

EXTRACCIÓN ASISTIDA CON MICROONDAS DE ACEITE ESENCIAL DE ACUYO (*Piper auritum*) Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO ANTIFÚNGICO CONTRA *Penicillium expansum*

Gómez Cruz, N.I.^a, Sosa Morales, M.E.^{b,c*}, López-Malo, A.^a

- a) Universidad de las Américas, Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Ex Hacienda Santa Catarina Mártir, C.P. 72820, Cholula, Puebla, México.
- b) Universidad de Guanajuato, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Departamento de Alimentos. Carr. Irapuato-Silao km 9, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.
- c) Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica, Luis Enrique Erro No. 1, C.P. 72000, Santa María Tonanzintla, Puebla, México. * mariae.sosam@gmail.com

RESUMEN

En este trabajo se realizó la extracción asistida por microondas del aceite esencial de hojas de acuyo (*Piper auritum*) que crece de forma silvestre en la zona central del estado de Veracruz, al cual se le determinó rendimiento, composición química, propiedades físicas (índice de refracción, densidad y color) y se probó su efectividad como agente antifúngico en sistemas modelo contra *Penicillium expansum*. El rendimiento de la extracción fue alto (2.85%), comparado con el reportado con otros métodos de extracción. El componente principal es el safrol, pero contenido en baja concentración. Las propiedades físicas medidas (índice de refracción, densidad y color) no se pudieron comparar con otras similares, ya que no se encontraron otros resultados de este tipo para el aceite de acuyo. En general en la evaluación del efecto antifúngico se observó que a medida que aumenta la concentración del aceite esencial la velocidad de crecimiento del moho disminuye. Por tanto, el aceite no tuvo efecto antifúngico, pero retardó el crecimiento (efecto fungistático), ésto probablemente debido a la baja concentración de safrol que contuvo el aceite esencial.

ABSTRACT

Microwave-assisted extraction of essential oil from acuyo leaves (*Piper auritum*) was studied. The yield, chemical composition, physical properties (refraction index, density and color) and its effectiveness as antifungal agent was tested in model systems against *Penicillium expansum*. The yield was high (2.85 %) compared to that reported for other extraction methods. The main component is safrole, but contained in a low concentration. The measured physical properties can not be compared with other similar oils, as the information about acuyo essential oil is scarce. In general, the evaluation of antifungal effect was observed: an increasing concentration of the essential oil the mold resulted in lower growth rate. Thus, the essential oil does not have antifungal effect, however as it retarded the growth the effect was fungistatic. This effect can be related to low concentration of safrole in the acuyo essential oil.

Palabras clave: Acuyo (*Piper auritum*), extracción asistida con microondas, *Penicillium expansum*.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Piper auritum es un pequeño árbol que se conoce en México con el nombre de acuyo, hoja santa o momo (Magaña, 2006). Las hojas de acuyo se utilizan para condimentar alimentos debido a que imparten un sabor y aroma característicos y para fines terapéuticos o medicinales (Sánchez, 2000). Esto último debido a que poseen actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antifúngica (Monzote et al., 2010). Los estudios realizados al aceite esencial de acuyo coinciden en que el safrol es el principal componente en porcentajes por encima del 70% (García et al., 2007; Monzote, 2010; Castañeda et al., 2007 y Sánchez et al., 2009). Estos reportes documentan acuyos de Brasil, Ecuador y Colombia, pero no hay reportes para acuyo mexicano.

Este trabajo se encaminó a la extracción asistida por microondas del aceite esencial de hojas de *Piper auritum*, al cual se le determinó el rendimiento, su composición química, propiedades físicas (índice de refracción, densidad y color) y se probó su efectividad como agente antifúngico en sistemas alimentarios modelo contra el moho *Penicillium expansum*,

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se empleó un lote de hojas frescas de acuyo (*Piper auritum*) de origen silvestre proveniente de Xalapa, Veracruz. Se seleccionaron las hojas de tamaño uniforme (15-20 cm de diámetro) y sin tallo, que estén completas y que se observen sanas. Las hojas se extendieron y se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente extraer su aceite esencial.

Extracción asistida con microondas de aceite esencial de acuyo

La extracción de aceite esencial de acuyo se realizó en un horno de microondas doméstico (Daewoo, China) de 600 W y 2450 MHz adaptado para extracción. En un matraz de 1000 mL se colocaron 100 g de hojas de acuyo secas y trituradas, y 300 mL de agua destilada, posteriormente se introdujo en el horno de microondas y se acopló a un condensador con sistema de recirculación de agua fría. Se seleccionaron las condiciones del horno de microondas al 80% de potencia (380 W) durante 30 min para calentar la mezcla de agua-acuyo y así generar vapores. Estas condiciones se seleccionaron de acuerdo al diseño experimental probado por Cardoso-Ugarte et al. (2013), en las que se obtuvo el mayor rendimiento para aceite esencial de albahaca y epazote. El vapor obtenido al llegar al condensador se enfría y se transformó en un extracto líquido que se recibe en un matraz. Se recuperó el aceite esencial y se midió su volumen utilizando una micropipeta. El agua remanente en el aceite se removió añadiendo sulfato de sodio anhidro; el aceite ya seco se colocó en frascos ámbar, se taparon y se almacenaron en refrigeración hasta su análisis (Juárez, 2011).

Evaluación del rendimiento y propiedades físicas del aceite esencial de acuyo

Rendimiento. El rendimiento del aceite esencial se obtuvo dividiendo el volumen obtenido de aceite respecto al peso del material sometido a extracción.

Índice de refracción. La medición del índice de refracción del aceite esencial se realizó con refractómetro digital (Reichert, Estados Unidos). El refractómetro se calibró con agua destilada para luego secar con papel y colocar una gota de muestra de aceite esencial sobre el cristal. La lectura se hizo por triplicado (AOAC, 2000).

Densidad. La densidad del aceite extraído se determinó por la relación de masa entre volumen, usando un picnómetro de vidrio a peso constante. Se pesó el picnómetro vacío. El picnómetro se llenó con el aceite y se pesó nuevamente. La diferencia entre estos pesos se dividió entre el volumen indicado en el picnómetro. La densidad se expresó en kg/m^3 (AOAC, 2000).

Color. El color del aceite esencial de acuyo se determinó por transmitancia usando un colorímetro Gardner-Colorgard System (BKY, Restron VA). Antes de realizar la medición se calibró el colorímetro con la ayuda de la placa negra y el completo paso de luz ($L=100$, $a=0$, $b=0$). El color del aceite se midió en un vaso de precipitados de 15 mL para obtener los parámetros de la escala de Hunter L, a, b.

Determinación de la composición química del aceite esencial de acuyo

La composición química del aceite esencial de acuyo se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en un cromatógrafo (Agilent Technologies modelo 6850N) acoplado a un detector de masas de triple eje (5975C). Se usó una columna capilar (HP5-MS) para separar los componentes, utilizando helio (grado cromatográfico) como gas de arrastre a un flujo constante de 1.5 mL/min y el inyector a una temperatura de 240°C. Pasado el periodo inicial, la temperatura en la columna se mantuvo por 10 min a 60°C, después se incrementó cada 5 min hasta alcanzar los 240°C que se mantienen por 50 min (Marangon et al., 2008). El espectrograma obtenido se analizó con la base de datos NIST versión 2010.

Preparación del inóculo

La siembra de *Penicillium expansum* se realizó siguiendo una modificación al método que plantea la Norma Oficial Mexicana, NOM-111-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1995). Este método se fundamenta en la inoculación del moho en cuñas de agar papa dextrosa e incubado a una temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$.

Evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial

Las colonias de cada moho crecidas en las cuñas de agar se sembraron y se incubaron 10 días a 25°C. Las cuñas se lavaron con 10 mL de agua estéril para recuperar las esporas. La suspensión de esporas se mantuvo en refrigeración hasta su uso pero no más de 2 días (López-Malo, 1995). Se preparó y esterilizó agar papa dextrosa. Una vez que el agar se encuentra a temperatura de 40-45°C, se dividió en frascos previamente esterilizados y se adicionaron 0 (control), 100, 500, 1000, 2000 y 3000 ppm del aceite esencial. El agar se mezcló suavemente y se vació en cajas Petri de tamaño 60x15 dejando solidificar. Se inocularon 10 μL de la

suspensión de esporas en el centro de la caja con el agar solidificado, y se registró el crecimiento durante 8 días después de la inoculación a 25°C, midiendo diariamente el diámetro de la colonia. Las cajas inoculadas se mantuvieron en cámaras herméticas con suficiente espacio de cabeza (Juárez, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevaron a cabo 2 extracciones del aceite esencial y se obtuvo como resultado un rendimiento promedio de 2.85 ± 0.07 % (g de aceite esencial/100 g de acuyo seco). El rendimiento fue alto al compararlo con otros métodos de extracción como extracción supercrítica (2.37 – 3.09%) y destilación por arrastre de vapor (1.58%), reportados por Conde (2013).

El índice de refracción del aceite esencial fue de 1.5283 ± 0.00007 a 20 °C. La densidad del aceite esencial fue de 1023.3 ± 0.008 kg/m³. La mayoría de los aceites esenciales, al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros, tienen una densidad menor de 1 g/cm³, pero hay algunos aceites esenciales con densidad mayor como el de la canela, sazafrán y clavo (Ortuño, 2006). Los parámetros de color obtenidos para el aceite esencial de acuyo fueron: $L=86.37 \pm 0.1768$, $a=-0.41 \pm 0.0637$ y $b=20.70 \pm 0.1556$, por lo que el aceite califica como transparente con tono amarillo/verde.

El análisis cromatográfico cualitativo realizado reveló 68 picos; los principales componentes identificados fueron el safrol (44%), terpinoleno (11.52%), cariofileno (7.2%), nerolidol y β -cubebeno (7.03%), germacreno (6.08%), metoxieugenol (4.23), γ -terpineno (4.18%), α -terpineno (3.49%), α -pineno (3.26%), β -pineno (3.06%), eugenol dimetileter (1.67%), α -cariofileno (1.27%) y esqualeno (1.26%). El porcentaje de safrol resultó menor a lo reportado para aceite esencial de acuyo de otros orígenes (García et al., 2007; Monzote, 2010; Castañeda et al., 2007 y Sánchez et al., 2009).

A pesar de utilizar altas concentraciones del aceite, las colonias crecieron en todas las cajas con diferentes concentraciones. Se siguió el crecimiento de las colonias durante 8 días y las curvas de crecimiento observadas se muestran en la figura 1. Se observó que a mayor concentración del aceite, la velocidad de crecimiento disminuye. Esto significa que en la concentración de 3000 ppm se disminuyó en un 65.6% el crecimiento de la colonia con respecto al control, este comportamiento se muestra en la Tabla I.

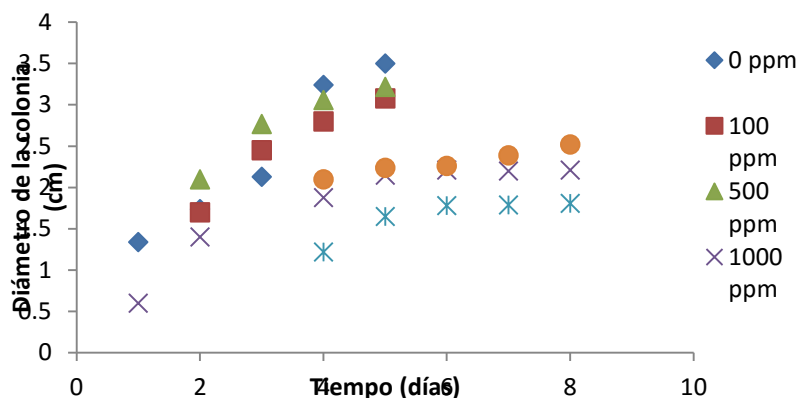


Figura 1. Curvas de crecimiento observadas en *P. expansum* a diferentes concentraciones del aceite esencial de acuyo.

Tabla I. Velocidad de crecimiento de *P. expansum* en agar papa dextrosa adicionado con aceite esencial de acuyo.

Concentración (ppm)	Parámetro de cinética	
	Velocidad (cm / día)	R ²
0	0.503± 0.112	0.953
100	0.397± 0.074	0.924
500	0.373 ± 0.011	0.94
1000	0.217 ± 0.007	0.832
2000	0.173 ± 0.057	0.726
3000	0.09 ± 0.013	0.801

Con los resultados obtenidos se concluye que el acuyo tiene un alto rendimiento de aceite esencial cuando es extraído con microondas. Este aceite tuvo efecto fungistático (no fungicida) contra el moho *Penicillium expansum*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para N.I. Gómez Cruz y el proyecto 0168990.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of A.O.A.C International. Association of Official Analytical Chemists.
- CARDOSO-UGARTE, G., Juárez-Becerra, G., Sosa-Morales, M. y López-Malo, A. 2013. Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy. 47 (1).
- CASTAÑEDA, M., Muñoz, A., Martínez, J. y Stanshenko, E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Scientia et Technica Año XIII. (33): 165-166.
- CONDE, L. 2013. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos y/o aceites esenciales obtenidos por medio de arrastre con vapor, disolventes y extracción

- supercrítica, a partir de *Piper auritum*, *Porophyllum ruderale* y *Rosmarinus officinalis* L. Tesis doctoral. Universidad de las Américas Puebla. México.
- GARCÍA, A., Leyva, M., Martínez, J. y Stashenko, E. 2007. Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) difundida en la costa colombiana. *Scientia et Technica* Año XIII. (33): 439-442.
- JUÁREZ, G. 2011. Extracción asistida con microondas y arrastre de vapor de aceite esencial de epazote (*Chenopodium ambrosioides*) y su evaluación como agente antifúngico. Tesis de maestría. Universidad de las Américas Puebla. México.
- LÓPEZ-MALO, A. 1995. Efecto de diversos factores sobre la capacidad antimicótica de vainilla. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas, Puebla. México.
- MAGAÑA, A. 2006. "Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas de Tabasco". 2da ed. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.
- MARANGON, C., Newandram, G., Dev, O. y Moreira, M. 2008. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Chemical Ecology*. 34 (9):1213–1218.
- MONZOTE, L., García, M., Montalvo, A., Scull, R. y Miranda, M. 2010. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 105(2): 168-173.
- ORTUÑO, M. 2006." Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes". Aiyana ediciones. España.