

Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica

Paco Noriega¹ y Cesare Dacarro²

¹ Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. E-mail: decano_agro@ups.edu.ec

² Dipartimento di Farmacologia Sperimentale ed Applicata, Laboratorio di Microbiologia, Università di Pavia, Pavia, Italia.

Resumen

Los principales componentes identificados en el aceite esencial de las hojas de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. son: Cariofileno 19,029%, Humuleno 14,323% y Eremofileno 11,407%, aclarándose que éstos sobresalen de un total de 62 compuestos. La técnica utilizada para la extracción del aceite fue destilación con agua y vapor de agua, empleando un destilador de 250 litros de capacidad. La cantidad de aceite obtenida fue de 3 ml por cada 10 kg de hojas frescas. El aceite fue utilizado para un experimento de evaluación de actividad antimicrobiana y antifúngica, siendo el resultado la inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Streptococcus piogenes* y *Streptococcus mutans*. Los resultados del experimento demostraron que el aceite foliar tiene una alta capacidad inhibitoria contra hongos (levaduras) y bacterias; así, se recomienda por un lado, continuar con análisis químicos más finos para determinar la naturaleza específica de los 62 compuestos y, por el otro, realizar ensayos con un número mayor de agentes patógenos.

Palabras clave: *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., ishpingo, aceite foliar, antimicrobiano, antifúngico, Amazonía.

Introducción

La identificación química de compuestos activos del aceite de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., aún está en una fase inicial, tanto a nivel del Ecuador como en otros países, es así que se convierte en una prioridad por su actividad biológica iniciar estudios que valoren sus propiedades antimicrobianas.

Por lo antes expuesto, es importante aclarar que son escasos los estudios publicados respecto a las propiedades medicinales de *O. quixos*, entre los que se destacan los de Naranjo (1981), Gupta (1995) y Ulloa (2006), quienes mencionan sus usos tradicionales; Bruni y Medici (2003) y Ballabeni *et al.* (2007), quienes reportan la composición química del aceite del cáliz y su actividad biológica, y Sacchetti *et al.* (2006), quienes estudian la composición química del aceite foliar.

Dentro de este contexto, esta investigación se propuso relacionar las actividades medicinales propias de los aceites esenciales con actividad biológica para erradicar agentes microbianos. Así, se decidió emplear técnicas modernas de análisis fitoquímico para evaluar principios activos del aceite extraído de las hojas y probar su actividad biológica contra cepas de bacterias y hongos (levadura) como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Streptococcus piogenes*, *Streptococcus mutans*.

La selección de los árboles que proporcionaron las hojas de *O. quixos* para el experimento se realizó en el bosque que circunda la población de Proaño (provincia de Morona Santiago). El material fresco fue transportado al centro de destilación de la Fundación Chankuap (Macas, provincia de Morona Santiago),

donde se extrajo el aceite, luego éste fue transportado a Quito al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana) para ser analizado a nivel bioquímico.

La identificación del valor curativo del aceite de las hojas de *O. quixos* para combatir patógenos es un nuevo aporte para la ciencia, por lo tanto se recomienda en los próximos estudios determinar cuál o cuáles de los 62 compuestos hasta el momento registrados tiene o tienen la capacidad inhibitoria.

Es importante resaltar que en el futuro el aceite foliar de *O. quixos* puede ser una fuente importante para el desarrollo de medicamentos de origen orgánico y que pueden ser promocionados tanto en centros de salud como en el mercado farmacéutico convencional.

Métodos empleados para determinar la composición química y la actividad biológica del aceite esencial de las hojas de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.

1. Recolección del material vegetal: Las hojas de *O. quixos* fueron recolectadas a 10,5 km de la ciudad de Macas, específicamente en una hacienda localizada en el km 18 de la vía a Riobamba, que pertenece a la parroquia San Isidro, cantón Macas, provincia de Morona Santiago. La propiedad está cubierta por vegetación de sucesión secundaria y se encuentra a una altitud de 1.200 msnm entre las coordenadas 1,6° latitud N y 79,6° de longitud S, así presenta: clima subtropical, temperatura promedio anual de 24°C, precipitación media anual de 2.400 mm y humedad relativa promedio de 80%.

2. Datos botánicos de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: La especie *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. pertenece a la familia Lauraceae y es conocida en el Ecuador con diferentes nombres vernáculos, entre los que se destacan: canelón, ishpink, ispingu y/o ishpingo (Gupta 1995; Rios et al. 2007). El hábitat natural de este árbol es el bosque húmedo tropical de la Amazonía ecuatoriana, encontrándose entre 310 y 1.250 msnm de altitud y destacándose por ser endémico de este lugar.

Algunas de las características botánicas más importantes de la especie *O. quixos* la distinguen por ser un árbol perenne de 2-5 m de altura; lámina de la hoja de 14,5-23,5 cm de longitud x 3,5-6 cm de ancho, olor a canela; flor blanco-verdosa; cáliz persistente de seis sépalos y fruto ovalado de 4 cm de longitud. La

especie florece y fructifica cada dos años cuando alcanza mínimo veinte años de madurez (Figura 1).

3. Métodos para determinar la composición química del aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: El experimento fue ejecutado de la siguiente manera:

a. Preparación de la muestra vegetal: se emplearon 10 kg de hojas frescas que fueron colocadas en un destilador de acero inoxidable.

b. Obtención del aceite: se obtuvo el aceite mediante la técnica de destilación con agua y vapor de agua (Sharapin 1999) en un destilador de 250 litros construido por los autores. El rendimiento fue de 30 ml por cada 10 kg de material vegetal fresco.

c. Identificación de los componentes químicos del aceite foliar: se analizaron 20 µl de aceite esencial diluidos a 2ml con n-hexano. De esta muestra, se inyectaron 2 µl en el equipo de cromatografía gaseosa acoplada a masas marca VARIAN modelo Saturn 2001, siendo las condiciones del análisis una temperatura del inyector a 250° C, columna factor four VF-5ms (30m x 0,25mm), gas transportador Helio 1ml/min y split 200 (Tabla 1).



Figura 1. Rama con hojas y frutos de "ishpingo" [*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., Lauraceae].

Tabla 1. Condiciones de la columna del cromatógrafo de gases acoplado a masas para el análisis del aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.

Temperatura (°C)	Velocidad (°C/min)	Permanencia (min)	Total (min)
50	0	2	2
100	20	0	4,5
220	5	1,5	30

El cromatógrafo de gases acoplado a masas funciona en conjunto con un espectrómetro de masas que se operó bajo las siguientes condiciones analíticas: energía de ionización 70 eV, corriente de emisión 40mA, rango de masas 40 – 400 m/z y temperatura ion source de 220° C.

d. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC): La MIC se evaluó con las siguientes cepas de bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, así como con la levadura *Candida albicans*.

Los patógenos fueron escogidos porque son responsables de varias infecciones severas, mencionándose las principales a continuación:

- *Escherichia coli* causa infecciones intestinales.
- *Staphylococcus aureus* provoca infecciones de la piel, neumonía, sepsis con o sin metástasis (osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados y gastroenteritis).
- *Staphylococcus epidermidis* produce infecciones tanto en mucosas como en membranas animales y humanas.
- *Streptococcus mutans* origina infecciones en la cavidad bucal, siendo la más conocida la caries dental.
- *Streptococcus pyogenes* ocasiona la fiebre reumática e infecciones de la garganta (Brooke 1999).
- *Cándida albicans* induce infecciones superficiales que afectan a la piel, uñas y mucosas, así como la infección vaginal conocida como candidiasis (Brooke 1999).

e. Screening antibacteriano y antifúngico: se prepararon de forma independiente las suspensiones de bacterias y levadura a una concentración de 10^8 ufc/ml. Se adicionó 100 µl de aceite esencial a 2 ml de agar Mueller Hinton Broth con tween 20 al 0,5% en tubos de ensayo por duplicado. Se toma una alícuota

de 1 ml de la disolución preparada, se transfiere a un tubo que tiene un ml de Mueller Hinton Broth y Tween, se siembran las bacterias, se adiciona 1 ml de la concentración de 10^8 ufc/ml a 10 ml de Mueller Hinton Broth y se obtiene un inóculo de $1,10^7$ ufc/ml que será $0,5 \cdot 10^7$ ufc/ml en la disolución; así, sucesivamente hasta alcanzar la dilución número 10 y hasta obtener concentraciones de aceite de: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, y 0,097 µl /ml.

A cada uno de los tubos se sometió al siguiente procedimiento: se agitó en el vórtice, se adicionó 1ml de suspensión bacteriana a cada dilución, se controló el crecimiento del stock en una muestra control con el tween sin aceite, se incubó por 24 horas para medir el crecimiento de bacterias.

El cultivo obtenido se sembró en cajas petri que tenían Mueller Hinton Agar para observar la MIC en una probeta. En caso de que el aceite impida la observación se debe colocar una alícuota de 50 µl en un portaobjeto para ver en el microscopio si existe crecimiento, esto indicó si la concentración fue bactericida o bacteriostática.

Composición química del aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.

El porcentaje de identificación de compuestos del aceite extraído de las hojas de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. fue de 83,89%, siendo los principales componentes identificados Cariofileno 19,029%, Humuleno 14,323% y Eremofileno 11,407%, aclarándose que estos sobresalen de un total de 62 (Tabla 2) y de 30 que fueron identificados comparándose con la base de datos de la NIST/02.

Tabla 2. Composición química del aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.

Compuesto	Método de identificación	Tiempo de retención (min)	Identificado RA %	No Identificado RA%
1. NI	CG-MS	5,243		0,038
2. NI	CG-MS	5,543		0,128
3. NI	CG-MS	5,775		1,590
4. Canfeno	CG-MS	6,030	0,250	
5. Benzaldehido	CG-MS	6,211	0,886	
6. 1R- α pineno	CG-MS	6,303	0,748	
7. 1R- β pineno	CG-MS	6,418	2,194	
8. NI	CG-MS	6,798		0,057
9. Terpinolen	CG-MS	6,955	0,197	
10. Cimeno	CG-MS	7,079	0,062	
11. 3,3 dimetil-2 metileno canfeno	CG-MS	7,154	0,708	
12. p-Cimeno				
13. Mosleno	CG-MS	7,246	2,951	
14. NI	CG-MS	7,613	0,291	
15. linalol	CG-MS	8,101		0,087
16. hidroxicinimaldehido	CG-MS	8,274	0,952	
17. Bornil alcohol	CG-MS	8,629	0,113	
18. 4 terpineol	CG-MS	9,893	0,053	
19. α terpineol	CG-MS	10,014	0,332	
20. Cinemaldehido	CG-MS	10,299	0,265	
21. Acetol	CG-MS	12,059	3,425	
22. NI	CG-MS	12,270	0,055	
23. α cubebeno	CG-MS	13,294		0,056
24. NI	CG-MS	13,626	0,304	
25. Ciclosativeno	CG-MS	14,207		0,099
26. α Copaeno	CG-MS	14,250	0,088	
27. Cinamato de metil	CG-MS	14,353	7,000	
28. NI	CG-MS	14,564	7,214	
29. NI	CG-MS	14,824		0,131
30. NI	CG-MS	15,066		0,126
31. NI	CG-MS	15,144		0,069
32. Cariofileno	CG-MS	15,241		0,067
33. NI	CG-MS	15,438	19,029	
34. NI	CG-MS	15,599		0,078
35. Cinamato de etilo	CG-MS	15,704		0,054
36. NI	CG-MS	15,913	4,733	
37. Humuleno	CG-MS	16,069		0,533
38. NI	CG-MS	16,270	14,323	
39. NI	CG-MS	16,374		0,024
40. NI	CG-MS	16,590		0,286
41. α cumemeno	CG-MS	16,616		0,310
42. NI	CG-MS	16,699	0,172	
43. NI	CG-MS	16,832		0,148
44. Eremofileno	CG-MS	16,909		0,610
45. NI	CG-MS	17,053	11,407	
46. NI	CG-MS	17,188		6,016
47. NI	CG-MS	17,315		1,092
48. NI	CG-MS	17,472		0,137
49. α cadineno	CG-MS	17,546		0,054
50. NI	CG-MS	17,624	0,763	
51. NI	CG-MS	17,766		3,243
52. NI	CG-MS	17,986		0,133
53. α Calcoreno	CG-MS	18,047		0,196
54. NI	CG-MS	18,215	0,099	
55. NI	CG-MS	18,673		0,196
56. Espatulenol	CG-MS	19,017		0,124
57. Óxido de cariofileno	CG-MS	19,091	0,280	
58. NI	CG-MS	19,241	3,831	
59. 1,5,5,8- tetrametil- 1,2 oxabicyclo 1.9.1.01. dodeca-3,7-dieno	CG-MS	19,486		0,081
	CG-MS	19,871	1,165	
60. NI	CG-MS	20,365		0,102
61. NI	CG-MS	20,458		0,063
62. NI	CG-MS	21,154		0,183
Total			83,89	16,111

**Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)
del aceite foliar de
Ocotea quixos (Lam.) Kosterm.**

El estudio de la actividad biológica comprobó que el aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Figura 2) tiene una alta capacidad de inhibición en el crecimiento de las cepas tanto de bacterias *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus piogenes* y *Streptococcus mutans*, como del hongo (levadura) *Candida albicans* (Tablas 2 y 3).



Figura 2. Aceite foliar de “ishpingo” [*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., Lauraceae].

Tabla 2. Capacidad de inhibición del aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. contra el crecimiento de las cepas de bacterias y de un hongo (levadura).

Cepas de hongo y bacterias	Crecimiento como concentración en $\mu\text{l/ml}$									
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,097
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus piogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. contra el crecimiento de las cepas de bacterias y de un hongo (levadura).

Cepas de hongo y bacterias	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)
<i>Candida albicans</i>	12,50 $\mu\text{l/ml}$
<i>Escherichia coli</i>	12,50 $\mu\text{l/ml}$
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,25 $\mu\text{l/ml}$
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,12 $\mu\text{l/ml}$
<i>Streptococcus piogenes</i>	0,39 $\mu\text{l/ml}$
<i>Streptococcus mutans</i>	Menor a 0,10 $\mu\text{l/ml}$

Literatura citada

- Ballabeni, V.; M. Tognolini; S. Bertoni; R. Bruni; A. Guerrini; G. Moreno Rueda y E. Barocelli 2007. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research** 55(1): 23-30.
- Brooke, J. 1999. 8ª ed. **Biología de los microorganismos**. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. 1125 pp.
- Bruni, R. y A. Medici. 2003. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry** 85 (20): 415-421.

- CYTED. 1995. **Manual de técnicas de investigación.** Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma de Química Fina Farmacéutica. Proyecto XI: Búsqueda de Principios Bioactivos de la Región. Mimeo no publicado.
- Gupta, M. (Ed.). 1995. **270 plantas medicinales Iberoamericanas.** CYTED-SECAB. Bogotá, Colombia. 617 pp.
- Iowa State University. 2006. **Electron Impact Ionization.** En línea: <<http://www.cif.iastate.edu/MassSpec/ei.shtml>>. Consulta: 2 de agosto del 2006.
- Mellerio, G. 2004. **Appunti di spettrofotometria di massa.** Università di Pavia. Pavia, Italia. 125 pp.
- Naranjo, P. 1981. El ishpingo (*Ocotea quixos* Lam.) aspectos históricos y etnobotánicos. **Boletín de Informaciones Científicas Nacionales** 16(111): 21-28.
- Rios, M.; M.J. Koziol; H. Borgtoft Pedersen y G. Granda. 2007. **La colección etnobotánica del Herbario QCA/Ethnobotanical Collection of the Herbarium QCA.** En: M. Rios, M. Koziol, H. Borgtoft Pedersen y G. Granda (Eds.), **Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas/Useful plants of Ecuador: applications, challenges, and perspectives.** Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador. Pp.: 113-640.
- Sacchetti, G., A. Guerrini, P. Noriega, A. Bianchi y R. Bruni. 2006. Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. **Flavour and Fragrance Journal** 21(4): 674-676.
- Sam Houston State University. 2006. **GC/MS Introduction.** En Línea: <<http://www.shsu.edu/~chemistry/primers/gcms.html>>. Consulta: 25 de julio del 2006.
- Scientific Instrument Services, Inc. 2006. **Mass Spectral Library.** En línea: <<http://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>>. Consulta: 10 de noviembre del 2006.
- Sharapin, N. 1999. **Fundamentos de tecnología de productos fitoerapéuticos.** CITED. Bogotá, Colombia. 247 pp.
- Ulloa, C. 2006. Aromas y sabores. En: M. Moraes R., B. Øllgaard, L.P. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev (Eds.), **Botánica económica de los Andes Centrales.** Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. Pp.: 313-328.
- Wikipedia. 2006. **Escherichia coli.** En línea: <http://es.wikipedia.org/wiki/Bacillus_coli>. Consulta: 15 de agosto del 2006.

El aceite foliar de “canelón” o “ishpingo” [*Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm., Lauraceae] tiene una alta capacidad de inhibir el crecimiento de cepas tanto de bacterias como de hongos (levaduras).

