

Artículo Original / Original Article

Composición química y actividad Butirilcolinesterasa selectiva del aceite esencial de *Piper arboreum* Aubl. de Ecuador

[Chemical composition and selective BuChE activity of the essential oil of *Piper arboreum* Aubl. from Ecuador]

Lisseth Carolina Espinosa Espinoza¹, Melissa Salinas Rivera¹, Nicole Bec², Jorge Ramírez Robles¹,
Christian Larroque² y Chabaco Armijos¹

¹Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano alto, Loja-Ecuador

²Institute for Regenerative Medicine and Biotherapy (IRMB), Université de Montpellier, INSERM, Montpellier, France

Reviewed by:

Ana María Vazquez
Universidad Católica de Córdoba
Argentina

Alejandro Madrid
Universidad de Playa Ancha
Chile

Correspondence:

Chabaco ARMIJOS
cparmijos@utpl.edu.ec

Section Biological Activity

Received: 24 April 2022

Accepted: 7 May 2022

Accepted corrected: 4 September 2022

Published: 30 September 2023

Citation:

Espinosa Espinoza LC, Salinas Rivera M, Bec N, Ramírez Robles J, Larroque C, Armijos C
Composición química y actividad Butirilcolinesterasa selectiva del aceite esencial de *Piper arboreum* Aubl. de Ecuador
Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat
22 (5): 628 - 635 (2023).
<https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.5.45>

Abstract: The aim of this study was to identify the chemical composition of the *Piper arboreum* Aubl. essential oil (EO), and to evaluate its inhibitory activity *in vitro* against the enzymes butyrylcholinesterase (BuChE) and acetylcholinesterase (AChE). The EO was obtained by steam distillation of the leaves, which were collected in Pindal canton of the Loja province in southern Ecuador. The chemical composition was analyzed using the gas chromatography technique coupled to a mass spectrometry detector (GC-MS) and gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID). A total of 41 compounds were identified, the major components found in the oil were limonene (31,46%), β -selinene (12,01%), (E)-caryophyllene (7,53%), bicyclogermacrene (6,72%), germacrene D (3,83%) and β -elemene (3,63%). In *in vitro* analyzes, the EO showed high selective inhibition for BuChE with an IC₅₀ inhibition value of $29,3 \pm 3,3$ $\mu\text{g/mL}$. By contrast, the EO was not active against the AChE enzyme (IC₅₀ was $100,1 \pm 15,2$ $\mu\text{g/mL}$).

Keywords: *Piper arboreum*; Essential oil; GC-MS; GC-FID; BuChE-AChE activity.

Resumen: El objetivo del presente estudio consistió en identificar la composición química del aceite esencial de la especie *Piper arboreum* Aubl. y evaluar su actividad inhibitoria *in vitro* frente a las enzimas butirilcolinesterasa (BuChE) y acetilcolinesterasa (AChE). El aceite esencial (AE) se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor de las hojas de la planta, que se colectaron en el cantón Pindal de la provincia de Loja al sur de Ecuador. La composición química se analizó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID). Se identificaron en total 41 compuestos, siendo los mayoritarios, el limoneno (31,46%), β -selineno (12,01%), (E)-cariofileno (7,53%), bicyclogermacrene (6,72%), germacrene D (3,83%) y β -elemeno (3,63%). En los análisis *in vitro*, el AE mostró una alta inhibición selectiva para BuChE con un valor de inhibición CI₅₀ de $29,3 \pm 3,3$ $\mu\text{g/mL}$. Por el contrario, el AE no resultó activo frente a la enzima AChE con un valor de inhibición CI₅₀ = $100,1 \pm 15,2$ $\mu\text{g/mL}$.

Palabras clave: *Piper arboreum*; Aceite esencial; GC-MS; GC-FID; Actividad BuChE-AChE.

INTRODUCCIÓN.

La familia botánica Piperaceae comprende alrededor de 14 géneros y 1950 especies (Mabberley, 1987), *Piper* y *Peperomia* constituyen los géneros más abundantes, con alrededor de 700 y 600 especies, respectivamente (Joly, 1985). En Ecuador el género *Piper* incluye 157 especies nativas, de las cuales 75 son endémicas (León et al., 2011).

Una gran variedad de plantas del género *Piper*, son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de vaginitis, desordenes intestinales, dolores y espasmos, por sus efectos antimicrobacterianos, antifúngicos, desinfectantes, contra parásitos, fiebre, gastritis, gripe, reumatismo y problemas de prostata entre otros (Ngane et al., 2003; De Campos et al., 2005; Mesa, 2007; Ramírez et al., 2013; Perez, 2014).

Entre los principales metabolitos secundarios que se han aislado de especies del género *Piper* se encuentran alcaloides, lignanos, ácidos benzoicos, terpenos entre otros (Parmar, 1998; Terreaux et al., 1998; Lee et al., 2001), muchos de los cuales muestran actividad antifúngica, insecticida, antimalárica, estimulante, bactericida y citotóxica (Wadt, 2004; Mesa, 2007).

En Ecuador la especie *Piper arboreum* es una especie nativa de la región andino-amazónica, que se la puede encontrar hasta los 1500 msnm. (Jørgesen y León-Yáñez, 1999) y es conocida popularmente como cordoncillo, cordoncillo verde, bazo panka, vivora o arabila, la mezcla de la planta junto a otras especies se utiliza para la preparación de remedios antiofídicos, de igual forma las hojas se emplean en medicina tradicional para inducir el vómito y en baños para eliminar piojos (De la Torre et al., 2008).

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) predomina en el cerebro sano de una persona, y se considera que la butirilcolinesterasa (BuChE) desempeña un papel menor en la regulación de los niveles de acetilcolina (ACh) en el cerebro. Evidencia reciente sugiere que tanto la AChE como la BuChE pueden tener un papel en la etiología y progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA) más allá de la regulación de los niveles de ACh sináptica. Se ha encontrado que la actividad de BuChE aumenta progresivamente en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), mientras que la actividad de AChE permanece sin cambios o disminuye. Por tanto, ambas enzimas representan dianas terapéuticas legítimas para mejorar el déficit colinérgico que se

considera responsable de la disminución del funcionamiento cognitivo y conductual característico de la EA (Greig et al., 2002). De hecho, los estudios clínicos han demostrado que, con una mayor inhibición de las colinesterasas ChEs, hay una mejora en las funciones cognitivas, así como en las pruebas de memoria verbal, espacial y los tiempos de reacción.

Hasta la fecha no existen investigaciones sobre la composición química del AE de *P. arboreum* de Ecuador y tampoco estudios precedentes sobre la actividad BuChE-AChE del AE de esta especie colectada y estudiada en otros países como el Chepo-Panamá (Mundina et al., 1998), Reserva Biológica Bom, Recife-Brasil (Nascimento et al., 2015), Reserva de Ripasa, Ibaté-Brasil (Navickiene et al., 2006), Parque ecológico Serra de Itabaiana-Brasil (Lima et al., 2019), Bahia-Brasil (Silva et al., 2014) y de especies de *P. arboreum* cultivadas en invernadero en la Universidad Estatal Paulista en Araquara-Brasil (Regasini et al., 2009a; Regasini et al., 2009b).

El presente artículo aporta información sobre la composición química del AE de la especie silvestre *Piper arboreum* Aubl. colectada en el al sur de Ecuador, así mismo se reporta por primera vez la actividad de inhibición *in vitro* de las enzimas colinesterasas BuChE y AChE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

La colecta de la parte aérea (ramas y hojas) de la especie vegetal *Piper arboreum* Aubl., se la realizó durante el mes de noviembre del año 2020 en el cantón Pindal de la provincia de Loja a una altitud 800 msnm, en las coordenadas 601417,5 E y 95475,2 N. Las muestras fueron recolectadas con el permiso de investigación número MAE-DBN-2016-0655 otorgado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador. La especie vegetal fue identificada por el botánico Nixon Cumbicus en la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL) utilizando muestras de referencia de herbario, el nombre científico de la especie se sigue la nomenclatura propuesta por Jørgesen y León (1999).

Antes de obtener el AE se procedió a separar las hojas de las ramas.

Destilación y obtención del aceite esencial

El AE se obtuvo de las hojas de la especie mediante arrastre de vapor en un equipo tipo Clevenger. Este

proceso fue realizado por triplicado a partir de tres muestras diferentes de la planta, el tiempo de cada destilación fue de 4 horas, el AE obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro y se almacenó a 4°C en frascos ámbar de vidrio hasta su análisis posterior.

Análisis químico cualitativo

El análisis químico cualitativo del AE de *Piper arboreum* se lo realizó de acuerdo con (Eduarte et al., 2022) en un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies serie 6890 N, acoplado a un espectrómetro de masas 5973 (Santa Clara, CA 95051, USA), operado en modo SCAN y ionización de electrones a 70 eV, con un rango de masas de 45-350 m/z. El equipo dispone de un autoinyector Agilent 7683 (Little Falls, DE, USA) y un software MSD-Chemstation D.01.00 SP1.

El análisis GC-MS del AE se realizó en una columna de fase estacionaria apolar, DB-5MS marca Agilent (5%-phenyl-methylpolysiloxane, 30 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de diámetro interno; J & W Scientific, Folson, CA, USA), La inyección se realizó en modo Split (relación 40:1) a una velocidad de 1 mL/min, a una temperatura de 220 °C y un con un volumen de inyección de 1 µL, el gas de arrastre empleado fue helio. Para la elución de los compuestos se utilizó el siguiente programa de temperatura: 50°C por 5 minutos, de 50°C a 180°C a 3°C/min; y finalmente de 180°C a 250°C a 15°C/min.

En las mismas condiciones se realizaron corridas con una mezcla de alcanos (C9 de BDH y C10-C25 con una pureza del 99%), para la identificación de los componentes el aceite esencial se calcularon los índices de retención lineal según Van Den Dool y Kratz, los cuales se compararon con los índices reportados en la literatura (Adams, 2017). Para el análisis se inyectó una muestra (1 µL) del AE disuelto en diclorometano (1:100 v/v). El análisis se realizó por triplicado.

Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo del AE se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies (modelo 6890N), acoplado a un detector de ionización de llama (FID). La cantidad porcentual para cada compuesto se la determinó correlacionando el área del compuesto con el área total de los compuestos

identificados, los valores del análisis cuantitativo se expresaron como los valores medios de tres inyecciones.

Actividad inhibidora de las colinesterasas

Las actividades anti-AChE (AChE de *Electrophorus electricus*, Sigma-Aldrich, SRE020, St Louis MO.) y anti-BuChE (BuChE, de suero equino, Sigma Aldrich, SRE020, St. Louis MO.), se efectuaron de acuerdo al procedimiento colorimétrico desarrollado por Ellman et al. (1961). El principio se basa en la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina (ASChE), produciendo acetato y tiocolina. La tiocolina, en presencia del ión ditiobisnitrobenzoato altamente reactivo (DTNB), genera un color amarillo, que se puede analizar cuantitativamente mediante absorción espectrofotométrica a 412 nm (Bosak et al., 2018). El volumen usado para el análisis de inhibición contenía, 200 µL de solución salina tamponada con fosfato (pH=7.4), 1.5 mM de DTNB o reactivo de Ellman, y la muestra del AE disuelta en DMSO (1% v/v). Las dos enzimas AChE y BuChE fueron disueltas en la solución salina tamponada con fosfato (pH=7.4) y se tomaron 24 mU/mL para cada ensayo realizado, luego de 10 minutos de preincubación se añadió el sustrato de yoduro de acetilcolina (1.5 mM) para iniciar la reacción. Transcurridos 30 minutos a 30°C, las microplacas de 96 pocillos fueron leídas en un equipo de detección Varioskan Flash (Thermofisher). El AE fue analizado por triplicado.

RESULTADOS

El AE de la especie *Piper arboreum*, se obtuvo mediante destilación con vapor de agua durante 4 h, el rendimiento promedio de tres destilaciones fue de $0.06 \pm 0.01\%$.

Composición química

En el AE de la especie *Piper arboreum*, se pudieron identificar 41 compuestos (95.08%), entre monoterpenos (38,10%), sesquiterpenos (55,49%) y diterpenos (1,50%). Entre los compuestos mayoritarios del AE (Tabla N° 1) se encuentra el limoneno (31,46%), β-selineno (12,01%), (E)-cariofileno (7,53%), biciclogermacreno (6,72%), germacreno D (3,83%) y β-elemeno (3,63%).

Tabla N° 1
Composición química del AE de *Piper arboreum* del cantón Pindal de la provincia de Loja - Ecuador

N°	TR	Compuesto	IR ^a	IR ^b	Área Relativa % ^c	σ^d
1	8.05	α -Pinenos	932	939	2.16	0.08
2	9.69	Sabineno	971	975	0.72	0.10
3	9.90	β -Pinenos	976	979	2.21	0.06
4	10.4	Myrceno	988	990	0.52	0.09
5	12.25	Limoneno	1029	1029	31.46	2.56
6	13.05	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	1046	1050	1.02	0.12
7	27.71	Silphiperfol-5,7(14)-dieno	1363	1360	1.76	0.25
8	28.16	α -Copaeno	1374	1376	0.46	0.07
9	28.77	β -Elemeno	1388	1390	3.63	0.57
10	30.00	(<i>E</i>)-Cariofileno	1417	1419	7.53	0.79
11	30.92	6,9-Guaiadieno	1440	1444	0.79	0.06
12	31.46	(<i>Z</i>)- β -Farneseno	1453	1442	0.61	0.08
13	31.65	Allo-Aromadendreno	1457	1460	0.76	0.12
14	32.07	4,5- <i>di-epi</i> -Aristolocheno	1468	1473	0.71	0.27
15	32.30	γ -Muuroleno	1473	1479	1.25	0.18
16	32.54	Germacreno D	1479	1481	3.83	0.23
17	32.84	β -Selineno	1486	1490	12.01	0.88
18	32.94	Viridifloreno	1489	1496	0.46	0.13
19	33.15	Biciclogermacreno	1494	1500	6.72	0.96
20	33.26	α -Muuroleno	1497	1500	0.48	0.13
21	33.58	α -Bulneseno	1505	1509	1.28	0.18
22	33.65	β -Bisaboleno	1506	1505	0.39	0.13
23	33.93	γ -Cadineno	1514	1513	0.49	0.21
24	34.04	δ -Cadineno	1516	1523	1.98	0.67
25	34.50	Ni	1528	-	0.63	0.20
26	35.77	(<i>E</i>)-Nerolidol	1561	1563	0.33	0.12
27	36.02	Maaliol	1567	1567	0.23	0.02
28	36.30	Ni	1575	-	1.37	0.20
29	36.65	Viridiflorol	1583	1592	2.02	0.51
30	36.97	Guaiol	1592	1600	1.88	0.47
31	37.06	Cubeban-11-ol	1594	1595	1.28	0.17
32	37.46	Rosifoliol	1605	1600	0.49	0.07
33	37.63	Ni	1609	-	0.57	0.05
34	37.99	Eremiligenol	1619	1631	0.46	0.11
35	38.11	Ni	1622	-	0.51	0.24

36	38.23	β -Himachaleno oxide	1625	1616	1.98	0.58
37	38.94	α -Muurolol (=torreyol)	1645	1646	0.63	0.23
38	39.26	α -Cadinol	1653	1654	0.48	0.19
39	39.35	Pogostol	1656	1653	0.55	0.16
40	43.41	Ni	1769	-	1.84	0.09
41	48.11	Sclareno	1978	1974	1.50	0.19
Monoterpenos Hidrocarbonados (%)					38.10	
Sesquiterpenos Oxigenados (%)					10.34	
Sesquiterpenos Hidrocarbonados (%)					45.14	
Diterpenos (%)					1.50	
Total identificado (%)					95.08	

Nota: TR, Tiempo de retención; ^a, Índices de retención lineal experimental de la columna DB-5MS; ^b, Índices de retención lineal de literatura (Adams, 2017); ^c, Porcentaje relativo promedio de tres destilaciones; ^d, Desviación estándar; Ni: Compuestos no identificados

Inhibición de las colinesterasas

Tabla N° 2

Inhibición AChE y BuChE del aceite esencial de *Piper arboreum*.

Muestra	AChE (CI ₅₀ g/mL±SD)	BuChE (CI ₅₀ g/mL±SD)
Aceite esencial de <i>P. arboreum</i>	101,1 ± 15,2	29,3 ± 3,3
<i>Donepezil</i>	0.04 ± 0,01	3,60 ± 0,02

Nota: CI₅₀ es Concentración inhibitoria media máxima expresada en µg/mL

El aceite esencial de *P. arboreum* mostró una actividad inhibitoria débil (IC₅₀ = 101,1 ± 15,2 µg/mL) frente a la enzima AChE; sin embargo, presentó una alta actividad inhibitoria frente a BuChE con un valor IC₅₀ de 29,3 ± 3,3 µg/mL. El donepezil utilizado como sustancia de referencia para la inhibición de las dos enzimas ChEs evaluadas mostró un valor de inhibición CI₅₀ de 0.04 µg/mL frente a AChE y un valor CI₅₀ de 3.6 µg/mL frente a BuChE.

DISCUSIÓN

En el análisis del AE de *Piper arboreum*, se identificaron un total de 41 compuestos que representa el 95,08% del total del aceite, el tipo de compuestos químicos presentes en mayor abundancia fueron los sesquiterpenos (55.49%), mientras que en menor cantidad se encuentran los monoterpenos (38.10%). Los compuestos mayoritarios del AE son el limoneno (31,46%), β -selineno (12,01%), (*E*)-cariofileno (7,53%), biciclogermacreno (6,72%), germacreno D (3,83%), β -elemeno (3,63%).

En estudios precedentes realizados, el AE de las hojas de *Piper arboreum* colectadas en Pernambuco-Brasil, se caracteriza por presentar compuestos sesquiterpenoides como componentes principales del aceite, siendo los mayoritarios el δ -cadineno, β -cariofileno, germacreno D y biciclogermacreno (Nascimento *et al.*, 2015). El predominio de sesquiterpenos como compuestos mayoritarios también ha sido determinado para el AE de *P. arboreum* colectada en el Instituto de Química (UNESP) en Araraquara-Brasil, entre ellos el β -cariofileno, germacreno D y biciclogermacreno son los principales (Andréia de A. Morandim, 2006). Así mismo, para el AE de *P. arboreum* de Panamá se ha reportado como mayoritarios los compuestos, δ -cadinene, α -copaeno y germacreno D (Mundina, 1988). Al igual que los aceites esenciales (AEs) de *Piper arboreum* estudiados en diferentes países, en el AE de *P. arboreum* de Ecuador también se confirma el predominio de compuestos sesquiterpenos frente a los monoterpenos, sin embargo, en la especie ecuatoriana el compuesto que se encuentra en mayor

cantidad (%) es el Limoneno, lo que permitiría diferenciarlo de los aceites de otras localidades.

En el ensayo *in vitro* de inhibición de las enzimas colinesterasas (BuChE y AChE), el AE de *P. arboreum* exhibió una actividad selectiva inhibitoria contra BuChE. Lo cual podría estar vinculado con su composición química y el efecto sinérgico o antagonico que ejercen entre si dichos componentes para lograr o no un mecanismo específico de inhibición (Espinosa et al., 2019; Salinas et al., 2020). La inhibición de BuChE y AChE es de gran interés para el estudio del tratamiento o relentizacion de la enfermedad del Alzheimer (Dhivya et al., 2014) y otras enfermedades neurodegenerativas. La actividad inhibitoria del AE de *Piper arboreum* para las dos enzimas no ha sido descrita previamente en la literatura existente y nuevos estudios para establecer su potencial uso farmacológico son necesarios (Armijos et al., 2020). En un cerebro normal, la AChE representa el 80% de la actividad, mientras que la BuChE representa el 20% restante (Greig et al., 2001). En los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), la actividad de BuChE aumenta, mientras que la actividad de AChE permanece sin cambios o disminuye. Se ha demostrado que la inhibición selectiva de BuChE no solo aumenta significativamente el nivel de acetilcolina sino que también mejora la memoria en ratas de edad avanzada (Ayaz et al., 2015). Por lo tanto, los inhibidores selectivos de BuChE derivados de plantas (compuestos químicos, extractos o AEs),

se buscan activamente en diferentes laboratorios para probar su efecto farmacológico.

CONCLUSIONES

La composición química y actividad biológica del aceite esencial de las hojas de *P. arboreum* de Ecuador ha sido reportada por primera vez, 41 compuestos que representan el 95.08% total del aceite han sido identificados, en el AE han predominando los compuestos sesquiterpenos. Los compuestos mayoritarios fueron el limoneno (31,46%), β -selineno (12,01%), (*E*)-cariofileno (7,53%), biciclogermacreno (6,72%), germacreno D (3,83%), β -elemeno (3,63%). En el estudio para determinar la actividad inhibitoria de las enzimas colinesterasas (BuChE y AChE), el AE presentó una marcada inhibición contra BuChE con un valor CI_{50} de $29,3 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$, por el contrario, no presento actividad de inhibición frente a AChE. Por la interesante actividad de inhibición selectiva frente a BuChE el AE de *P. arboreum* se puede considerar como un candidato idóneo en estudios relacionados con el descubrimiento de sustancias naturales que permitan mejorar la calidad de vida de personas con Alzheimer.

AGRADECIMIENTOS

Estamos agradecidos con el programa de maestría en Química Aplicada de la Universidad Particular de Loja, Ecuador, por su apoyo para realizar la presente investigación.

REFERENCIAS

- Adams RP. 2017. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Pub. Corp., Illinois, USA.
- Andréia de A. Morandim A. 2006. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Quim Nova** 29: 467 - 470.
- Armijos C, Matailo A, Bec N, Salinas M, Aguilar G, Solano N, Calva J, Ludeña C, Larroque C, Vidari G. 2020. Chemical composition and selective BuChE inhibitory activity of the essential oils from aromatic plants used to prepare the traditional Ecuadorian beverage *Horchata lojana*. **J Ethnopharmacol** 263: 1 - 12. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113162>
- Ayaz M, Junaid M, Ullah F, Sadiq A, Khan M, Ahmad W, Shah M, Imran M, Ahmad S. 2015. Comparative chemical profiling, cholinesterase inhibitions and anti-radicals properties of essential oils from *Polygonum hydropiper* L: A preliminary anti-Alzheimer's study. **Lipids Health Dis** 14: 141 - 152.
- Bosak A, Ramic A, Smidlehner T, Hrenar T, Primozić I, Kovarik Z. 2018. Design and evaluation of selective butyrylcholinesterase inhibitors based on Cinchona alkaloid scaffold. **Plos One** 13: 1 - 18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205193>
- Danelutte A, Lago J, Young M, Kato M. 2003. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry** 64: 555 - 559. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00299-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00299-1)
- De Campos M, Cechinel Filho V, Da Silva RZ, Yunus RA, Zacchino S, Juarez S, Bella Cruz RC, Bella Cruz A.

2005. Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biol Pharmaceut Bull** 28: 1527 - 1530. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1527>
- De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M, Balslev H. 2008. **Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador**. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito, Ecuador.
- Dhivya P, Sobiya M, Selvamani P, Latha S. 2014. An approach to Alzheimer's disease treatment with cholinesterase inhibitor activity from various plant species. **Int J Pharm Tech Res** 6: 1450 - 1467.
- Eduarte R, Bec N, Salinas M, Ramírez J, Larroque C, Armijos C. 2022. Composición química y actividad AChE-BuChE del aceite esencial de palo santo *Bursera graveolens* (Kunth) Triana & Planch de Jipijapa, Ecuador. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 21: 455 - 463. <https://doi.org/10.37360/blacpma.22.21.4.28>
- Ellman GL, Courtney KD, Valentino A, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol** 7: 88 - 90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Espinosa S, Bec N, Larroque C, Ramirez J, Sgorbini B, Bicchi C, Gillardoni G. 2019. Chemical, enantioselective, and sensory analysis of a cholinesterase inhibitor oil from *Coreopsis triloba* S.F. Blake (Asteraceae). **Plants** 8: 448. <https://doi.org/10.3390/plants8110448>
- Greig N, Lahiri D, Sambamurti K. 2002. Butyrylcholinesterase: an important new target in alzheimer's disease therapy. **Int Psychogeriatr** 77 - 91. <https://doi.org/10.1017/s1041610203008676>
- Joly A. 1985. Botânica: **Introdução À Taxonomia Vegetal**. Companhia Editora Nacional, São Paulo, Brazil.
- Jørgesen P, León S. 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. **Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard** 75: 1 - 1182.
- Lee S, Park B, Kim M, Choi W, Kim H, Cho K, Lee S, Lee H. 2001. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **Crop Protection** 20: 523 - 528. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00172-1](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00172-1)
- León S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa C, Navarrete H. 2011. **Libro rojo de plantas endémicas del Ecuador**. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Lima RN, Ribeiro AS, Santiago GMP, Costa COS, Soares MB, Bezerra DP, Shanmugam S, Freitas LDS, Alves PB. 2019. Antitumor and *Aedes aegypti* larvicidal activities of essential oils from *Piper klotzschianum*, *P. hispidum*, and *P. arboreum*. **Nat Prod Commun** 1 <https://doi.org/10.1177/1934578X19863932>
- Mabberley D. 1987. **The plant-book: A portable dictionary of the higher plants**. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Mesa AC. 2007. Actividad *in vitro* anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia piperaceae. **Scientia et Technica** 3.
- Mundina M, Vila R, Tomi F, Gupta MP, Adzet T, Casanova J, Cañigual S. 1988. Leaf essential oils of three panamanian *Piper* species. **Phytochemistry** 47: 1277 - 1282. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00762-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00762-0)
- Nascimento SA, Araujo EA, Silva JMD, Ramos CS. 2015. Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (Piperaceae). **J Chil Chem Soc** 1: 2837 - 2839.
- Navickiene H, Alécio A, Kato M, Bolzani V, Young M, Cavalheiro AJ, Furlan M. 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry** 55: 621 - 626. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00226-0)
- Navickiene HMD, Morandim AA, Alécio AC, Regasini LO, Bergamo M, Telascra DCB, Cavalheiro AJ, Lopes MN, Bolzani VS, Furlan M, Marques MOM, Young S, Kato MJ. 2006. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum*. **Quim Nova** 29: 467.
- Ngane A, Biyiti L, Bouchet P, Nkengfack A, Amvam Zollo PH. 2003. Antifungal activity of *Piper guineense* of Cameroon. **Fitoterapia** 74: 464 - 468. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(03\)00112-6](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00112-6)
- Parmar V, Jain S, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VK, Kumar R, Azim A, Malhotra S, Kumar N, Jain R, Sharma NK, Tyagi OD, Lawrie SJ, Errington W, Howarth OW, Olsen CE, Wengel SKSA. 1998. Wengel, polyphenols and alkaloids from piper species. **Phytochemistry** 49: 1069 - 1078. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00208-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00208-8)
- Pérez YS. 2014. Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum* Sw. y actividad antimicrobiana sobre

Xanthomonas albilineans (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson.

Prot Veg 7.

Ramírez J, Cartuche L, Morocho V, Aguilar S, Malagon O. 2013. Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. **Braz J Pharmacogn** 23: 370 - 373.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000012>

Regasini LO, Cotinguiba F, Passerini GD, Bolzani VS, Cicarelli RMB, Kato MJ, Furlan M. 2009a. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Rev Bras Farmacogn** 19: 199 - 203.

Regasini LO, Cotinguiba V, Morandim AA, Kato MJ, Scorzoni L, Mendes-Giannini MJS, Bolzani VS, Furlan M. 2009b. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. **Afr J Biotechnol** 8: 66 - 70.

Salinas M, Bec N, Calva J, Ramirez J, Andrade Morocho JM, Larroque C, Vidari G, Armijos C. 2020. Chemical composition and anticholinesterase activity of the essential oil from the Ecuadorian plant *Salvia pichinchensis* Benth. **Rec Nat Prod** 14: 276 - 285. <http://doi.org/10.25135/rnp.164.19.07.1342>

Silva JA, Oliveira FF, Guedes ES, Bittencourt MAL, Oliveira RA. 2014. Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum*. **Rev Bras Plant Med** 16: 700 - 706.

Terreaux C, Gupta MP, Hostettmann K. 1998. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum* in honour of Professor GH Neil Towers 75th birthday. **Phytochemistry** 49: 461 - 464.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00197-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00197-6)

Wadt HDO. 2004. Genetic diversity of "pimenta longa" genotypes (*Piper* spp., piperaceae) of the embrapa acre germplasm collection. **Gen Mol Biol** 74 - 82.