nitrógeno y, posteriormente, se almacenaron en ausencia de luz y en refrigeración. Este procedimiento se realizó por triplicado, tanto para partes aéreas, como para inflorescencias y hojas destiladas por separado.

4.4. Obtención de extractos con solvente

El material vegetal se utilizó en estado seco (25 g), se picó y se mezcló en una solución de etanol (96%): agua (500 mL, 70:30% v/v), luego, se llevó a un baño de ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania) durante 1 h a 50 °C, con una frecuencia de 37 kHz. Se filtró al vacío y se rotaevaporó en el equipo *Heidolph (Hei-VAP, Advantage HL*, Chicago, EE. UU.). El extracto resultante, libre de solvente orgánico, se liofilizó en un equipo *Virtis Advance Plus (SP Scientific*, New York, EE. UU.), para eliminar el agua residual. Las extracciones de cada especie se realizaron por triplicado ($n=3$) y su rendimiento se calculó utilizando el peso inicial del material vegetal como referencia. Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de las inflorescencias, hojas y partes aéreas, que se almacenaron a 4 °C, protegidos de la luz para su posterior análisis por cromatografía líquida.

4.5. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Las muestras para análisis se prepararon a partir del AE (10 mg) disuelto en una solución de *n*-tetradecano (1 mL, 500 ppm en diclorometano). La muestra (2 µL) se inyectó a un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS). El análisis se realizó en un cromatógrafo GC 6890 *Plus (Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas MSD 5973 *Network (Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.) usando ionización por electrones (EI, 70 eV). El modo de inyección fue *split* (30:1) y la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C. La temperatura del horno cromatográfico se programó desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min), a una velocidad de 5 °C/min y luego, hasta 230 °C (10 min), a una velocidad de 5 °C/min. Cuando se utilizó la

columna DB-5MS, se añadió otra rampa de temperatura hasta 275 °C (15 min), a una velocidad de 10 °C/min (**Figura 14**). Las temperaturas de la cámara de ionización y del cuadrupolo fueron de 230 y 150 °C, respectivamente. El rango de masas fue m/z 45-450 u, con velocidad de adquisición de 3.58 *scan/s*. Los datos se procesaron en el *software MSDChemStation G1701DA* (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.). Se emplearon dos columnas: una apolar, DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.) con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_f , y una columna polar, DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), con fase estacionaria de poli(etilenglicol) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_f .

Figura 14.

Cromatógrafo de gases AT 6890 Plus, equipado con un detector selectivo de masas MS 5973 Network.



Nota. Fotografía tomada por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO, en el Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS de la UIS, Bucaramanga, 10 de mayo de 2023.

Como criterios de identificación se usaron los índices de retención lineales (IRL), calculados a partir de una mezcla de hidrocarburos (**Ecuación 2**), C₆-C₂₅. Los espectros de masas obtenidos se compararon con los de las bases de datos (Adams, 2007; Wiley, 2008; NIST, 2017) y con los de sustancias de referencia disponibles.

$$\text{IRL} = 100n + 100 \left[\frac{t_{R(x)} - t_{R(n)}}{t_{R(N)} - t_{R(n)}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

IRL: índice de retención lineal del compuesto de interés.

n y N: números de átomos de carbonos del *n*-alcano que eluye antes (n) o después (N) del compuesto de interés.

$t_{R(x)}$: tiempo de retención del compuesto de interés (x).

$t_{R(n)}$ y $t_{R(N)}$: tiempo de retención del *n*-alcano que eluye antes (n) o después del compuesto de interés.

4.6. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama

La cuantificación de los metabolitos presentes en el AE de las especies de *Piper* spp. se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890N (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un detector de ionización en llama (GC/FID), con una columna apolar DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.), con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm, d_f , idéntica a la descrita en el análisis por GC/MS, así como otras variables y parámetros de gas de arrastre, su flujo y la programación de temperatura del horno cromatográfico (**Figura 15**). El AE se inyectó bajo en misma cantidad que para el

análisis por GC/MS. La cuantificación se realizó usando el método del estándar interno.

Figura 15.

Cromatógrafo de gases AT 6890N, acoplado a un detector de ionización en llama (FID).



Nota. Fotografía tomada por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO, en el Laboratorio de Instrumentación Analítica CROM-MASS de la UIS, Bucaramanga, 10 de mayo de 2023.

4.7. Análisis de extractos con solvente por cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución UHPLC/ESI⁺/Orbitrap-HRMS

Los extractos hidroalcohólicos de *Piper* spp. se pesaron (20 mg) y se disolvieron en fase móvil (1 mL) metanol-agua 50:50 (0.1 % de ácido fórmico y 5 mM de formiato de amonio). El análisis de los extractos se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia *VanquishTM* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.) UHPLC/ESI-*Orbitrap*-MS, equipado con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un automuestreador (10 °C) y un compartimento de columna controlado

termostáticamente (40 °C). La separación cromatográfica se realizó en una columna *Zorbax Eclipse XDB C₁₈* (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.), 50 mm de longitud x 2.1 mm D.I., tamaño de partícula de 1.8 µm. El caudal de la fase móvil fue de 300 µL/min y contenía fase móvil: (A) agua (0.1 % ácido fórmico + 5 mM formiato de amonio) y (B) MeOH (0.1% ácido fórmico + 5 mM formiato de amonio). La condición de gradiente inicial fue 100 % A, que cambió linealmente a 100 % B en 8 min, se mantuvo durante 5 min, volvió a 100 % A en 1 min, y así permaneció durante 4 min. El volumen de inyección fue de 2 µL. El cromatógrafo líquido fue conectado a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización con calentamiento (HESI-II). El voltaje de capilar fue 3.5 kV. La temperatura del nebulizador se fijó en 350 °C y la temperatura del capilar en 320 °C. El gas de secado y el gas auxiliar (N₂) se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno (pureza >99 %) se obtuvo de un generador (NM32LA, *Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). Los iones inyectados a la celda HCD (*Higher-Energy Collision Dissociation Cell*), después de su almacenamiento en *C-trap*, se fragmentaron con energías de colisión normalizadas por pasos de 10 eV a 70 eV. El rango de masas escaneado en el espectrómetro de masas fue *m/z* 80-1000 (**Figura 16**).

Figura 16.

Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia Vanquish™ acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive.



Nota. Fotografía por Darlyng Fernanda Poveda Carreño, Laboratorio Alexander MAKÀROV de CROM-MASS, UIS, Bucaramanga, 10 de mayo de 2023.

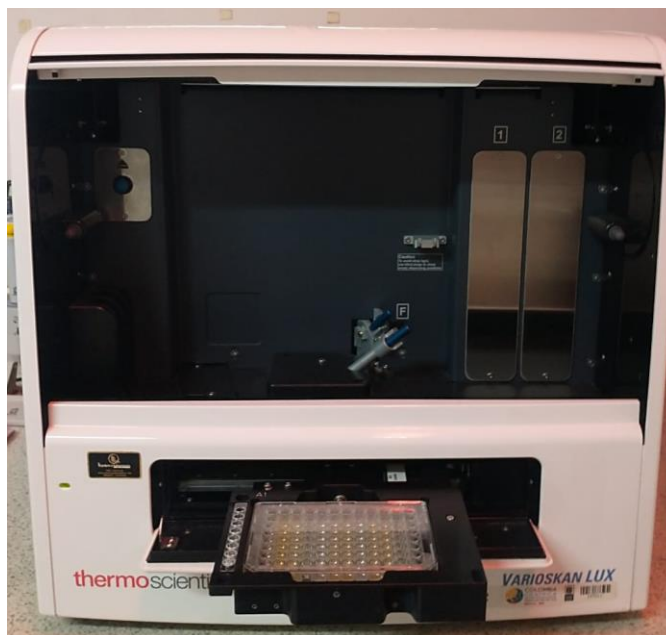
Los datos se obtuvieron y analizaron con el software *Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ Chromatography Data System (CDS)*, versión 7.2, y el software *Thermo Xcalibur 3.1 (Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.)*. La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención (t_R), espectros de masas, relaciones isotópicas y fórmulas moleculares exactas con los de las sustancias-patrón disponibles y con los de las bases de datos HMDB 4.0 y *MassBank*. Los espectros de masas se analizaron en modo de adquisición de iones seleccionados (SIM), se adquirieron en los modos de ionización de iones positivos o negativos. La cuantificación se realizó por el método de estándar interno, se expresaron como relación A_i/A_{istd} , usando la sustancia de referencia miricetina ($\geq 99\%$).

4.8. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS⁺

Se evaluó la capacidad antioxidante de los AE y de los extractos de las tres especies de *Piper* spp. para capturar el catión-radical ABTS⁺ mediante el procedimiento descrito por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones. Las mediciones se realizaron un espectrofotómetro *Varioskan LUX VL0000D0* (*Thermo Scientific*, República de Singapur, Asia), con microplacas de poli(estireno) de 96 pozos, a una longitud de onda de $\lambda=750$ nm y una temperatura de 25 °C (**Figura 17**).

Figura 17.

Espectrofotómetro Varioskan LUX VL0000D0.



Nota. Fotografía tomada por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el complejo CENIVAM-UIS, Bucaramanga, 23 de mayo de 2023.

El ABTS (7 mM) y el PDS (2.45 mM) se mezclaron y sonificaron (30 min), la mezcla se almacenó a 4 °C (24 h), en ausencia de luz. Posteriormente se tomó el ABTS^{•+} para diluirlo en un *buffer* de acetato de sodio (pH 4.5) hasta lograr una absorbancia de 0.70 ± 0.20 , esta solución se almacenó a 4 °C durante 30 min antes de ser utilizada.

Los AE y los extractos se pesaron (60 mg) y se diluyeron en 1 mL de etanol, se adicionó el catión-radical (190 µL) a las diluciones de las muestras en etanol (10 µL), posteriormente, se agitó durante 2 min, a 25 °C, y se registró la absorbancia a $\lambda=750$ nm, durante 60 min, tiempo después del cual se determinó el porcentaje de inhibición. La capacidad antioxidante se determinó a partir de una curva de calibración con Trolox[®] (50-550 µM). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 3**. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de µmol Trolox[®]/g de extracto.

$$\text{Inhibición, \%} = \left(\frac{A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{blanco}}} \right) \times 100$$

Ecuación 3




5. Resultados y discusión

5.1. Identificación botánica

En la **Tabla 2**, se muestra información sobre la identificación botánica de las especies *P. aduncum*, *P. dilatatum* y *P. peltatum*, se incluyen detalles como la descripción de la especie, su nombre común, el número de *voucher* y posibles sinonimias asociadas.

Tabla 2.

Especies identificadas *P. aduncum*, *P. peltatum* y *P. dilatatum*.

Especie	Sinónimos	Nº <i>voucher</i>	Nombre común	Descripción	Fotografías
<i>Piper aduncum</i> L	<i>P. celtidifolium</i> , <i>P. disparispicum</i> , <i>P. elongatifolium</i> .	Herbario UIS 22033	Matico-cordoncillo, hierba del soldado (Gupta <i>et al.</i> , 2013a).	Arbusto de 3-7 m de altura, con inflorescencias curvadas de color amarillo claro y marrón al madurar.	
<i>Piper dilatatum</i> Rich.	<i>P. dilatatifolium</i> , <i>P. ignacioanum</i> .	Herbario UIS 22075	Cordoncillo (Gupta <i>et al.</i> , 2013a).	Arbusto de 2-5 m de altura, con inflorescencias curvadas de color amarillo claro y marrón al madurar.	
<i>Piper peltatum</i> L	<i>P. scutiphylum</i> , <i>P. ottonis</i> .	Herbario UIS 22204	Hierba de Santa María, hoja de corazón (Gupta <i>et al.</i> , 2013a).	Arbustos de 1-3 m de altura, inflorescencias de color verde claro y marrón al madurar.	

Nota. Las imágenes fueron tomadas por Darlyng Fernanda POVEDA CARREÑO en el jardín experimental de CENIVAM-UIS, Bucaramanga, 23 de mayo de 2023.

5.2. Caracterización química de los aceites esenciales de las especies *Piper* spp.

En la **Tabla 3** se muestran los rendimientos obtenidos de los AE de las partes aéreas, hojas e inflorescencias de *P. aduncum*, *P. peltatum* y *P. dilatatum*. El AE destilado de la especie *P. aduncum*, por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), fue un líquido de color amarillo claro con un olor característico a la pimienta. Los rendimientos obtenidos para los AE de esta especie variaron entre 0.16% y 0.27%. En un estudio realizado por Navickiene *et al.* (2006) sobre *P. aduncum* en estado seco se reportaron rendimientos de destilación más altos para hojas, frutos y tallos con valores de 2.0%, 2.5% y 0.5%, respectivamente. Existen investigaciones previas realizadas con otras especies del género *Piper* que indican que el proceso de secado del material vegetal puede influir sobre el rendimiento y la calidad de los AE obtenidos.

En el caso de la especie *P. peltatum* no se obtuvo AE del material vegetal en estado fresco, sin embargo, se destiló el material vegetal en estado seco y se obtuvo un rendimiento [0.03% p/p], menor que el reportado por Pino *et al.* (2004) de material vegetal seco de hojas de *P. peltatum* (syn. *P. peltata*) [0.1%]. Por otro lado, los AE de *P. dilatatum* son semi-sólidos de color blanco y alcanzaron rendimientos entre 0.14% y 0.19%. Andrade *et al.* (2011) en su estudio sobre la especie *P. dilatatum*, reportaron rendimientos del AE entre 0.2% y 1.2%, valores muy similares a los obtenidos en este trabajo.

Tabla 3.

Rendimientos de los aceites esenciales de P. aduncum, P. peltatum y P. dilatatum.

Especie	Material vegetal	Rendimiento, % p/p \pm s ($n = 3$)		
		Hojas	Inflorescencias	Partes aéreas
<i>Piper aduncum</i>	Fresco	0.16 \pm 0.02	0.272 \pm 0.005	0.24 \pm 0.03
<i>Piper peltatum</i>	Seco	-	-	0.03*
<i>Piper dilatatum</i>	Fresco	0.19 \pm 0.06	0.145 \pm 0.007	0.15 \pm 0.01

* $n = 1$

5.2.1. *Piper aduncum*

Los metabolitos secundarios volátiles presentes en los AE de *P. aduncum*, obtenidos por MWHD de partes aéreas, hojas e inflorescencias, se analizaron por GC/MS, utilizando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos. Área de rechazo del pico fue igual a 0.1 y umbral de integración, *threshold*, 16.5. Los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC/MS en una columna apolar (DB-5MS) del AE de *P. aduncum*, se muestran en los **Figura 18**. Se realizó una comparación de los espectros de masas y los índices de retención lineales experimentales calculados para columnas con fases estacionarias apolar y polar, con los reportados en la literatura (Babushock *et al.* 2011), bases de datos (Adams, NIST y Wiley) y con las sustancias de referencia disponibles en el laboratorio.

En la **Tabla 4**, se reportan los compuestos identificados en los AE, en total se detectaron 66 compuestos con áreas relativas superiores al 0.1% y se identificaron 58 compuestos. Los resultados indicaron que las partes aéreas y las hojas presentaron una mayor cantidad de hidrocarburos monoterpénicos, representando un 45% y 41%, respectivamente. Por otro lado, en las inflorescencias se encontró una mayor cantidad de monoterpenos

oxigenados, representando un 58% del total de compuestos identificados. También, se observaron diferencias entre los AE de hojas e inflorescencias, específicamente, en cuanto a los hidrocarburos sesquiterpénicos y los sesquiterpenos oxigenados. Estos resultados sugieren la posibilidad de que la composición química del AE de las partes aéreas de la planta pueda derivar predominantemente de las hojas o de las inflorescencias y no de tallos, indicando que estas partes de la planta podrían desempeñar un papel importante en la formación de los compuestos de los AE.

Figura 18.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los aceites esenciales de *P. aduncum* **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI 70 eV). Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la **Tabla 4.**

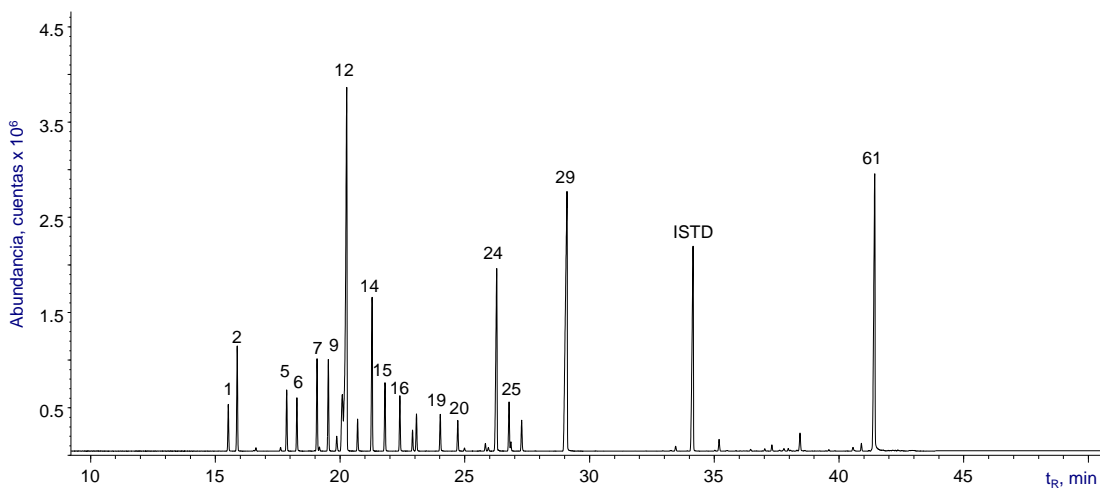
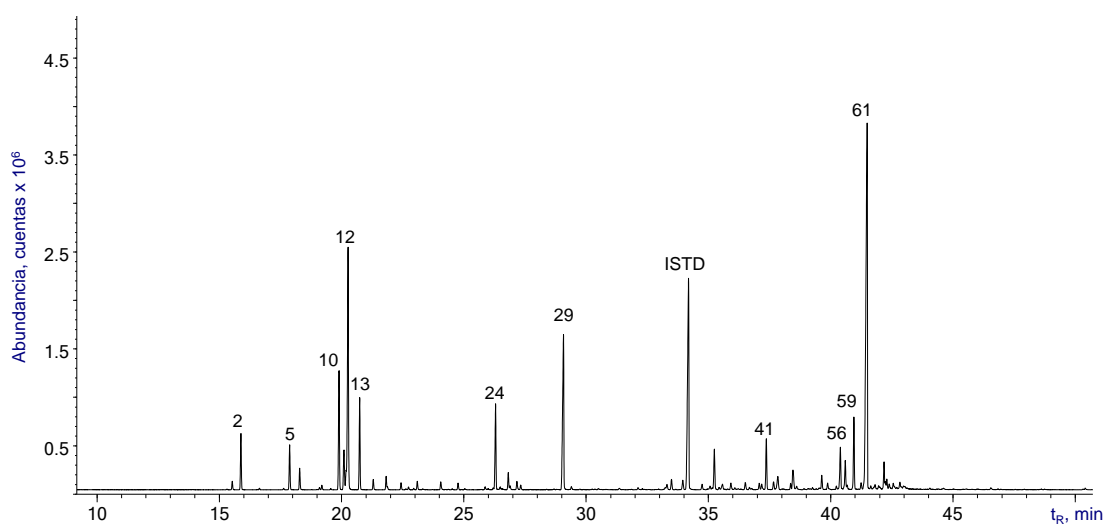
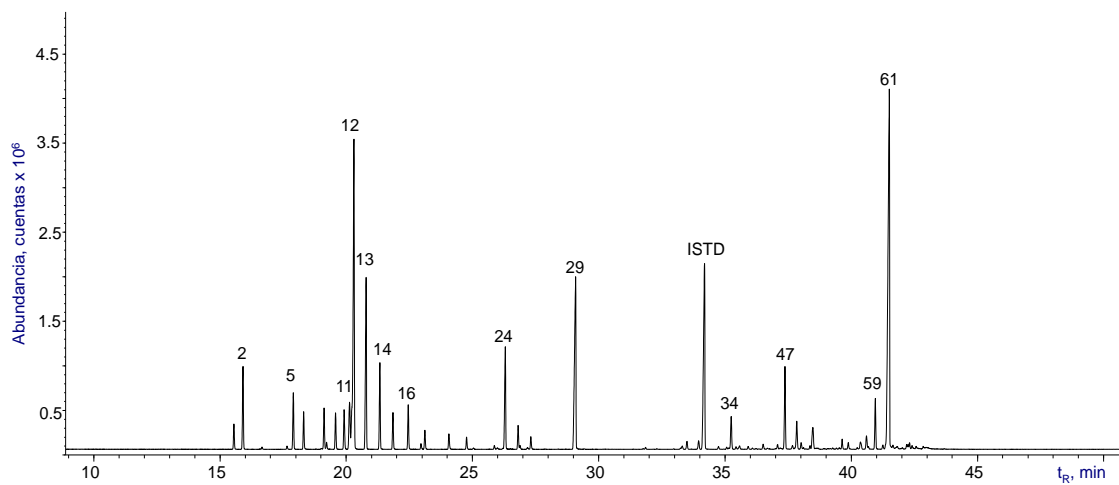


Tabla 4.Composiciones químicas obtenidas por GC/MS de los aceites esenciales destilados de *P. aduncum*.

N° Fig. 18	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (IRL)				Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$, (n = 3)		
			DB-5MS		DB-WAX		Partes aéreas	Hojas	Inflorescencias
			Exp	Lit	Exp	Lit			
1	α -Thujeno ^{a,b}	HM	927	930 ^d	1024	1026 ^e	1.0 \pm 0.1	0.40 \pm 0.07	1.0 \pm 0.2
2	α -Pinoeno ^{a,b,c}	HM	935	939 ^d	1019	1025 ^e	3.0 \pm 0.4	3.0 \pm 0.8	3.1 \pm 0.4
3	Canfeno ^{a,b,c}	HM	952	954 ^d	1062	1068 ^e	-	-	0.10 \pm 0.01
4	Sabineno ^{a,b,c}	HM	975	975 ^d	1119	1122 ^e	-	-	0.13 \pm 0.01
5	β -Pinoeno ^{a,b}	HM	980	979 ^d	1106	1110 ^e	2.4 \pm 0.3	2.7 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2
6	β -Mirceno ^{a,b,c}	HM	989	990 ^d	1163	1161 ^e	1.70 \pm 0.06	1.4 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2
7	α -Felandreno ^{a,b,c}	HM	1008	1002 ^d	1163	1168 ^e	1.0 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	2.6 \pm 0.3
8	Δ^3 -Careno ^{a,b}	HM	1010	1011 ^d	1146	1147 ^e	0.30 \pm 0.04	0.2 \pm 0.2	0.12 \pm 0.01
9	α -Terpinoeno ^{a,b,c}	HM	1019	1017 ^d	1178	1177 ^e	1.0 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2	2.5 \pm 0.3
10	<i>p</i> -Cimeno ^{a,b,c}	HM	1027	1024 ^d	1271	1270 ^e	2.0 \pm 0.6	5.5 \pm 0.9	0.55 \pm 0.09
11	Limoneno ^{a,b,c}	HM	1032	1029 ^d	1198	1198 ^e	3.00 \pm 0.09	3.0 \pm 0.2	6.0 \pm 0.7
12	1,8-Cineol ^{a,b,c}	MO	1036	1037 ^d	1208	1211 ^e	15.7 \pm 0.6	16 \pm 2	17.0 \pm 0.4
13	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	HM	1047	1050 ^d	1252	1250 ^e	8.0 \pm 0.4	7 \pm 3	1.0 \pm 0.1
14	γ -Terpinoeno ^{a,b,c}	HM	1061	1059 ^d	1245	1245 ^e	3.0 \pm 0.6	0.7 \pm 0.6	5.0 \pm 0.5
15	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno ^{a,b}	MO	1073	1070 ^d	1465	1460 ^e	1.60 \pm 0.10	0.7 \pm 0.1	2.5 \pm 0.2
16	Terpinoleno ^{a,b}	HM	1088	1088 ^d	1282	1282 ^e	1.6 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1
17	Linalol ^{a,b,c}	MO	1100	1096 ^d	1546	1543 ^e	0.30 \pm 0.02	-	0.80 \pm 0.01
18	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno ^{a,b}	MO	1104	1098 ^d	1550	1549 ^e	0.80 \pm 0.04	0.40 \pm 0.07	1.4 \pm 0.1
19	<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol ^{a,b}	MO	1128	1121 ^d	-	1614 ^e	0.70 \pm 0.05	0.3 \pm 0.2	1.30 \pm 0.05
20	<i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol ^{a,b}	MO	1146	1140 ^d	1629	1606 ^f	0.54 \pm 0.02	3 \pm 2	1.10 \pm 0.02

Tabla 4. Continuación.

21	Alcanfor ^{a,b}	MO	1153	1146 ^d	1523	1515 ^e	-	-	0.12 ± 0.01
22	δ-Terpineol ^{a,b}	MO	1174	1166 ^d	1673	1679 ^e	-	-	0.33 ± 0.01
23	Borneol ^{a,b}	MO	1177	1169 ^d	1704	1700 ^e	-	-	0.130 ± 0.002
24	Terpinen-4-ol^{a,b,c}	MO	1186	1177 ^d	1605	1601 ^e	5.5 ± 0.3	3 ± 3	9.6 ± 0.1
25	α-Terpineol ^{a,b,c}	MO	1199	1190 ^d	1699	1694 ^e	1.0 ± 0.3	0.5 ± 0.5	1.70 ± 0.04
26	N.I. (Figura A 4) ^b	-	1208	-	1820	-	-	8 ± 8	-
27	trans-Piperitol ^{a,b}	MO	1201	1208 ^d	1680	1710 ^e	0.09 ± 0.09	-	0.8 ± 0.4
28	cis-Piperitol ^{a,b}	MO	1212	1194 ^e	1743	1750 ^e	0.4 ± 0.3	-	0.6 ± 0.5
29	Piperitona^{a,b}	MO	1262	1252 ^d	1735	1730 ^e	13.0 ± 0.6	8 ± 7	21.0 ± 0.2
30	Ciclosativeno ^{a,b}	HS	1377	1374 ^f	1485	1483 ^e	0.08 ± 0.08	-	-
31	α-Copaeno ^{a,b}	HS	1381	1376 ^d	1494	1491 ^e	0.30 ± 0.06	0.4 ± 0.4	0.15 ± 0.04
32	β-Elemenol ^{a,b}	HS	1394	1390 ^d	1593	1591 ^e	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.4	-
33	α-Gurjuneno ^{a,b}	HS	1417	1409 ^d	1532	1529 ^e	0.5 ± 0.5	1 ± 1	-
34	trans-β-Cariofileno ^{a,b,c}	HS	1431	1427 ^f	1602	1599 ^e	1.7 ± 0.2	1 ± 1	0.40 ± 0.08
35	β-Santaleno ^{a,b}	HS	1465	1459 ^d	1650	1644 ^e	-	-	0.04 ± 0.04
36	β-Copaeno ^{a,b}	HS	1441	1432 ^d	-	1576 ^e	0.70 ± 0.09	0.7 ± 0.5	-
37	Aromadendreno ^{a,b,c}	HS	1450	1441 ^d	1612	1620 ^e	0.1 ± 0.1	0.50 ± 0.04	-
38	α-Humuleno ^{a,b,c}	HS	1467	1468 ^f	1673	1667 ^e	0.30 ± 0.04	0.60 ± 0.04	-
39	N.I. (Anexo, Figura A 5) ^b	HS	1481	-	1760	-	-	-	0.1 ± 0.1
40	γ-Muuroleno ^{a,b}	HS	1483	1478 ^d	1692	1690 ^e	0.30 ± 0.05	1.5 ± 1.1	0.02 ± 0.02
41	Germacreno D^{a,b,c}	HS	1492	1481 ^d	1714	1708 ^e	3.0 ± 0.4	2.0 ± 1.8	0.15 ± 0.06
42	Viridifloreno ^{a,b}	HS	1499	1496 ^d	-	1708 ^e	-	0.3 ± 0.3	-

Tabla 4. Continuación.

43	<i>cis</i> - β -Guaieno ^{a,b}	HS	1505	1493 ^d	-	1696 ^e	-	1.0 \pm 0.3	0.06 \pm 0.06
44	α -Muuroleno ^{a,b}	HS	1505	1500 ^d	-	1726 ^f	-	-	0.4 \pm 0.4
45	Cadina-3,9-dieno ^{a,b}	HS	1511	1518 ^f	-	1720 ^f	-	-	0.12 \pm 0.01
46	Valenceno ^{a,b}	HS	1500	1496 ^d	-	1729 ^e	0.17 \pm 0.01	-	-
47	Biciclogermacreno ^{a,b}	HS	1505	1500 ^d	-	1735 ^e	1.0 \pm 0.3	-	-
48	N.I. (Anexo, Figura A 6) ^b	HS	1510	-	-	-	0.2 \pm 0.2	-	-
49	γ -Cadineno ^{a,b}	HS	1522	1513 ^d	1760	1760 ^f	0.5 \pm 0.3	0.4 \pm 0.2	-
50	δ -Cadineno ^{a,b}	HS	1525	1522 ^d	1756	1763 ^e	0.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	-
51	Miristicina ^{a,b}	FN	1526	1518 ^d	2265	2261 ^e	0.2 \pm 0.3	-	0.4 \pm 0.3
52	N.I. (Anexo, Figura A 7) ^b	-	1562	-	2039	-	-	-	0.10 \pm 0.08
53	<i>trans</i> -Nerolidol ^{a,b,c}	SO	1563	1563 ^d	2039	2036 ^e	0.2 \pm 0.1	-	0.05 \pm 0.05
54	N.I. (Anexo, Figura A 8) ^b	SO	1563	-	-	-	-	0.5 \pm 0.4	-
55	Germacreno B ^{a,b}	HS	1571	1559 ^d	1832	1823 ^e	0.3 \pm 0.3	1.0 \pm 0.8	-
56	Espatuleno ^{a,b}	SO	1588	1578 ^d	-	2127 ^e	0.50 \pm 0.08	2.0 \pm 1.5	-
57	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	SO	1595	1583 ^d	1985	1986 ^e	0.60 \pm 0.03	2.0 \pm 0.3	-
58	N.I. (Anexo, Figura A 9) ^b	HS	1594	-	-	-	-	-	0.1 \pm 0.1
59	Viridiflorol ^{a,b}	SO	1608	1592 ^d	2083	2090 ^e	1.90 \pm 0.08	4.0 \pm 0.3	0.20 \pm 0.08
60	Ledol ^{a,b}	SO	1619	1612 ^f	-	2039 ^e	0.30 \pm 0.01	0.40 \pm 0.03	-
61	Dilapiol^{a,b,c}	FN	1628	1620 ^d	2361	2346 ^e	17.0 \pm 0.2	20 \pm 4	10 \pm 3
62	N.I. (Anexo, Figura A 10) ^b	SO	1652	-	-	-	-	2 \pm 1	-
63	α -Muurolol ^{a,b}	SO	1657	1642 ^d	-	-	-	0.1 \pm 0.2	-
64	4-Murolen-10-ol ^{a,b}	SO	1653	1653 ^f	-	2187 ^f	0.46 \pm 0.02	-	-

Tabla 4. Continuación.

65	α -Cadinol ^{a,b}	SO	1655	1654 ^d	-	2227 ^e	0.40 \pm 0.06	0.1 \pm 0.1	-
66	N.I. (Anexo, Figura A 11) ^b	SO	1676	-	-	-	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	-
HM	Hidrocarburos monotérmicos						29.0 \pm 0.6	25 \pm 2	28.0 \pm 0.7
MO	Monoterpenos oxigenados						40.0 \pm 0.6	37 \pm 6	58.0 \pm 0.5
FN	Fenilpropanoides						17.0 \pm 0.2	18 \pm 2	12 \pm 2
HS	Hidrocarburos sesquiterpénicos						10.0 \pm 0.5	12 \pm 2	1.4 \pm 0.3
SO	Sesquiterpeno oxigenado						4.5 \pm 0.1	9 \pm 1	0.20 \pm 0.06

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales medidos en las columnas DB-WAX y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD), *i.e.*, α -pineno (98%, IRL_{DB-5MS}= 937, IRL_{DB-WAX}=1024), canfeno (95%, IRL_{DB-5MS}= 954, IRL_{DB-WAX}= 1068), sabineno (95%, IRL_{DB-5MS}= 976, IRL_{DB-WAX}= 1124), β -mirreno (94%, IRL_{DB-5MS}= 989, IRL_{DB-WAX}= 1165), α -felandreno (98%, IRL_{DB-5MS}= 1007, IRL_{DB-WAX}= 1168), α -terpineno (97%, IRL_{DB-5MS}= 1020, IRL_{DB-WAX}= 1184), *p*-cimenol (99%, IRL_{DB-5MS}= 1028, IRL_{DB-WAX}= 1274), limoneno (97%, IRL_{DB-5MS}= 1033, IRL_{DB-WAX}= 1202), 1,8-cineol (99%, IRL_{DB-5MS}= 1036, IRL_{DB-WAX}= 1215), γ -terpineno (96%, IRL_{DB-5MS}= 1066, IRL_{DB-WAX}= 1259), linalol (97%, IRL_{DB-5MS}= 1102, IRL_{DB-WAX}= 1551), terpinen-4-ol (95%, IRL_{DB-5MS}= 1187, IRL_{DB-WAX}= 1611), α -terpineol (90%, IRL_{DB-5MS}= 1202, IRL_{DB-WAX}= 1704), *trans*- β -cariofileno (98.5%, IRL_{DB-5MS}= 1434, IRL_{DB-WAX}= 1611), aromadendreno (99%, IRL_{DB-5MS}= 1452, IRL_{DB-WAX}= 1620), α -humuleno (96%, IRL_{DB-5MS}= 1470, IRL_{DB-WAX}= 1683), germacreno D (90%, IRL_{DB-5MS}= 1490, IRL_{DB-WAX}= 1716), *trans*-nerolidol (96%, IRL_{DB-5MS}= 1534, IRL_{DB-WAX}= 2261), óxido de cariofileno (95%, IRL_{DB-5MS}= 1598, IRL_{DB-WAX}= 1996) y dilapiol (95%, IRL_{DB-5MS}= 1627, IRL_{DB-WAX}= 2359) por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, >95% de concordancia) y tiempos de retención (t_r).

d Adams (2007).

e Babushok *et al.* (2011).

f NIST (2017).

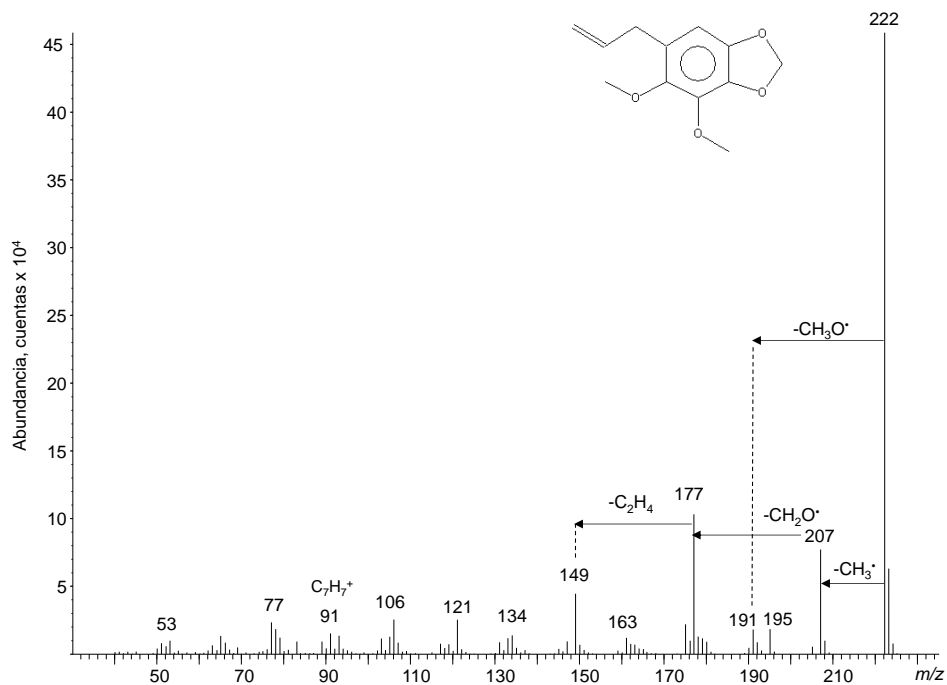
En un estudio realizado por Rali *et al.* (2007), los autores compararon las composiciones químicas de los AE destilados de las hojas, tallos y frutos de *P. aduncum*, encontrando una mayor cantidad de monoterpenos en los AE de frutos y tallos (85.1% y 66.9%, respectivamente). Piperitona (6.7%), dilapiol (43.3%) y *trans*- β -ocimeno (2.5%) fueron los compuestos mayoritarios. Pino *et al.* (2004) reportaron el dilapiol (82.2%) como el compuesto mayoritario del AE de hojas secas de *P. aduncum*.

Los compuestos mayoritarios en los AE de *P. aduncum* destilados de partes aéreas, hojas e inflorescencias fueron el 1,8-cineol (15.7%, 16.0% y 17.0%), *trans*- β -ocimeno (8.0%, 7.0% y 1.0%), terpinen-4-ol (5.5%, 3.0% y 9.6%), dilapiol (17.0%, 20.0% y 10.0%) y piperitona (13.0%, 8.0% y 21.0%). Se destacó la presencia de dilapiol, y miristicina, compuestos de gran interés debido a sus propiedades biológicas, que van desde efectos psicotrópicos hasta propiedades antimicrobiana, antioxidante y citotóxica. Estos compuestos fenólicos poseen una estructura relativamente simple, lo que permite sintetizar nuevos análogos con actividades biológicas potenciadas (Parise *et al.*, 2011).

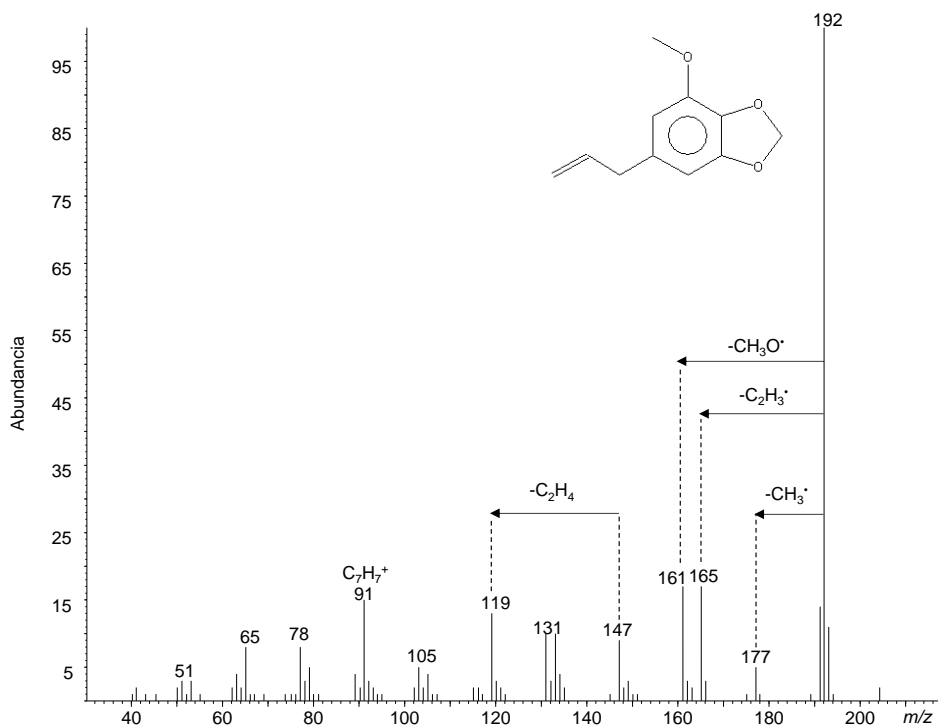
La ruta biosintética de los fenilpropanoides sucede a través de la ruta del ácido shikímico, que es muy importante para originar compuestos fenólicos. En los espectros de masas del dilapiol (**Figura 19**) y la miristicina (**Figura 20**) se observaron pérdidas características de radicales CH_3^\bullet y $\text{CH}_3\text{O}^\bullet$; junto con la pérdida del grupo carbonilo (CO).

Figura 19.

*Espectro de masas del compuesto dilapiol $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en el aceite esencial de P. aduncum. $[\text{M}^+ \cdot]$ m/z 222; $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ m/z 207, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$ m/z 191, $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{CH}_2\text{O}]^+$ m/z 177. Véase pico cromatográfico N°61 en la **Tabla 4**.*

**Figura 20.**

Espectro de masas del compuesto miristicina $C_{11}H_{12}O_3$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en los aceites esenciales de *P. aduncum*. $[M^+ \cdot]$ m/z 192; $[M-CH_3]^+$ m/z 177; $[M-C_2H_3]^+$ m/z 165, $[M-CH_3O]^+$ m/z 161, $C_7H_7^+$ m/z 91. Véase pico cromatográfico N°51 en la **Tabla 4**.



La cuantificación de los componentes en los AE destilados de *P. aduncum* se realizó mediante la relación de área del compuesto (A_i) y la del patrón interno (A_i/A_{istd}) de los picos cromatográficos obtenidos por GC/FID en una columna con fase estacionaria apolar (**Anexos, Tabla A 1, Figura A 1**). Se evidenció que la cantidad más alta de dilapiol ($A_i/A_{istd} = 1.10 \pm 0.08$) se registró en el AE destilado de partes aéreas, otros compuestos como la piperitona se detectó en mayor cantidad en las inflorescencias ($A_i/A_{istd} = 1.6 \pm 0.1$), comparado con la de las hojas ($A_i/A_{istd} = 0.4 \pm 0.3$).

Adicionalmente, se destiló por MWHD el aceite esencial de las raíces de la especie *P. aduncum* y se logró un rendimiento de 0.50 ± 0.09 % p/p ($n = 3$). En el AE se encontraron compuestos como dilapiol ($95.0 \pm 0.5\%$), miristicina ($4.0 \pm 0.3\%$), canfeno ($0.4 \pm 0.1\%$), Δ^3 -careno ($0.5 \pm 0.2\%$), *trans*- β -cariofileno ($0.1 \pm 0.2\%$) y apiol ($0.4 \pm 0.07\%$) (**Anexos, Tabla A 2**). Los perfiles cromatográficos, obtenidos en la columna apolar (DB-5MS) de las corridas por GC/MS y GC/FID de los AE estudiados se encuentran en los **Anexos, Figura A 2**. La cantidad alta de dilapiol en el AE de raíces ($A_i/A_{istd} = 10.0 \pm 0.1$), puede indicar que las plantas acumulan ciertos compuestos para su almacenamiento o liberación gradual en respuesta a los cambios ambientales y las raíces, al estar en contacto directo con el suelo y su microbiota pueden requerir una mayor cantidad de dilapiol como mecanismo de defensa de la planta.

El dilapiol tiene diversas funciones beneficiosas para la planta, puede actuar como insecticida y repelente contra herbívoros, además, posee una actividad antimicrobiana alta. Estas propiedades del dilapiol pueden ayudar a la planta a defenderse contra depredadores y patógenos, asegurando así su supervivencia y el desarrollo en su entorno natural. En la medicina folclórica el té elaborado de las raíces de *P. aduncum* se usa para tratar la diarrea,

disentería, náuseas, úlceras, infecciones del aparato urinario y trastornos hemorrágicos (Guerrini *et al.* 2009).

5.2.2. *Piper peltatum*

Para esta especie no se obtuvo AE del material vegetal fresco, en cambio, se logró destilar muy poco aceite esencial de plantas secas. El AE obtenido se analizó por GC/MS y GC/FID; en la **Figura 21** aparecen los perfiles cromatográficos. En el AE de *P. peltatum* se detectaron 27 compuestos, con áreas cromatográficas relativas mayores que 0.1% (**Tabla 5**). Los sesquiterpenos y los compuestos oxigenados fueron los más abundantes, representando el 61% y el 22% respectivamente, en términos de cantidad relativa (A%).

El *trans*- β -cariofileno (25.3%), germacreno D (17.4%), oxido de cariofileno (7.3%), biciclogermacreno (7.5%) y fitol (16.4%) se encontraron en el AE de *P. peltatum* en cantidades relativamente altas. Estos compuestos también han sido reportados en la literatura científica como los principales componentes del AE destilado de plantas secas de *P. peltatum*: por ejemplo, Pino *et al.* (2004) detectaron en el AE de las hojas de *P. peltatum* destiladas en estado seco, germacreno D (2.8%), epóxido de humuleno II (2.6%), espatulenol (9.0%) y óxido de cariofileno (22.9%), al igual que lo reportado en este estudio.

Figura 21.

Perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de material vegetal seco de *P. peltatum* obtenidos por: **A.** GC/MS; **B.** GC/FID. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de picos cromatográficos en la **Tabla 5**.

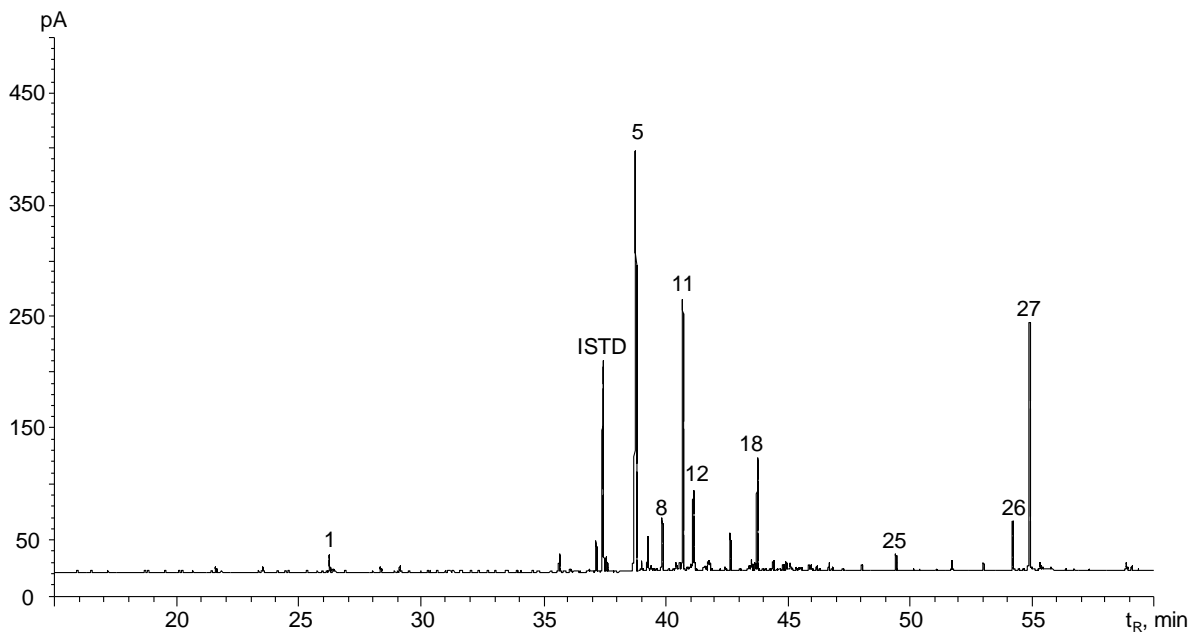
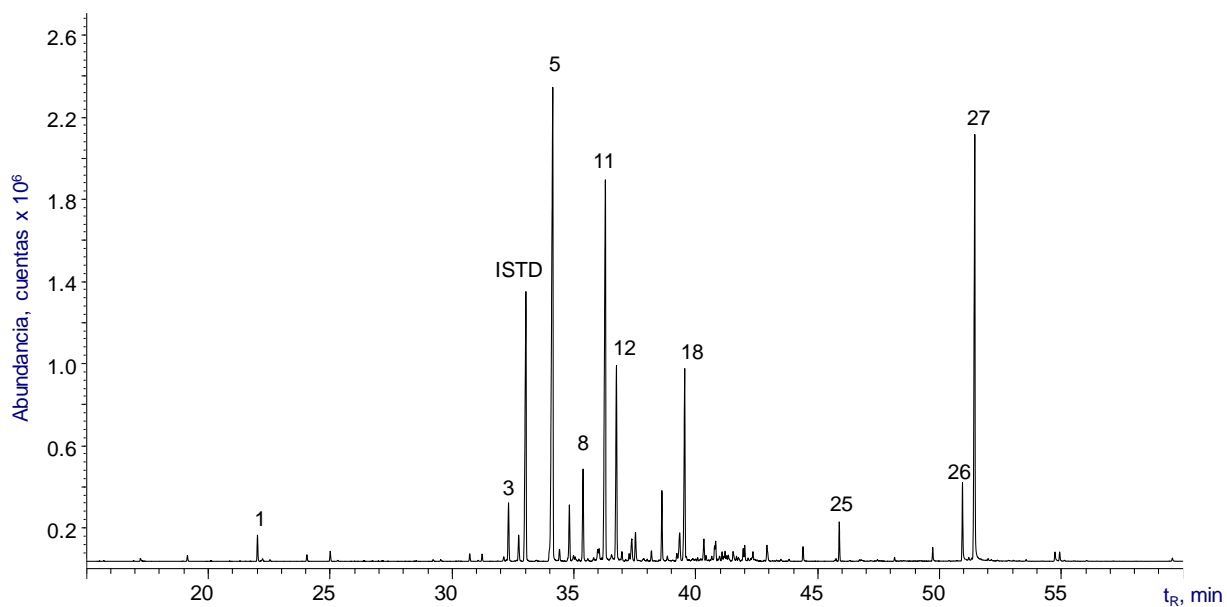


Tabla 5.Composición química obtenida por GC/MS y GC/FID del aceite esencial destilado de partes aéreas de *P. peltatum*.

N° Fig. 21	Compuesto	Familia	Índices de retención lienes (IRL)				Cantidad relativa, % (n =1)
			DB-5MS		DB-WAX		
			Exp	Lit	Exp	Lit	Partes aéreas
1	Linalol ^{a,b,c}	MO	1100	1096 ^d	1545	1543 ^e	0.7
2	Borneol ^{a,b}	MO	1177	1169 ^d	1701	1700 ^e	0.3
3	α -Copaeno ^{a,b}	HS	1380	1376 ^d	1492	1491 ^e	2.2
4	β -Cubebeno ^{a,b}	HS	1392	1388 ^d	1539	1542 ^e	1.0
5	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b,c}	HS	1431	1427 ^f	1600	1599 ^e	25.3
6	β -Copaeno ^{a,b}	HS	1438	1432 ^d	1594	1580 ^e	0.5
7	Acetona de geranilo ^{a,b}	CO	1449	1451 ^e	1852	1854 ^e	2.0
8	α -Humuleno ^{a,b}	HS	1465	1468 ^f	1671	1667 ^e	3.2
9	γ -Muuroleno ^{a,b}	HS	1482	1478 ^d	1688	1690 ^e	0.4
10	<i>trans</i> - β -Ionona ^{a,b}	CO	1483	1487 ^d	-	1937 ^e	0.5
11	Germacreno D ^{a,b,c}	HS	1490	1481 ^d	1712	1708 ^e	17.4
12	Biciclogermacreno ^{a,b}	HS	1503	1500 ^d	1733	1735 ^e	7.5
13	δ -Cadineno ^{a,b}	HS	1523	1523 ^d	1756	1756 ^e	1.4
14	<i>cis</i> -Calameneno ^{a,b}	HS	1528	1529 ^d	1830	1835 ^e	1.1
15	α -Calacoreno ^{a,b}	HS	1549	1545 ^d	1914	1921 ^e	0.4
16	<i>trans</i> -Nerolidol ^{a,b}	SO	1563	1563 ^d	2037	2036 ^e	2.2
17	Espatuleno ^{a,b}	SO	1586	1578 ^d	2120	2127 ^e	1.6
18	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	SO	1593	1583 ^d	1982	1986 ^e	7.3
19	Epóxido de humuleno II ^{a,b}	SO	1620	1608 ^d	-	2047 ^e	1.6
20	1- <i>epi</i> -Cubebol ^{a,b}	SO	1636	1628 ^d	2061	2088 ^e	0.4

Tabla 5. Continuación.

21	α - <i>epi</i> -Muurolool ^{a,b}	SO	1652	1640 ^d	-	2186 ^e	1.5
22	Cadeleno ^{a,b}	HS	1681	1675 ^d	2219	2233 ^e	0.5
23	<i>cis, cis</i> -Farnesol ^{a,b}	SO	1693	1698 ^d	-	2324 ^e	0.6
24	Benzoato de bencilo ^{a,b,c}	SO	1776	1761 ^e	2494	2612 ^e	0.5
25	Trimetil-pentadecanona ^{a,b}	CO	1840	1847 ^f	2124	2110 ^f	1.1
26	Octadecanol ^{a,b}	CO	2088	2077 ^d	2497	2569 ^e	2.4
27	Fito ^{a,b}	CO	2109	2116 ^e	2495	2622 ^f	16.4
MO	Monoterpenos oxigenados						1
HS	Hidrocarburos sesquiterpénicos						61
CO	Compuestos oxigenados						22
SO	Sesquiterpenos oxigenados						16

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales medidos en las columnas DB-WAX y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD). *i.e.* linalol (97%, IRL_{DB-5MS}= 1102, IRL_{DB-WAX}= 1551), *trans*- β -cariofileno (98.5%, IRL_{DB-5MS}= 1434, IRL_{DB-WAX}= 1611), germacreno D (90%, IRL_{DB-5MS}= 1490, IRL_{DB-WAX}= 1716), óxido de cariofileno (95%, IRL_{DB-5MS}= 1598, IRL_{DB-WAX}= 1996), *trans*-nerolidol (96%, IRL_{DB-5MS}= 1534, IRL_{DB-WAX}= 2261) y benzoato de bencilo (99%, IRL_{DB-5MS}= 1780, IRL_{DB-WAX}= 2652) por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, grado de coincidencia >95%) y tiempos de retención (*t_r*)

d Adams (2007).

e Babushok *et al.* (2011).

f NIST (2017).

El *trans*- β -cariofileno es un sesquiterpeno volátil lipofílico presente en los AE de varias plantas; se ingiere comúnmente con alimentos vegetales y se usa como aditivo en cosméticos (Cronin, 1979). Este sesquiterpeno es abundante en el AE de *P. peltatum*, presenta actividades antimicrobiana, antioxidante, anestésica y antiinflamatoria, además, en un estudio realizado por Soares *et al.* (2013) sobre el potencial anticancerígeno de este compuesto presente en el AE de copaiba (40,9% en el 78,2% de sesquiterpenos totales en la muestra estudiada), resultó ser un ingrediente promisorio para el desarrollo de fitomedicamentos antileishmaniacos, aunque su mecanismo de acción actualmente aún no se conoce.

El germacreno D ha sido identificado en plantas angiospermas, gimnospermas y briófitas. Este compuesto puede ser un importante precursor para la biosíntesis de diferentes sesquiterpenos (Noge & Becerra, 2009). En un estudio realizado por Bülow & König (2000), se demostró que el germacreno D se isomeriza en condiciones ácidas dando lugar a una amplia variedad de hidrocarburos sesquiterpénicos naturales, entre los que se incluyen las estructuras con esqueleto de cadinano, muurolano y amorfano. Estos sesquiterpenos han sido ampliamente estudiados por su rol en la defensa contra herbívoros, el germacreno D podría estar involucrado en mecanismos de protección de las plantas contra el ataque de varios microorganismos y patógenos (Langenheim, 1994). Se han reportado estudios donde se demostró la actividad insecticida del germacreno D contra mosquitos, también, se ha observado que actúa como un repelente efectivo contra pulgones y garrapatas (Bruce *et al.* 2005).

5.2.3. *Piper dilatatum*

Los AE de *P. dilatatum*, destilados por MWHD de partes aéreas, hojas e inflorescencias, se analizaron por GC/MS, utilizando los siguientes parámetros de integración de los picos cromatográficos: área de rechazo del pico igual a 0.1 y umbral de integración, *threshold*: 17.0. Los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC/MS (columna DB-5MS) de las hojas, inflorescencias y partes aéreas de *P. dilatatum*, se muestran en la **Figura 22**. En la **Tabla 6** aparecen las composiciones químicas de los AE de *P. dilatatum*; se detectaron 43 compuestos, de los cuales se identificaron 34. Los compuestos no identificados pueden corresponder a los hidrocarburos sesquiterpénicos (M^+ , m/z 204) y sesquiterpenos oxigenados (M^+ , m/z 220 o m/z 222), considerando que la corrida cromatográfica se puede “dividir” en los diversos intervalos de tiempo de retención (t_R) característicos para distintas familias de sustancias típicas (terpenos) presentes en los AE (Stashenko & Martínez, 2009b).

Las composiciones químicas obtenidas son similares a las reportadas por Potzernheim *et al.* (2006), quienes detectaron como compuestos mayoritarios el *cis*- β -ocimeno (19.7%), *trans*- β -ocimeno (3.3%), germacreno D (1.5%) y β -cariofileno (3.0%), sustancias también encontradas en los AE de *P. dilatatum* estudiados en este trabajo. En otro estudio, realizado por Andrade *et al.* (2011), compararon las composiciones químicas de 12 AE de *P. dilatatum* recolectadas en el centro y noreste de Brasil, en estado seco, y encontraron metabolitos secundarios como α -pineno, β -pineno, *trans*- β -ocimeno, *trans*- β -cariofileno, *trans*-nerolidol y germacreno D, entre otros. Los autores concluyeron que existieron variaciones cuantitativas en los componentes reportados en las composiciones químicas de los AE bajo estudio debido a variaciones geográficas, climáticas, de suelos y micronutrientes.

Figura 22.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS de los aceites esenciales de *P. dilatatum* **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Véase la identificación de cada pico cromatográfico en la **Tabla 6.**

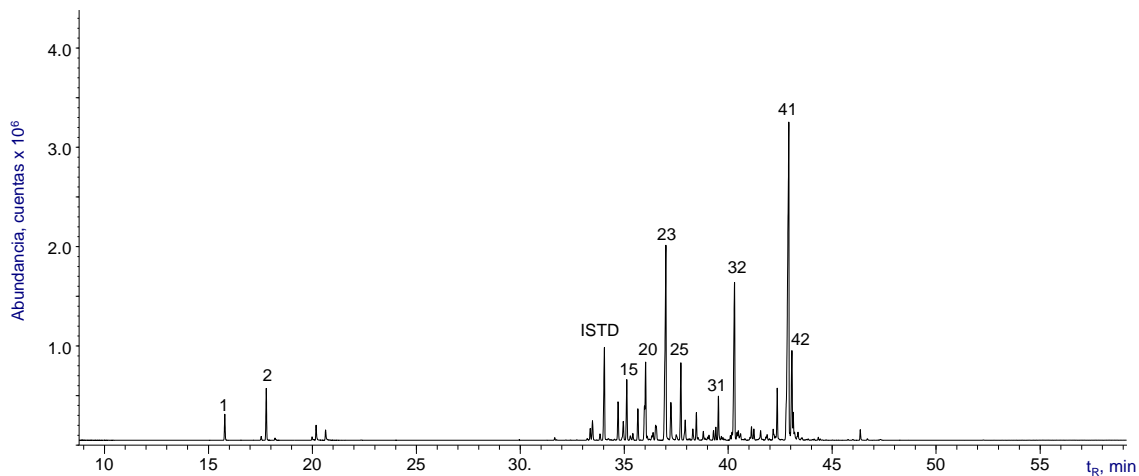
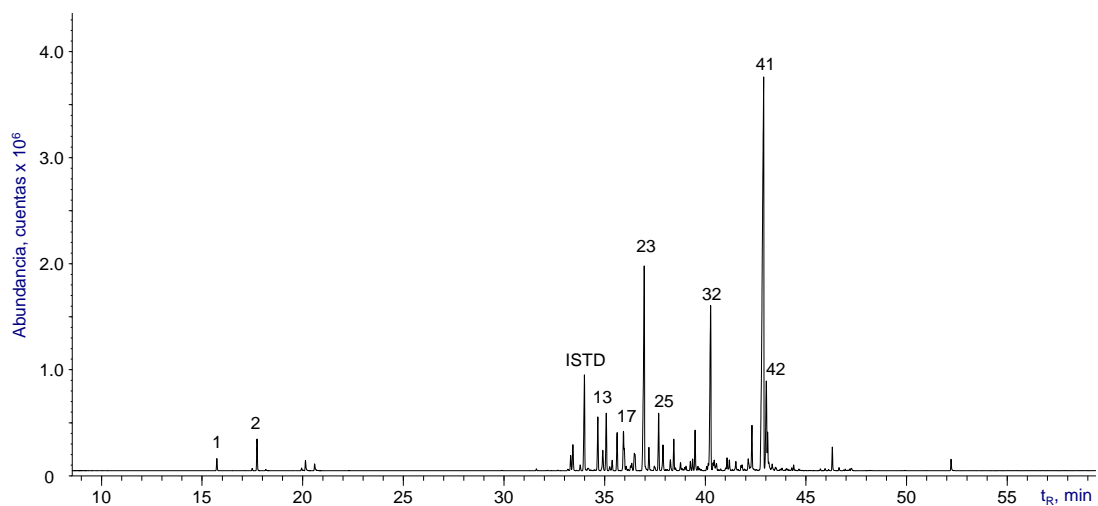
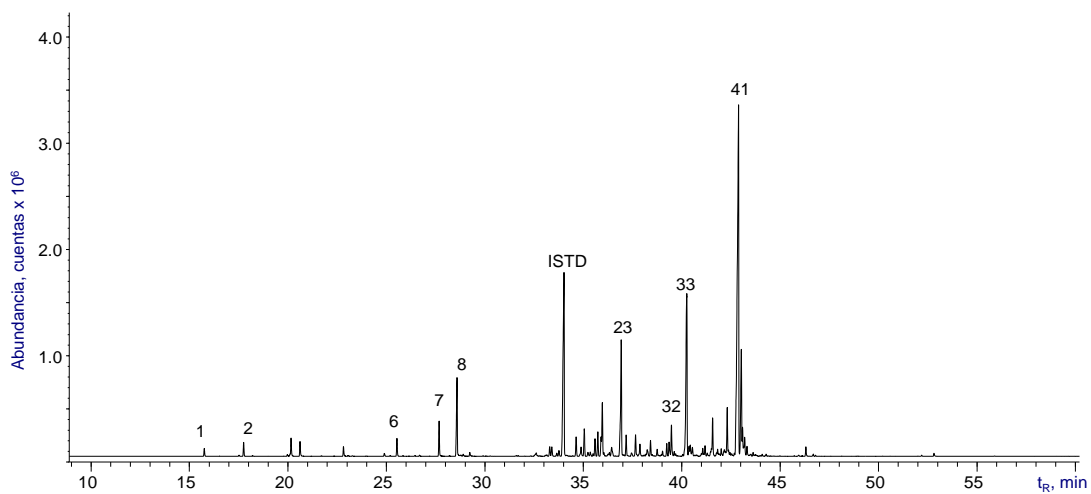
**A.****B.****C.**

Tabla 6.Composiciones químicas obtenidas por GC/MS y GC/FID de los aceites esenciales destilados de *P. dilatatum*.

N° Fig. 22	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (IRL)				Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$ (n = 3)		
			DB-5MS		DB-WAX		Partes aéreas	Hojas	Inflorescencias
			Exp	Lit	Exp	Lit			
1	α -Pinoeno ^{a,b,c}	HM	934	939 ^d	1018	1025 ^e	1.3 \pm 0.4	1.0 \pm 0.5	0.5 \pm 0.1
2	β -Pinoeno ^{a,b}	HM	980	979 ^d	1105	1110 ^e	3.0 \pm 0.7	3 \pm 1	1.0 \pm 0.1
3	<i>cis</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	HM	1036	1037 ^d	1234	1235 ^e	1.3 \pm 0.1	0.6 \pm 0.5	0.8 \pm 0.8
4	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	HM	1047	1050 ^d	1251	1250 ^e	1.20 \pm 0.09	0.5 \pm 0.5	0.7 \pm 0.7
5	Linalol ^{a,b,c}	MO	1100	1096 ^d	1543	1543 ^e	-	-	0.6 \pm 0.3
6	<i>iso</i> -Mentona ^{a,b,c}	MO	1170	1162 ^d	1466	1483 ^e	-	-	0.8 \pm 0.8
7	Citronelal ^{a,b}	MO	1227	1229 ^d	-	1763 ^e	-	-	1 \pm 2
8	Geraniol ^{a,b,c}	MO	1252	1255 ^e	1843	1839 ^e	-	-	5 \pm 5
9	α -Copaeno ^{a,b}	HS	1382	1376 ^d	1484	1491 ^e	-	-	0.3 \pm 0.5
10	β -Cubebeno ^{a,b}	HS	1380	1387 ^d	1537	1541 ^e	0.80 \pm 0.09	0.5 \pm 0.5	0.2 \pm 0.2
11	Dauceno ^{a,b}	HS	1383	1380 ^d	-	1495 ^e	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.4	0.7 \pm 0.7
12	β -Elemeno ^{a,b}	HS	1394	1390 ^d	1593	1591 ^e	0.56 \pm 0.06	0.2 \pm 0.3	-
13	α - <i>cis</i> -Bergamoteno ^{a,b}	HS	1418	1411 ^d	1567	1559 ^e	2.4 \pm 0.2	3.0 \pm 0.5	1.3 \pm 0.2
14	β -Gurjuneno ^{a,b}	HS	1425	1431 ^d	1604	1596 ^e	1.0 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	0.4 \pm 0.3
15	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b,c}	HS	1431	1420 ^e	1590	1598 ^e	3.5 \pm 0.4	2.7 \pm 0.6	1.0 \pm 0.2
16	<i>trans</i> - α -Bergamoteno ^{a,b}	HS	1439	1434 ^d	-	1576 ^e	0.60 \pm 0.06	0.60 \pm 0.05	0.1 \pm 0.2
17	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno ^{a,b}	HS	1445	1448 ^d	-	1634 ^g	1.8 \pm 0.1	2.0 \pm 0.3	0.4 \pm 0.6
18	α -Guaieno ^{a,b}	HS	1449	1439 ^d	1606	1598 ^f	-	-	1 \pm 2
19	<i>trans</i> - β -Farneseno ^{a,b}	HS	1455	1456 ^d	1664	1664 ^e	1 \pm 1	2.0 \pm 0.5	2 \pm 1
20	N.I. (Anexo, Figura A 12) ^b	HS	1457	-	-	-	5.0 \pm 0.4	-	-

Tabla 6. Continuación.

21	α -Humuleno ^{a,b,c}	HS	1467	1468 ^f	1673	1667 ^e	0.70 \pm 0.09	0.5 \pm 0.4	-
22	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno ^{a,b}	HS	1469	1465 ^d	1656	1643 ^f	0.80 \pm 0.08	0.8 \pm 0.2	0.2 \pm 0.3
23	<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno ^{a,b}	HS	1482	1493 ^d	1697	-	14.0 \pm 1	10 \pm 3	5 \pm 1
24	Germacreno D ^{a,b,c}	HS	1490	1481 ^d	1713	1708 ^e	1.0 \pm 0.1	0.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.5
25	Biciclogermacreno ^{a,b}	HS	1506	1500 ^d	1736	1735 ^e	4.0 \pm 0.4	2 \pm 2	0.4 \pm 0.7
26	β -Bisaboleno ^{a,b}	HS	1511	1505 ^d	1725	1728 ^e	0.40 \pm 0.03	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
27	β -Sesquifelandreno ^{a,b}	HS	1528	1521 ^d	1765	1771 ^e	2.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.6	1.0 \pm 0.3
28	<i>cis</i> -Calameneno ^{a,b}	HS	1540	1529 ^d	1851	1834 ^e	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.2
29	N.I. (Anexo, Figura A 13) ^b	HS	1556	-	-	-	0.3 \pm 0.3		
30	N.I. (Anexo, Figura A 14) ^b	SO	1559	-	-	-	1.30 \pm 0.09		0.4 \pm 0.7
31	<i>trans</i> -Nerolidol ^{a,b,c}	SO	1564	1563 ^d	2036	2036 ^e	2.5 \pm 0.2	2.6 \pm 0.6	1.7 \pm 0.2
32	N.I. (Anexo, Figura A 15) ^b	SO	1588	-	2076	-	10.0 \pm 0.8	10 \pm 2	12 \pm 2
33	Carotol ^{a,b}	SO	1592	1594 ^d	-	2027 ^e	1.29 \pm 0.05	0.8 \pm 0.9	0.6 \pm 0.6
34	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	SO	1594	1583 ^d	1982	1986 ^e		1 \pm 2	0.5 \pm 0.4
35	N.I. (Anexo, Figura A 16) ^b	HS	1596	-	-	-	0.3 \pm 0.5	0.5 \pm 0.5	-
36	Ledol ^{a,b}	SO	1615	1612 ^f	2027	2039 ^e	0.90 \pm 0.08	1.0 \pm 0.3	0.5 \pm 0.5
37	N.I. (Anexo, Figura A 17) ^b	SO	1633	-	-	-	0.4 \pm 0.4	0.7 \pm 0.1	-
38	γ -Eudesmol ^{a,b}	SO	1635	1632 ^d	-	2176 ^e	-	-	1 \pm 1
39	4-Murolen-10-ol ^{a,b}	SO	1652	1653 ^f	-	2187 ^f	-	-	0.3 \pm 0.3
40	N.I. (Anexo, Figura A 18) ^b	SO	1663	-	2287	-	2.8 \pm 0.2	1 \pm 1	2.0 \pm 0.5
41	N.I. (Figura 23) ^b	SO	1684	-	2386	-	31 \pm 2	44 \pm 2	55 \pm 15
42	N.I. (Anexo, Figura A 19) ^b	HS	1689	-	2232	-	2.02 \pm 0.09	4 \pm 1	3.0 \pm 0.6

Tabla 6. *Continuación.*

43	Fitol ^{a,b}	CO	2110	2116 ^e	-	2622 ^f	-	0.5 ± 0.5	-
HM	Hidrocarburos monoterpenicos						7.0 ± 0.5	5.0 ± 0.8	2.0 ± 0.6
MO	Monoterpenos oxigenados						-	-	5 ± 3
CO	Compuestos oxigenados						-	0.5 ± 0.3	-
HS	Hidrocarburos sesquiterpénicos						40 ± 1	30 ± 2	15 ± 2
SO	Sesquiterpenos oxigenados						50 ± 2	66 ± 2	78 ± 9

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales medidos en las columnas DB-WAX y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD), i.e., α -pineno (98%, IRL_{DB-5MS}= 937, IRL_{DB-WAX}=1024), linalol (97%, IRL_{DB-5MS}= 1102, IRL_{DB-WAX}= 1551), *iso*-mentona (90%, IRL_{DB-5MS}= 1162, IRL_{DB-WAX}= 1500), geraniol (98%, IRL_{DB-5MS}= 1253, IRL_{DB-WAX}= 1853), *trans*- β -cariofileno (98.5%, IRL_{DB-5MS}= 1434, IRL_{DB-WAX}= 1611), α -humuleno (96%, IRL_{DB-5MS}= 1470, IRL_{DB-WAX}= 1683), germacreno D (90%, IRL_{DB-5MS}= 1490, IRL_{DB-WAX}= 1716), *trans*-nerolidol (96%, IRL_{DB-5MS}= 1534, IRL_{DB-WAX}= 2261) y óxido de cariofileno (95%, IRL_{DB-5MS}= 1598, IRL_{DB-WAX}= 1996), por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, >95% de concordancia) y tiempos de retención (*t_r*).

d Adams (2007).

e Babushok *et al.* (2011).

f NIST (2017).

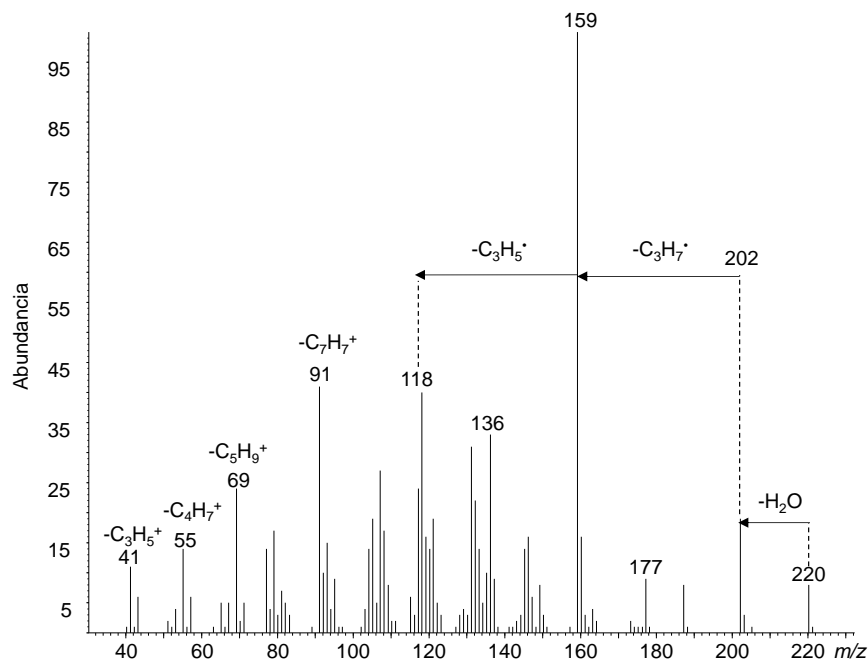
g Arze *et al.* (2009).

Entre los compuestos mayoritarios, hay algunos que no se identificaron positivamente entre estos, el compuesto N° 41 presente en los tres AE de *P. dilatatum*. En el espectro de masas del compuesto N°41 se evidenciaron pérdidas del radical de $C_3H_7^\bullet$ y de una molécula de agua (**Figura 23**). Los AE destilados de partes aéreas, hojas e inflorescencias, están compuestos principalmente por sesquiterpenos y sesquiterpenos oxigenados, lo que puede llegar a influir sobre las propiedades fisicoquímicas del AE. La proporción alta de estos compuestos contribuye en aspectos como su estabilidad térmica hasta sus características polares y puntos de ebullición. Esto se debe a que las moléculas cíclicas más grandes y complejas en su estructura, pueden tener resistencia más alta a la degradación térmica, los AE con una cantidad de monoterpenos mayor serán más volátiles y tendrán puntos de ebullición más bajos (Sánchez & Restrepo, 2009).

La presencia de iones típicos insaturados en m/z 41 ($C_3H_5^+$), m/z 55 ($C_4H_7^+$) y m/z 69 ($C_5H_9^+$) indica que en la molécula está presente uno o varios enlaces dobles. La pérdida de H_2O indica la presencia de oxígeno en la molécula, y la pérdida de radical propilo o isopropilo es típica para sesquiterpenoides.

Figura 23.

Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en los aceites esenciales de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). $[M^+ \cdot]$ m/z 220; $[M-H_2O]^+ \cdot$ m/z 202; $[M-C_3H_7]^+$ m/z 159, $[M-C_3H_5]^+$ m/z 118, $C_7H_7^+$ m/z 91, $C_5H_9^+$ m/z 69, $C_4H_7^+$ m/z 55 y $C_3H_5^+$ m/z 41. Véase pico cromatográfico N°41 en la **Tabla 6**.



Los resultados obtenidos revelaron que en el AE de inflorescencias predominaron los monoterpenos y sus derivados oxigenados ($A_i/A_{istd} = 0.3 \pm 0.2$). Por otro lado, en los AE de hojas, se observó una concentración significativamente mayor ($A_i/A_{istd} = 3.0 \pm 0.5$) de hidrocarburos sesquiterpenicos (**Anexos, Tabla A 1**). Los perfiles cromatográficos obtenidos de los AE de *P. dilatatum* por GC/FID en una columna con fase estacionaria apolar se encuentran en **Anexos, Figura A 3**.

5.3. Caracterización química de extractos, obtenidos con solvente de *Piper* spp.

Los rendimientos de extractos de las partes aéreas de *P. aduncum* (13%), y *P. peltatum* (9%) y de hojas de *P. dilatatum* (13%) fueron los más altos de todos los obtenidos para cada especie (**Tabla 7**). En la literatura Nailufar & Priyono (2017) reportaron rendimientos de extracción que variaron entre 9% y 11% para *P. aduncum*, valores cercanos a los obtenidos experimentalmente en este estudio. Los parámetros de la extracción asistida por ultrasonido de *Piper* spp., se han estudiado para maximizar la extracción de compuestos de interés biológico (Ali *et al.* 2018).

Tabla 7.

Rendimientos de extractos obtenidos con solvente de P. aduncum, P. peltatum y P. dilatatum.

Especie	Rendimiento, % p/p \pm s ($n = 3$)		
	Hojas	Inflorescencias	Partes aéreas
<i>P. aduncum</i>	9 \pm 1	10 \pm 1	13 \pm 1
<i>P. peltatum</i>	6.2 \pm 0.8	5.6 \pm 0.5	9 \pm 1
<i>P. dilatatum</i>	13 \pm 2	4.95 \pm 0.01	11 \pm 2

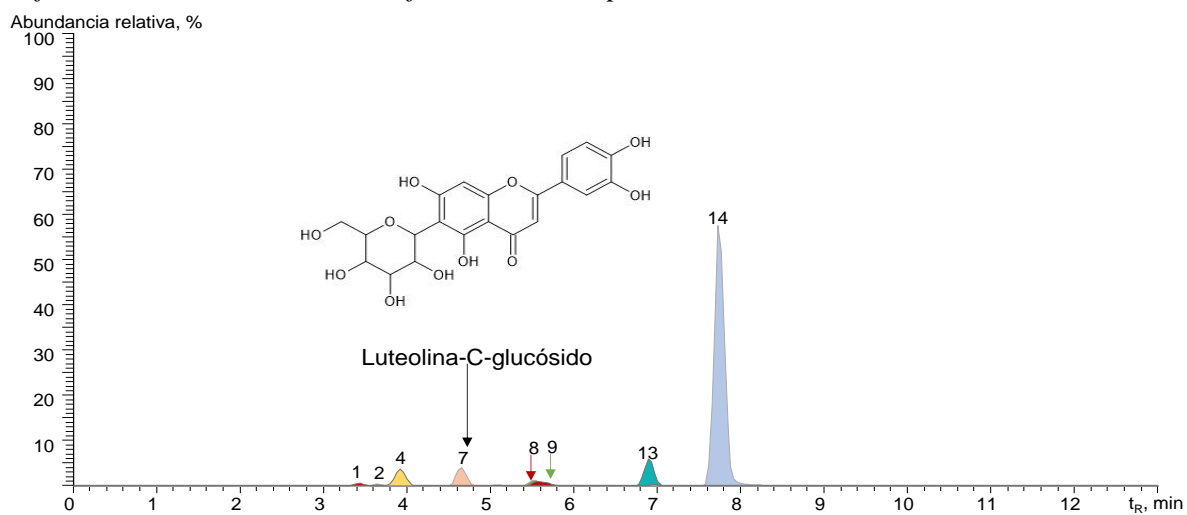
Las composiciones químicas de plantas de *Piper* spp. usadas comercialmente han sido objeto de estudio no solo porque sean plantas comerciales, también, debido a las propiedades biológicas que otorgan sus metabolitos secundarios, entre las cuales figuran: alcaloides, flavonoides y terpenos (Gaub *et al.* 2004).

La adquisición de corrientes iónicas obtenidas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas UHPLC-ESI/Orbitrap-HRMS de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas pertenecientes al género *Piper*, se realizó en el modo dual, de iones positivos y negativos. Para el estudio del patrón de fragmentación de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o

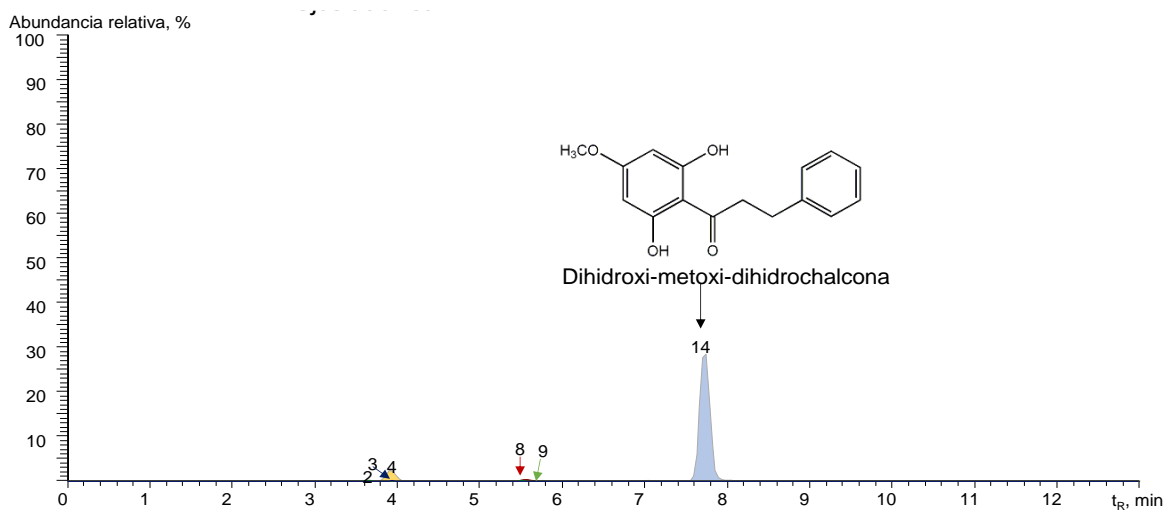
deprotonadas $[M-H]^-$ se usaron diferentes energías de colisión (10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 eV) en una celda de colisiones activadas, HCD. La elección de la energía se basó en la capacidad de observar tanto las moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$, como sus fragmentos característicos.

En la **Tabla 8** se muestran los quince compuestos detectados en los extractos de *P. aduncum*, *P. dilatatum* y *P. peltatum*; trece de los cuales se identificaron tentativamente y uno de manera confirmatoria, usando una sustancia-patrón. Las **Figuras 24-26** muestran las corrientes iónicas extraídas (EIC) por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, adquiridas en modo *full scan*, de los compuestos detectados. En todos los extractos se registró a la magnoflorina. Este alcaloide posee propiedades antiinflamatorias, también, es posible que actúe como sedante y ansiolítico (de la Peña *et al.* 2013). Algunos derivados de flavonas y amidas substituidas del ácido benzoico se detectaron, también, en los extractos bajo estudio.

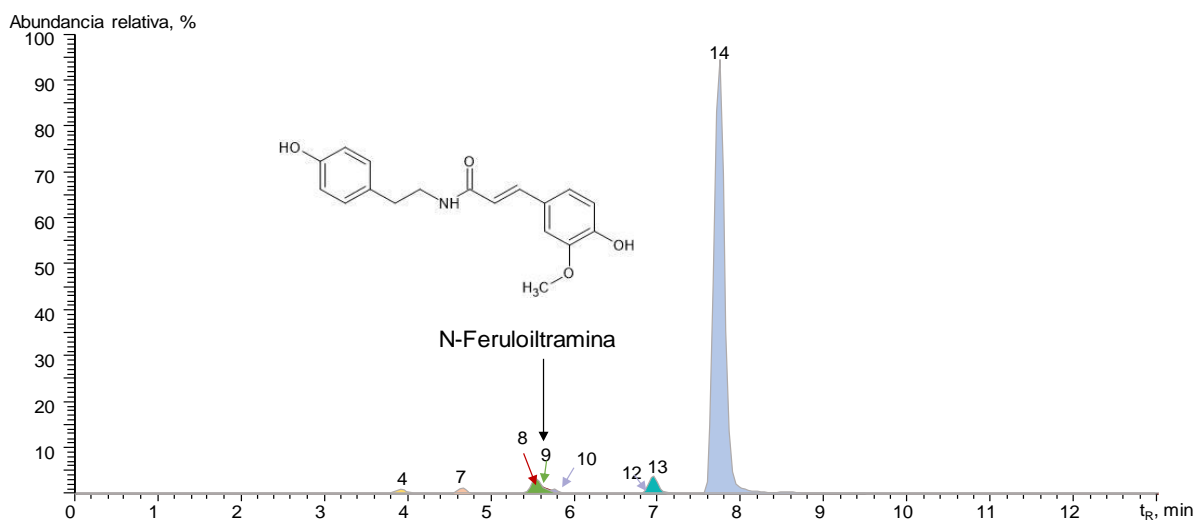
Figura 24. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C₁₈. Los extractos de *P. aduncum*: A. Partes aéreas; B. Hojas y C. Inflorescencias. Véase la identificación de los picos en la Tabla 8.



A.



B.



C.

Figura 25. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C_{18} . Los extractos de *P. dilatatum*: **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 8**.

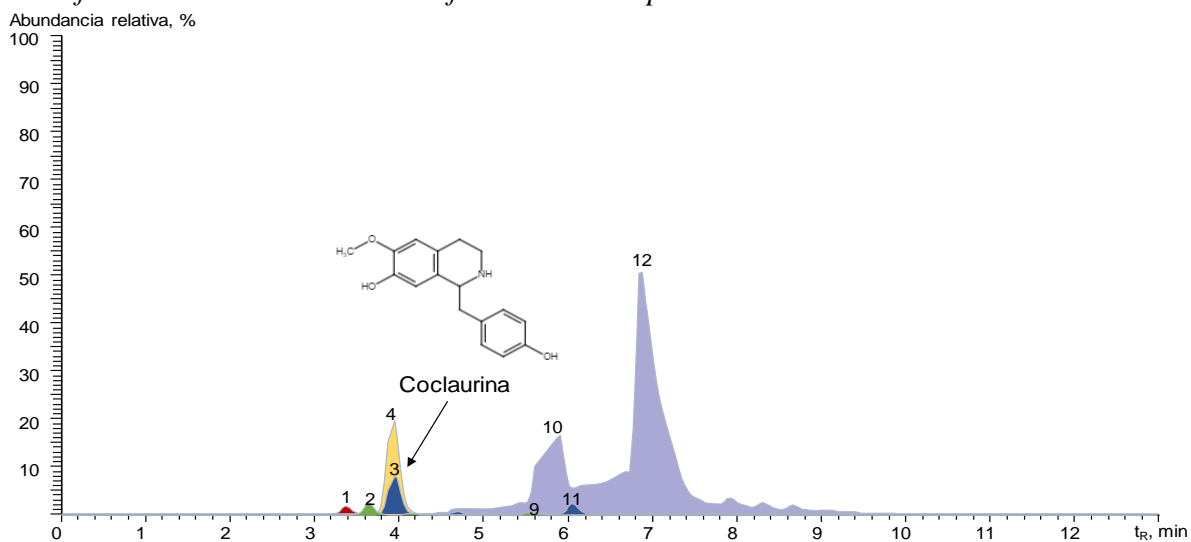
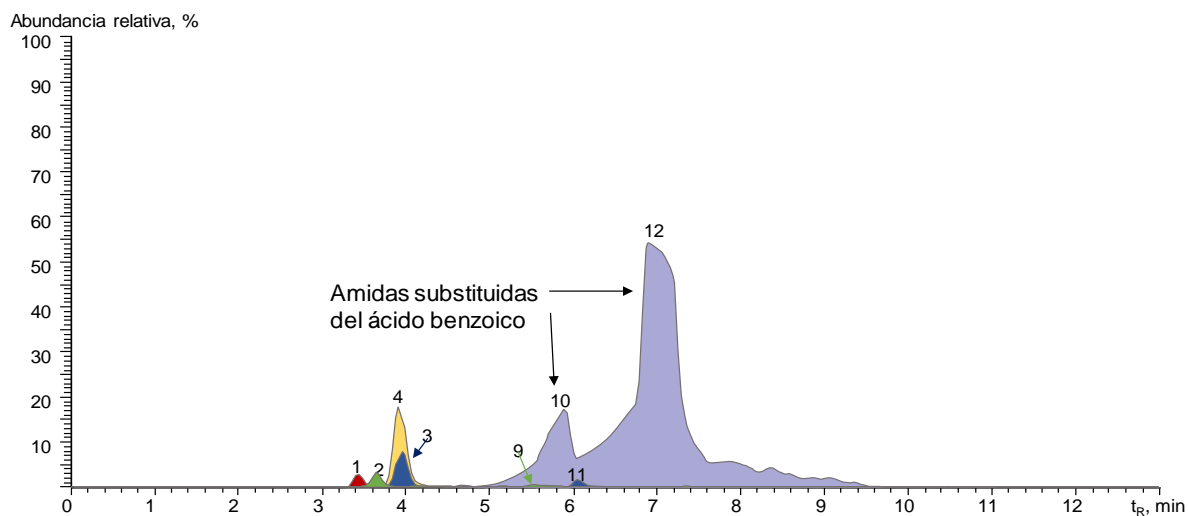
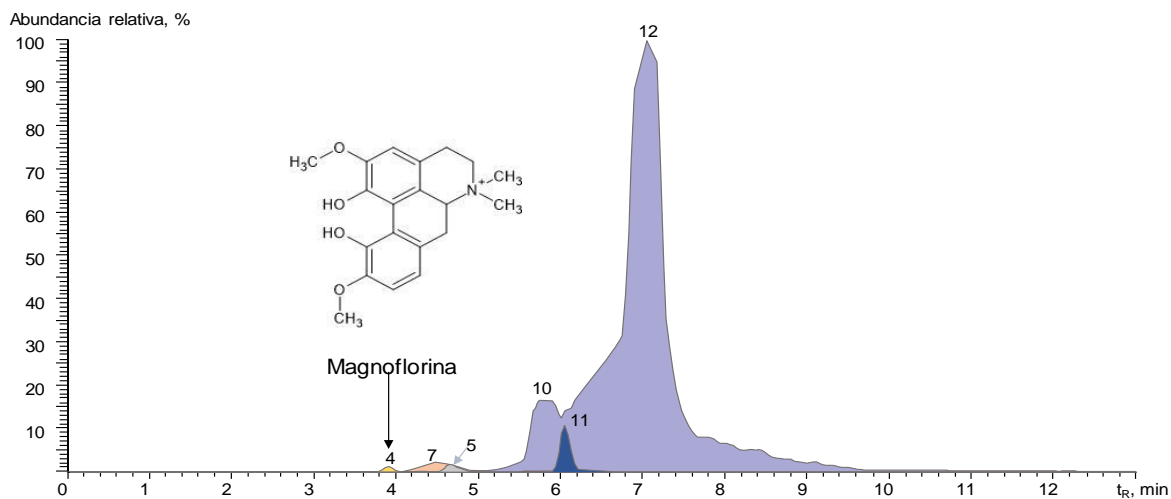
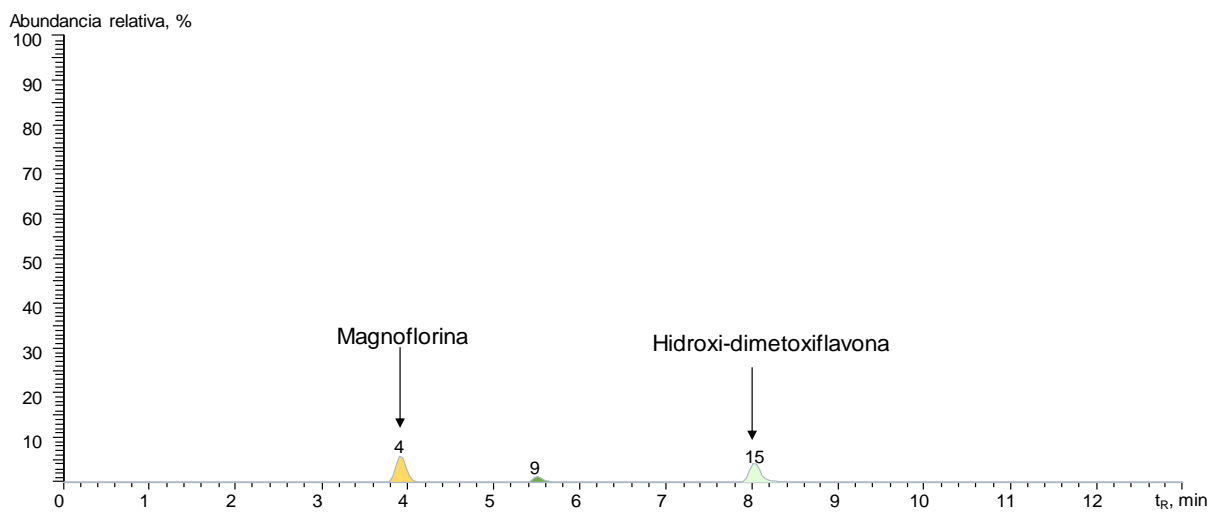
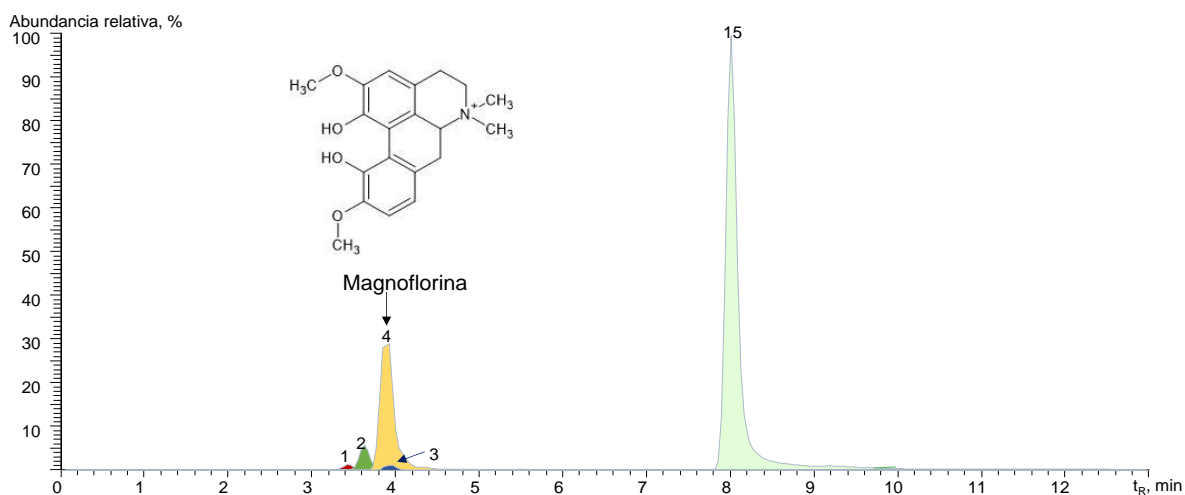
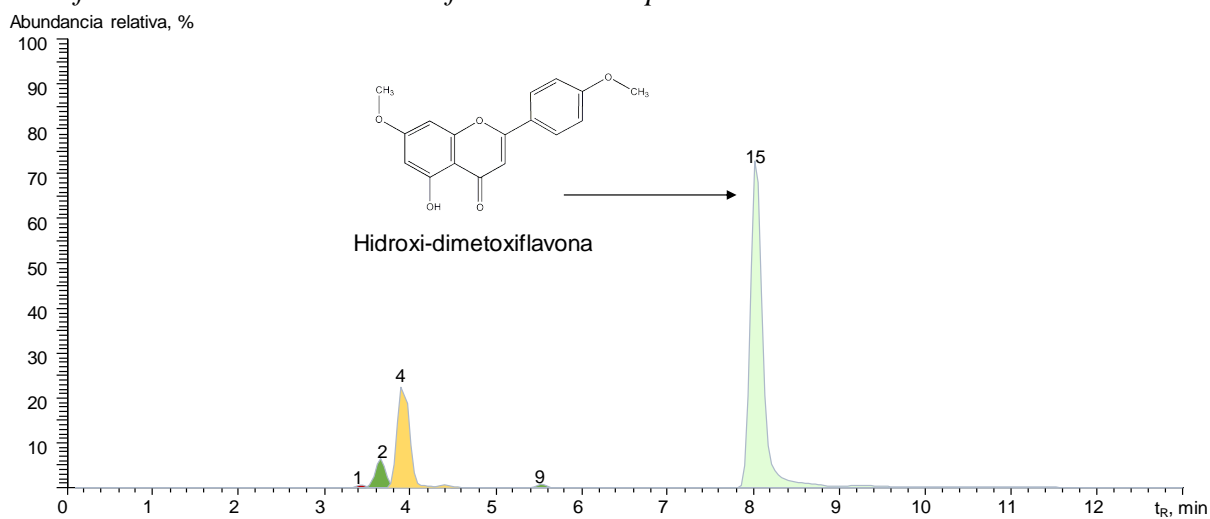
**A.****B.****C.**

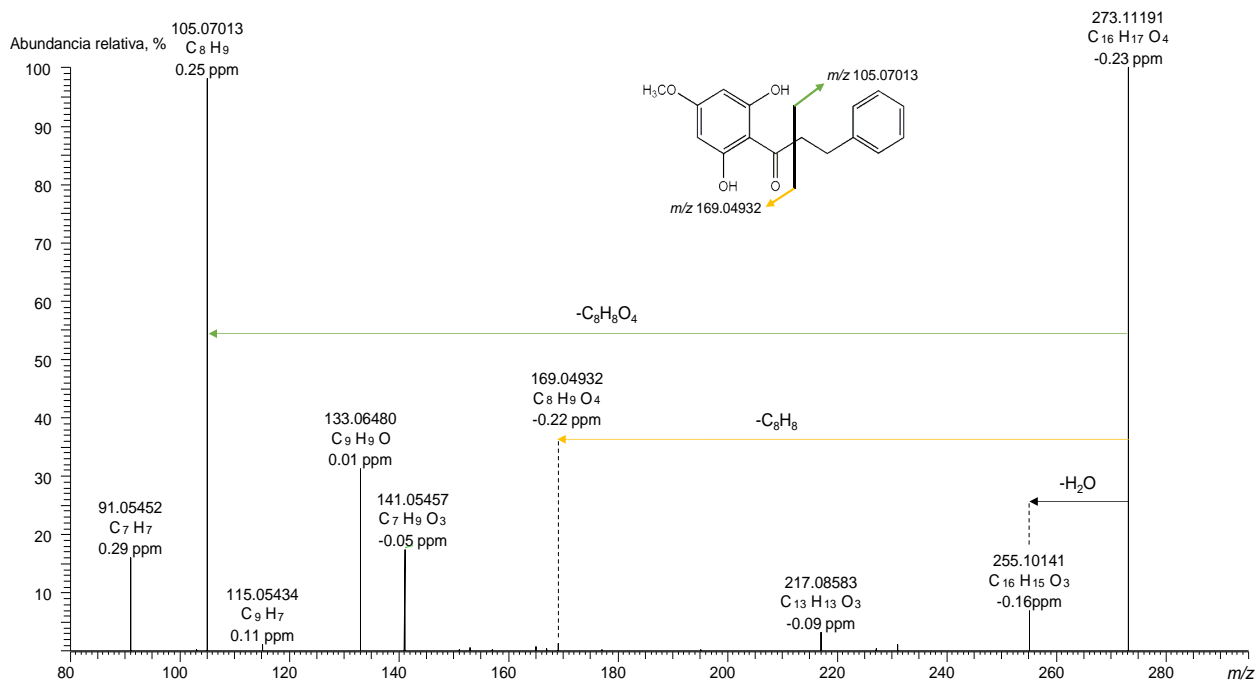
Figura 26. Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo full scan Columna Zorbax Eclipse C_{18} . Los extractos de *P. peltatum*: A. Partes aéreas; B. Hojas y C. Inflorescencias. Véase la identificación de los picos en la Tabla 8



En los extractos hidroalcohólicos de hojas, partes aéreas e inflorescencias de *P. aduncum*, el compuesto mayoritario fue la dihidroxi-metoxi-dihidrochalcona. En la **Figura 27** se muestra el espectro de masas de la dihidroxi-metoxi-dihidrochalcona en m/z 273.11191 y sus fragmentos generados a partir de la deshidratación $[(M+H)-H_2O]^+$ en m/z 255.10157 y la ruptura en la posición α del grupo carbonilo $[(M+H)-C_8H_8O_4]^+$ en m/z 105.07013 y $[(M+H)-C_8H_8]^+$ en m/z 169.04932.

Figura 27.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de dihidroxi-metoxi-dihidrochalcona $[M+H]^+$ en m/z 273.11191, obtenido en el modo SIM y HCD 50 eV.



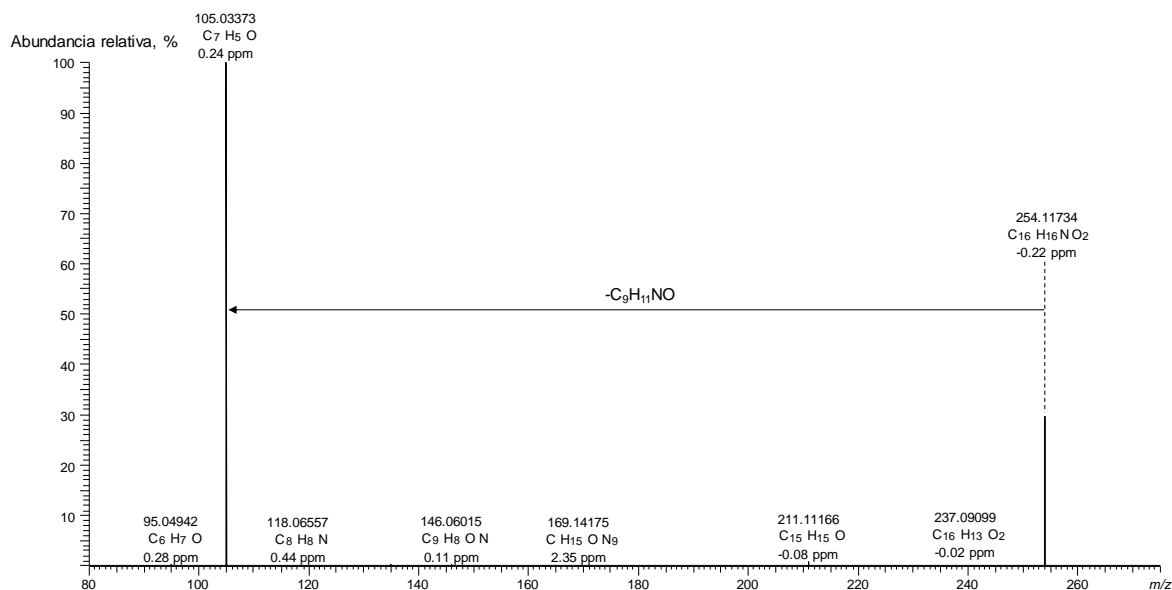
La 2-6-dihidroxi-4-metoxidihidrochalcona extraída de las hojas de *Piper hostmannianum* posee actividad antiparasitaria contra *Plasmodium vinckei* (Portet *et al.* 2007). También, otras dihidrochalconas se han detectado en los extractos de hojas de *P.*

aduncum recolectadas en Papúa Nueva Guinea, las cuales se utilizan por la comunidad local para el tratamiento de heridas (Orjala *et al.* 1994).

En el extracto de *P. dilatatum* se identificaron tentativamente amidas substituidas del ácido benzoico. En la **Figura 28** se presenta el espectro de masas de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 254.11734 y sus fragmentos en m/z 237.09099 y m/z 105.03373 que corresponden a $[(M+H)-NH_3]^+$ y $[(M+H)-C_9H_{11}NO]^+$, respectivamente.

Figura 28.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 254.11734, obtenido en el modo SIM y HCD a 20 eV.



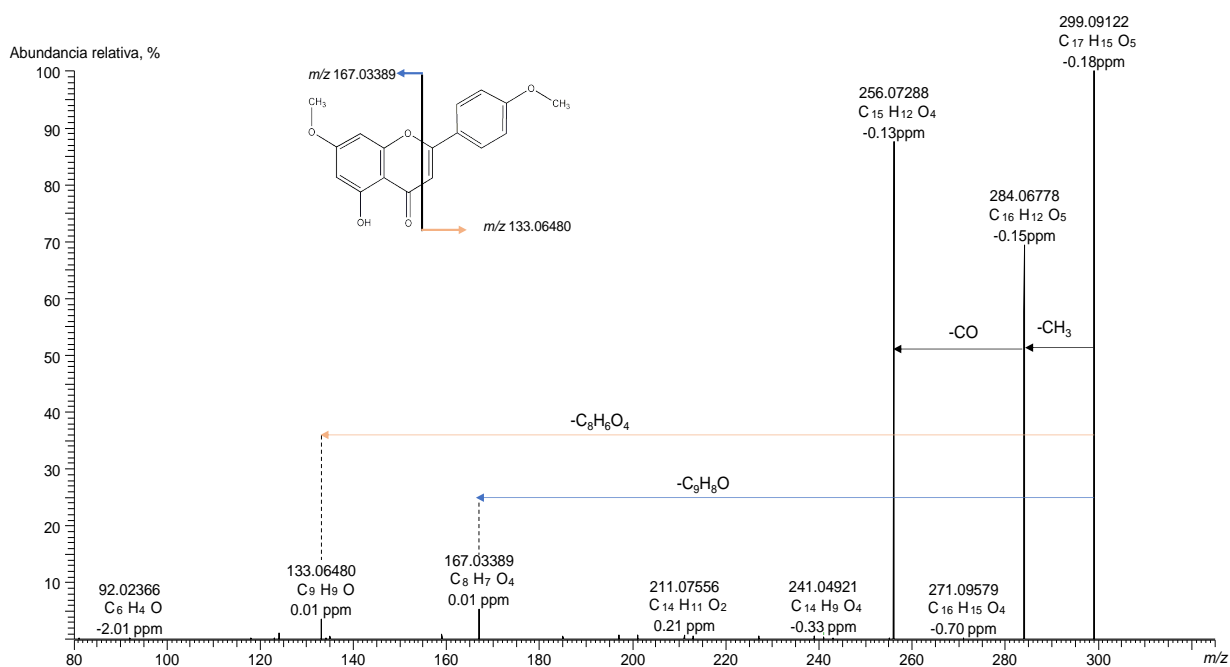
Las amidas substituidas del ácido benzoico se han detectado en varias especies de *Piper*. De la *Piper guayranum*, distribuida en Trinidad, Tobago y Venezuela, se aisló la utilamida (Maxwell & Ramprasad, 1989); este compuesto es un derivado de la

β -feniletilamina y fue sintetizado debido al interés farmacológico, ya que posee propiedad antiinflamatoria (Sambaiah *et al.* 2021).

La hidroxi-dimetoxiflavona fue el compuesto mayoritario detectado en el extracto de *P. peltatum*. En la **Figura 29** se muestra el espectro de masas de la molécula protonada de hidroxi-dimetoxiflavona $[M+H]^+$ en m/z 299.09122, y sus fragmentos producidos a partir de la pérdida de un radical metilo $[(M+H)-CH_3]^+$, en m/z 284.06778, seguido de la salida de CO $[(M+H)-CH_3-CO]^+$, en m/z 256.07288. Los iones-producto $[(M+H)-C_9H_8O]^+$ en m/z 167.03389 y $[(M+H)-C_8H_6O_4]^+$ en m/z 133.06480 se formaron debido a la ruptura del anillo C de la flavona.

Figura 29.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS de la molécula protonada de hidroxi-dimetoxiflavona $[M+H]^+$ en m/z 299.09122, obtenido en el modo SIM y HCD a 50 eV.



La *Piper caninum* que crece en Sarawak, Malasia, contiene al, menos ocho flavonas metoxiladas, entre ellas, 4-hidroxi-5,7-dimetoxiflavona. Estas moléculas resultan ser efectivas contra la bacteria *Bacillus subtilis* (Salleh *et al.* 2015). La mayoría de los flavonoides aislados de esta especie son flavonas metiladas o metoxiladas, que pueden ser agentes quimiopreventivos del cáncer humano de hígado, boca, esófago y pulmón (Tsuji *et al.* 2006).

En la **Tabla 9**, aparecen las relaciones de áreas cromatográficas de compuesto y del patrón interno para cada sustancia detectada en los extractos de *Piper* spp. Hasta la fecha, los estudios sobre la composición química de *Piper* spp. se han realizado usando las plantas completas, mientras que en nuestra investigación se determinaron las composiciones químicas de extractos, obtenidos de hojas, inflorescencias y partes aéreas, lo que permitió evidenciar en qué parte de la planta se encuentran compuestos específicos en una proporción más alta. Por ejemplo, en los extractos, obtenidos de *P. aduncum* se registraron cantidades altas de dihidroxi-metoxi-dihidrochalcona y N-feruloiltramina; la mayor cantidad de estos compuestos se encontró en las inflorescencias (**Tabla 9**, $A_i/A_{istd} = 46 \pm 18$, 10.0 ± 0.3 , respectivamente). El extracto obtenido de inflorescencias de *P. dilatatum* se caracterizó por el contenido alto de una amida del ácido benzoico (**Tabla 9**, $A_i/A_{istd} = 220 \pm 24$). En el extracto aislado de *P. peltatum* fue predominante la hidroxidimetoxiflavona, su cantidad más alta, se encontró en las hojas (**Tabla 9**, $A_i/A_{istd} = 87 \pm 5$). Estos resultados son de interés si se pretende seleccionar un extracto por su componente mayoritario o para estudios de actividad biológica.

Tabla 9. Relaciones de áreas cromatográficas del compuesto y del estándar interno (A_i/A_{std}) de moléculas protonadas $[M+H]^+$ o deprotonadas $[M-H]^-$ detectadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS en extractos obtenidos de *Piper* spp. en modo full scan.

N° Fig. 24-26	Compuesto	Fórmula	$A_i/A_{std}, \bar{x} \pm s (n = 3)$								
			<i>P. aduncum</i>			<i>P. dilatatum</i>			<i>P. peltatum</i>		
			Hojas	Inflorescencias	Partes aéreas	Hojas	Inflorescencias	Partes aéreas	Hojas	Inflorescencias	Partes aéreas
1	Norocloaurina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	0.205 ± 0.008	0.55 ± 0.02	1.95 ± 0.05	3.0 ± 0.3	-	2.0 ± 0.3	1.10 ± 0.04	0.075 ± 0.004	0.440 ± 0.006
2	Amida substituida del ácido benzoico	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	0.60 ± 0.02	-	1.60 ± 0.04	4.7 ± 0.2	0.20 ± 0.02	4.0 ± 0.4	5.0 ± 0.5	-	4.7 ± 0.3
3	Cocloaurina	C ₁₇ H ₁₉ O ₃ N	0.60 ± 0.02	0.90 ± 0.04	3.0 ± 0.6	10 ± 1	-	10 ± 1	1.0 ± 0.5	0.20 ± 0.01	0.40 ± 0.06
4	Magnoflorina	C ₂₀ H ₂₃ O ₄ N	8.6 ± 0.4	4.6 ± 0.3	11.0 ± 0.4	26 ± 2	1.70 ± 0.02	30 ± 6	32 ± 20	4.0 ± 0.3	20 ± 6
5	Apigenina-C-C-dihexosido	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0.26 ± 0.01	0.084 ± 0.003	0.40 ± 0.02	0.60 ± 0.03	-	0.30 ± 0.04	0.05 ± 0.01	-	0.06 ± 0.01
6	Ácido <i>p</i> -cumarico	C ₉ H ₈ O ₃	0.063 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.023 ± 0.001	0.025 ± 0.003	0.02 ± 0.01	2.26 ± 1.95	-	-	-
7	Luteolina-C-glucósido	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	2.0 ± 0.1	6.0 ± 0.2	14.0 ± 0.9	0.037 ± 0.002	1.0 ± 0.1	0.015 ± 0.002	-	-	-
8	Tembamida	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	1.90 ± 0.07	6.0 ± 0.5	5.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.10 ± 0.03	-	0.016 ± 0.001	-
9	N-feruloiltramina	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	0.90 ± 0.03	10.0 ± 0.3	5.0 ± 0.4	1.4 ± 0.1	1.00 ± 0.04	1.0 ± 0.1	-	1.2 ± 0.1	0.50 ± 0.02
10	Amida substituida del ácido benzoico	C ₁₆ H ₁₅ NO ₂	0.007 ± 0.002	7.0 ± 0.5	0.040 ± 0.004	46 ± 9	45 ± 6	41 ± 3	0.002 ± 0.001	0.010 ± 0.003	0.0020 ± 0.0004
11	Amida substituida del ácido benzoico	C ₁₇ H ₁₉ O ₃ N	-	-	-	-	14.0 ± 0.3	2.5 ± 0.3	-	-	-
12	Amida substituida del ácido benzoico	C ₁₆ H ₁₅ NO ₂	0.004 ± 0.001	9.0 ± 0.6	0.015 ± 0.003	120 ± 5	220 ± 24	86 ± 10	0.004 ± 0.002	0.017 ± 0.003	-
13	N.I.	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	2.0 ± 0.1	17 ± 1	17.0 ± 0.8	-	-	-	-	-	-
14	Dihidroxi-metoxi-dihidrochalcona	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	11 ± 6	46 ± 18	20 ± 13	-	-	-	-	-	-
15	Hidroxi-dimetoxiflavona	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	0.116 ± 0.008	-	0.060 ± 0.004	0.020 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.060 ± 0.009	87 ± 5	4.0 ± 0.1	48 ± 9

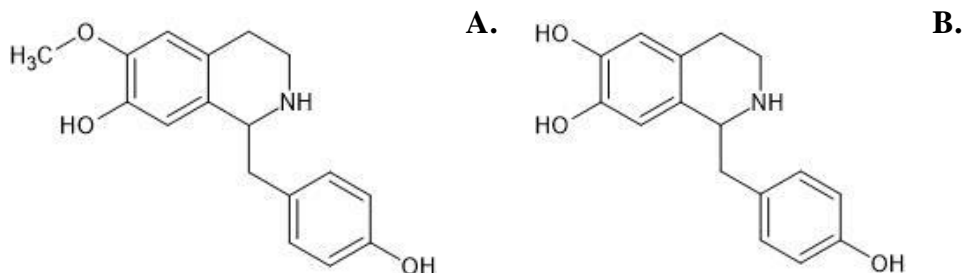
Cuantificación realizada por el método de estándar interno, el patrón utilizado es miricetina a una concentración 4 ppm.

N.I: No identificado.

En los extractos bajo estudio se registraron norcoclaurina y coclaurina, en el Anexo, Figura A 20, A22 se encuentran los espectros de masas de las moléculas protonadas de coclaurina $[M+H]^+$ en m/z 286.14349 y norcoclaurina $[M+H]^+$ en m/z 272.12775, compuestos antes no reportados en plantas de *Piper* y que pertenecen a una familia de alcaloides con propiedades medicinales. Las estructuras químicas de estos alcaloides se diferencian porque la coclaurina tiene un sustituyente metoxi mientras que la norcoclaurina tiene un grupo hidroxilo en esta posición (**Figura 30**) (Morales *et al.* 1998).

Figura 30.

Estructuras químicas: de **A.** Coclaurina, **B.** Norcoclaurina.

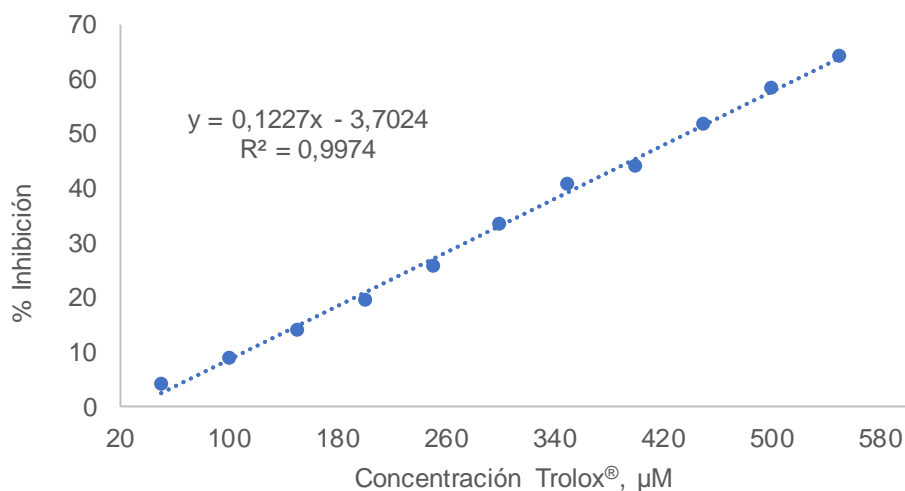


5.4. Actividad antioxidante de los aceites esenciales y extractos aislados de *Piper* spp.

En la **Tabla 10**, se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los AE y los extractos de *Piper* spp. En la **Figura 31**, se encuentra la curva de Trolox[®], utilizada para calcular los resultados de la actividad antioxidante como μmol de Trolox[®]/g de muestra.

Figura 31.

Curva de calibración de Trolox[®], utilizada para expresar los resultados de actividad antioxidante por el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}.



El AE destilado de partes aéreas de *P. aduncum*, tiene el valor más alto de μmol Trolox[®]/g de muestra (80 ± 3) en comparación con los valores de los AE destilados de hojas (70 ± 1), inflorescencias (39 ± 2) y de la sustancia-patrón, dilapiol (39 ± 1). Por tanto, los compuestos registrados en los AE de partes aéreas (con tallos) podrían tener efecto aditivo que explicaría la actividad antioxidante más alta del AE destilado de la planta total. Los resultados de actividad antioxidante obtenido para el AE de hojas de *P. aduncum* fueron comparables con los reportados por Ingaroca *et al.* (2019) para el AE destilado de plantas cosechadas en Loreto, Perú ($70.5 \mu\text{mol Trolox/mL}$ de muestra).

Tabla 10.

Valores de actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales y extractos de *Piper spp.*

Muestra	Actividad antioxidante ^a $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra ($n = 3$)					
	Aceites esenciales			Extractos hidroalcohólicos		
	Hojas	Inflorescencias	Partes aéreas	Hojas	Inflorescencias	Partes aéreas
<i>P. aduncum</i>	70 \pm 1	40 \pm 2	80 \pm 3	430 \pm 28	890 \pm 17	590 \pm 25
<i>P. peltatum</i>	*	*	*	176 \pm 2	110 \pm 2	164 \pm 3
<i>P. dilatatum</i>	-	-	-	134 \pm 5	97 \pm 2	105 \pm 3
Sustancias de referencia						
α -Tocoferol	415 \pm 9					
Quercetina	11000 \pm 170					
Dilapiol	40 \pm 1					

* No se evaluó actividad antioxidante

- Actividad antioxidante por debajo del límite de detección de la técnica.

La actividad antioxidante del extracto de inflorescencias de *P. aduncum* fue la más alta (890 \pm 17 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra) entre todas las muestras evaluadas. Esto podría deberse a las cantidades elevadas de luteolina-C-glucósido, dihidroxi-metoxi-dihidrochalcona y amidas del ácido benzoico, registradas en este extracto. Las actividades antioxidante y citoprotectora según Herrera *et al.* (2019) del extracto metanólico de *P. aduncum* se deben a las cantidades altas de compuestos fenólicos y las amidas.

Para los extractos de *P. dilatatum* y *P. peltatum* se obtuvieron los valores de 176 \pm 2 y 134 \pm 5 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra, respectivamente. Puertas *et al.* (2009), reportaron la actividad antioxidante *in vitro* de fracciones obtenidas a partir del extracto de hojas de *P. peltatum* porque las hojas de esta especie se utilizan para el tratamiento de afecciones cutáneas. Los extractos de *Piper spp.* tienen propiedad antioxidante atribuida posiblemente a flavonas, flavonas metiladas y amidas detectada en sus composiciones químicas.

6. Conclusiones

En este trabajo, se destilaron AE de partes aéreas totales, hojas e inflorescencias *P. aduncum*, *P. dilatatum* y *P. peltatum* con rendimientos de 0.14% hasta 0.27%. Los AE de las especies bajo estudio se caracterizaron por la presencia de hidrocarburos monoterpénicos y monoterpenos oxigenados, también, se detectaron fenilpropanoides como dilapiol y miristicina. En el AE de raíces de *P. aduncum* se encontró la cantidad más alta de dilapiol ($94.7 \pm 0.5\%$) compuesto con actividad antioxidante de $40 \pm 1 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra.

Los rendimientos de extracción de *Piper* spp. fueron entre 4.95% y 13%; estos extractos contienen flavonas (luteolina, apigenina), flavonas metiladas y metoxiladas, alcaloides (norcoclaurina, coclaurina) y amidas que contribuyen a la actividad antioxidante. Para *P. aduncum* el valor más alto de actividad antioxidante, se registró para el extracto obtenido de inflorescencias ($890 \pm 17 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra), mientras que para *P. dilatatum* y *P. peltatum* los valores encontrados para los extractos de hojas fueron 176 ± 2 y $134 \pm 5 \mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ muestra, respectivamente.

Los resultados de esta investigación contribuyen al estudio fitoquímico de plantas de *Piper* spp. que crecen en Colombia y que poseen aplicaciones en la medicina tradicional. La información sobre la composición química y actividad antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Piper* spp. podría ser útil para aquellos investigadores que buscan ingredientes naturales nuevos con potencial farmacológico.

Referencias bibliográficas

- Acosta, K., Moyano, M., & Vinueza, D. (2020). Diuretic activity of *Piper peltatum* L. (Piperaceae) from Ecuador on *Rattus norvegicus*. *Pharmacology Online*. 1. 68-76.
- Adams, R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4ª Ed. *Allured Publishing Corporation*. Carol Stream, IL, EE. UU. 1-698.
- Alguacil, F. (1998). La recuperación de cobre mediante lixiviación-extracción con disolventes-electrólisis: hacia el siglo XXI. *Revista de Metalurgia*. 34(6). 499-506.
- Ali, A., Lim, X., Chong, C., Mah, S., & Chua, B. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from *Piper betle* using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*. 89. 681-688.
- Amorati, R., Foti, M., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(46). 10835-10847.
- Andrade, E., Alves, C., Guimarães, E., Carreira, L., & Maia, J. (2011). Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* LC Rich. *Biochemical Systematics and Ecology*. 39(4-6). 669-675.
- Arciniegas, A., Riveros, A., & Loaiza, J. (2002). Efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo *in-vitro* de *Mycosphaerella fijensis*, agente causal de la Sigatoka negra en Musáceas. *Memorias XV Reunión Internacional, ACORBAT*. 617.
- Arze, J., Collin, G., Garneau, F., Jean, F., & Gagnon, H. (2009). Essential Oils from Bolivia. VI. Lamiaceae: *Lepechinia graveolens* (Reg.) Epling *L. floribunda* (Benth.) Epling, and *L. meyeri* (Walp.) Epling. *Journal of Essential Oil Research*, 21(1), 36-40.
- Azuola, R., & Vargas, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Revista Tecnología en Marcha*. 20(4). 31-39.
- Babushok, V., Linstrom, P., & Zenkevich, I. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 40. 1-

47.

Bandoni A. (2003). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. *Ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma IV. Proyecto IV.* 11-24. Buenos Aires. Argentina.

Baser, K., & Buchbauer, G. (2009). Handbook of essential oils. science, technology and applications. *CRC Press. Taylor and Francis Group.* 39-81. 121-183. New York. EE. UU.

Benítez, R., Sarria, R., Gallo, J., Pérez, N., Álvarez, J., & Giraldo, C. (2019). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas.* 15(1). 31-40.

Bižanov, G., Normantiené, T., Jonauskiené, I., & Vyšniauskis, G. (2018). Evaluation of herb extracts and germanium oxide as immunological adjuvants in quails (*Coturnix coturnix* japónica). *Revista MVZ Córdoba.* 23(3). 6838-6849.

Bruce, T., Birkett, M., Blande, J., Hooper, A., Martin, J., Khambay, B., & Wadhams, L. (2005). Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science.* 61(11). 1115-1121.

Bülow, N., & König, W. (2000). The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry.* 55(2). 141-168.

Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía colombiana.* 26(1). 97-106.

Cerón, I., & Cardona, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. *Ingeniería y ciencia,* 7(13). 65-86.

Christ, J., Sarnaglia, V., Barreto, L., Guimarães, E., Garbin, M., & Carrijo, T. (2016). The genus *Piper* (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil. *Rodriguésia.* 67. 1031-1046.

Craveiro, A., Matos, F., Alencar, J., & Plumel, M. (1989). Microwave oven extraction of an essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 4. 43-44.

Cronin, E. (1979). Oil of turpentine—a disappearing allergen. *Contact Dermatitis*. 5(5). 308-311.

da Silva, H., Yamaguchi, L., Young, M., Ramos, C., Amorim, A., Kato, M., & Batista, R. (2018). Antifungal piperamides from *Piper mollicomum* kunth (Piperaceae). *Eclética Química*. 43(1). 33-38.

de la Peña, J., Lee, H., Yoon, S., Kim, G., Lee, Y., & Cheong, J. (2013). The involvement of magnoflorine in the sedative and anxiolytic effects of *Sinomeni Caulis* et *Rhizoma* in mice. *Journal of Natural medicines*, 67, 814-821.

Dewick, P. (2003). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3th Ed. *John Wiley & Sons*. 167- 173. Universidad de Nottingham. Nottingham. Reino Unido.

Donato, P., Cacciola, F., Tranchida, P. Q., Dugo, P., & Mondello, L. (2012). Mass spectrometry detection in comprehensive liquid chromatography: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends. *Mass spectrometry reviews*. 31(5). 523-559.

dos Santos, P., de Lima, D., Guimarães, E., & Coelho, M. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from de Brazilian Atlantic Forest. *Phytochemistry*. 58. 547-551.

Fazolin, M., Monteiro, A., Bizzo, H., Gama, P., Viana, L., & Lima, M. (2022). Insecticidal activity of *Piper aduncum* oil: variation in dillapiole content and chemical and toxicological stability during storage. *Acta Amazónica*. 52. 179-188.

Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., & Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*. 23(4). 213-226.

Flowerin, F. (1998). The Angiosperm phylogeny group (1998). An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 85(4). 531–553.

Gaub, M., Von Brocke, A., Roos, G., & Kovar, K. (2004). High-performance liquid chromatography–coordination ion spray–mass spectrometry (HPLC-CIS/MS): a new tool for the analysis of non-polar compound classes in plant extracts using the example of *Piper methysticum* forst. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 15(5). 300-305.

Golmakani, M., & Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food chemistry*. 109(4). 925-930.

Gomis, V. (2008). Tema 3. Cromatografía de gases. *Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial*. 8-10. Universidad de Alicante. Alicante. España.

Gu, D., Yang, H., Kim, S., Hwang, Y., & Ha, H. (2022). Water extract of *Piper longum* Linn ameliorates ovariectomy-induced bone loss by inhibiting osteoclast differentiation. *Nutrients*. 14(17). 3667.

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(1). 39-48.

Gupta, M., Santana, A., & Espinosa, A. (2013a). Plantas medicinales de Panamá. 435-440. Panamá.

Gupta, M., Santana, A., & Espinosa, A. (2013b). Plantas medicinales de Panamá: *Piper peltatum* L. *Species Plantarum*. 1(30). 412-416.

Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*. 49. 1341-1348.

Herrera, M., Raveles, L., & Velásquez, R. (2016). Cambios en el metabolismo de los fenilpropanoides en plantas de Chile tipo mirasol infectadas por fitoplasma. *Folleto Técnico* 79. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP. México. 12-18.

Herrera, O., Chacaltana, L., Yuli, R., Pari, B., Enciso, E., Tinco, J., Rojas, J., Veliz, L., & Franco, C. (2019). Antioxidant and cytoprotective effect of *Piper aduncum* L. against sodium fluoride (NaF)-induced toxicity in albino mice. *Toxics*. 7(2). 28.

Hurtado, R. (2018). El género *Piper* L. (Piperaceae) en el santuario ecológico municipal San Juan de Corralito. Santa Cruz. Bolivia. *Kempffiana*. 14(1). 32-38.

Ingaroca, S., Castro, A., & Ramos, N. (2019). Composición química y ensayos de actividad antioxidante y del efecto fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial de *Piper aduncum* L. "Matico". *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 85(2). 268-279.

Jahan, I., Akbar, P., Khan, N., Khan, T., Rahman, M., Hira, A., & Hossain, H. (2014). Comparative study of anti-nociceptive activity and phenolic content of the ethanol extracts of *Piper nigrum* and *Piper longum* fruits. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 27(1). 47-52.

Jaramillo, B., Duarte, E., & Pino, N. (2015). Evaluation of repellent activity of essential oils obtained from Piperaceae plants from Chocó department. Colombia. *Revista de Toxicología*. 32. 112-116.

Jaramillo, B., Pino, N., & González, A. (2019). Volatile composition and biocidal (antifeedant and phytotoxic) activity of the essential oils of four Piperaceae species from Choco-Colombia. *Industrial Crops & Products*. 138. 111463.

Kato, M., & Furlan, M. (2007). Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry*. 79(4). 529-538.

Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*. 13(2). 105-113.

la Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., & Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*. 198(1). 267-284.

Langenheim, J. (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*. 20. 1223-1280.

Lee, Y., Hsieh, Y., Yeh, Y., & Huang, C. (2015). Synthesis of phenolic amides and evaluation of their antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*. *RSC Advances*. 5(104). 85806-85815.

Lock, O., & Rojas, R. (2004). Química y farmacología del *Piper aduncum* L. (" Matico"). *Revista de Química*. 18(2). 27-32.

Luengo, M. T. L. (2002). Flavonoides. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 21(4), 108-113.

Macheix, J., Fleuriet, A., & Billiot, J. (1990). Fruit Phenolics. 1st Ed. *CRC Press Revivals*. Florida. EE. UU. 95-96.

Marriott, P., Shellie, R., & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. 936. 1-22.

MassBank. Disponible en: www.massbank.eu/MassBank/. Fechas de consulta: enero de 2023 a agosto de 2023.

Maxwell, A., & Ramprasad, D. (1989). β -Phenylethylamine-derived amides from *Piper guayranum*. *Journal of Natural Products*. 52(2). 411-414.

McLafferty, F., Stauffer, D., Stenhagen, E., & Heller, S. (2008). The Wiley/NBS registry of mass spectral data. *John Wiley & Sons*.

Miller, N., Sampson, J., Candeias, L., Bramley, P., & Rice, C. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*. 384(3). 240-242.

Morales, M., Bustamante, S., Brito, G., Paz, D., & Cassels, B. (1998). Cardiovascular effects of plant secondary metabolites norarmepavine, coclaurine and norcoclaurine. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 12(2). 103-109.

Muñoz, A., González, M., De Moya, Y., & Rodríguez, J. (2023). Volatile Metabolites of

Piper eriopodon (Miq.) C. DC. from Northern Region of Colombia and Assessment of *in-vitro* Bioactivities of the Leaf Essential Oil. *Molecules*. 28(6). 2594.

Nailufar, N., & Prijono, D. (2017). Synergistic activity of *Piper aduncum* fruit and *Tephrosia vogelii* leaf extracts against the cabbage head caterpillar. *Crocidolomia pavonana*. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*. 23(1). 102-110.

Navickiene, H., Morandim, A., Alécio, A., Regasini, L., Bergamo, D., Telascrea, M., & Kato, M. (2006). Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Química Nova*. 29. 467-470.

Nigam, S., & Purohit, R. (1962). Chemical examination of the essential oil of the leaves of *Piper betle*. *Riechstoffs Aromen*. 12. 185-190.

Noge, K., & Becerra, J. (2009). Germacrene D, a common sesquiterpene in the genus *Bursera* (Burseraceae). *Molecules*. 14(12). 5289-5297.

Noriega, P. (2020). Terpenes in Essential Oils: Bioactivity and Applications. In *Terpenes and Terpenoids: Recent Advances*. *IntechOpen*. Norderstedt, Germany. 21. 13-17

Núñez, V., Castro, V., Murillo, R., Ponce, L., Merfort, I., & Lomonte, B. (2005). Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*. 66. 1017-1025.

Orjala, J., Wright, A., Behrends, H., Folkers, G., Sticher, O., Rügger, H., & Rali, T. (1994). Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Journal of Natural Products*. 57(1). 18-26.

Panchawat, S., Rathore, K., & Sisodia, S. (2010). A review on herbal antioxidants. *International Journal of PharmaTech Research*. 2. 232-239.

Parise, R., Pastrello, M., Pereira, C., Silva, G., Agostinho, L., de Souza, T., & Polli, M. (2011). The anti-inflammatory activity of dillapiole and some semisynthetic analogues. *Pharmaceutical Biology*. 49(11). 1173-1179.

Pássaro, C., Rivera, C., Román, M., Cardona, L., Muñoz, L., Gómez, D., Quiceno, J., & Rojas, L. (2016). *Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones*. 22-32. Servicio Nacional de Aprendizaje. Antioquia. Colombia

Pino, J., Marbot, R., Bello, A., & Urquiola, A. (2004). Essential oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 16(2). 124-126.

Poole, C. (2015). Ionization-based detectors for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1421. 137-153.

Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., & Moulis, C. (2007). Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry*. 68(9). 1312-1320.

Potzernheim, M., Bizzo, H., Agostini, T., Vieira, R., Carvalho, M., & Gracindo, L. (2006). Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 8. 10-12.

Puertas, M., Gómez, L., Rojano, B., & Sáez, J. (2009). Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2).

Rali, T., Wossa, S., Leach, D., & Waterman, P. (2007). Volatile chemical constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C. DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. *Molecules*. 12(3). 389-394.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 26(9-10). 1231-1237.

Reyes, A., González, J., Urquiola, A., García, M., & Monteagudo, R. (2017). Influencia del método de secado y el tiempo de almacenamiento en estante de las hojas de *Erythroxylum minutifolium* griseb sobre la actividad citotóxica y antiherpética tipo 1. *Revista Cubana de Química*. 19(1). 33-35.

Rice, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of

flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(7). 933-956.

Ríos, J. (2016). Essential Oils: what they are and how the terms are used and defined. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, Valencia, España. 3-10.

Rojano, B., Gaviria, C., & Sáez, J. (2008). Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae*. 15(2). 212-218.

Salehi, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K., & Setzer, W. N. (2019). *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. *Molecules*, 24(7), 1364.

Salleh, W., Ahmad, F., & Yen, K. (2015). Chemical constituents from *Piper caninum* and antibacterial activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(6). 020-025.

Sambaiah, M., Thota, P., Kottawar, S., Yennam, S., Shiva, K., & Behera, M. (2021). Synthesis of new lansiumamide A/alamide (*cis*-isomer) based unnatural α -amino acid derivatives via the suzuki-miyaura cross coupling as key step. *Chemistry Select*. 6(22). 5406-5410.

Sánchez, R., & Restrepo, J. (2009). Comparación de la composición de aceites esenciales de salvia amarga (*Eupatorium odoratum*) obtenidos por hidrodestilación y dióxido de carbono supercrítico. *El Hombre y la Máquina*. (32). 76-85.

Scigelova, M., & Makarov, A. (2006). Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics. *Proteomics*. 6(S2). 16-21.

Semple, K. (1974). Pollination in Piperaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 868-871.

Silva, J., Oliveira, F., Guedes, E., Bittencourt, M., & Oliveira, P. (2014). Antioxidant activity of *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* and *Piper divaricatum*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 16. 700-706.

Singh, S., Chaurasia, P. K., & Bharati, S. L. (2022). Functional roles of essential oils as an effective alternative of synthetic food preservatives: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*. 46(8). e16804.

Skoog, D. (2015). Principios del análisis instrumental. *Edi Cengage*. 9^{na} Ed. Singapur, EE. UU. 181, 183, 251-283, 794-801, 960-968.

Snyder, L., Kirkland, J., & Dolan, J. (2010). Introduction to modern liquid chromatography. *John Wiley y Sons Inc. Hoboken*. 3th Ed. 110-111. New York. EE. UU.

Soares, D., Portella, N., Ramos, M., Siani, A., & Saraiva, E. (2013). *trans*- β -Caryophyllene: an effective antileishmanial compound found in commercial copaiba oil (*Copaifera* spp.). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013. 1-13

Sruthi, D., & Zachariah, T. (2016). Phenolic profiling of *Piper* species by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 25(2). 123-132

Stashenko, E. (2009a). Aceites esenciales. División de publicaciones. Universidad Industrial de Santander. 1^{ra} Ed. Bucaramanga. Colombia.

Stashenko, E., & Martínez, J. (2009b). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. 1. 29-45.

Stashenko, E., & Martínez, J. (2011). Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. 3(1).

Stashenko, E., & Martínez, J. GC-MS: (2010). Más de un analizador de masas. ¿para qué? *Scientia Chromatographica*. 2(4). 25-48.

Stashenko, E., Jaramillo, B., & Martínez, J. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* Mill. N.E. Brown. grown in Colombia. and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*. 1025. 93-103.

Suárez, D., & Morales, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Formación Investigativa*. 4. 1–8.

Tabopda, T., Ngoupayo, J., Liu, J., Mitaine, A., Tanoli, S., Khan, S., & Luu, B. (2008). Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *Phytochemistry*. 69(8). 1726-1731.

The NIST mass spectral search program (2.3). (2017). Standard reference data program of the National Institute of Standards and Technology.

ThermoFisher Scientific. *Orbitrap* LC-MS. Disponible en: thermofisher.com/co/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms.html. Fecha de consulta: 15 de junio de 2022.

Tsuji, P., Winn, R., & Walle, T. (2006). Accumulation and metabolism of the anticancer flavonoid 5, 7-dimethoxyflavone compared to its unmethylated analog chrysin in the *Atlantic killifish*. *Chemico-Biological Interactions*. 164(1-2). 85-92.

Usano, J., Paúl, J., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)*. 7(2).

Varughese, T., Unnikrishnan, P., Deepak, M., Balachandran, I., & Rema, A. (2016). Chemical composition of the essential oils from stem, root, fruit and leaf of *Piper longum* Linn. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. 19(1). 52-58.

Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(3). 701-705.

Wishart, D., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J. A., Lim, E., Sobsey, C. A., Shrivastava, S., Huang, P., Forsythe, I. (2009). The human metabolome database. *Nucleic Acids Res*. <https://hmdb.ca/>.

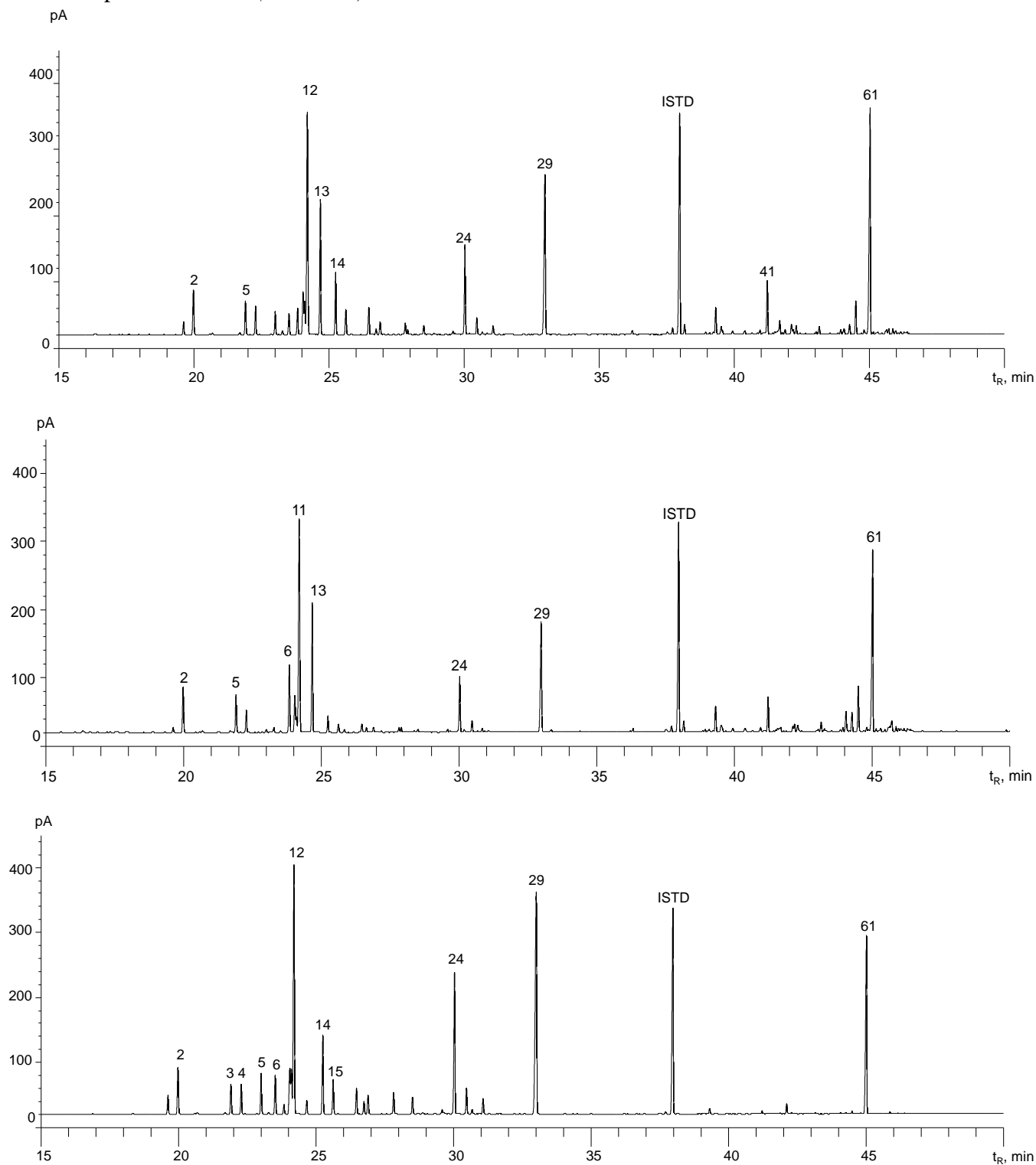
Wolfenden, B., & Willson, R. (1982). Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azino-bis-(3-

ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions.* 2(7). 805-812.

Yoshida, N., Benedetti, A., dos Santos, R., Ramos, C., Batista, R., Yamaguchi, L., & Kato, M. (2018). Alkenylphenols from *Piper dilatatum* and *P. diospytifolium*. *Phytochemistry Letters.* 25. 136-140.

Anexos

Figura A 1. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de *P. aduncum* A. Partes aéreas; B. Hojas, y C. Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV)



A.

B.

C.

Tabla A 1. Composiciones químicas obtenidas por GC/ FID de los aceites esenciales destilados de *P. aduncum*.

N° Fig. A1	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (IRL)				Relación $A_i/A_{std} \bar{x} \pm s$ ($n = 3$)		
			DB-5MS		DB-WAX		Partes aéreas	Hojas	Inflorescencias
			Exp	Lit	Exp	Lit			
1	α -Thujeno ^{a,b}	HM	927	930 ^d	1024	1026 ^e	0.06 \pm 0.01	0.020 \pm 0.006	0.10 \pm 0.02
2	α -Pinenol ^{a,b,c}	HM	935	939 ^d	1019	1025 ^e	0.20 \pm 0.03	0.20 \pm 0.06	0.20 \pm 0.05
3	Canfeno ^{a,b,c}	HM	952	954 ^d	1062	1068 ^e	-	-	0.008 \pm 0.002
4	Sabineno ^{a,b,c}	HM	975	975 ^d	1119	1122 ^e	-	-	0.010 \pm 0.002
5	β -Pinenol ^{a,b}	HM	980	979 ^d	1106	1110 ^e	0.16 \pm 0.02	0.15 \pm 0.04	0.15 \pm 0.03
6	β -Mirceno ^{a,b,c}	HM	989	990 ^d	1163	1161 ^e	0.12 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03
7	α -Felandreno ^{a,b,c}	HM	1008	1002 ^d	1163	1168 ^e	0.08 \pm 0.02	0.007 \pm 0.006	0.20 \pm 0.04
8	Δ^3 -Careno ^{a,b}	HM	1010	1011 ^d	1146	1147 ^e	0.020 \pm 0.003	0.01 \pm 0.01	0.010 \pm 0.002
9	α -Terpineno ^{a,b,c}	HM	1019	1017 ^d	1178	1177 ^e	0.07 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.20 \pm 0.04
10	<i>p</i> -Cimeno ^{a,b,c}	HM	1027	1024 ^d	1271	1270 ^e	0.15 \pm 0.04	0.30 \pm 0.02	0.040 \pm 0.004
11	Limoneno ^{a,b,c}	HM	1032	1029 ^d	1198	1198 ^e	0.20 \pm 0.02	0.16 \pm 0.03	0.44 \pm 0.10
12	1,8-Cineol ^{a,b,c}	MO	1036	1037 ^d	1208	1211 ^e	1.10 \pm 0.09	1.0 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2
13	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	HM	1047	1050 ^d	1252	1250 ^e	0.60 \pm 0.06	0.4 \pm 0.2	0.08 \pm 0.02
14	γ -Terpineno ^{a,b}	HM	1061	1059 ^d	1245	1245 ^e	0.20 \pm 0.05	0.04 \pm 0.04	0.40 \pm 0.07
15	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno ^{a,b}	MO	1073	1070 ^d	1465	1460 ^e	0.10 \pm 0.01	0.040 \pm 0.002	0.20 \pm 0.03
16	Terpinoleno ^{a,b}	HM	1088	1088 ^d	1282	1282 ^e	0.10 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02
17	Linalol ^{a,b,c}	MO	1100	1096 ^d	1546	1543 ^e	0.020 \pm 0.001	-	0.060 \pm 0.006
18	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno ^{a,b}	MO	1104	1098 ^d	1550	1549 ^e	0.060 \pm 0.006	0.020 \pm 0.001	0.10 \pm 0.01
19	<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol ^{a,b}	MO	1128	1121 ^d	-	1614 ^e	0.050 \pm 0.004	0.01 \pm 0.01	0.100 \pm 0.008
20	<i>trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol ^{a,b}	MO	1146	1140 ^d	1629	1606 ^f	0.040 \pm 0.003	0.2 \pm 0.1	0.080 \pm 0.008

Tabla A 1. Continuación.

21	Alcanfor ^{a,b}	MO	1153	1146 ^d	1523	1515 ^e	-	-	0.010 ± 0.002
22	δ-Terpineol ^{a,b}	MO	1174	1166 ^d	1673	1679 ^e	-	-	0.025 ± 0.003
23	Borneol ^{a,b}	MO	1177	1169 ^d	1704	1700 ^e	-	-	0.010 ± 0.001
24	Terpinen-4-ol^{a,b,c}	MO	1186	1177 ^d	1605	1601 ^e	0.37 ± 0.03	0.1 ± 0.1	0.70 ± 0.07
25	α-Terpineol ^{a,b,c}	MO	1199	1190 ^d	1699	1694 ^e	0.06 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.13 ± 0.02
26	N.I. (Figura A 4)	-	1208	-	1820	-	-	0.4 ± 0.4	-
27	<i>trans</i> -Piperitol ^{a,b}	MO	1201	1208 ^d	1680	1710 ^e	0.006 ± 0.006	-	0.06 ± 0.03
28	<i>cis</i> -Piperitol ^{a,b}	MO	1212	1194 ^e	1743	1750 ^e	0.03 ± 0.02	-	0.04 ± 0.04
29	Piperitona^{a,b}	MO	1262	1252 ^d	1735	1730 ^e	0.90 ± 0.04	0.4 ± 0.3	1.6 ± 0.1
30	Ciclosativeno ^{a,b}	HS	1377	1374 ^f	1485	1483 ^e	0.005 ± 0.005	-	-
31	α-Copaeno ^{a,b}	HS	1381	1376 ^d	1494	1491 ^e	0.020 ± 0.005	0.02 ± 0.02	0.010 ± 0.003
32	β-Elemenol ^{a,b}	HS	1394	1390 ^d	1593	1591 ^e	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.03	-
33	α-Gurjuneno ^{a,b}	HS	1417	1409 ^d	1532	1529 ^e	0.02 ± 0.03	0.07 ± 0.06	-
34	<i>trans</i> -β-Cariofileno ^{a,b,c}	HS	1431	1427 ^f	1602	1599 ^e	0.110 ± 0.004	0.08 ± 0.08	0.030 ± 0.008
35	β-Santaleno ^{a,b}	HS	1465	1459 ^d	1650	1644 ^e	-	-	0.003 ± 0.003
36	β-Copaeno ^{a,b}	HS	1441	1432 ^d	-	1576 ^e	0.045 ± 0.003	0.04 ± 0.03	-
37	Aromadendreno ^{a,b,c}	HS	1450	1441 ^d	1612	1620 ^e	0.009 ± 0.009	0.027 ± 0.002	-
38	α-Humuleno ^{a,b,c}	HS	1467	1468 ^f	1673	1667 ^e	0.022 ± 0.001	0.030 ± 0.005	-
39	N.I. (Figura A 5)	HS	1481	-	1760	-	-	-	0.01 ± 0.01
40	γ-Muuroleno ^{a,b}	HS	1483	1478 ^d	1692	1690 ^e	0.020 ± 0.002	0.08 ± 0.07	0.002 ± 0.002
41	Germacreno D^{a,b,c}	HS	1492	1481 ^d	1714	1708 ^e	0.20 ± 0.01	0.10 ± 0.10	0.010 ± 0.004
42	Viridifloreno ^{a,b}	HS	1499	1496 ^d	-	1708 ^e	-	0.01 ± 0.01	-

Tabla A 1. Continuación.

43	<i>cis</i> - β -Guaieno ^{a,b}	HS	1505	1493 ^d	-	1696 ^e	-	0.04 ± 0.02	0.004 ± 0.004
44	α -Muuroleno ^{a,b}	HS	1505	1500 ^d	-	1726 ^f	-	-	0.004 ± 0.003
45	Cadina-3,9-dieno ^{a,b}	HS	1511	1518 ^f	-	1720 ^f	-	-	0.006 ± 0.006
46	Valenceno ^{a,b}	HS	1500	1496 ^d	-	1729 ^e	0.011 ± 0.001	-	-
47	Biciclogermacreno ^{a,b}	HS	1505	1500 ^d	-	1735 ^e	0.07 ± 0.02	-	-
48	N.I. (Figura A 6)	HS	1510	-	-	-	0.01 ± 0.01	-	-
49	γ -Cadineno ^{a,b}	HS	1522	1513 ^d	1760	1760 ^f	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	-
50	δ -Cadineno ^{a,b}	HS	1525	1522 ^d	1756	1763 ^e	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	-
51	Miristicina ^{a,b}	FN	1526	1518 ^d	2265	2261 ^e	0.01 ± 0.02	-	0.050 ± 0.006
52	N.I. (Figura A 7)	-	1562	-	2039	-	-	-	0.003 ± 0.006
53	<i>trans</i> -Nerolidol ^{a,b,c}	SO	1563	1563 ^d	2039	2036 ^e	0.02 ± 0.01	-	0.002 ± 0.004
54	N.I. (Figura A 8)	SO	1563	-	-	-	-	0.02 ± 0.02	-
55	Germacreno B ^{a,b}	HS	1571	1559 ^d	1832	1823 ^e	0.02 ± 0.02	0.05 ± 0.05	-
56	Espatuleno ^{a,b}	SO	1588	1578 ^d	-	2127 ^e	0.036 ± 0.004	0.09 ± 0.08	-
57	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	SO	1595	1583 ^d	1985	1986 ^e	0.040 ± 0.002	0.090 ± 0.006	-
58	N.I. (Figura A 9)	HS	1594	-	-	-	-	-	0.012 ± 0.003
59	Viridiflorol ^{a,b}	SO	1608	1592 ^d	2083	2090 ^e	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.015 ± 0.007
60	Ledol ^{a,b}	SO	1619	1612 ^f	-	2039 ^e	0.020 ± 0.002	0.02 ± 0.002	-
61	Dilapiol^{a,b,c}	FN	1628	1620 ^d	2361	2346 ^e	1.10 ± 0.08	0.98 ± 0.07	0.9 ± 0.2
62	N.I. (Figura A 10)	SO	1652	-	-	-	-	0.08 ± 0.07	-
63	α -Muurolol ^{a,b}	SO	1657	1642 ^d	-	-	-	0.01 ± 0.01	-
64	4-Murolen-10-ol ^{a,b}	SO	1653	1653 ^f	-	2187 ^f	0.030 ± 0.001	-	-

Tabla A 1. Continuación.

65	α -Cadinol ^{a,b}	SO	1655	1654 ^d	-	2227 ^e	0.026 \pm 0.002	0.006 \pm 0.006	-
66	N.I. (Figura A 11)	SO	1676	-	-	-	0.007 \pm 0.007	0.005 \pm 0.005	-
HM	Hidrocarburos monoterpénicos						1.96 \pm 0.06	1.4 \pm 0.1	2.10 \pm 0.09
MO	Monoterpenos oxigenados						2.70 \pm 0.06	2.0 \pm 0.4	4.4 \pm 0.1
FN	Fenilpropanoides						1.15 \pm 0.05	0.98 \pm 0.04	0.9 \pm 0.1
HS	Hidrocarburos sesquiterpénicos						0.65 \pm 0.03	0.7 \pm 0.1	0.09 \pm 0.01
SO	Sesquiterpeno oxigenado						0.31 \pm 0.01	0.50 \pm 0.06	0.017 \pm 0.005

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales medidos en las columnas DB-WAX y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD). *i.e.*, α -pineno (98%. IRL_{DB-5MS}= 937. IRL_{DB-WAX}=1024). canfeno (95%. IRL_{DB-5MS}= 954. IRL_{DB-WAX}= 1068). sabineno (95%. IRL_{DB-5MS}= 976. IRL_{DB-WAX}= 1124). β -mirceneno (94%. IRL_{DB-5MS}= 989. IRL_{DB-WAX}= 1165). α -felandreno (98%. IRL_{DB-5MS}= 1007. IRL_{DB-WAX}= 1168). α -terpineno (97%. IRL_{DB-5MS}= 1020. IRL_{DB-WAX}= 1184). p-cimeno (99%. IRL_{DB-5MS}= 1028. IRL_{DB-WAX}= 1274). limoneno (97%. IRL_{DB-5MS}= 1033. IRL_{DB-WAX}= 1202). 1.8-cineol (99%. IRL_{DB-5MS}= 1036. IRL_{DB-WAX}= 1215). γ -terpineno (96%. IRL_{DB-5MS}= 1066. IRL_{DB-WAX}= 1259). linalol (97%. IRL_{DB-5MS}= 1102. IRL_{DB-WAX}= 1551). terpinen-4-ol (95%. IRL_{DB-5MS}= 1187. IRL_{DB-WAX}= 1611). α -terpineol (90%. IRL_{DB-5MS}= 1202. IRL_{DB-WAX}= 1704). *trans*- β -cariofileno (98.5%. IRL_{DB-5MS}= 1434. IRL_{DB-WAX}= 1611). aromadendreno (99%. IRL_{DB-5MS}= 1452. IRL_{DB-WAX}= 1620). α -humuleno (96%. IRL_{DB-5MS}= 1470. IRL_{DB-WAX}= 1683). germacreno D (90%. IRL_{DB-5MS}= 1490. IRL_{DB-WAX}= 1716). *trans*-nerolidol (96%. IRL_{DB-5MS}= 1534. IRL_{DB-WAX}= 2261). óxido de cariofileno (95%. IRL_{DB-5MS}= 1598. IRL_{DB-WAX}= 1996) y dilapiol (95%. IRL_{DB-5MS}= 1627. IRL_{DB-WAX}= 2359) por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, grado de coincidencia >95%) y tiempos de retención (t_R).

d Adams (2007).

e Babushok *et al.* (2011).

f NIST, (2017).

Tabla A 2. Composición química obtenida por GC/MS de los aceites esenciales destilados de las raíces de *P. aduncum*.

N° Fig. A2	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (IRL)				Cantidad relativa, % $\bar{x} \pm s$ (n = 3)	Relación A_i/A_{istd} $\bar{x} \pm s$ (n = 3)
			DB-5MS		DB-WAX			
			Exp	Lit	Exp	Lit		
1	Canfeno ^{a,b,c}	HM	952	954 ^d	-	1069 ^e	0.4 ± 0.1	0.05 ± 0.01
2	Δ^3 -Careno ^{a,b}	HM	1010	1011 ^d	1145	1147 ^e	0.5 ± 0.2	0.06 ± 0.02
3	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b,c}	HS	1430	1427 ^f	1599	1599 ^e	0.1 ± 0.2	0.02 ± 0.03
4	Miristicina ^{a,b}	FN	1528	1518 ^d	2262	2261 ^e	4.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1
5	Dilapio ^{a,b,c}	FN	1634	1625 ^f	2362	2346 ^e	95.0 ± 0.5	10.0 ± 0.9
6	Apiol ^{a,b}	FN	1680	1678 ^d	2482	2446 ^f	0.40 ± 0.07	0.05 ± 0.01
HM	Hidrocarburos monoterpenicos						1.0 ± 0.1	0.11 ± 0.01
FN	Fenilpropanoides						99.0 ± 0.3	11.0 ± 0.5
HS	Hidrocarburos sesquiterpenicos						0.1 ± 0.1	0.02 ± 0.02

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales medidos en las columnas DB-WAX y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD). *i.e.* canfeno (95%. $IRL_{DB-5MS}=954$, $IRL_{DB-WAX}=1068$). *trans*- β -cariofileno (98.5%. $IRL_{DB-5MS}=1434$, $IRL_{DB-WAX}=1611$) y dilapio^l (95%. $IRL_{DB-5MS}=1627$, $IRL_{DB-WAX}=2359$) por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, grado de coincidencia >95%) y tiempos de retención (t_R).

d Adams (2007).

e Babushok *et al.* (2011).

f NIST (2017).

Figura A 2. Perfiles cromatográficos del aceite esencial de las raíces de *P. aduncum* obtenidos por: **A.** GC/MS y **B.** GC/FID. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

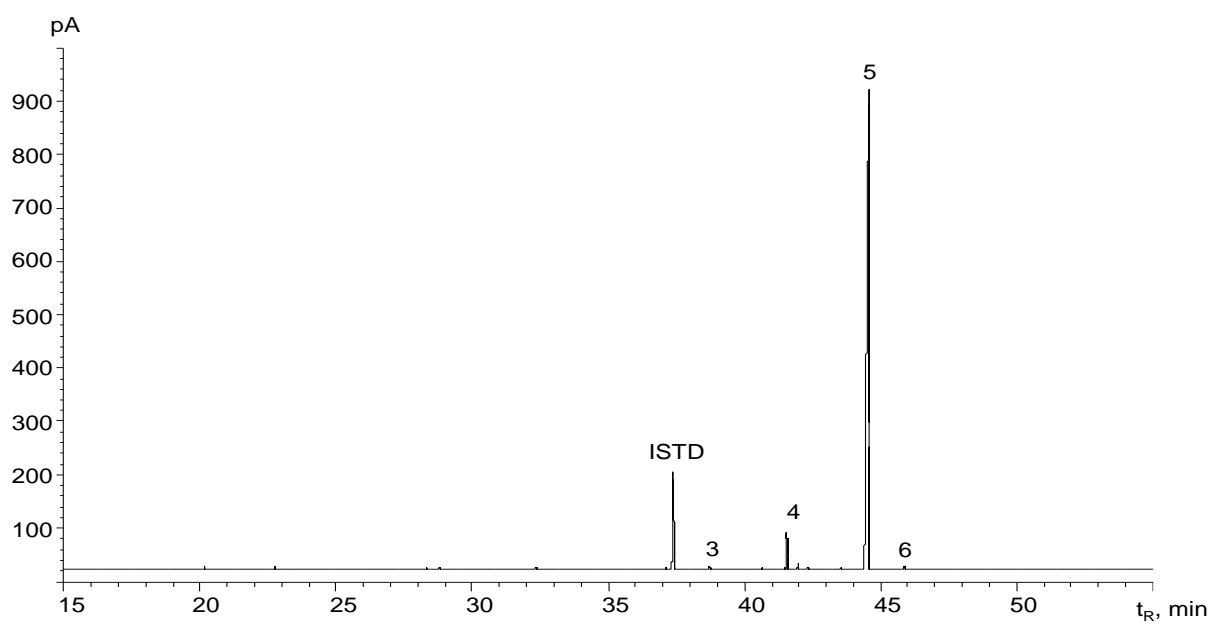
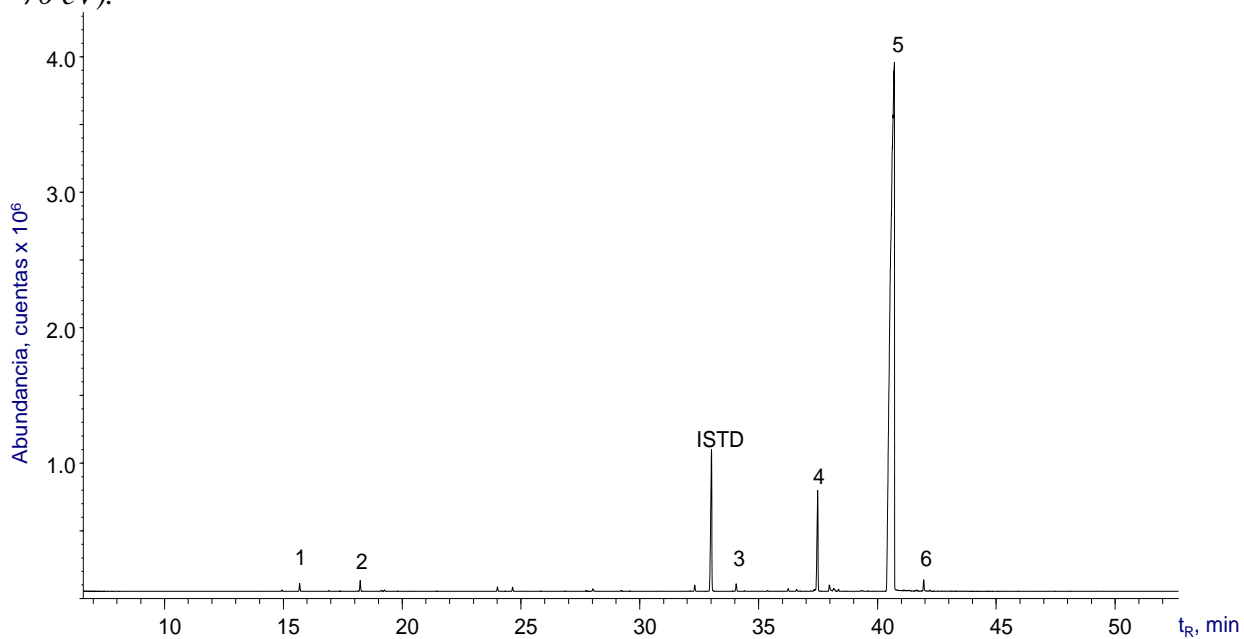


Tabla A 3. Composición química obtenida por GC/FID del aceite esencial destilado de partes aéreas de *P. peltatum*.

N° Fig. 21	Compuesto	Familia	Índices de retención lienes				Relación, A_i/A_{istd} ($n=1$) Partes aéreas
			DB-5MS		DB-WAX		
			Exp	Lit	Exp	Lit	
1	Linalol ^{a,b,c}	MO	1100	1096 ^d	1545	1543 ^e	0.08
2	Borneol ^{a,b}	MO	1177	1169 ^d	1701	1700 ^e	0.03
3	α -Copaeno ^{a,b}	HS	1380	1376 ^d	1492	1491 ^e	0.14
4	β -Cubebeno ^{a,b}	HS	1392	1388 ^d	1539	1542 ^e	0.08
5	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b,c}	HS	1431	1427 ^f	1600	1599 ^e	2.27
6	β -Copaeno ^{a,b}	HS	1438	1432 ^d	1594	1580 ^e	0.05
7	Acetona de geranilo ^{a,b}	CO	1449	1451 ^e	1852	1854 ^e	0.16
8	α -Humuleno ^{a,b}	HS	1465	1468 ^f	1671	1667 ^e	0.26
9	γ -Muuroloeno ^{a,b}	HS	1482	1478 ^d	1688	1690 ^e	0.04
10	<i>trans</i> - β -Ionona ^{a,b}	CO	1483	1487 ^d	-	1937 ^e	0.05
11	Germacreno D ^{a,b,c}	HS	1490	1481 ^d	1712	1708 ^e	1.32
12	Biciclogermacreno ^{a,b}	HS	1503	1500 ^d	1733	1735 ^e	0.47
13	δ -Cadineno ^{a,b}	HS	1523	1523 ^d	1756	1756 ^e	0.04
14	<i>cis</i> -Calameneno ^{a,b}	HS	1528	1529 ^d	1830	1835 ^e	0.05
15	α -Calacoreno ^{a,b}	HS	1549	1545 ^d	1914	1921 ^e	0.03
16	<i>trans</i> -Nerolidol ^{a,b}	SO	1563	1563 ^d	2037	2036 ^e	0.16
17	Espatuleno ^{a,b}	SO	1586	1578 ^d	2120	2127 ^e	0.07
18	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	SO	1593	1583 ^d	1982	1986 ^e	0.53
19	Epóxido de humuleno II ^{a,b}	SO	1620	1608 ^d	-	2047 ^e	0.06
20	1- <i>epi</i> -Cubeno ^{a,b}	SO	1636	1628 ^d	2061	2088 ^e	0.03

Tabla A 3. Continuación.

21	α - <i>epi</i> -Muurolool ^{a,b}	SO	1652	1640 ^d	-	2186 ^e	0.02
22	Cadeleno ^{a,b}	HS	1681	1675 ^d	2219	2233 ^e	0.04
23	<i>cis-cis</i> -Farnesol ^{a,b}	SO	1693	1698 ^d	-	2324 ^e	0.02
24	Benzoato de bencilo ^{a,b,c}	SO	1776	1761 ^e	2494	2612 ^e	0.04
25	trimetil-Pentadecanona ^{a,b}	CO	1840	1847 ^f	2124	2110 ^f	0.07
26	Octadecanola,b	CO	2088	2077 ^d	2497	2569 ^e	0.23
27	Fitol ^{a,b}	CO	2109	2116 ^e	2495	2622 ^f	1.27
MO	Monoterpenos oxigenados						0.10
HS	Hidrocarburos sesquiterpénicos						4.79
CO	Compuestos oxigenados						1.77
SO	Sesquiterpenos oxigenados						0.93

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales medidos en las columnas DB-WAX y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD). i.e. linalol (97%, IRL_{DB-5MS}= 1102, IRL_{DB-WAX}= 1551), *trans*- β -cariofileno (98.5%, IRL_{DB-5MS}= 1434, IRL_{DB-WAX}= 1611), germacreno D (90%, IRL_{DB-5MS}= 1490, IRL_{DB-WAX}= 1716), óxido de cariofileno (95%, IRL_{DB-5MS}= 1598, IRL_{DB-WAX}= 1996), *trans*-nerolidol (96%, IRL_{DB-5MS}= 1534, IRL_{DB-WAX}= 2261) y benzoato de bencilo (99%, IRL_{DB-5MS}= 1780, IRL_{DB-WAX}= 2652) por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, grado de coincidencia >95%) y tiempos de retención (t_R)

d Adams (2007).

e Babushok *et al.* (2011).

f NIST (2017).

Tabla A 4. Composición química obtenida por GC/FID de los aceites esenciales destilado de *P. dilatatum*.

N° Fig. A 3.	Compuesto	Familia	Índices de retención lineales (IRL)				Relación, A _i /A _{istd} , $\bar{x} \pm s$ (n = 3)		
			DB-5MS		DB-WAX		Partes aéreas	Hojas	Inflorescencias
			Exp	Lit	Exp	Lit			
1	α -Pinoeno ^{a,b,c}	HM	934	939 ^d	1018	1025 ^e	0.15 \pm 0.05	0.13 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01
2	β -Pinoeno ^{a,b}	HM	980	979 ^d	1105	1110 ^e	0.35 \pm 0.09	0.30 \pm 0.05	0.07 \pm 0.03
3	<i>cis</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	HM	1036	1037 ^d	1234	1235 ^e	0.160 \pm 0.005	0.07 \pm 0.06	0.04 \pm 0.04
4	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^{a,b}	HM	1047	1050 ^d	1251	1250 ^e	0.140 \pm 0.004	0.07 \pm 0.06	0.03 \pm 0.03
5	Linalol ^{a,b,c}	MO	1100	1096 ^d	1543	1543 ^e	-	-	0.044 \pm 0.002
6	<i>iso</i> -Mentona ^{a,b,c}	MO	1170	1162 ^d	1466	1483 ^e	-	-	0.04 \pm 0.04
7	Citronelal ^{a,b}	MO	1227	1229 ^d	-	1763 ^e	-	-	0.09 \pm 0.09
8	Geraniol ^{a,b,c}	MO	1252	1255 ^e	1843	1839 ^e	-	-	0.3 \pm 0.3
9	α -Copaeno ^{a,b}	HS	1382	1376 ^d	1484	1491 ^e	-	-	0.04 \pm 0.04
10	β -Cubebeno ^{a,b}	HS	1380	1387 ^d	1537	1541 ^e	0.100 \pm 0.006	0.06 \pm 0.06	0.02 \pm 0.02
11	Dauceno ^{a,b}	HS	1383	1380 ^d	-	1495 ^e	0.130 \pm 0.006	0.14 \pm 0.03	0.04 \pm 0.03
12	β -Elemeno ^{a,b}	HS	1394	1390 ^d	1593	1591 ^e	0.070 \pm 0.004	0.03 \pm 0.03	-
13	α - <i>cis</i> -Bergamoteno ^{a,b}	HS	1418	1411 ^d	1567	1559 ^e	0.28 \pm 0.01	0.30 \pm 0.06	0.10 \pm 0.05
14	β -Gurjuneno ^{a,b}	HS	1425	1431 ^d	1604	1596 ^e	0.12 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.03 \pm 0.03
15	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a,b,c}	HS	1431	1420 ^e	1590	1598 ^e	0.40 \pm 0.02	0.3 \pm 0.1	0.10 \pm 0.02
16	<i>trans</i> - α -Bergamoteno ^{a,b}	HS	1439	1434 ^d	-	1576 ^e	0.070 \pm 0.004	0.06 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02
17	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno ^{a,b}	HS	1445	1448 ^d	-	1634 ^g	0.210 \pm 0.009	0.20 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03
18	α -Guaieno ^{a,b}	HS	1449	1439 ^d	1606	1598 ^f	-	-	0.07 \pm 0.07
19	<i>trans</i> - β -Farneseno ^{a,b}	HS	1455	1456 ^d	1664	1664 ^e	0.15 \pm 0.15	0.20 \pm 0.09	0.10 \pm 0.03
20	N.I. (Figura A 12)	HS	1457	-	-	-	0.60 \pm 0.02	-	-

Tabla A 4. Continuación.

21	α -Humuleno ^{a,b,c}	HS	1467	1468 ^f	1673	1667 ^e	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.05	-
22	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno ^{a,b}	HS	1469	1465 ^d	1656	1643 ^f	0.090 ± 0.005	0.090 ± 0.006	0.03 ± 0.03
23	<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno ^{a,b}	HS	1482	1493 ^d	1697	-	1.66 ± 0.05	1.0 ± 0.5	0.35 ± 0.07
24	Germacreno D ^{a,b,c}	HS	1490	1481 ^d	1713	1708 ^e	0.110 ± 0.008	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.02
25	Biciclogermacreno ^{a,b}	HS	1506	1500 ^d	1736	1735 ^e	0.50 ± 0.02	0.2 ± 0.2	0.03 ± 0.03
26	β -Bisaboleno ^{a,b}	HS	1511	1505 ^d	1725	1728 ^e	0.053 ± 0.001	0.060 ± 0.004	0.03 ± 0.02
27	β -Sesquifelandreno ^{a,b}	HS	1528	1521 ^d	1765	1771 ^e	0.27 ± 0.01	0.20 ± 0.09	0.07 ± 0.02
28	<i>cis</i> -Calameneno ^{a,b}	HS	1540	1529 ^d	1851	1834 ^e	0.03 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
29	N.I. (Figura A 13)	HS	1556	-	-	-	0.04 ± 0.04	-	-
30	N.I. (Figura A 14)	SO	1559	-	-	-	0.15 ± 0.01	-	0.03 ± 0.03
31	<i>trans</i> -Nerolidol ^{a,b,c}	SO	1564	1563 ^d	2036	2036 ^e	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.10 ± 0.06
32	N.I. (Figura A 15)	SO	1588	-	2076	-	1.2 ± 0.1	1.10 ± 0.04	1.00 ± 0.45
33	Carotol ^{a,b}	SO	1592	1594 ^d	-	2027 ^e	0.15 ± 0.01	0.1 ± 0.1	0.03 ± 0.03
34	Óxido de cariofileno ^{a,b,c}	SO	1594	1583 ^d	1982	1986 ^e	-	0.2 ± 0.2	0.04 ± 0.04
35	N.I. (Figura A 16)	HS	1596	-	-	-	0.06 ± 0.06	0.07 ± 0.07	-
36	Ledol ^{a,b}	SO	1615	1612 ^f	2027	2039 ^e	0.10 ± 0.01	0.130 ± 0.006	0.05 ± 0.04
37	N.I. (Figura A 17)	SO	1633	-	-	-	0.05 ± 0.05	0.070 ± 0.002	-
38	γ -Eudesmol ^{a,b}	SO	1635	1632 ^d	-	2176 ^e	-	-	0.05 ± 0.05
39	4-Murolen-10-ol ^{a,b}	SO	1652	1653 ^f	-	2187 ^f	-	-	0.02 ± 0.02
40	N.I. (Figura A 18)	SO	1663	-	2287	-	0.30 ± 0.03	0.1 ± 0.1	0.18 ± 0.04
41	N.I. (Figura 23)	SO	1684	-	2386	-	4.0 ± 0.5	4.7 ± 0.7	5 ± 2
42	N.I. (Figura A 19)	HS	1689	-	2232	-	0.24 ± 0.02	0.40 ± 0.07	0.3 ± 0.1

Tabla A 4. *Continuación.*

43	Fitol ^{a,b}	CO	2110	2116 ^e	-	2622 ^f	-	0.04 ± 0.04	-
HM	Hidrocarburos monoterpenicos						0.80 ± 0.06	0.56 ± 0.06	0.15 ± 0.03
MO	Monoterpenos oxigenados						-	-	0.3 ± 0.2
CO	Compuestos oxigenados						-	0.04 ± 0.02	-
HS	Hidrocarburos sesquiterpénicos						5.0 ± 0.1	3.0 ± 0.5	1.03 ± 0.08
SO	Sesquiterpenos oxigenados						6.0 ± 0.3	7.0 ± 0.4	6 ± 1

a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90%).

b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales medidos en las columnas DB-WAX y DB-5MS.

c Identificación confirmatoria basada en sustancias de referencia (STD), i.e., α -pineno (98%, IRL_{DB-5MS}= 937, IRL_{DB-WAX}=1024), linalol (97%, IRL_{DB-5MS}= 1102, IRL_{DB-WAX}= 1551), *iso*-mentona (90%, IRL_{DB-5MS}= 1162, IRL_{DB-WAX}= 1500), geraniol (98%, IRL_{DB-5MS}= 1253, IRL_{DB-WAX}= 1853), *trans*- β -cariofileno (98.5%, IRL_{DB-5MS}= 1434, IRL_{DB-WAX}= 1611), α -humuleno (96%, IRL_{DB-5MS}= 1470, IRL_{DB-WAX}= 1683), germacreno D (90%, IRL_{DB-5MS}= 1490, IRL_{DB-WAX}= 1716), *trans*-nerolidol (96%, IRL_{DB-5MS}= 1534, IRL_{DB-WAX}= 2261) y óxido de cariofileno (95%, IRL_{DB-5MS}= 1598, IRL_{DB-WAX}= 1996), por comparación de espectros de masas (MS; EI, 70 eV, grado de coincidencia >95%) y tiempos de retención (t_R).

d Adams (2007).

e Babushok *et al.* (2011).

f NIST (2017).

g Arze *et al.* (2009).

Figura A 3. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/FID de los aceites esenciales de *P. dilatatum* **A.** Partes aéreas; **B.** Hojas y **C.** Inflorescencias. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).

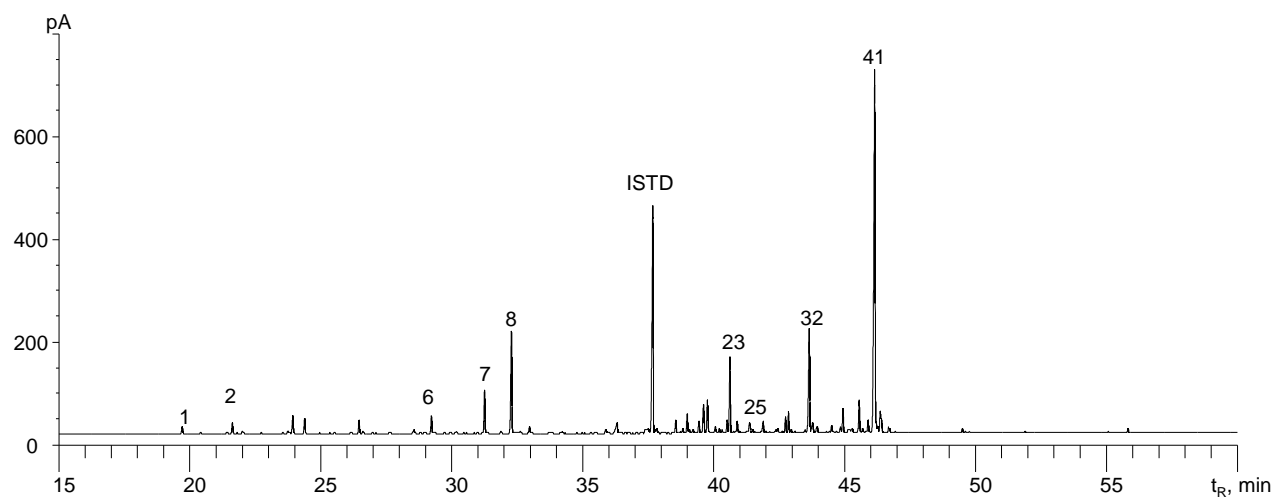
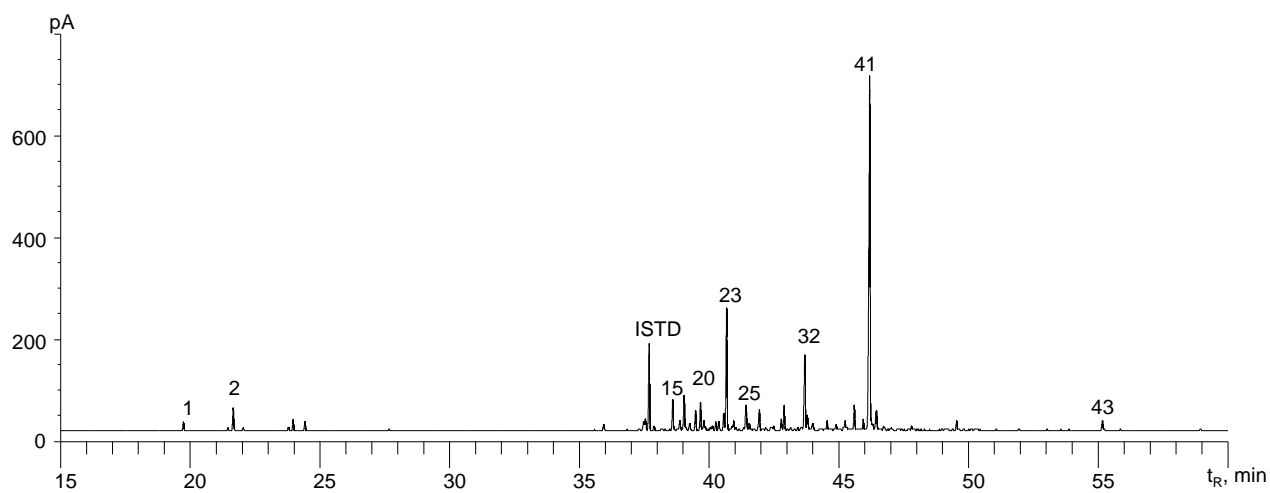
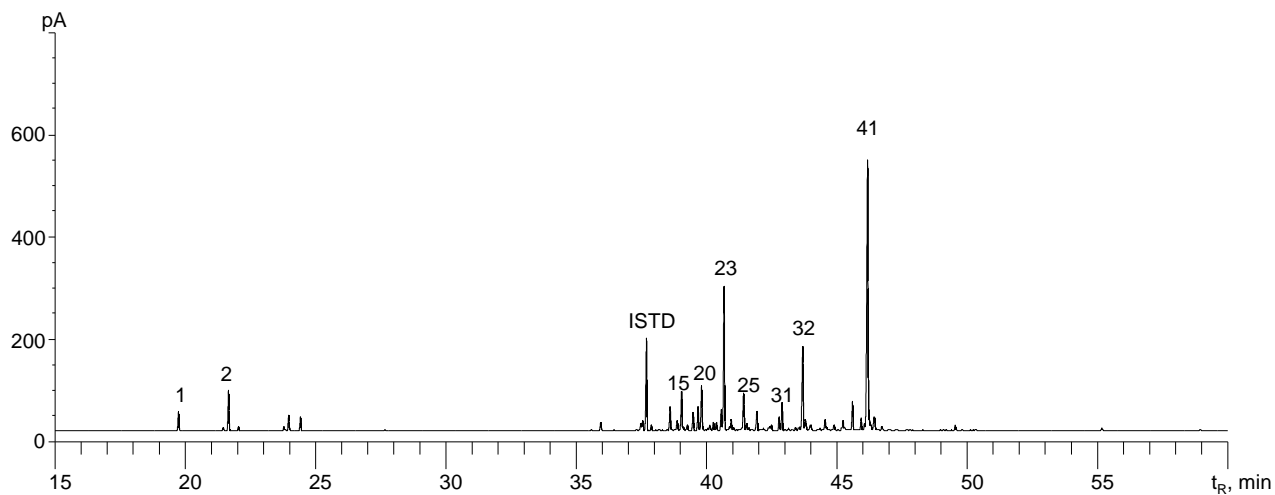


Figura A 4. Espectro de masas obtenido por GC/MS del monoterpreno no identificado $C_{10}H_{16}O$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°26 en la **Tabla 4**.

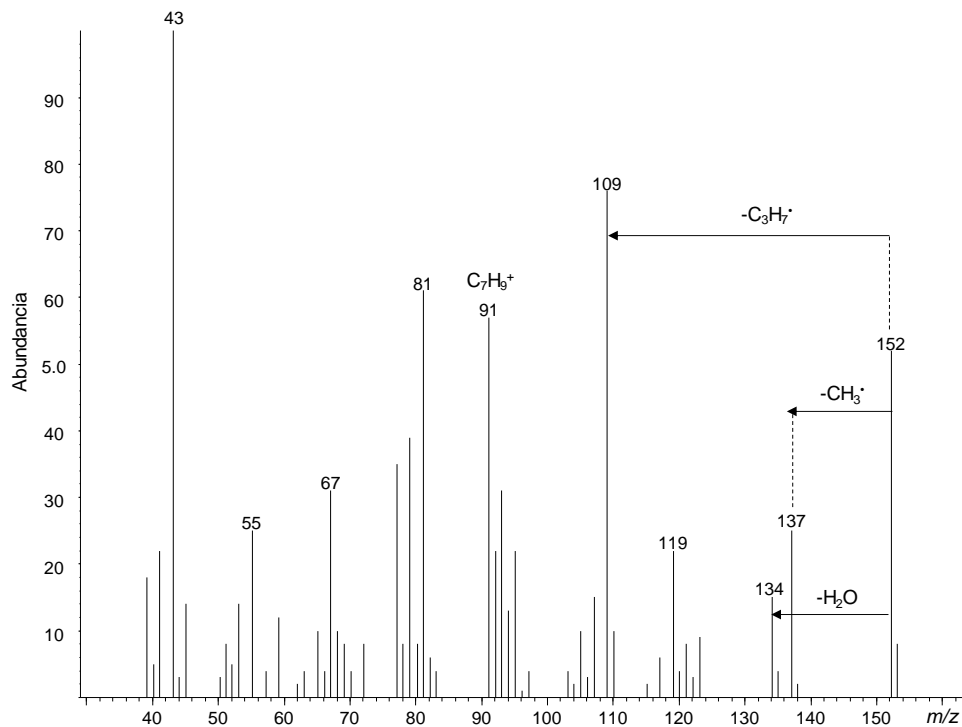


Figura A 5. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpreno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°39 en la **Tabla 4**.

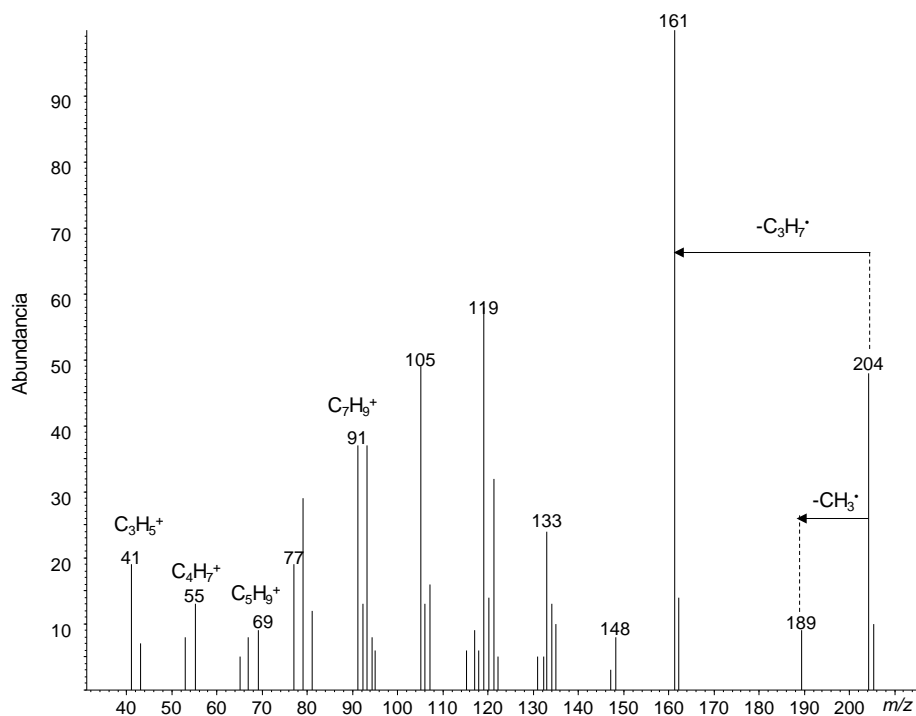


Figura A 6. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°48 en la **Tabla 4**.

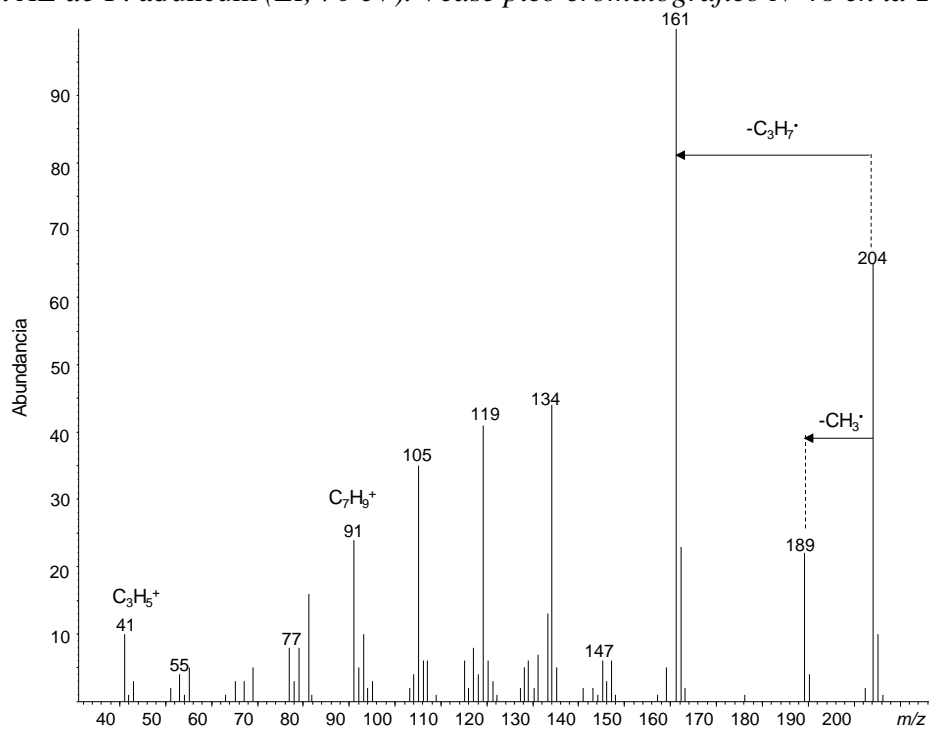


Figura A 7. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°52 en la **Tabla 4**.

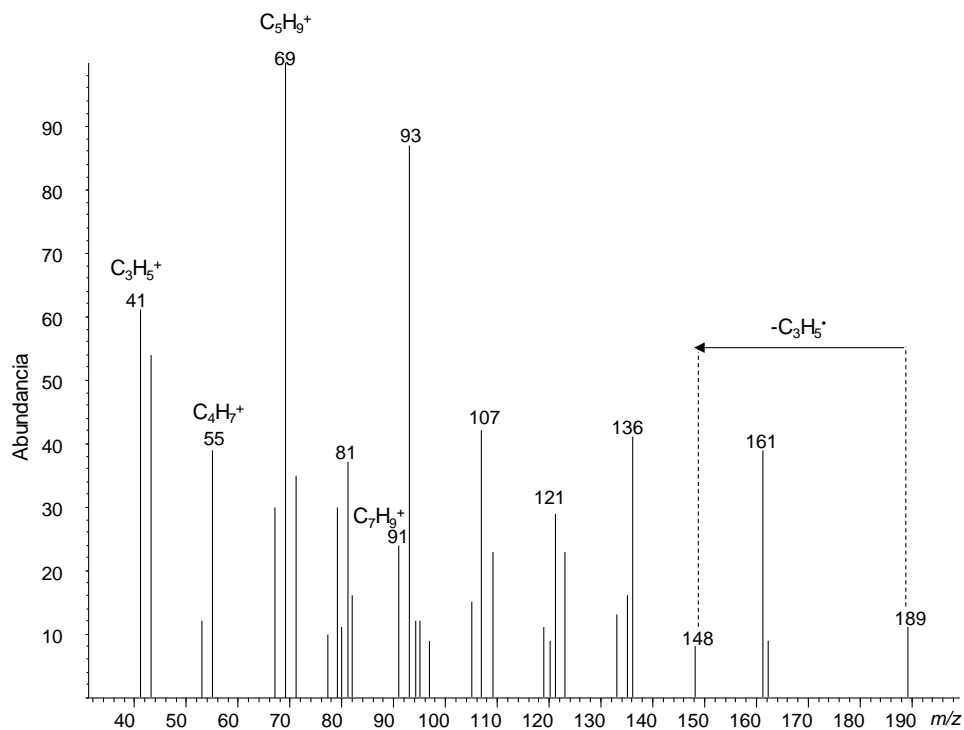


Figura A 8. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°54 en la **Tabla 4**.

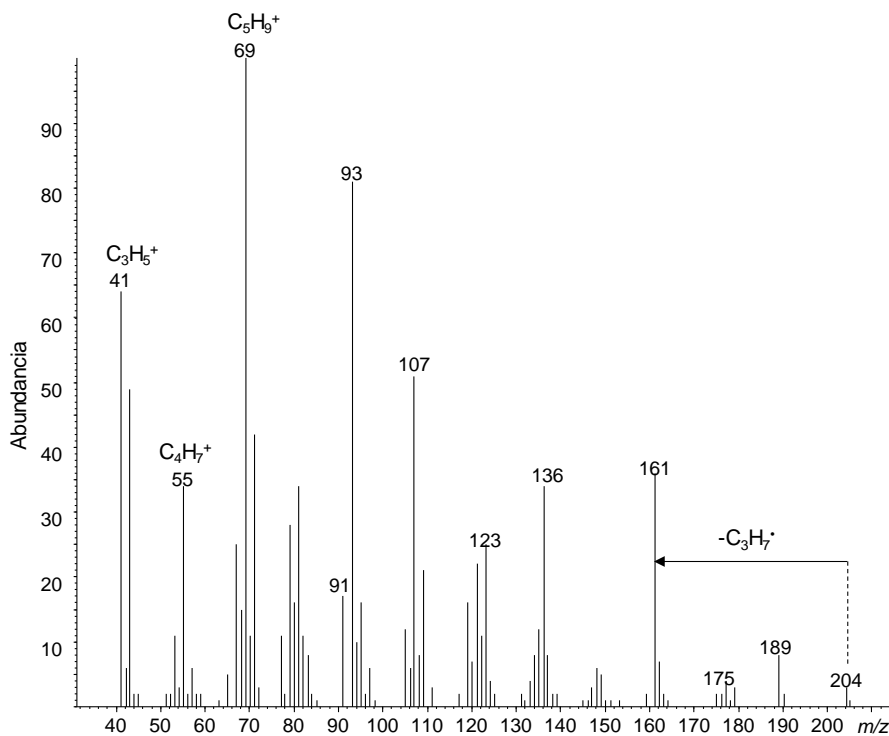


Figura A 9. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°58 en la **Tabla 4**.

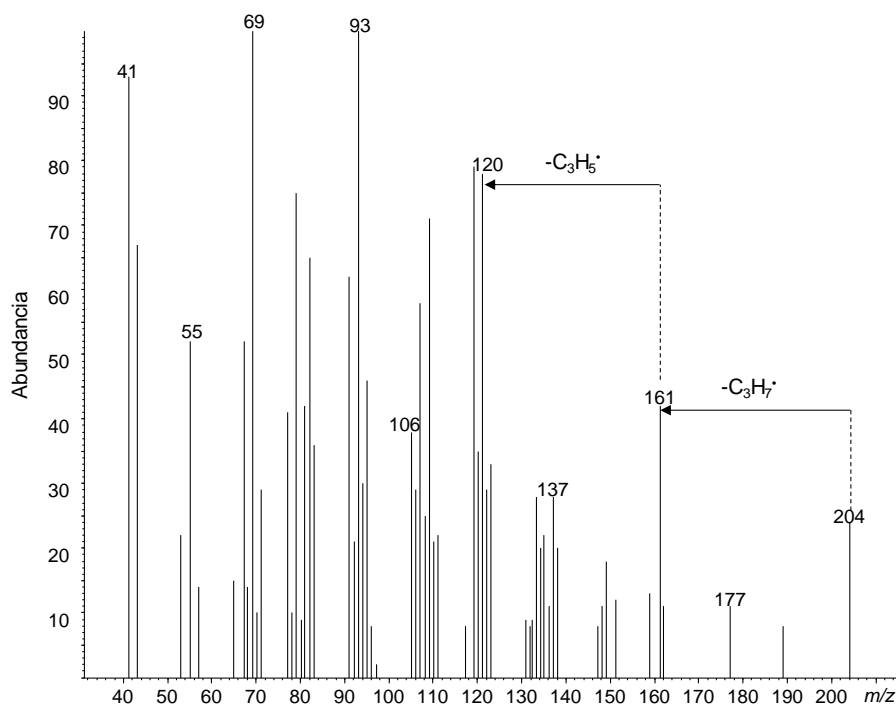


Figura A 10. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°62 en la *Tabla 4*.

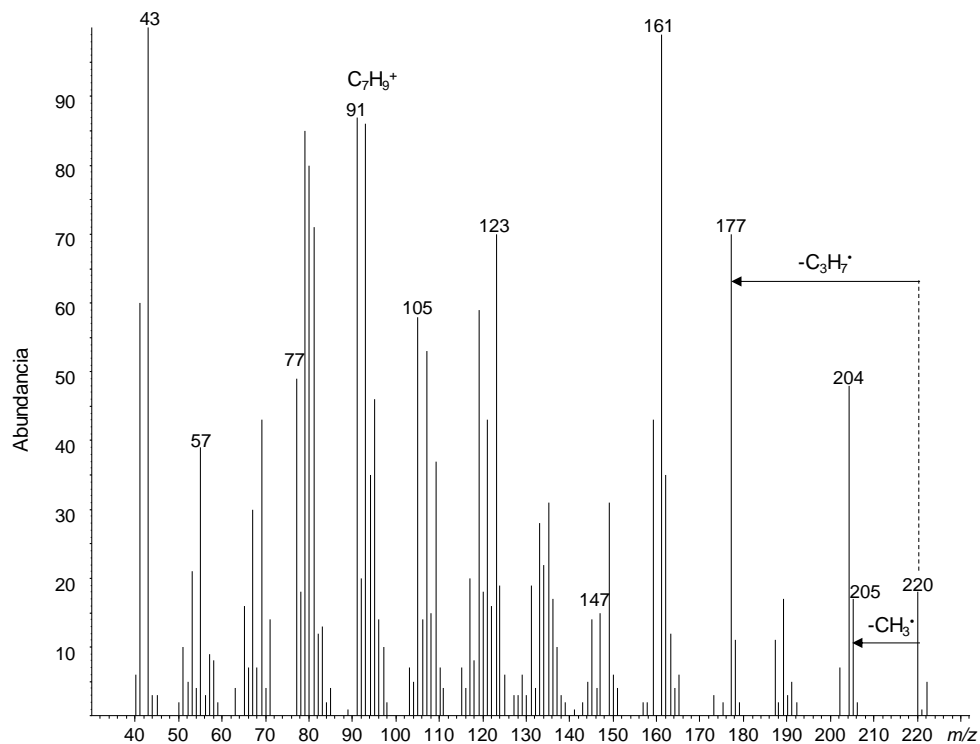


Figura A 11. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. aduncum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°66 en la *Tabla 4*.

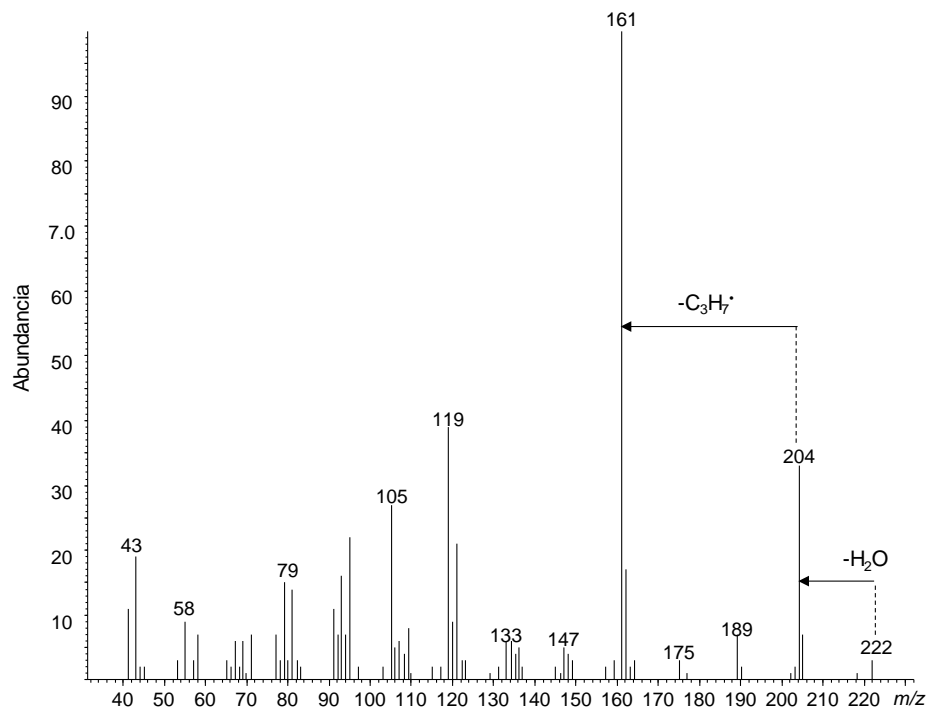


Figura A 12. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°20 en la **Tabla 6**.

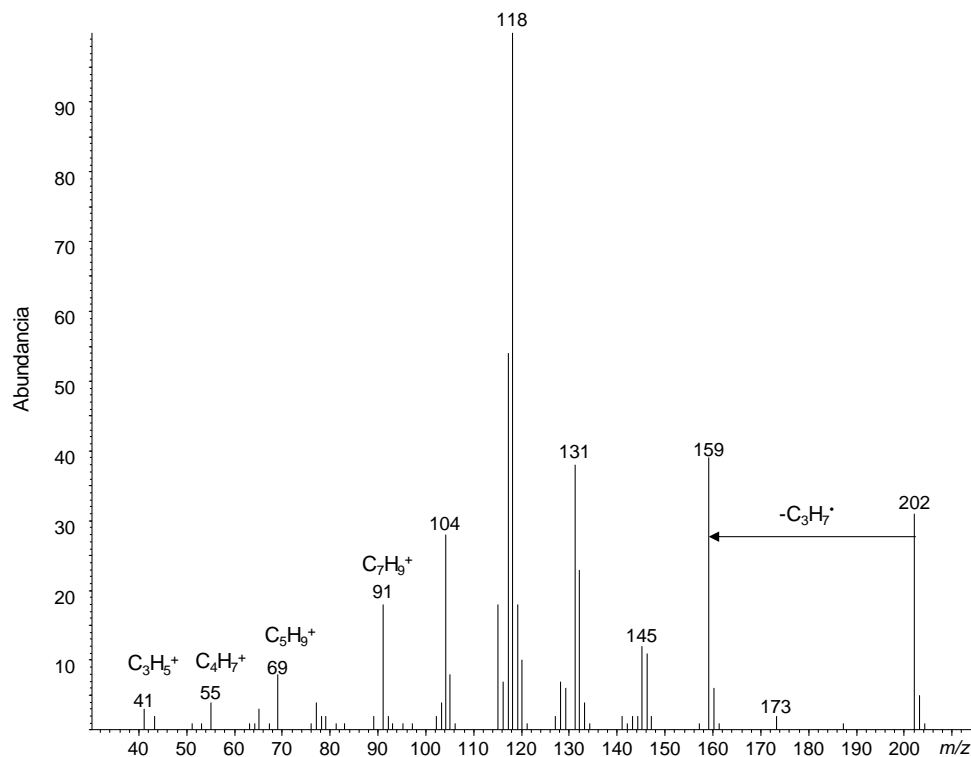


Figura A 13. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°29 en la **Tabla 6**.

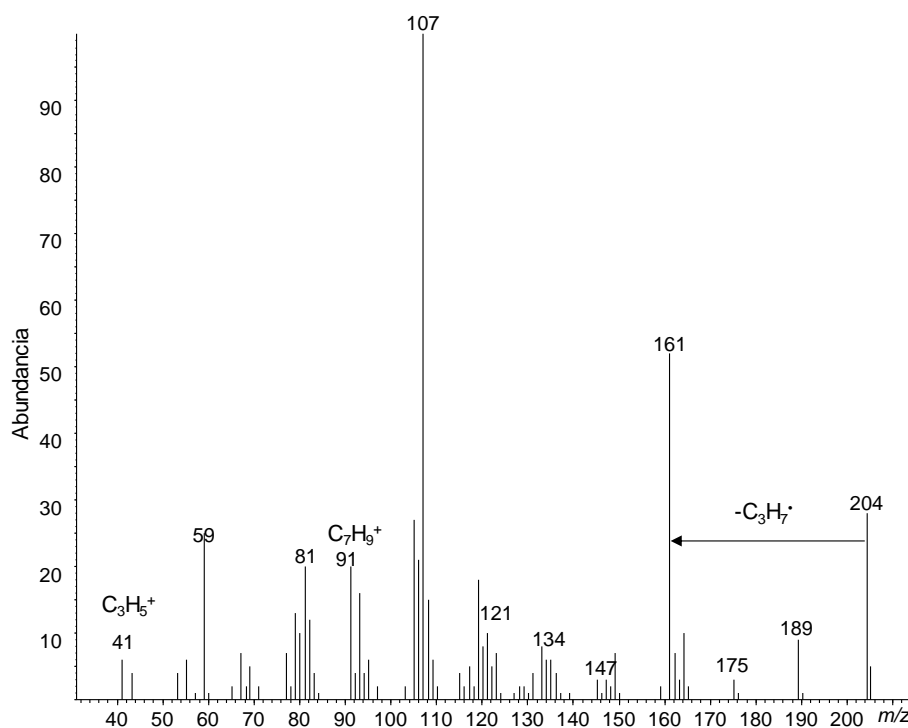


Figura A 14. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°30 en la *Tabla 6*.

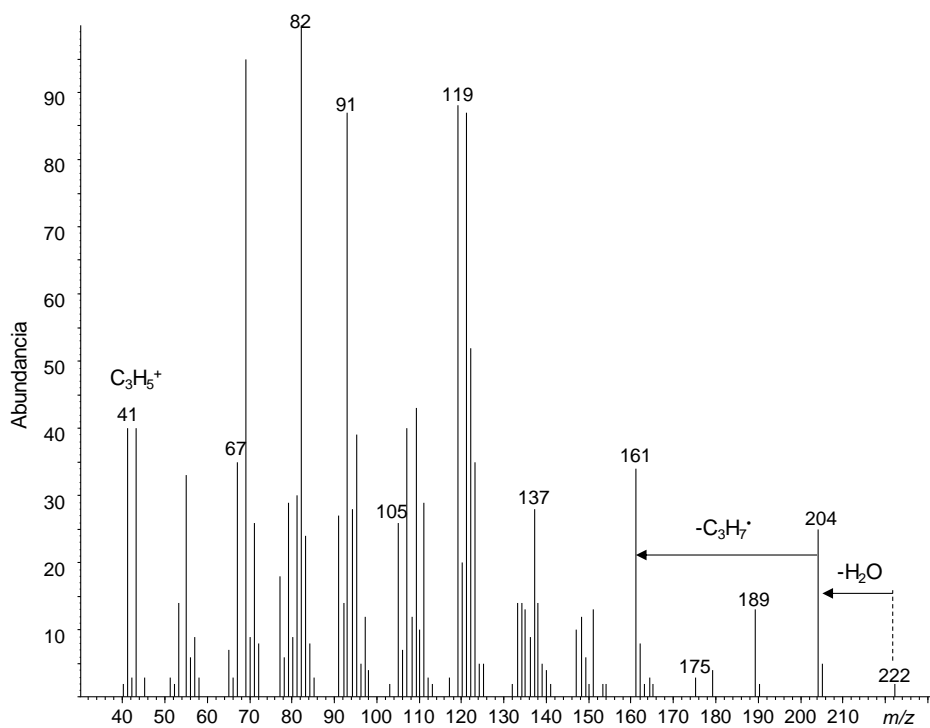


Figura A 15. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°32 en la *Tabla 6*.

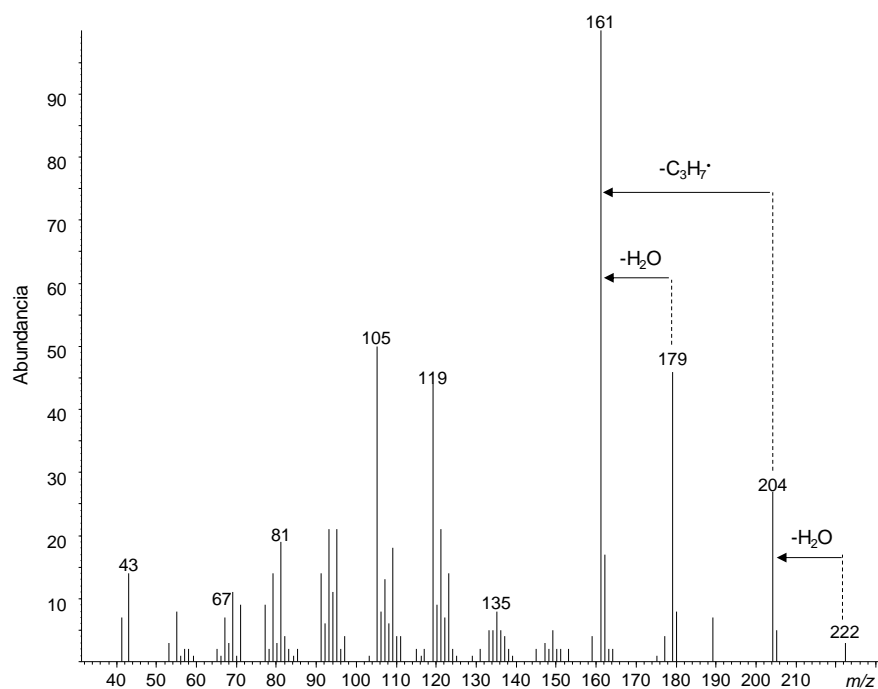


Figura A 16. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpeno no identificado $C_{15}H_{24}$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°35 en la **Tabla 6**.

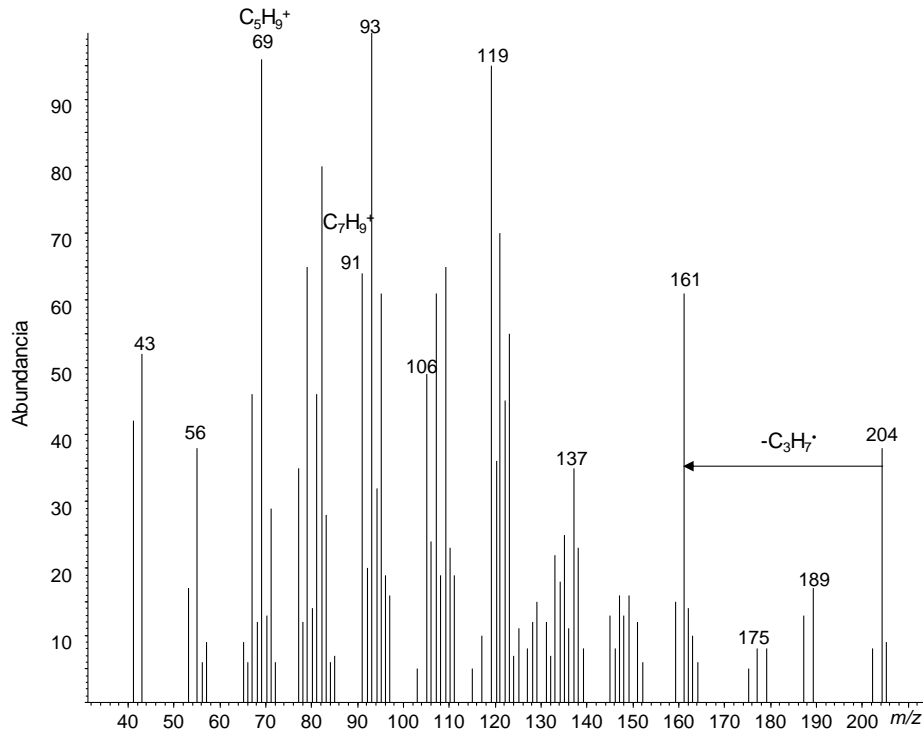


Figura A 17. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenol no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°37 en la **Tabla 6**.

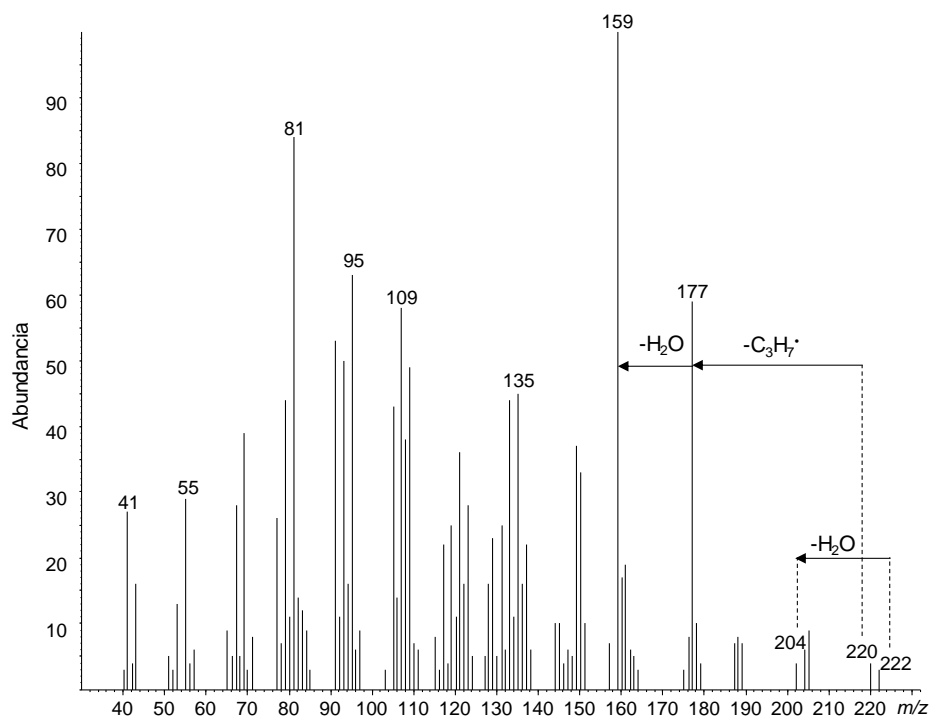


Figura A 18. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenoide no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°40 en la *Tabla 6*.

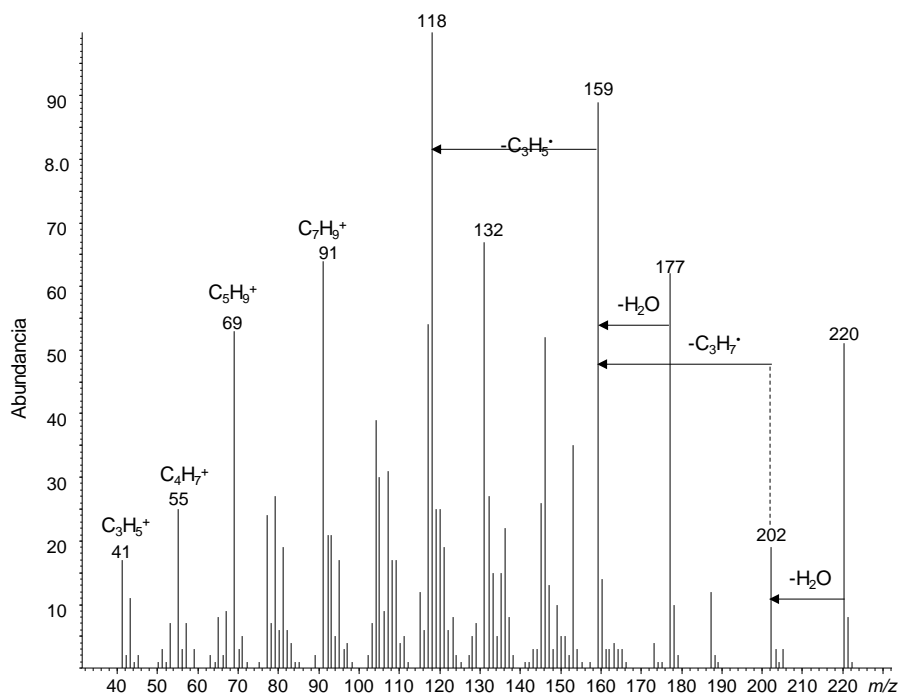


Figura A 19. Espectro de masas obtenido por GC/MS del sesquiterpenol no identificado $C_{15}H_{24}O$, en el AE de *P. dilatatum* (EI, 70 eV). Véase pico cromatográfico N°42 en la *Tabla 6*.

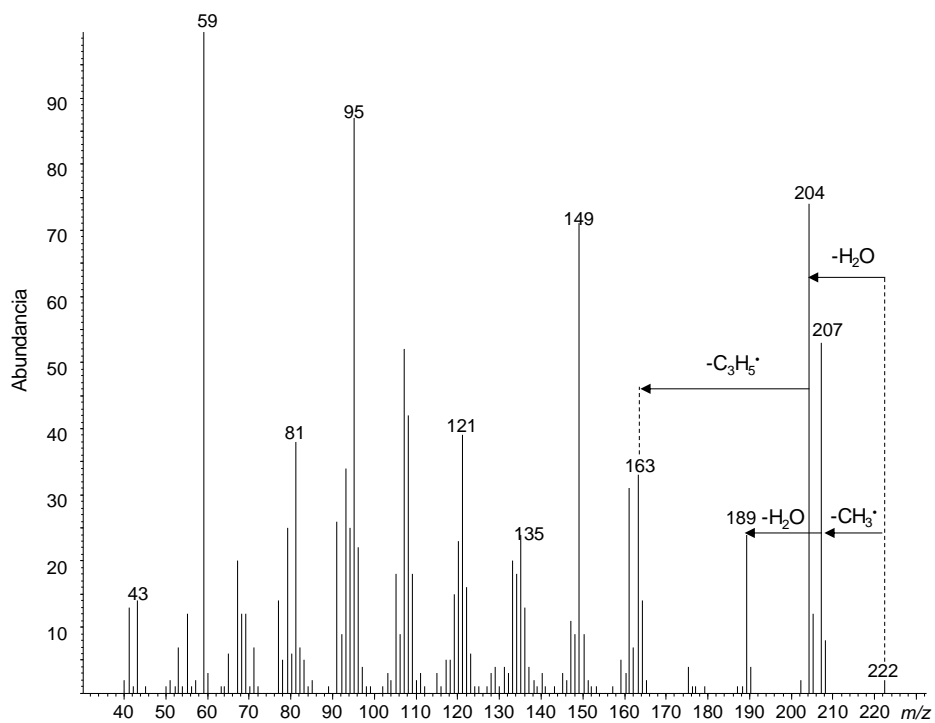


Figura A 20. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS de la molécula protonada de norcoclaurina $[M+H]^+$ en m/z 272.12775 obtenido en el modo SIM y HCD a 40 eV.

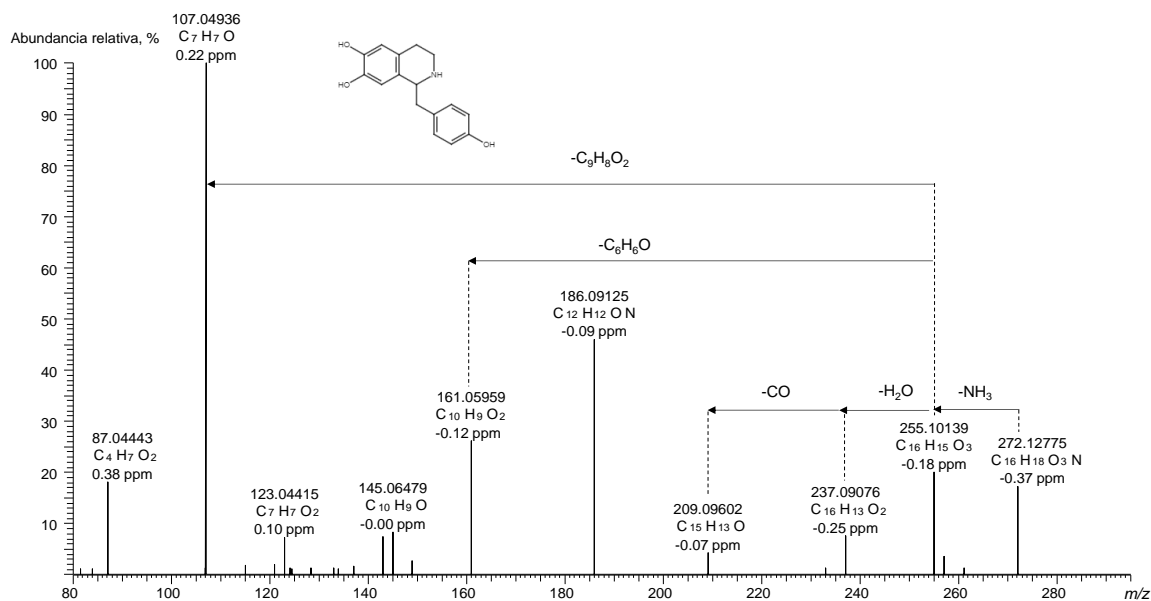


Figura A 21. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 314.13837, obtenido en el modo SIM y HCD 40 eV.

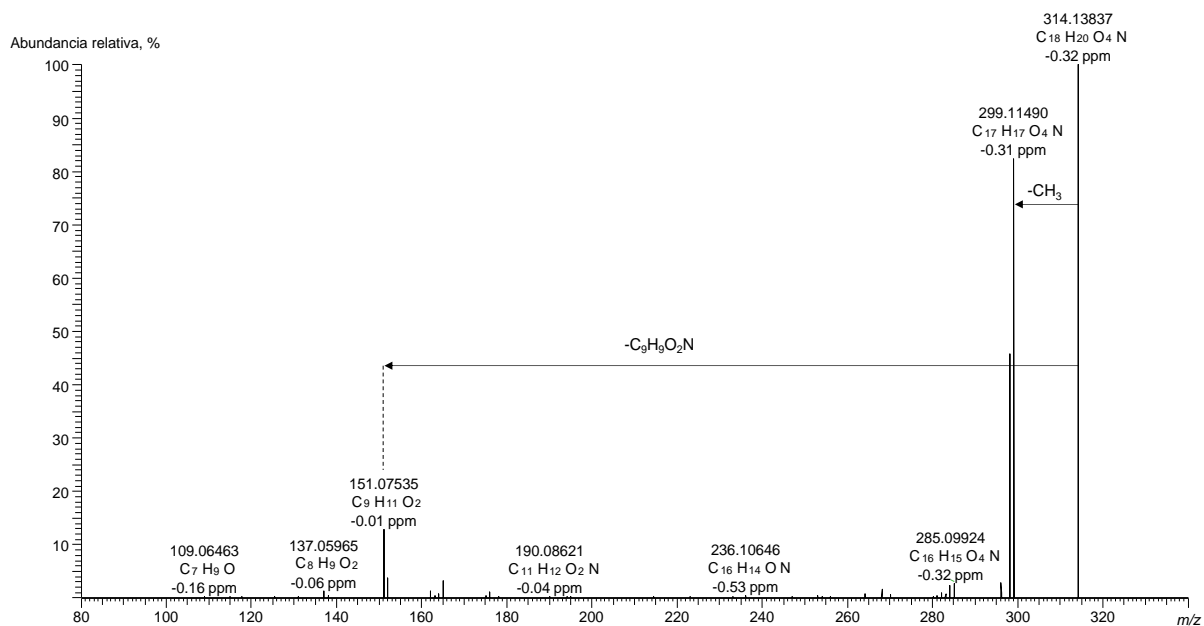


Figura A 22. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de coclaurina $[M+H]^+$ en m/z 286.14349, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV.

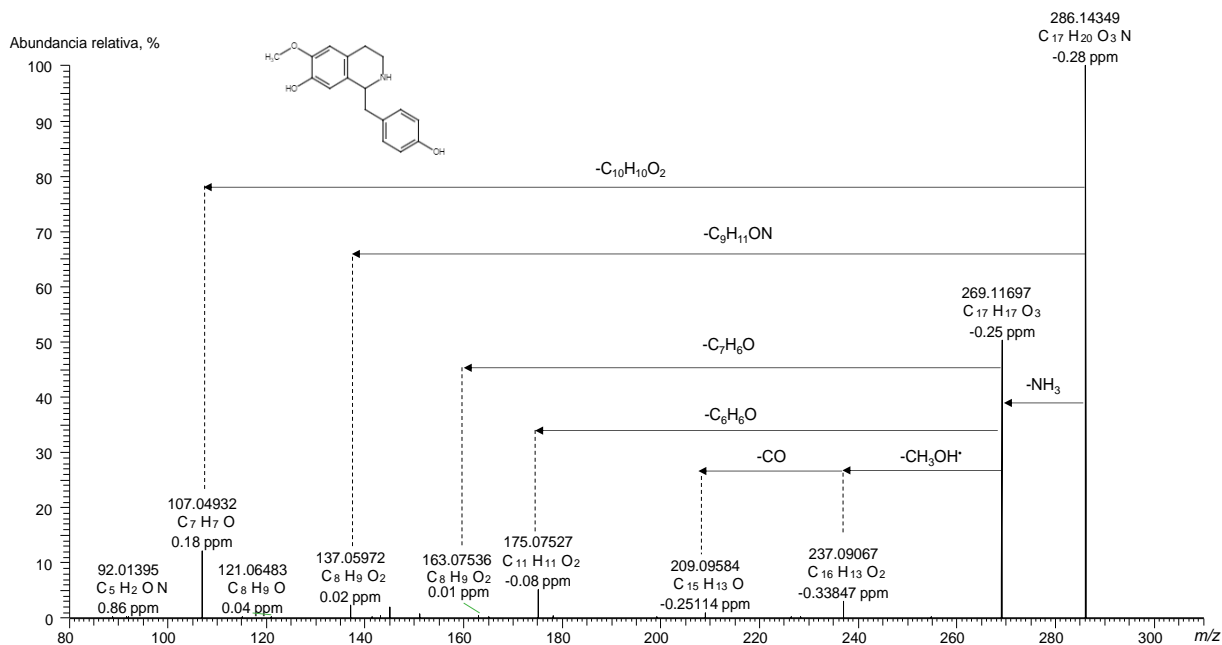


Figura A 23. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de magnoflorina M^+ en m/z 342.16946 obtenido en el modo SIM y HCD 30 eV.

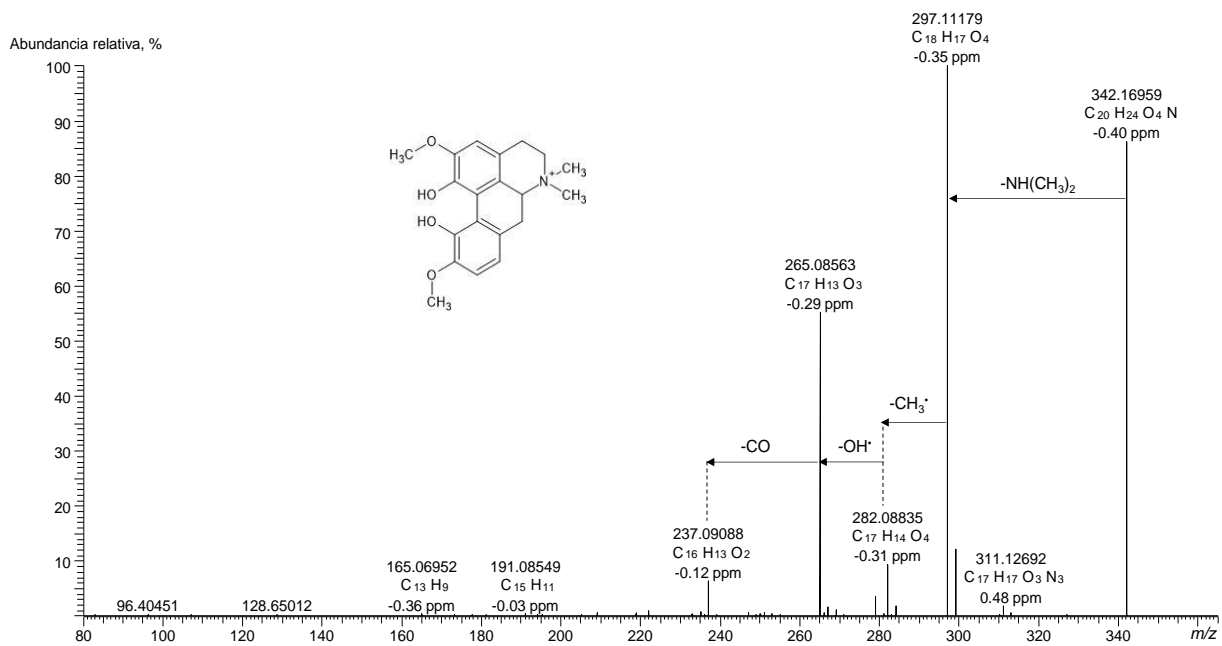


Figura A 24. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de apigenina-C.C-dihexosido $[M+H]^+$ en m/z 595.16541 obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV.

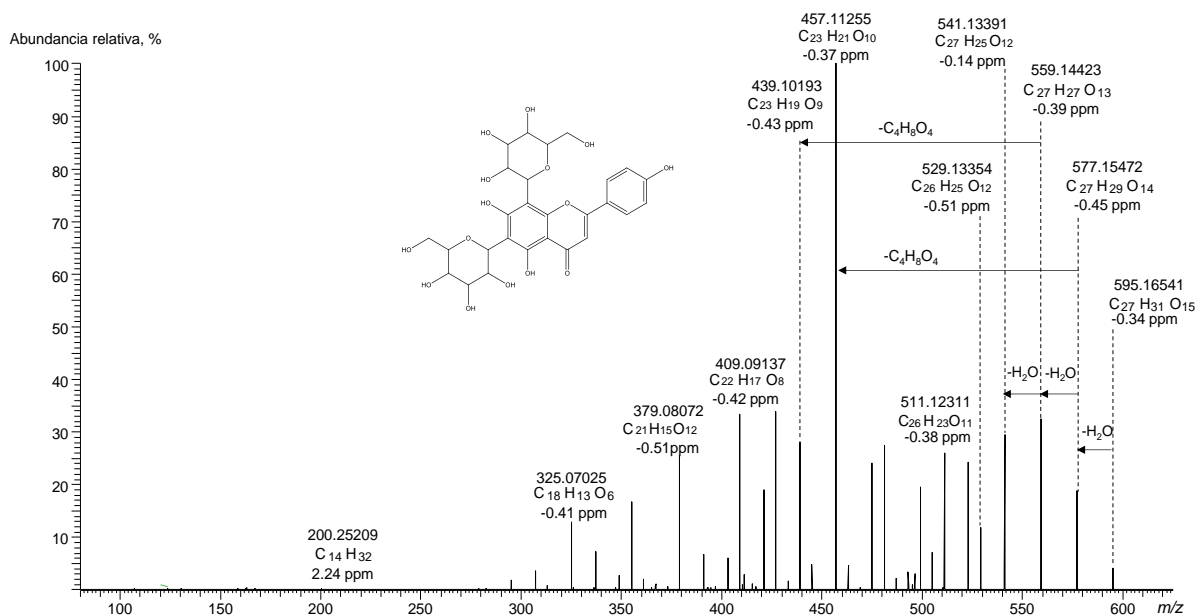


Figura A 25. Espectros de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS de la molécula deprotonada de ácido *p*-cumarico [M-H]⁻ en *m/z* 163.03941 **A.** En el extracto hidroalcohólico de *P. dilatatum*, **B.** Sustancia-patrón adquirida de *Sigma-Aldrich*. Modo SIM y HCD a 10 eV.

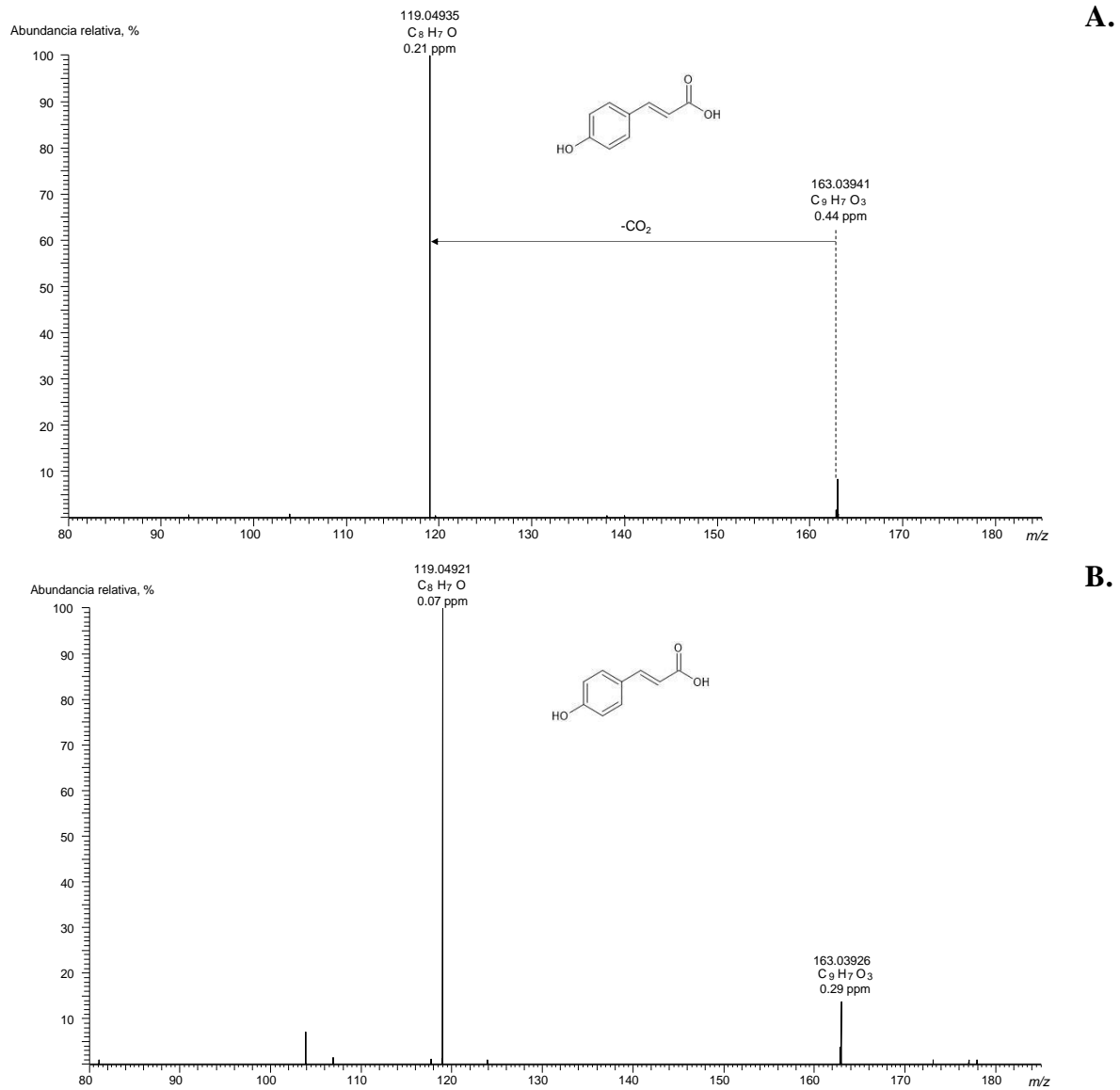


Figura A 26. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de luteolina-6-C-glucósido $[M+H]^+$ en m/z 449.10751, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV.

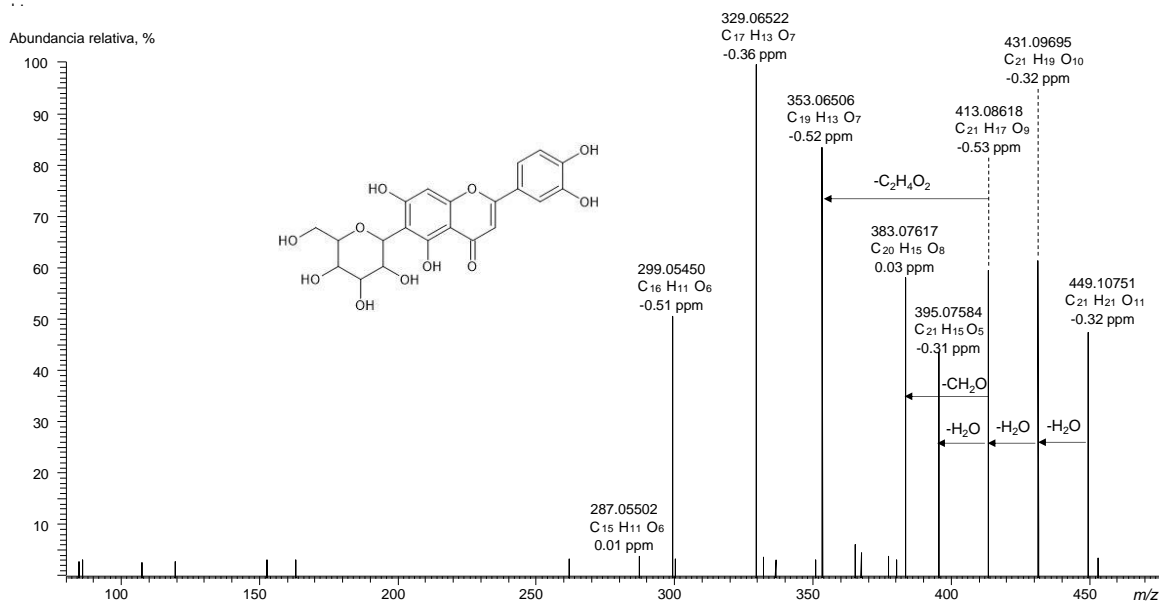


Figura A 27. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de tembamida $[M+H]^+$ en m/z 272.12766, obtenido en el modo SIM y HCD 40 eV.

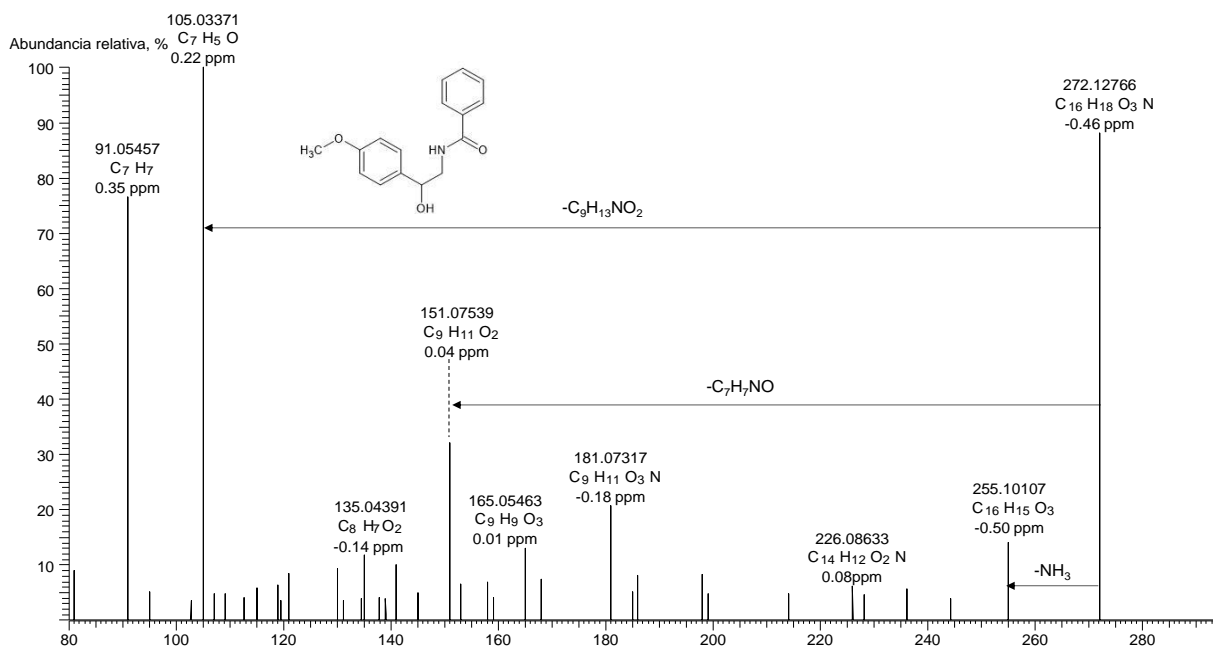


Figura A 28. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de *N*-feruloiltramina $[M+H]^+$ en m/z 314.13855, obtenido en el modo SIM y HCD 40 eV.

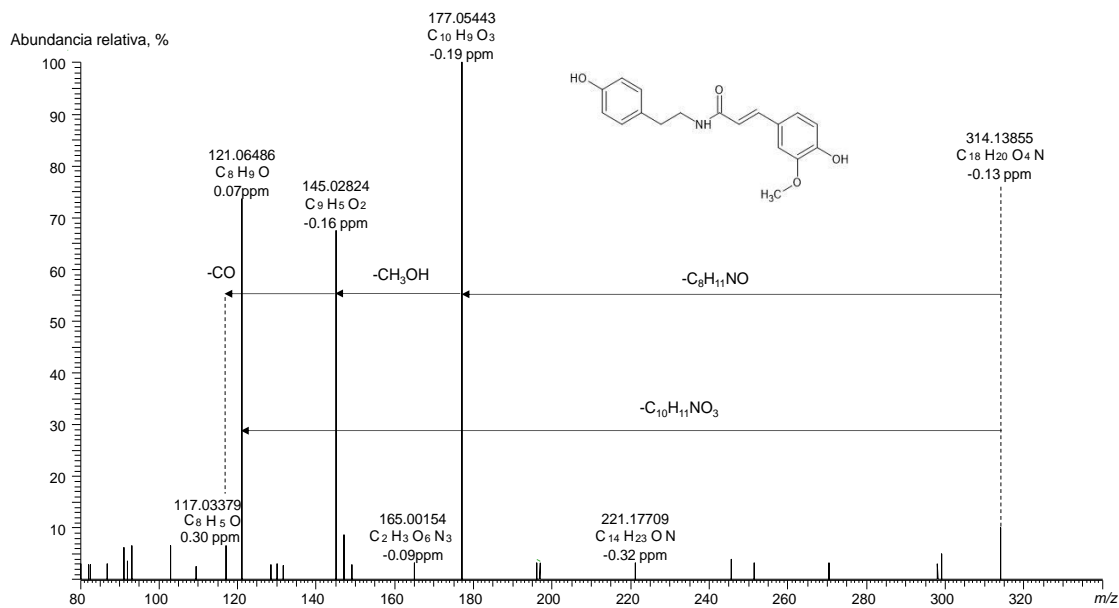


Figura A 29. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de una amida substituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 254.11734, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV.

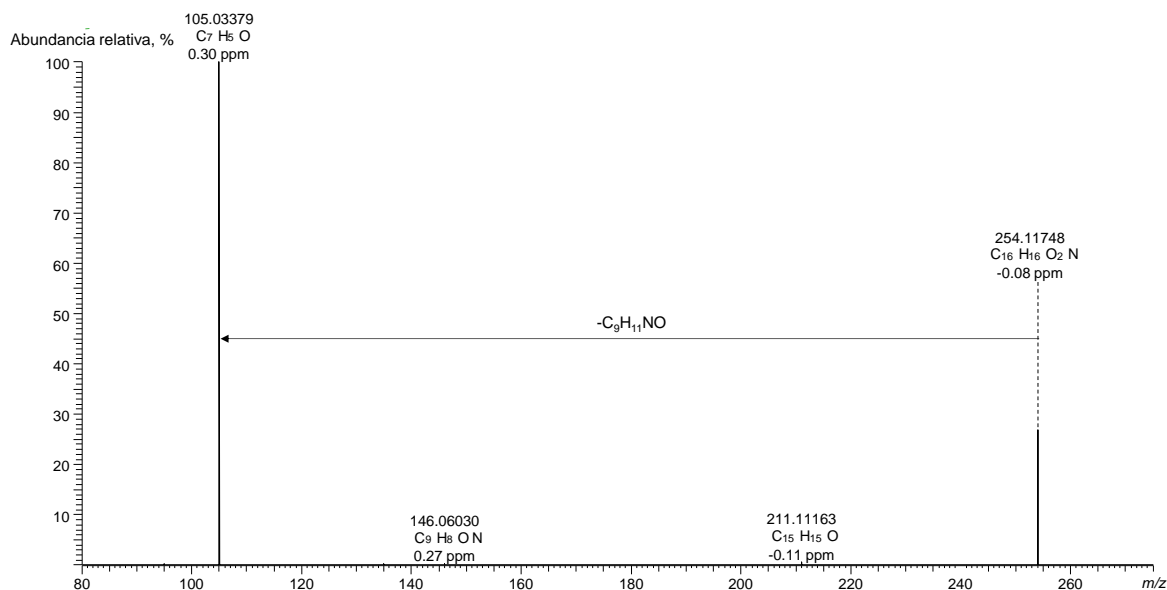


Figura A 30. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada de una amida sustituida del ácido benzoico $[M+H]^+$ en m/z 286.14346, obtenido en el modo SIM y HCD 10 eV.

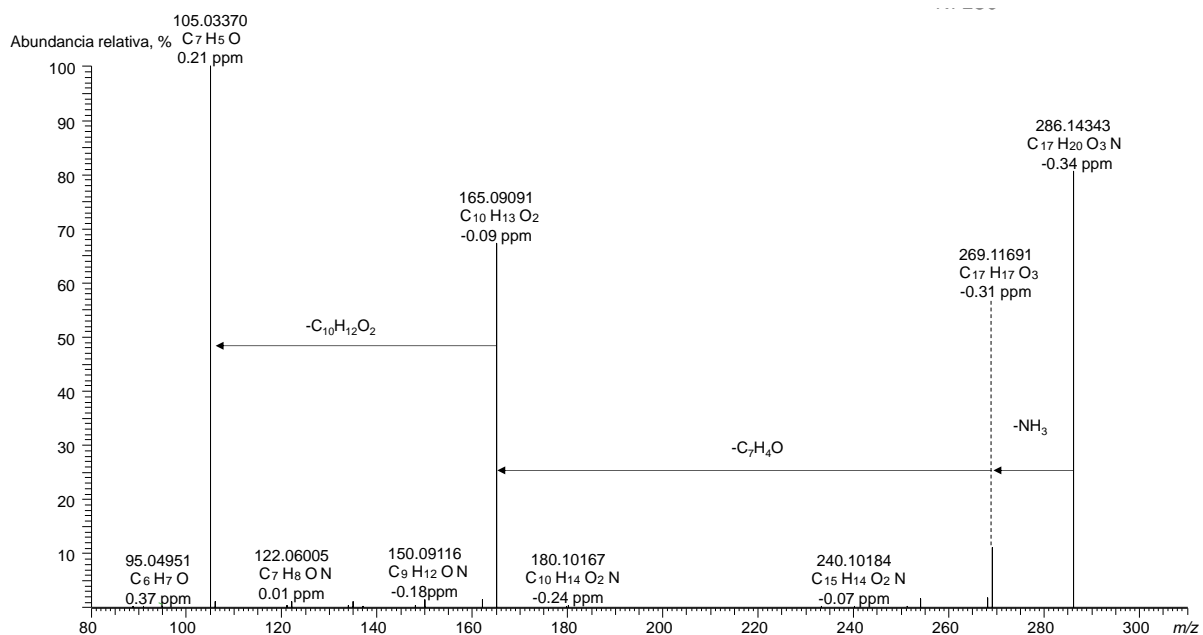


Figura A 31. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-HRMS, de la molécula protonada del compuesto no identificado $[M+H]^+$ en m/z 289.10684, obtenido en el modo SIM y HCD 20 eV.

