


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure, surrounded by various heraldic symbols including a crown, a lion, and a bear. The Latin motto "CETERA PARVIBUS CONSPICUA CAROLINA ACAD" is inscribed along the top arc, and "CETEMALENSIS INTER" along the bottom arc.

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALCALOIDES TIPO
PIPERINA Y DERIVADOS EN TRES ESPECIES DEL GÉNERO
PIPER NATIVAS DE MESOAMERICA Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**


P. amalago, P. jacquemontianum y P. retalhuleuense.

Jessica Esmeralda Morales Santa Cruz
Gloria María Sanabria Cabrera
Allan Ronaldo Vásquez Bolaños

QUÍMICOS FARMACÉUTICOS

Guatemala, Mayo de 2013

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALCALOIDES TIPO
PIPERINA Y DERIVADOS EN TRES ESPECIES DEL GÉNERO
PIPER NATIVAS DE MESOAMERICA Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

P. amalago, P. jacquemontianum y P. retalhuleuense.

Seminario de Investigación

Presentado por

Jessica Esmeralda Morales Santa Cruz
Gloria María Sanabria Cabrera
Allan Ronaldo Vásquez Bolaños

**Para optar al título de
Químicos Farmacéuticos**

Guatemala, Mayo de 2013

JUNTA DIRECTIVA

Oscar C3bar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio G3lvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fayver Manuel de Le3n Mayorga	Vocal IV
Br. Maily Graciela C3rdova Aud3n	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por habernos dado la oportunidad de poder desarrollar y realizar nuestros estudios superiores.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por los conocimientos adquiridos.

A la Doctora Sully Cruz Ph.D. por su apoyo, ayuda y asesoría en el seminario de investigación.

Al Licenciado Armando Cáceres, por su valiosa ayuda y por dirigirnos durante la realización del Seminario de Investigación.

A la Licenciada Beatriz Medinilla, por asesorar y dirigir el nuestro Seminario de investigación.

A nuestras Familias por el apoyo y cariño incondicional que siempre nos brindaron.

Jessica, Allan y Gloria.

DEDICATORIA

A DIOS

Por ser mi Universo, mi guía, mi ayuda, mi razón de seguir adelante, por no dejarme sola en ningún momento. Por darme su infinito amor y bondad. Y sobre todo por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A MIS PADRES

Mirna Santa Cruz, por ser mi mejor amiga, mi soporte. Samuel Morales, por ser mi guía y mi apoyo en todo momento. Gracias a ambos por animarme a ser mejor cada día, por darme su paciencia, su amor incondicional, este triunfo es de ustedes. Los amo.

A MIS HERMANOS

Josué y Leslie, por ser mis mejores amigos, por su amor, su apoyo y compañía. Son unos ángeles que Dios me regaló. Los amo.

A MIS TIOS Y ABUELITA

Herbert y Mamá Amparo, por todo su amor y apoyo. En especial a mi tía Emma por ser una amiga y por ser tan especial para mí. Los quiero.

A MIS AMIGOS

Alejandro, Joaquín, Iván y Gloria, gracias por su cariño, apoyo, por estar allí siempre. Y en Especial a Allan, por ser mi como mi hermano, mi confidente, por el cariño, por esos buenos y malos momentos que hemos pasado, te quiero muchísimo.

Jessica Morales

DEDICATORIA

A DIOS

Por haberme permitido llegar hasta este punto, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.

A MIS PADRES

Carlos Sanabria y Argelia Cabrera, por ser el pilar de mi vida. Por su apoyo incondicional en todo momento y su amor.

A MIS HERMANOS

José Carlo y Juan Carlos, por sus consejos, apoyo y amor.

A MIS TIAS

Matt, Alis, Yoli y Elvi por ser como madres para mí y darme su apoyo.

A JOSUE

Por su amor, apoyo y por estar a mi lado.

A MIS AMIGOS

Con mucho cariño, gracias por su amistad.

Gloria Sanabria

DEDICATORIA

A DIOS

Porque detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir, lo encontramos a Él.

A MI TÍA SANNIA Y A MI ABUELITA RUTH

Por cuidarme todos los días y darme alas para volar.

A IVETTE

Por estar en mi vida y hacer que todo tenga sentido.

A LILLY Y TATO

Mis amigos, que siempre están ahí.

A JESSICA

Gracias por compartir conmigo esta experiencia tan importante.

A MIS MAESTROS

Todos los que desde el principio me enseñado a pensar y me han enseñado a aprender.

Y A MI ABUELITA A ROSA BOLAÑOS

Que ya no está entre nosotros pero sé que me ve desde el cielo y está muy feliz.

Allan Vásquez

ÍNDICE

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
2. RESUMEN.....	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACIÓN.....	11
5. OBJETIVOS	12
6. HIPÓTESIS	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
8. RESULTADOS.....	25
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
10. CONCLUSIONES	35
11. RECOMENDACIONES	36
12. REFERENCIAS	37
13. ANEXOS.....	39

1. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

En el marco del proyecto “Valoración de especies mesoamericanas de *Piper* bioactivas como potenciales productos naturales de aplicación agroindustrial” se buscó cumplir el quinto objetivo del mismo: Extraer y cuantificar piperina en las especies que han mostrado tener una concentración similar a las semillas de *Piper nigrum*, así como colaborar en el cumplimiento del tercer objetivo: Comprobar la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina y métodos cuantitativos.

Para ello se estableció un método de extracción y recristalización de alcaloides, se determinó y cuantificó la presencia del alcaloides piperínicos y totales, y se evaluó la actividad antioxidante de hojas y raíces de tres especies del género *Piper* nativas de Guatemala: *P. amalago*, *P. jaquemontianum* y *P. retalhuleuense*, utilizando procedimientos viables y aplicables a escala industrial.

El estudio se realizó en las instalaciones de:

- Laboratorio FARMAYA
 - Secado de materia prima obtenida en la primera colecta realizada.
 - Preparación de muestras botánicas de las plantas estudiadas.

- Laboratorio del Departamento de Cito-histología, Escuela de Química Biológica. Edificio T 11, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
 - Maceración de material vegetal.

- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), edificio T 10, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala:
 - Secado de materia prima obtenida en la segunda colecta realizada.
 - Tamizaje de material vegetal utilizado en el estudio.
 - Concentración de los extractos obtenidos.
 - Recristalización de alcaloides.
 - Identificación de alcaloides tipo piperina.
 - Cuantificación de alcaloides tipo piperina.
 - Cuantificación de alcaloides totales.
 - Determinación de actividad antioxidante.

2. RESUMEN

Mesoamérica tiene una importante riqueza natural y por tanto un amplio reservorio de moléculas con potenciales aplicaciones en áreas de la salud, alimentos, cosméticos entre otros, aunque pocas especies han sido estudiadas a fondo por su composición química y su bioactividad. Es necesario investigar estas especies debido a su posible aprovechamiento agroindustrial.

Según estudios realizados con anterioridad, tanto en nuestro país como en otras partes del mundo, *Piper* es un importante género de especies tropicales por sus potenciales usos como aromáticos, colorantes, alimenticios y medicinales. Se ha publicado que tiene propiedades antidiarreicas, antitumorales y antimutagénica, antidepresivas, antiinflamatorias, efecto hepatoprotector, antiasmático, antihipertensivo y actividad antitiroidea.

En la búsqueda de las moléculas responsables de estas propiedades se ha reconocido a la piperina así como a sus derivados como una familia de alcaloides con importantes cualidades. Inhiben el citocromo CYP3A4 humano y glicoproteína P, enzimas importantes para el metabolismo y transporte de xenobióticos y metabolitos. En estudios en animales, la piperina también inhibe otras enzimas importantes en el metabolismo de fármacos, es por ello que la piperina puede aumentar la biodisponibilidad de diversos compuestos y alterar la eficacia de algunos medicamentos. También la piperina tiene aplicaciones en la conservación de alimentos.

Con esta investigación se logró establecer un método de extracción y evaluar la presencia del alcaloide piperina y sus derivados en hojas y raíces de tres especies del género *Piper* con hábitat en el territorio de Guatemala: *P. amalago*, *P. Jacquemontianum* y *P. retalhuleuense*.

Se recolectó material vegetal de las tres especies, en una finca ubicada en Samayac, Suchitepéquez. Luego se evaluó el método de extracción más adecuado para alcaloides de piperina y derivados. Ya establecido el método se procedió a preparar extractos etanólicos de las hojas y raíces de las tres especies, se realizaron análisis de identificación, cuantificación y estudio de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante cromatografía en capa fina, colorimetría, espectrofotometría, y combinaciones de éstas empleando como referencia el extracto de las semillas de *Piper nigrum* que se sabe contiene piperina, así como un estándar de dicho alcaloide.

Tras realizar los análisis no se detectó piperina en ninguna de las especies investigadas, únicamente en las raíces *P. retalhuleuense* se identificó piperetina mediante sus características ópticas, este se cuantificó mediante espectrofotometría estimando una concentración de 22.94 partes por millar.

En cuanto a la actividad antioxidante por medio de los métodos del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y del 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), se encontró que las raíces de la especie *P. Jacquemontianum* posee mayor actividad antioxidante con un CI50 0.99 y el de menor actividad la presentó la raíz de *P. retalhuleuense* con un CI50 4.00.

3. ANTECEDENTES

3.1. MONOGRAFÍAS DE LAS PLANTAS INVESTIGADAS

3.1.1. *Piper amalago* (Piperaceae)

Denominación, sinónimos y equivalencias

Sinonimias: *Enckea ceanothifolia* (Kunth) Kunth, *E. sieberi* Miq., *Piper cubilquitzianum* C. DC., *P. gaumeri* Trel., *P. lundellii* Trel. & Standl., *P. lundelliifolium* Trel., *P. adenophlebium* Trel., *P. amalago* fo. *ceanothifolium* (Kunth) Steyer., *P. amalago* var. *medium* (Jacq.) Yunck., *P. berlandieri* C. DC., *P. calvescens* Trel., *P. ceanothifolium* Kunth, *P. cobanense* Trel., *P. comayaguanum* Trel. ex Yunck., *P. compactum* Trel., *P. conversum* Trel., *P. deamii* var. *yojoanum* Trel., *P. decrescens* (Miq.) C. DC., *P. decrescens* var. *ovatum* C. DC., *P. gracillimum* Trel., *P. henshenii* C. DC., *P. lundellianum* Trel., *P. nicoyanum* C. DC., *P. medium* Jacq., *P. plantagineum* Lam., *P. realgoanum* C. DC., *P. recuperatum* Trel., *P. reticulatum* L., *P. saururoides* Desv. ex Ham., *P. sieberi* (Miq.) C. DC., *P. siguatepequense* Trel., *P. syringaefolium* Balb. ex Kunth, *P. tenuipes* C. DC., *P. tigranum* C. DC., *P. tigerianum* C. DC., *P. tilaranum* Trel., *P. vaccinum* Standl. & Steyer., *P. wilsonii* Trel., *P. xanthoneurum* Trel (Cáceres, 2009).

Descripción botánica

Arbusto alto y muy ramificado, de aproximadamente 1.5-3m de alto o algunas veces hasta 6m. Pecíolos cortos, glabros y vaginados solamente en la base. Hojas palmatinervias, delgadas pero muy firmes y rígidas, variables en forma, lanceolado-elípticas a ovado-elípticas o redondo-ovadas, 7-14cm de largo y 3.5-7cm de ancho, gradualmente o abruptamente acuminadas o largamente acuminadas, obtusas o redondeadas en la base, glabras o a veces diminutamente puberulentas en los nervios del envés. Pedúnculos delgados, de igual tamaño o incluso más grandes que el pecíolo, glabros o puberulentos. Inflorescencias delgadas en espigas solitarias, de 3-7cm de largo o más, el raquis puberulento o hirteloso, brácteas ciliadas, algunas veces hirtelosas, estambres cuatro, anteras reniformes, fruto glabro (Cáceres, 2009).

Datos agrotecnológicos

Hábitat: Matorrales húmedos o lluviosos o bosques mixtos, bosques húmedos y premontanos o bosques secos, en sitios parcialmente sombreados.

Altura y distribución geográfica: Se encuentra a una altura de 2,600msnm o menos. Se reporta para el sur de México, Guatemala (Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango), Belice, Jamaica y el resto de Centroamérica hasta Suramérica (Cáceres, 2009).

Usos populares

Utilizado para el dolor de cuerpo, dolor de estómago, dolor de pecho, tos, detener hemorragias nasales, mordeduras de serpientes, antiabortivo, enfermedades psicológicas y sus síntomas, dismenorrea, edema, fiebre, antiveneno, vértigo; y como repelente de serpientes (Cáceres, 2009).

Composición química

Sus hojas contienen alcaloides (4,5-dihidroPiperlonguminina, N-(3,4-dimetoxil) isobutil-amina, N-(3',4-dimetoxicinamonil)-isobutilamina, N-(3',5-dimetoxicinamonil)-pirrolidina, 2,11-eicosadienoilpirrolidina, 3,6-eicosadienoilpirrolidina, eicosanoilpirrolidina, 2-eicosenoilpirrolidina, 3,6-hexadecadienoilpirrolidina, hexa-decanoilpirrolidina, 2-hexadecenoilpirrolidina, 6-metoxiPiperolisobutilamina, 2'-metoxi-3',4'-metilendioxi-cinamoillisobutilamina, 2'-metoxi-4'5' metilendioxi-trans-cinamoilPiperidina, 2'-meoxi-4',5'-metilendioxi-trans-cinamoilpirrolidina, 2'-metoxi-3'4'-metilendioxi-cinamoilpirrolidina, 3',4'-metilenedioxicinamoillisopentil-amina, 3',4'-metilendioxicinamoil-n-pentilamina, 3',4'-metilendioxicinamoilpirrolidina, 17-(metilendioxfenil)-16-heptadecenoilpirrolidina, 15-(3,4-metilendioxfenil)-14-pentadecenoilpirrolidina, 3,6-octadecadienoilpirro-lidina, octadecanoilpirrolidina, 2-98 octadecenoilpirrolidina, 9-octadecenoilpirrolidina, Piperoilisopentilamina, Piperlongumina, 2,4-tetradecadienoilpirrolidina, trichostachina, 3',4',5'-trimetoxicinamoillisobutilamina, 3',4',5'-trimetoxicinamoilpirrolidina y wisanidina), terpenos (ishwarol), esteroides (β -amirina y sitosterol), compuestos misceláneos (α -ácido aminobutírico y dopamina), ácido cinámico (Cáceres, 2009).

Farmacología y toxicología

Según estudios ha presentado actividad moluscocida, antiinflamatoria, antihipertensiva, vasoconstrictora y espasmolítica (Cáceres, 2009).

3.1.2. *Piper jacquemontianum* (Piperaceae)

Denominación, sinónimos y equivalencias

Sinonimias: *Piper actae* Trel., *P. aeruginosibaccum* Trel., *P. allatum* Trel., *P. arenicola* Trel., *P. bakeri* C. DC., *P. barbulatum* C. DC., *P. catalinianum* Trel., *P. citrifolium* var. *cookii* C. DC., *P. dedititium* Trel., *P. dimorphophyllum* Trel. in Standl., *P. discolor* Trelease ind Standl., *P. emancipationis* Trelease in Standl., *P. emancipationis* var. *longum* Trel. in Standl., *P. evulsipilosum* Trel., *P. gentlei* Trelease, *P. gleasonii* Yunck., *P. jactatum* Trel. & Standl., *P. kantelulense* Trel., *P. kantelulense* var. *gentlei* Trel. In Standl., *P. nitidulifolium* Trel. in Standl., *P. nitidulilaminum* Trel. in Standl., *P. onerosum* Trel., *P. orosianum* Trel., *P. paludicola* Trel. ex Yunck., *P. panamense* C. DC., *P. pilibaccum* C. DC., *P. plumbeicolor* Trel., *P. praeterlatum* Trel., *P. plumbeicolor* Trel. in Standl., *P. sagax* Trel., *P. siquirresense* Trel., *P. subcitrifolium* C. DC, *P. tabanicidum* Trel., *P. triumphale* Trel., *P. tumidipedunculum* Trel., *P. uvitanum* C. DC., *P. vexans* Trel. (Cáceres, 2009)

Nombres vernáculos: Cordoncillo, pooczuyaax (Cáceres, 2009).

Descripción botánica

Arbustos profusamente ramificados de 1-4 m de alto. Hojas pinnatinervias, asimétricas, elíptico-ovadas, elíptico-lanceoladas a obovadas o incluso oblanceoladas, (9-) 10-15 (-21)cm de largo y (3.5) 5-8 (-9.5)cm de ancho, ápice largamente acuminado, base inequilátera, el lado más largo obtuso, el más corto cuneado, pelúcido-punteadas en el envés, verde nítidas y lustrosas en la haz y verde pálidas en el envés, cartáceas o coriáceas, verde-grisáceas discoloras y lustrosas en la haz y amarillentas en el envés cuando secas, glabras en la haz, cortamente pilosas o hirsutas en el envés a lo largo de los nervios secundarios. Pecíolos 0.3-0.6cm de largo (hasta 1.5cm en nudos estériles), densamente pilosos, pubescencia a menudo en líneas discretas, con un desarrollo estipular discreto, 0.5mm de largo en nudos floríferos, hasta 4mm en nudos estériles, caduco. Inflorescencias erectas en todos los estadios, blancas en la antesis, verde pálidas en fruto, pedúnculo 0.3-0.7cm de largo, densa y cortamente piloso, glabrescente, raquis (3.5-) 5-7cm de largo, glabro. Brácteas florales triangulares a deltoides, 0.2mm de ancho, cortamente fimbriadas. Flores densamente agrupadas en el raquis formando bandas discretas tempranamente en antesis, sésiles. Estambres 4, filamentos tan largos como las anteras, éstas con dehiscencia vertical. Pistilo umbonado con 3 estigmas sésiles. Frutos obovoides, 1mm de largo, apicalmente obtusos y parcialmente inmersos en el raquis, apicalmente pubescentes, indumento amarillo cuando seco, cuerpo del fruto café oscuro. (Cáceres, 2009)

Datos agrotecnológicos

Hábitat: Frecuente en sotobosque de matorrales o bosques húmedos o lluviosos y premontanos; algunas veces en bosques de pino o en marismas de *Mancaría*.

Altura y distribución geográfica: Se encuentra a una altura desde 0-900 msnm, a temperaturas de 23-34°C y humedad relativa entre 51-85% (5). Se reporta para el sur de México, Guatemala (Petén, Alta y Baja Verapaz, Izabal, Petén, Escuintla, Guatemala, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos), Belice, Caribe, El Salvador e incluso más al sur (Cáceres, 2009).

Usos populares

Se utiliza para el dolor de estómago (digestivo), catarros, fiebre, dolor de cabeza, dolor, diabetes, enfermedades renales y nerviosas (Cáceres, 2009).

Composición química

Las hojas contienen nerolidol, α -pineno y linalool (en un porcentaje elevado). El aceite esencial de las hojas contiene citonela, linalool (69.4%), nerolidol (8%) α -pineno (3.2%) y cineol, limoneno y citral, β -pineno, β -3-careno, bornileno, δ -elemeno, 1,5 ciclodecadieno, β -cariofileno y D-germacrano (Cáceres, 2009)

Farmacología y toxicología

El extracto etanólico tiene una amplia actividad contra microorganismos a dosis <1mg/mL; en el tamizaje contra protozoos se encontró potente actividad contra *P. falciparum* (11µg/mL), *T. cruzi* (12µg/mL) y *L. mexicana* (24µg/mL) (12). Del extracto etanólico se prepararon particiones con hexano, cloroformo y acetato de etilo y se determinó la MIC, encontrándose que la partición hexánica es activa contra *P. falciparum* (14µg/mL), *T. cruzi* (24µg/mL), *M. smegmatis* y *B. subtilis* (0.125mg/mL), *S. aureus* y *E. coli* (0.25mg/mL) y *C. albicans* (0.50mg/mL). La partición clorofórmica fue activa contra *T. cruzi* (8µg/mL), *P. falciparum* (11µg/mL), *B. subtilis* y *C. albicans* (0.0625mg/mL), *M. smegmatis* (0.125mg/mL), y *S. aureus* (0.5mg/mL). La partición con acetato de etilo fue activa contra *P. falciparum* y *T. cruzi* (22µg/mL), *B. subtilis* y *C. albicans* (0.0625mg/ml), y *S. aureus* y *M. smegmatis* (0.5mg/mL) (15). El extracto diclorometánico tiene actividad contra *B. subtilis*, *M. smegmatis* y *C. neoformans* (13). Los extractos diclorometánicos y metanólicos presentaron actividad contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis* (Cáceres, 2009).

La infusión de hojas al 10% es antiinflamatoria *in vivo* a dosis de 750 y 1000mg/kg de peso corporal.

Su aceite esencial posee actividad antilarvas de *A. albimanus* y *A. aegypti* y actividad citotóxica (Cáceres, 2009)

3.1.3. *Piper retalhuleuense* (Piperaceae)

Denominación, sinónimos y equivalencias

Sinonimias: No hay información disponible

Nombres vernáculos: Corrimiento

Descripción botánica

Plantas principalmente herbáceas pero más o menos leñosas cerca de la base, algunas veces suberectas (1.5m de largo o menos), ocasionalmente trepadoras, comúnmente postradas y enraizadas en los nodos más bajos. Las ramas verde pálido, algo gruesas, estriadas, glabras o algo puberulentas, muy nodosas. Pecíolos 1.5-2.5cm de largo, cortamente hirsutos, vaginado solamente en la base. Hojas palmatinervias, delgadas, algo flácidas, verdes cuando están secas, cordado-orbiculares u ovado-orbiculares, 4-8cm de largo y 4-8.5cm de ancho, abruptamente agudas o corto-acuminadas con una punta obtusa, algo cordadas en la base, hirteloso en los nervios y venas de la parte abaxial, pálido en la parte adaxial, escasas puntuaciones negras en el envés. Pedúnculos cortos de entre 7-10mm de largo, corto-hispiduloso o glabrado. Inflorescencias en espigas solitarias y erectas, 1.5-3.5cm de largo, 3mm de grosor en fruto. Frutos oval-globosos, algo puberulentos o granulares (Cáceres, 2009).

Datos agrotecnológicos

Hábitat: Matorrales o bosques de tierras bajas húmedos o secos.

Altura y distribución geográfica: A 325m o más bajo. *P. retalhuleuense* se reporta para Santa Rosa, Retalhuleu, Suchitepéquez. El Missouri Botanical Garden lo tiene reportado para Costa Rica en dos puntos altitudinales de la región de Guanacaste.

Usos populares

No hay información disponible

Composición química

No hay información disponible

Farmacología y toxicología

No hay información disponible

3.2. ESTUDIOS PREVIOS

3.2.1. Caracterización de la actividad antioxidante de extractos de especies nativas del género *Piper* y cuantificación de metabolitos secundarios con potencial de desarrollo.

En el año 2009, Cáceres y col. investigaron 11 especies del género *Piper* evaluando la actividad antioxidante.

El objetivo principal del estudio era determinar que al menos una de las especies nativas de Mesoamérica del género *Piper* en estudio presenta actividad antioxidante.

Para su desarrollo se recolectó la materia prima de hojas y raíces de las 11 especies, preparándose extractos de CH₂Cl₂ y MeOH, comparando los resultados con el estándar de *P. nigrum*. Evaluándose la actividad antioxidante cualitativamente por CCF y cuantitativamente por espectrofotometría ultravioleta-visible por los métodos de DPPH, ABTS y fenoles totales, para cuantificar piperina, flavonoides y saponinas.

Dando como resultado 17 extractos con bandas similares al extracto de *P. nigrum* en CCF. Y según la cuantificación en los diferentes métodos los extractos que presentaron mayor actividad antioxidante que el estándar fueron hojas de *P. Jacquemontianum*, raíces de *P. retalhuleuense* y raíces de *P. amalago*. (Cáceres, 2009)

3.2.2. Determinación de piperina en la pimienta negra

En el año de 1983 se publicó un artículo en Sri Lanka, por el Instituto de Investigación Científica e Industrial. El objetivo fue introducir una nueva técnica en el ensayo de Piperina basado en la cromatografía en capa fina – ultravioleta por densitometría que produce un resultado cercanamente parecido al método de cromatografía en capa fina – ultravioleta por espectrofotometría.

Para la realización del estudio la materia prima utilizada fue la pimienta negra de Sri Lanka, con un alto contenido de Piperina. Se utilizó como fase móvil tolueno: metanol. Debe observarse en luz ultravioleta a 342 nm.

Ambos métodos son viables como análisis de rutina para la determinación de Piperina en la pimienta. Los métodos son similares con respecto a la separación pero difiere en el paso de la cuantificación. Los resultados en este estudio confirman un porcentaje significativamente alto en el contenido de Piperina en la pimienta negra de Sri Lanka, comparadas con otras especies de diferentes países (Jansz, Pathirann, & Packiyasoathy, 1983).

3.2.3. Aislamiento de Piperina de la pimienta negra

En el año de 1993 científicos de la Universidad de Utah y Wisconsin Epstein, W. y otros, ensayaron un método para el aislamiento de *Piperina* de la pimienta negra (*P. nigrum*).

El objetivo principal del estudio era lograr el aislamiento del alcaloide *Piperina* proveniente de los frutos de *P. nigrum*, sometiendo a extracción por soxhlet durante 20 minutos usando diclorometano; el extracto obtenido se enfrió para luego agregarle éter para lograr la cristalización de la Piperina. Finalmente el extracto fue analizado por cromatografía en capa fina usando acetona: hexano como fase móvil, sin usar revelador se observa la placa bajo luz ultravioleta a 342 nm (Epstein, Netz, & Seidel, 1993).

3.2.4. Polifenoles y alcaloides en especies del genero *Piper*

En el año de 1998 en la Universidad de Nueva Delhi (India) Parmar y otros, investigaron los polifenoles y alcaloides presentes en doce especies del género *Piper*. El objetivo principal del estudio era determinar e identificar dichos compuestos en hojas y tallos, por medio de métodos cualitativos y cuantitativos. Para su desarrollo se realizaron diferentes tratamientos a cada especie obteniendo extractos etéreos, de petróleo, diclorometano y metanol. Se analizaron por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna empleando diferente fase móvil en cada especie estudiada. Para su cuantificación e identificación se utilizó espectroscopía de resonancia magnética nuclear y de masas. Se obtuvieron en total treinta y ocho compuestos aislados de las doce especies de *Piper* estudiadas, entre los que destaca el alcaloide *Piperina* obtenido del extracto metanólico de las hojas y tallos de la especie *P. khasiana* (Parmar, y otros, 1998).

3.2.5. Actividad química, antioxidante y antifúngica en el aceite volátil y extractos de acetona de la pimienta negra

En el año de 2004, en la India se realizó un estudio publicado en la Revista de la Ciencia de Alimentos y Agricultura. El objetivo del estudio era investigar la actividad química, antioxidante y antifúngica en el aceite volátil y extractos de acetona en la pimienta negra.

Los métodos utilizados fueron cromatografía de gases y cromatografía de gases con espectrofotometría de masas. En el análisis de aceites volátiles se obtuvieron 49 componentes que corresponden al 99.339% del contenido total. En el extracto de acetona se encontraron 18 componentes con un contenido de 75.59% de la cantidad total. El aceite volátil tuvo una efectividad del 100% en el control como antifúngico. El aceite volátil y el extracto de acetona fueron identificados como mejores antioxidantes (Gurdip, Marimuthu, Catalan, & deLampasona, 2004).

3.2.6. Actividad antioxidante y de radicales libres de las semillas de pimienta negra

En el año del 2005 la Revista Internacional de Ciencia de los Alimentos y Nutrición en Turquía publicó un estudio en el que se tiene como objetivo la investigación de la actividad antioxidante y de radicales libres en las semillas de pimienta negra (*Piper nigrum*). Se prepararon extractos con etanol y agua de las semillas de la pimienta negra en seis ensayos diferentes que fueron la identificación, análisis de la actividad total antioxidante, el poder reducido, barrido de radicales libres por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, barrido del anión radical superoxidado, barrido del peróxido de hidrogeno y actividad de metales quelantes. En ambos extractos de etanol y agua se obtuvo una actividad antioxidante fuerte, por otro lado presentan un porcentaje significativo en la inhibición de la peroxidación de la emulsión del ácido linoléico. También en el contenido fenólico ambos extractos mostraron una equivalencia con el ácido gálico (Gülcin, 2005).

3.2.7. Efecto del tratamiento térmico en las concentraciones de los principios bioactivos algunas especias incluida la pimienta negra.

En el año 2007 en la India, el Instituto Central de Investigaciones en Tecnología de Alimentos, realizó un estudio sobre el efecto del tratamiento térmico en las concentraciones de los principios bioactivos de algunas especias incluida la pimienta negra. Se determinó la pérdida de *Piperina* en frutos de pimienta negra (*Piper nigrum*). El tratamiento térmico fue: (i) ebullición durante 10 minutos, (ii) ebullición durante 20 minutos, y (iii) cocción a presión durante 10 minutos. La cuantificación de los principios activos en los extractos de disolventes orgánicos de los frutos liofilizados se realizó con un método apropiado de HPLC. Los resultados de esta investigación indican una disminución en la disponibilidad de *Piperina* en los frutos de pimienta negra cuando estos son sometidos al calor (Suresh, Manjunatha, & Srinivasan, 2007).

3.2.8. Análisis cualitativo y cuantificación de amidas totales en diferentes órganos vegetales de p. Sarmentosum en extractos etanólicos

En el año 2009, en la Universidad de Malaysia, Hussain, K. y otros, realizaron un análisis cualitativo y cuantitativo de la especie *Piper sarmentosum*. El objetivo principal del estudio era cuantificar el contenido de amidas totales de los extractos obtenidos de las hojas, raíces, tallos y frutos de *P. sarmentosum*. Para su desarrollo se prepararon extractos etanólicos de los diferentes órganos de la planta, los cuales fueron analizados por cromatografía de capa fina usando tolueno-acetato de etilo

70:30 como fase móvil, observándose la placa bajo luz ultravioleta en un a 254 y 366nm. Para la estimación de amidas totales se desarrolló el método colorimétrico de Labat, el cual utiliza ácido sulfúrico y ácido gálico en metanol analizándose en un espectrofotómetro a una absorbancia de 660nm, utilizándose como estándar *Piperina*. Finalmente se obtuvo que el contenido de amida varía en diferentes partes de la planta fruta > raíz> hoja> tallo y el etanol es un mejor disolvente para la extracción (Hussain, Ismail, Sadikun, & Ibrahim, 2009).

3.2.9. Metabolitos en hojas y frutos de variedades de pimienta negra

En el año 2010 un grupo de investigadores del instituto Indú de Investigación de Especies, liderados por T. John Zachariah realizó un estudio en hojas y frutos de pimienta negra provenientes de 26 diferentes cultivares de ese país. El objetivo principal del estudio fue determinar la relación que existe entre los componentes fitoquímicos de las hojas y los componentes similares de los frutos de pimienta negra en las 26 locaciones investigadas. Para ello se colectaron muestras de semillas y hojas en todos los lugares a investigar, se determinó en fresco los fenoles totales, almidón, total de carbohidratos, proteínas y aminoácidos totales; posteriormente se secaron y se determinaron metabolitos secundarios. La piperina se cuantificó extrayéndola mediante reflujo con etanol, estimándola por medio de cromatografía líquida de alta resolución y calculada con base en un estándar auténtico. Los componentes de los aceites fueron cuantificados por medio de cromatografía de gases. Finalmente se realizó un análisis estadístico por multiregresión usando el software Windowstat 7.5. Se encontró que la piperina y los fenoles totales en las hojas guardan una fuerte correlación positiva con la piperina de los frutos. En cuanto a la distribución de metabolitos secundarios en hojas y frutos no existe una correlación directa. Los componentes de los aceites de las hojas incluyen el cariofileno, germacreno-D, nerolidol, elemol. Los aminoácidos totales, el almidón, las proteínas y los hidratos de carbono totales de la hoja tienen un efecto residual en la *Piperina* encontrada en los frutos (Zachariah, y otros, 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

Piper es un importante género de especies tropicales por su potencial como aroma, colorante, alimento y medicamento.

La diversidad de especies del género *Piper* presentes en el país y la originalidad de su composición química y sus propiedades biológicas son razones que justifican su investigación para conocer mejor la biodiversidad y aprovecharla en forma integral promoviendo su conservación como un legado natural con posibilidades de explotación agroindustrial y aprovechamiento por la población rural de los lugares donde crece en forma natural.

Los conocimientos generados con la investigación de estas especies abren la posibilidad de desarrollar nuevos productos agroindustriales que podrían beneficiar a los sectores campesinos que dispondrían de nuevas alternativas de cultivo que por su adaptación a los lugares podrían ser más fácilmente producibles. Particularmente del género *Piper* que ha demostrado propiedades para la conservación de alimentos o medicinales como prevención de enfermedades degenerativas como Alzheimer y otros procesos oxidativos, además de su actividad como inhibidores de la acetilcolinesterasa (IACE), propiedades antiparasitarias, antifúngicas y ansiolíticas.

La valoración de las especies nativas de Mesoamérica permitirá aportar información importante para entusiasmar a los sectores agrícolas para conservar estas especies y desarrollar procedimientos de manejo o cultivo que garanticen la disponibilidad de material vegetal para su aprovechamiento.

La necesidad de establecer procedimientos de extracción y análisis para evaluar la concentración de piperina y moléculas similares, que servirán posteriormente para instaurar protocolos de obtención y determinación de estos principios activos a nivel industrial.

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

5.1.1. Evaluar la presencia de piperina o sus derivados, alcaloides totales y la actividad antioxidante en hojas y raíces de tres especies del género *Piper* (*P. amalago*, *P. jacquemontianum* y *P. retalhuleuense*) nativas de Mesoamérica.

5.2. ESPECÍFICOS

5.2.1. Establecer un método de extracción para alcaloides tipo piperina y sus derivados que pueda ser utilizado a escala industrial en hojas y raíces de las especies investigadas.

5.2.2. Identificar la presencia de piperina en los extractos de los órganos de las plantas, a través métodos cromatográficos y espectrofotométricos.

5.2.3. Cuantificar alcaloides totales en los extractos por medio de un método espectrofotométrico.

5.2.4. Determinar la actividad antioxidante de los extractos por medio de un método cualitativo y dos métodos cuantitativos para analizar moléculas polares y apolares.

6. HIPÓTESIS

Por lo menos uno de los extractos vegetales a ensayar contiene piperina o alguno de sus derivados.

Por lo menos uno de los extractos vegetales a ensayar presenta actividad antioxidante.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. UNIVERSO

Tres especies del genero *Piper* (*P. amalago*, *P. jacquemontianum* y *P. retalhuleuense*)

7.2. MUESTRA

Hojas y raíces de *P. amalago*, *P. jacquemontianum* y *P. retalhuleuense*.

7.3. RECURSOS

Investigadores

- Jessica Esmeralda Morales Santa Cruz
- Gloria María Sanabria Cabrera
- Allan Ronaldo Vásquez Bolaños

Coordinador del proyecto

- Lic. Armando Cáceres

Asesor

- Licda. Sully Cruz

7.4. MATERIALES

7.4.1. Materiales y Equipos

- Asperjador de vidrio
- Balanza analítica
- Balanza de humedad
- Balanza semianalítica
- Balones aforados de diferentes volúmenes
- Bomba de vacío
- Cámaras cromatográficas
- Campana de extracción de gases
- Centrifugadora
- Cromatoplasmas de Sílicagel 60 F254
- Desecadora
- Espectrofotómetro CARY-50
- Estufa eléctrica
- Gradillas para tubo de ensayo
- Horno desecador

- Lámpara de ultravioleta-visible
- Papel filtro
- Percolador de acero inoxidable
- Refrigeradora
- Rotavapor
- Sonificador
- Tubos de ensayo
- Vortex

7.4.2. Reactivos

- 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)
- Acetato de Etilo
- Acetato de Sodio
- Ácido Acético
- Ácido Clorhídrico
- Ácido Fórmico
- Ácido Nítrico
- Ácido Sulfúrico
- Agua destilada
- Cloroformo
- Dietilamina
- Estándar de piperina
- Etanol al 95%
- Éter de petróleo
- Éter etílico
- Hexano
- Magnesio metálico
- Metanol
- Nitrato de Bismuto
- Persulfato de potasio
- Quercetina
- Reactivo ABTS
- Rutina
- Reactivo de Dragendorff
- Sulfuro de Sodio
- Terc-butyl-hidroquinona (TBHQ)
- Tiourea
- Tolueno

- Trolox
- Vainillina
- Vitamina C
- Vitamina E
- Yoduro de Potasio

7.4.3. Papelería y Equipo

- Computadora
- Hojas de papel
- Impresora
- Tinta
- Fotocopiadora
- Material bibliográfico
- Cuadernos
- CDs en blanco

7.4.4. Recursos Institucionales

- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala
- Proyecto FODECYT No. 27-2011-

7.5. MÉTODOS

7.5.1. Recolección

El material vegetal fue recolectado en la Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez.

La primera colecta se realizó en el mes de diciembre de 2011 y la segunda en marzo de 2012, fueron colectadas hojas y raíces de *Piper amalago*, *Piper jacquemontianum* y *Piper retalhuleuense*. La colecta se dividió en dos fases debido a que *Piper retalhuleuense* prolifera en una época diferente a las otras dos especies.

7.5.2. Secado y molienda

Se secó las muestras en un horno desecador a 40°C durante dos horas.

Usando una balanza de humedad se determinó la humedad residual hasta que cumplió con las especificaciones de humedad (<10%).

La molienda de las hojas se realizó utilizando un tamiz No. 5 para disminuir el tamaño de partícula. Las raíces fueron cortadas utilizando tijeras de podar para disminuir el tamaño de partícula a aproximadamente 0.5cm.

7.5.3. Obtención de extractos húmedos

- a) Pesar 100 gramos de material vegetal.
- b) Colocar el material vegetal en un recipiente con tapadera, agregar suficiente hexano como para cubrirlo en su totalidad, dejar en reposo por 24h. Decantar el hexano y repetir el procedimiento una vez más.
- c) Extender el material vegetal en papel kraft dejar evaporar el disolvente por una noche (trabajar en campana).
- d) En un percolador macerar el material vegetal, añadiendo 800mL de etanol al 95% Dejar en reposo por 10 días, protegiéndolo de la luz. Agitar ocasionalmente cada dos días.
- e) Decantar en un vaso de precipitados y utilizar 200mL de etanol fresco para lavar el material vegetal.

7.5.4. Concentración mediante evaporador rotatorio

- a) Encender el baño de maría y llevar la temperatura a $50\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- b) Engrasar todas las partes esmeriladas y armar el equipo según el instructivo específico.
- c) Succionar la solución obtenida del percolador.
- d) Conectar la bomba de vacío y el evaporador rotatorio, e iniciar la destilación del extracto con recuperación del disolvente. Concentrar el extracto hasta obtener un volumen de 200mL. Se trabaja con vacío aproximadamente 175mmHg.

7.5.5. Cristalización del extracto (Epstein, Netz, & Seidel, 1993)

- a) Colocar el extracto en un beacker y enfriar en un baño de hielo hasta una temperatura de 8°C , agregar 3mL de éter etílico a 8°C .
- b) Agitar suavemente de 3-4 minutos, dejar que el disolvente se evapore. En este punto debe precipitar la piperina o derivados. Si no fuera así, enfriar de nuevo el extracto en baño de hielo, agregar otros 3mL de éter frío y raspar suavemente las paredes del beacker para promover la cristalización, dejar en baño de hielo por 10 minutos más, sacar el beacker del baño y dejar hasta el día siguiente para la obtención de cristales bien formados.
- c) Filtrar por succión, lavando los cristales con dos porciones de 2-3 mL de éter helado. Dejar secar al aire los cristales.
- d) Para eliminar la clorofila, lavar los cristales con éter de petróleo, se consigue eliminar los pigmentos en su mayor parte.

7.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS

7.6.1. Cromatografía en Capa Fina para caracterización de principios picantes (*Wagner & Blatt, 1996*)

- a) Pesar 0.1 g de extracto vegetal y diluir en 5 mL de metanol y filtrar.
- b) Preparar el estándar de piperina a una concentración de 5 mg/5 mL de metanol; así mismo preparar un extracto de semilla de *P. nigrum*, pesar 1 g de material vegetal, diluir en 10 mL de metanol, filtrar y concentrar a 3 mL.
- c) Aplicar en la placa de sílice gel F₂₅₄ 10 µL de cada una de las muestras y 5 µL del estándar de piperina y de *P. nigrum*. Colocar en la fase móvil de tolueno: acetato de etilo (70:30); emplear como revelador vainillina-H₂SO₄, asperjando primero el H₂SO₄ al 5% en etanol y después la vainillina al 1% en etanol; después de asperjado calentar la placa a 100°C durante 5 min.
- d) Observar bajo lámpara ultravioleta a 365nm, y buscar la presencia de una banda de color amarillo limón, en la zona media de la placa.

7.6.2. Estimación de alcaloides totales precipitables con el reactivo de Dragendorff (*Sreevidya & Mehorotra, 2003*)

- a) Preparar las siguientes soluciones:
 - Reactivo de Dragendorff: (1) Solución de 0.8g de nitrato de bismuto pentahidratado en 40mL de agua destilada y 10mL de ácido acético glacial. (2) solución de 8g de yoduro de potasio en 20mL de agua destilada. Mezclar las soluciones 1 y 2.
 - Solución Estándar de Nitrato de Bismuto: Disolver 10mg de Bi(NO₃)₃·5H₂O en 5mL de ácido nítrico concentrado y diluir a 100mL con agua destilada.
 - Tiourea al 3%: Disolver 3g de tiourea en 100mL de agua destilada.
 - Sulfuro de sodio al 1%: Disolver 1g de sulfuro de sodio en 100mL de agua destilada.
 - Extracto vegetal: Colocar 10g de material vegetal en un aparato Soxhlet con 100mL de etanol y someter a reflujo durante 2 horas. Concentrar el extracto a 10mL, agregar 10mL de KOH al 10% en etanol y diluir a 100mL
- b) Elaborar una curva de calibración con la solución estándar de nitrato de bismuto pipeteando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 mL de la solución estándar en balones aforados de 10mL y aforando con agua destilada. Tomar 1mL de esta solución y añadir 5mL de solución de tiourea. Medir la absorbancia a 435nm contra un blanco sin nitrato de bismuto.
- c) Tomar 5mL del extracto vegetal y llevar a un pH de 2 a 2.5 con HCl diluido, agregar 2mL de reactivo de Dragendorff y centrifugar, verificar si la precipitación fue completa agregando más reactivo de Dragendorff. Decantar el precipitado completamente con mucho cuidado, lavar el precipitado con alcohol y descartar el filtrado. Tratar el residuo con 2mL de sulfuro de sodio.

Centrifugar el precipitado café oscuro que se forma verificando la precipitación completa con sulfuro de sodio, decantar el filtrado y disolver el residuo en 2mL de ácido nítrico calentando si fuere necesario, llevar esta solución a un bolón aforado de 10mL llevando a volumen con agua destilada; pipetear 1mL y añadir a un tubo de ensayo agregando 5mL de solución de tiourea. Medir la absorbancia a 435nm.

- d) Con la curva de calibración elaborada utilizar la ecuación de la gráfica $y=mx+a$ para encontrar la concentración de las muestras.

7.6.3. Identificación de Piperina y Sus Derivados por Espectrofotometría ultravioleta-visible **(Hashimoto, y otros, 1996)**

- Elaborar soluciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los extractos vegetales en metanol.
- Elaborar una solución $5\mu\text{g/mL}$ de estándar de Piperina en metanol.
- Elaborar una solución $5\mu\text{g/mL}$ de estándar de Piperina en metanol y someter a la luz solar durante 72 horas para provocar su isomerización.
- Realizar un barrido espectrofotométrico de 200 a 700nm para establecer los picos máximos de absorbancia.

7.6.4. Cuantificación de Piperina y Sus Derivados por Espectrofotometría ultravioleta-visible **(Wood, Maureen, & James, 1988)**

- Elaborar una curva de Piperina con diluciones de 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 $\mu\text{g/mL}$ en y leer a las longitudes de 254, 280, 343 y 363 nm, preparando una ecuación de la recta con linealidad lo más cercano a 1 para cada longitud.
- Pesar 10 mg de extracto vegetal y diluir en 5 mL de metanol, disolver colocando en el baño ultrasónico por 5 min. Preparar diluciones de 0.25, 0.5, 1 y 2.5mL, de esta solución en 5 mL de metanol y leer en el espectrofotómetro a las longitudes de 254, 280, 343 y 363 nm.
- Para calcular el porcentaje de Piperina y derivados presentes promediar los porcentajes obtenidos en las cuatro longitudes de onda.

7.6.5. Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina (Gudiel, 2009)

- Aplicar $10\mu\text{L}$ de muestra de cada uno de los cristales obtenidos y $5\mu\text{L}$ del estándar antioxidante terc-butyl-hidroquinona (TBHQ), rutina, quercetina, vitamina C, vitamina E y Trolox en la cromatopla de sílica gel 60F254
- Colocar la placa en la cámara de vidrio saturada previamente con acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26).
- Secar y asperjar con 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) (1mg/mL en metanol)
- Detección: si los extractos presentan actividad antioxidante se observa la decoloración del DPPH en las bandas respectivas.

7.6.6. Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH (2,2-difenil-1picrilhidrazilo) mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (Córdova & Menéndez, 2009)

- a) Preparación de solución madre: Pesar 0.1g de extracto cristalizado y agregar 5mL de metanol absoluto luego introducirlo en el sonificador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

No. tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

- b) De estas disoluciones se encontrará el porcentaje de inhibición que esté entre (60-70%).
- c) Solución de 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) 500 μ M en metanol: Pesar 0.0219g de reactivo de DPPH y disolver con metanol hasta un volumen de 100ml en un balón aforado. Agitar la solución y conservar en un recipiente ámbar Por ser una solución inestable, se recomienda preparar la solución en mismo día que se va a emplear, preparando únicamente lo necesario.
- d) Buffer de acetato: Para preparar un litro de buffer se debe pesar 5.98g de acetato de sodio disolverlo con agua destilada y trasvasar a un balón de 1000ml; antes de aforar adicionar 3ml de ácido acético glacial. Aforar con agua destilada y agitar. El buffer tendrá un pH de 5.5
- e) Preparación de los tubos de reacción: Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran sustancias contenidas en el agua de chorro. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Preparar una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Blanco Control	Control	Blanco de ensayo	Ensayo*
Buffer de acetatos	1mL	1mL	1mL	1mL
Metanol	2mL	1.5mL	1.9mL	1.4mL
Solución de DPPH	-----	0.5mL	-----	0.5mL
Dilución de cada muestra	-----	-----	0.1mL	0.1mL

*Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado.

- f) Agitar los tubos preparados de esta forma en un vortex durante 30 segundos y luego incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Leer a una longitud de onda de 517nm. Siempre debe leerse la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo.
- g) Registro de los resultados y cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia: Registrar los valores obtenidos de la curva en base al siguiente esquema:

Tipo de muestra	Absorbancia del blanco	Absorbancia 1era repetición	Absorbancia 2da repetición	Absorbancia 3era repetición	Promedio	Diferencia	% de inhibición
Control							
1							
2							
3							
4							
5							

- h) Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}) * 100}{\text{Absorbancia del control}}$$

- i) Luego graficar la concentración del extracto (eje X) vs porcentaje de absorbancia (eje Y). Determinar la ecuación de la recta y el r² el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.
- j) Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI50), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de DPPH. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la fórmula de la siguiente manera:

$$CI50 = \frac{(50 - \text{pendiente})}{\text{intercepto}}$$

7.6.7. Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (Re, 1999)

- a) Preparación de solución madre: Pesar 0.1g de extracto cristalizado y agregar 5mL de metanol absoluto luego introducirlo en el sonificador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones

No. tubo	Extracto	Metanol	Dilución
1	1	4	0.2
2	2	3	0.4
3	3	2	0.6
4	4	1	0.8
5	5	0	1.0

- b) Preparación de estándares:

- Trolox 2.5mM, se prepara en etanol, emplear diluciones de 0-15 μ M
- Vitamina C: Pesar 0.1g y diluir con 5mL de metanol, preparar diluciones de 0.03-0.04-0.05-0.06-0.07/5mL
- Vitamina E: Pesar 10mg y diluir con 5mL de metanol, preparar diluciones de 0.8-0.9-1-1.1-1.2/5
- Rutina: Pesar 40mg y diluir en 20mL de metanol, preparar diluciones de 2-2.5-3-3.5-4/5.
- Quercetina: Pesar 10mg y diluir con 5mL de etanol, preparar diluciones de 0.2-0.25-0.3-0.35-0.4/5
- Ter-butilhidroquinona (TBHQ): Pesar 10mg y diluir con 5mL de etanol, preparar diluciones de 0.4-0.5-0.6-0.7-0.8/5
- Solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS+) 7mM en agua: Para preparar 10mL pesar 38.41mg y diluir con agua hasta 10mL
- Solución de persulfato de potasio 2.45mM en agua: Para preparar 5mL pesar 3.31mg y diluir con agua hasta 5mL.
- Formación del catión (ABTS+): se produce por la reacción de la solución stock de ABTS con persulfato de potasio 2.45mM, una proporción 2:1; y dejando la mezcla en un lugar oscuro por al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Se prepara un día antes de realizar la prueba.

- Preparación de la solución de uso: La solución ABTS+ es diluida con etanol hasta lograr una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734nm y equilibrado a 30°C. Se emplea una dilución 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.
- c) Preparación de los tubos de reacción: Utilizar tubos de vidrio con capacidad de 10ml, de preferencia nuevos. En caso de no contar con tubos nuevos, emplear tubos que se hayan lavado correctamente, agregando agua desmineralizada después de su lavado para evitar que interfieran sustancias contenidas en el agua de chorro. Recubrir los tubos completamente con papel aluminio para proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar la vitamina C. Preparar una serie de tubos que contiene los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Control	Ensayo*
Solución de ABTS+	3mL	3mL
Dilución de cada muestra	----	30μL

*Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se prepara por triplicado. El blanco de la corrida es etanol al 95%. Tanto la solución de ABTS+ como la muestra deben haber estado en la incubadora a 37°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos.

- d) La lectura de la absorbancia se toma a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.
- e) Para calcular el porcentaje de inhibición de la concentración se emplea la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}) * 100}{\text{Absorbancia del control}}$$

- f) Luego graficar la concentración del extracto (eje X) vs. porcentaje de absorbancia (eje Y). Determinar la ecuación de la recta y el r^2 el cual se debe encontrar entre 0.97-0.99.
- g) Expresar la actividad antioxidante en términos de la concentración de inhibición al 50% (CI50), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50% de disminución de absorbancia de ABTS. Para ello se emplea la ecuación de la recta, quedando la fórmula de la siguiente manera:

$$CI50 = \frac{(50 - \text{pendiente})}{\text{intercepto}}$$

- h) La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto.

i) Los valores de TEAC se determinan como sigue:

$$\Delta A_{\text{trolox}} = (A_{T=0 \text{ Trolox}} - A_{T=6 \text{ Trolox}}) - \Delta A_{\text{solvent}}(0-6 \text{ min})$$

$$\Delta A_{\text{trolox}} = m \cdot [\text{Trolox}]$$

$$\text{TEAC}_{\text{extracto}} = (\Delta A_{\text{extracto}} / m) \cdot d$$

Donde ΔA = reducción de la absorbancia, A = absorbancia al tiempo dado, m = pendiente de la curva estándar, $[\text{Trolox}]$ = concentración de trolox, d = factor de dilución.

7.7. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizó un muestreo no probabilístico a conveniencia de las distintas especies vegetales: de *Piper amalago*, *Piper jacquemontianum* y *Piper retalhuleuense*.

7.7.1. Muestra:

Se trabajó con dos órganos de cada planta: hoja y raíz de 500g cada una. Se realizó un extracto de cada órgano de cada especie a investigar (6 extractos).

7.7.2. Análisis de resultados

Se realizó un estudio de tipo descriptivo.

Ensayos Cualitativos

A cada extracto se le realizaron pruebas cualitativas:

- Cromatografía en capa fina para la determinación de principios picantes (Wagner & Blatt, 1996).
- Cromatografía en capa fina para actividad antioxidante. (Re, 1999)

Ensayos Cuantitativos

Análisis de alcaloides y de piperina

Los extractos se sometieron a cuantificación espectrofotométrica de alcaloides totales y a la determinación de piperina por espectrofotometría; se realizaron tres réplicas de cada análisis.

Cuantificación de Actividad Antioxidante

Así mismo los extractos que demostraron actividad antioxidante en cromatografía en capa fina se analizaron mediante espectrofotometría ultravioleta-visible por el método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) y por el ensayo de decoloración de radical ABTS (ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).

Para cada método se elaboró una curva de regresión lineal con seis estándares de concentración conocida, leyendo cada concentración por triplicado. Se evaluó la linealidad por medio del coeficiente de determinación (r^2).

8. RESULTADOS

8.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

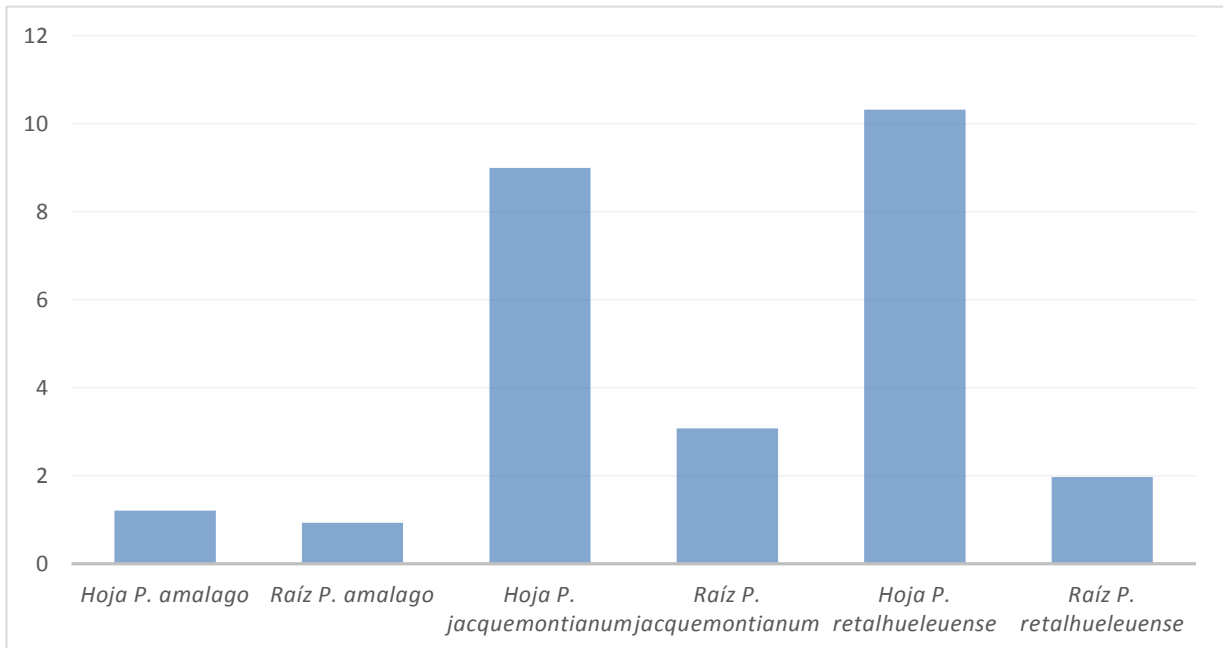
Únicamente dos de los extractos formaron cristales, los otros restantes fueron desecados para obtener una oleorresina o extracto seco rico en alcaloides. (Cuadro 8.2, Grafica 8.1)

CUADRO 8.1: Rendimiento de extracción.

Especie	Humedad del material vegetal (%)	Extracto seco (g)	Rendimiento de extracción (%)	Humedad de oleorresina (%)
Cristales hoja <i>P. amalago</i>	7.39	6.04	1.21	No aplica
Cristales raíz <i>P. amalago</i>	6.28	4.67	0.93	No aplica
Extracto hoja <i>P. jacquemontianum</i>	9.50	45.00	9.00	7.21
Extracto raíz <i>P. jacquemontianum</i>	6.28	15.38	3.08	5.47
Extracto hoja <i>P. retalhuleuense</i>	5.52	51.59	10.32	6.93
Extracto raíz <i>P. retalhuleuense</i>	6.37	9.85	1.97	3.65

Fuente: Datos Experimentales

GRAFICA 8.1 Rendimiento de extracción.



Fuente: Datos Experimentales

8.2. INVESTIGACIÓN DE ALCALOIDES

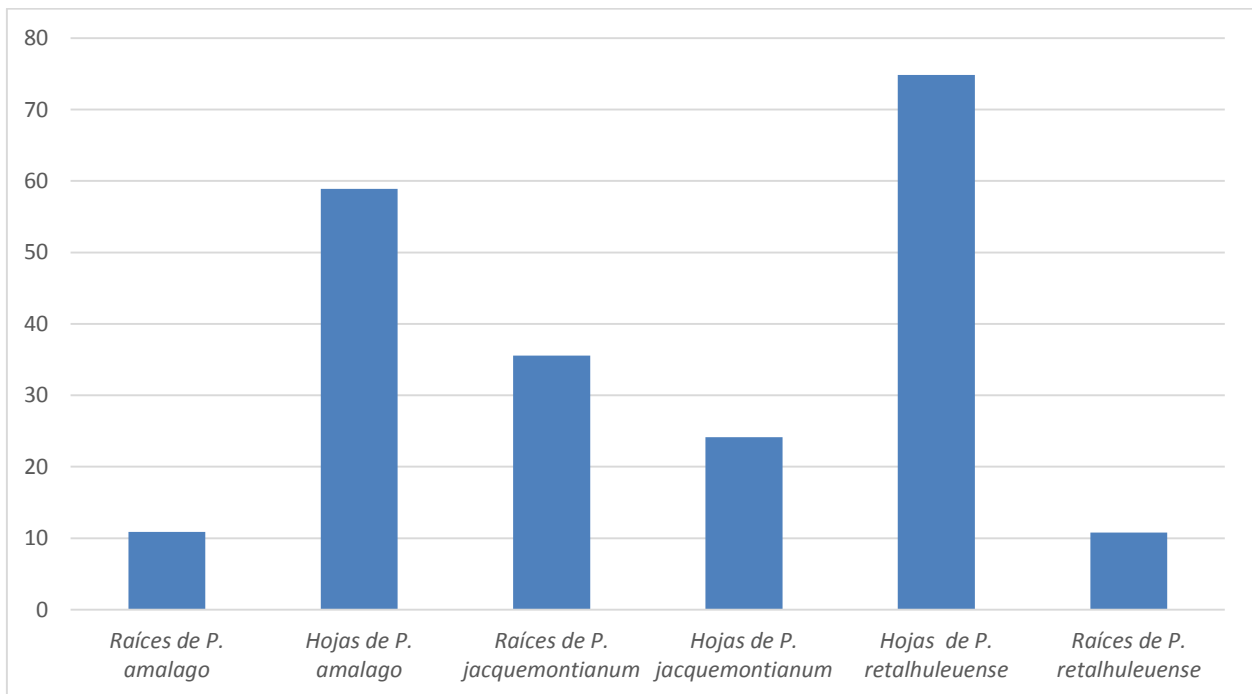
Se realizó la cuantificación de alcaloides totales precipitables con el reactivo de Dragendorff para medir la concentración de alcaloides en los extractos etanólicos obtenidos, el complejo formado se cuantificó a 435nm. (Ver tabla 8.3)

CUADRO 8.2 Porcentaje de alcaloides totales

Extracto	Porcentaje en Extracto \bar{x} (%)	Desviación Estándar
Raíces de <i>P. amalago</i>	10.88	0.31
Hojas de <i>P. amalago</i>	58.91	0.48
Raíces de <i>P. jacquemontianum</i>	35.55	0.72
Hojas de <i>P. jacquemontianum</i>	24.13	0.73
Hojas de <i>P. retalhuleuense</i>	74.83	0.31
Raíces de <i>P. retalhuleuense</i>	10.77	0.49

Fuente: Datos Experimentales, promedios de tres replicas.

GRAFICA 8.2 Porcentaje de alcaloides totales en extracto.



Fuente: Datos Experimentales

8.3. INVESTIGACIÓN DE PRINCIPIOS PICANTES

Ninguna de las muestras mostró coincidencia con el factor de retención del estándar de piperina.

CUADRO 8.3 Determinación de principios picantes por cromatografía en capa fina

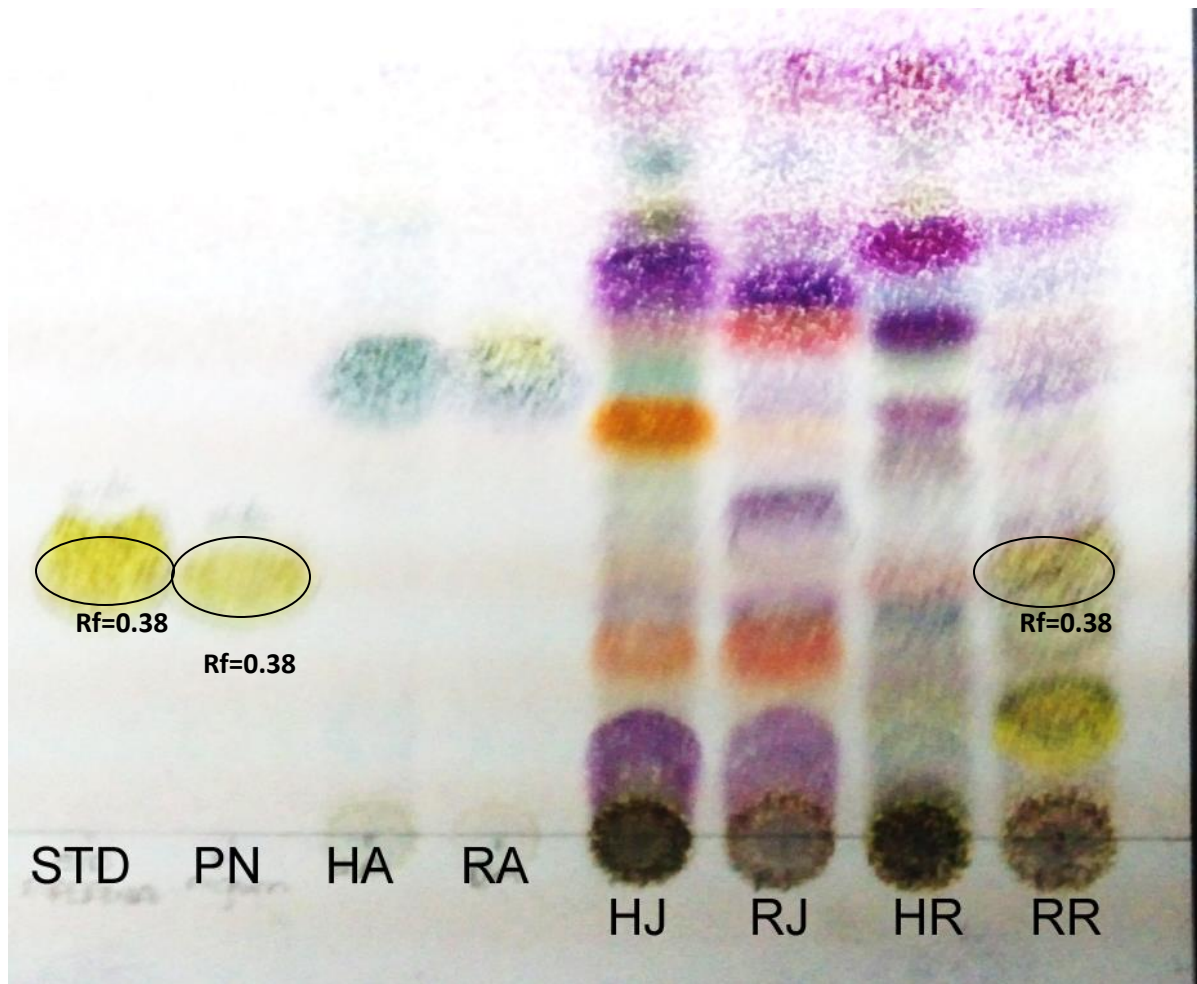
Especie	Banda	Color de la banda	Rf	Resultado
Hoja <i>P. amalago</i>	1	Café	0.70	Negativo
Raíz <i>P. amalago</i>	1	Verde	0.14	Negativo
	2	Café	0.52	Negativo
Hoja <i>P. jacquemontianum</i>	1	Amarillo	0.14	Negativo
	2	Café	0.52	Negativo
Raíz <i>P. jacquemontianum</i>	1	Amarillo	0.46	Negativo
Hoja <i>P. retalhuleuense</i>	1	Verde	0.70	Negativo
Raíz <i>P. retalhuleuense</i>	1	Amarillo	0.38	Negativo
	2	Café	0.34	Negativo
	3	Café	0.28	Negativo
Estándar piperina	1	Amarillo limón	0.38	Positivo
Piperina obtenida <i>P. nigrum</i>	1	Amarillo limón	0.38	Positivo

Fase móvil: Tolueno: Acetato de Etilo (70:30) Revelador: Vainillina – Ácido Sulfúrico (ver fotografía 1)

Interpretación: Una banda con Rf de aproximadamente 0.38 color amarillo limón indica la presencia principios picantes.

Fuente: Datos Experimentales

FOTOGRAFÍA 1: CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE CARACTERIZACIÓN DE PRINCIPIOS PICANTES.



Fase móvil: Tolueno-Acetato de Etilo 70:30

STD: Piperina

PN: Semilla *P. nigrum*

HA: hoja *P. amalago*

RA: raíz *P. amalago*

HJ: hoja *P. Jacquemontianum*

RJ: raíz *P. Jacquemontianum*

HR: hoja *P. retalhuleuense*

RR: raíz *P. retalhuleuense*

Comparación de los picos de absorbancia máximos de las muestras, estándares y reportados en la literatura. Se isomerizó deliberadamente una muestra de piperina sometiéndola a la luz solar para descartar posibles isomerizaciones en las muestras.

De las muestras analizadas únicamente el extracto de raíces de *P. retalhuleuense* mostró un pico de absorbancia que corresponde con el alcaloide piperetina, derivado de la piperina, las demás muestras no mostraron similitud con los estándares.

CUADRO 8.4 Características ópticas de las muestras.

Muestra	Máxima absorbancia (nm)	Longitud de onda máxima reportada en la literatura (nm)
Estándar de piperina	343	343
<i>Piper nigrum</i>	343	343
Raíces de <i>P. amalago</i>	293	-
Hojas de <i>P. amalago</i>	292	-
Raíces de <i>P. jacquemontianum</i>	233	-
Hojas de <i>P. jacquemontianum</i>	238	-
Raíces de <i>P. retalhuleuense</i>	264, 364	-
Hojas de <i>P. retalhuleuense</i>	269	-
Piperina foto-isomerizada	257, 329	-
Chavicina	-	318
Isopiperina	-	335
Isochavicina	-	329
Piperetina	-	364

Fuente: Datos Experimentales, (Hashimoto, y otros, 1996)

El extracto de las raíces de *P. retalhuleuense* fue el que presentó una mayor concentración de estos alcaloides (22.94 ± 0.00558).

CUADRO No. 8.5 Concentración de alcaloides piperínicos en material vegetal seco.

Órgano y Especie	Partes por millar de Alcaloides Piperínicos (\bar{x})	Desviación estándar
Raíces de <i>P. amalago</i>	12.38	0.00313
Hojas de <i>P. amalago</i>	3.52	0.08914
Raíces de <i>P. jacquemontianum</i>	2.32	0.00981
Hojas de <i>P. jacquemontianum</i>	22.49	0.00595
Raíces de <i>P. retalhuleuense</i>	22.94	0.00558
Hojas de <i>P. retalhuleuense</i>	9.77	0.03824

Fuente: Datos Experimentales. Promedio de tres lecturas

8.4. INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Mediante cromatografía en capa fina se observó que los cristales de hojas y raíces de *P. amalago*, no presentaron actividad antioxidante, mientras que los extractos de hojas y raíces de *P. jacquemontianum* y *P. retalhuleuense* mostraron una actividad entre media y alta.

La cuantificación se realizó por el método de 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), para moléculas polares, determinándose la concentración de inhibición al 50% (CI50) únicamente para los extractos que presentaron actividad antioxidante por el método cualitativo (Cuadro 8.9, Gráfica 2 y Anexo 13.7).

La cuantificación para moléculas apolares, se realizó por el método de 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), de la misma manera los extractos a evaluar fueron los que presentaron actividad antioxidante en el método cualitativo (Cuadro 8.10, Gráfica 3 y Anexo 13.8).

CUADRO 8.6 Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos.

Especie		Intensidad	Resultado
Cristales de alcaloides de hoja <i>P. amalago</i>		-	Negativo
Cristales de alcaloides de raíz <i>P. amalago</i>		-	Negativo
Extracto hoja <i>P. jacquemontianum</i>		+++	Positivo
Extracto raíz <i>P. jacquemontianum</i>		++	Positivo
Extracto hoja <i>P. retalhuleuense</i>		+++	Positivo
Extracto raíz <i>P. retalhuleuense</i>		++	Positivo
Estándar piperina		-	Negativo
Cristales de alcaloides de semilla de <i>P. nigrum</i>		-	Negativo
Estándares	Rutina	+++	Positivo
	Quercetina	+++	Positivo
	Vitamina C	+++	Positivo
	TBHQ	+++	Positivo
	Trolox	+++	Positivo

Niveles: +: actividad baja; ++: actividad media; +++: actividad alta; -: sin actividad

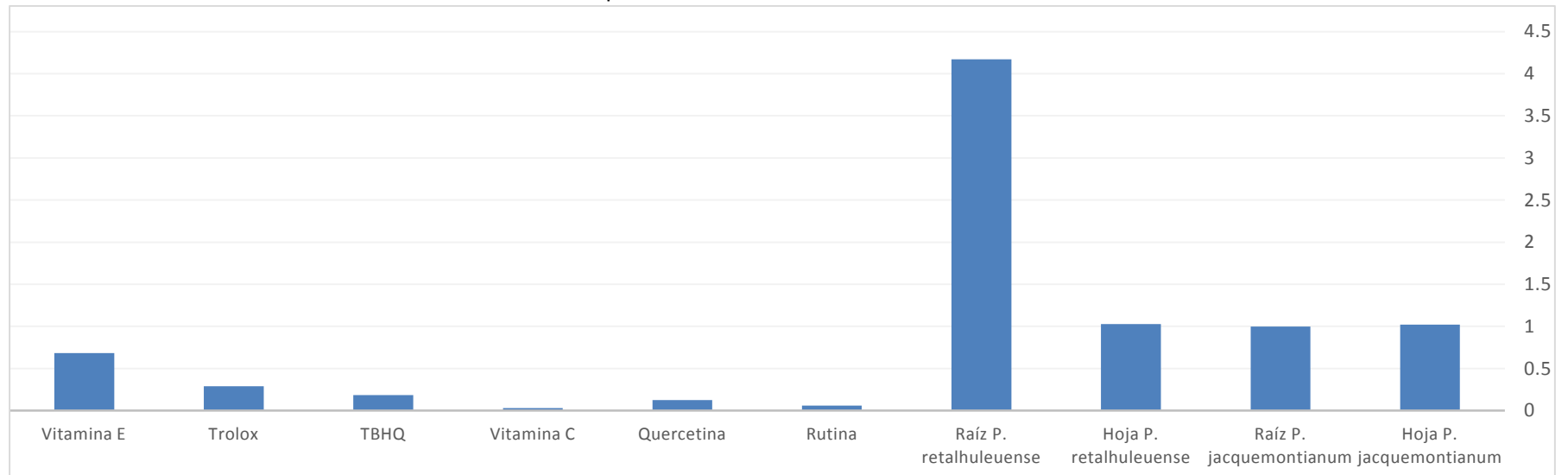
Fuente: Datos Experimentales

Fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial-agua (100:11:11:27) Revelador: reactivo de DPPH

CUADRO 8.7 En el siguiente cuadro se muestran los resultados de la actividad antioxidante por medio de reactivo de DPPH.

Especie		Peso (g)	Reconstitución (ml)	Dilución empleada	Inhibición (%) (\bar{X})	CI50 (mg/ml) (\bar{X})	Desviación Estándar
Hoja <i>P. jacquemontianum</i>		0.4009	20	1.2	60.40	1.0149	0.0055
Raíz <i>P. jacquemontianum</i>		0.3987	20	1.6	66.11	0.9915	0.0050
Hoja <i>P. retalhuleuense</i>		0.4082	20	1.2	59.67	1.025	0.0029
Raíz <i>P. retalhuleuense</i>		0.4065	20	5.6	64.44	4.1299	0.0422
Estándares	Rutina	0.1005	5	0.016	62.52	0.0588	0.0002
	Quercetina	0.0101	5	0.035	62.75	0.1255	0.0005
	Vitamina C	0.1002	5	0.008	65.43	0.0299	0.0005
	TBHQ	0.0101	5	0.08	61.45	0.1846	0.0013
	Trolox	0.0099	5	0.08	62.58	0.2872	0.0037
	Vitamina E	0.0101	5	0.18	65.32	0.6752	0.0076

Fuente: Datos Experimentales. Promedio de tres lecturas.

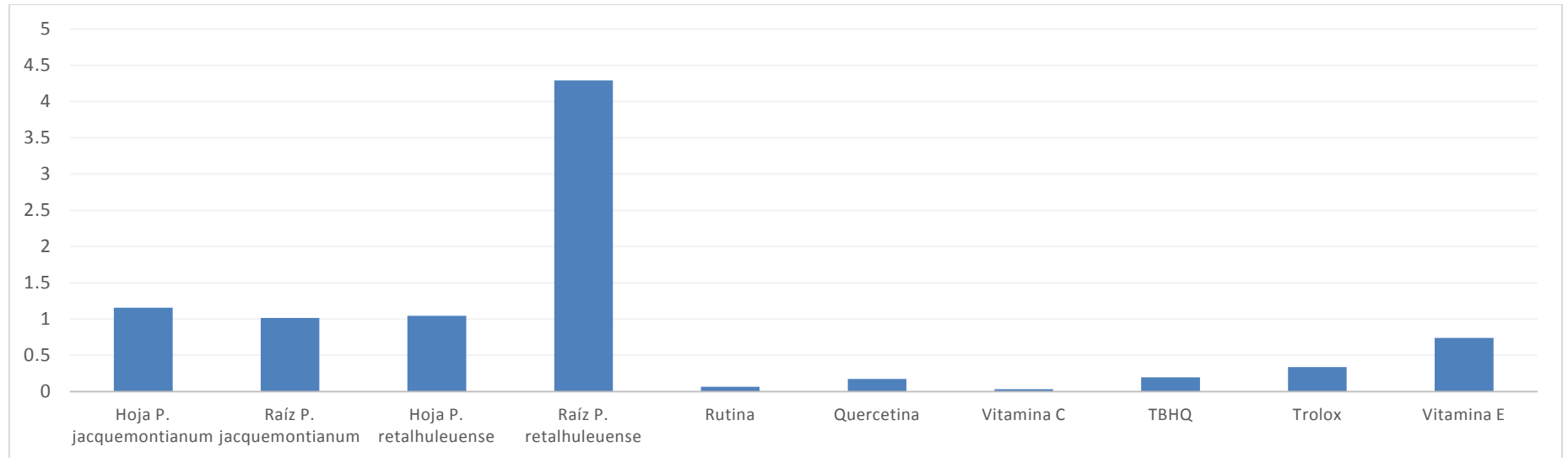
GRAFICA 8.3 CI50 de actividad antioxidante determinado por medio de DPPH

Fuente: Datos Experimentales

CUADRO 8.8 Actividad antioxidante por medio de reactivo de ABTS

Especie		Peso (g)	Reconstitucion (ml)	Dilución empleada	Inhibición (%) (\bar{x})	CI50 (mg/ml) (\bar{x})	Desviación Estándar	Equivalentes de trolox (mmol/g)
Hoja <i>P. jacquemontianum</i>		0.4009	20	0.07	60.61	1.1494	0.0055	2.00
Raíz <i>P. jacquemontianum</i>		0.3987	20	0.08	65.09	1.0897	0.0244	1.75
Hoja <i>P. retalhuleuense</i>		0.4104	20	0.105	60.51	1.6071	0.0207	1.54
Raíz <i>P. retalhuleuense</i>		0.4065	20	0.28	60.62	4.6456	0.1633	0.78
Estándares	Rutina	0.0402	20	0.4	68.72	0.5919	0.0868	-----
	Quercetina	0.0100	5	0.08	64.19	0.3286	0.0465	-----
	Vitamina C	0.1000	5	0.01	63.15	0.0408	0.00154	-----
	TBHQ	0.0100	5	0.12	68.71	0.4500	0.0105	-----
	Trolox	0.0101	5	0.06	64.99	0.1953	0.0493	-----
	Vitamina E	0.0210	10	0.22	64.64	0.2912	0.6303	-----

Fuente: Datos Experimentales. Promedio de tres lecturas.

GRAFICA 8.4 CI50 de actividad antioxidante determinado por medio de ABTS

Fuente: Datos Experimentales

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el informe del proyecto FODECYT 17-2009 se describe que las tres plantas incluidas en este estudio mostraron una concentración de piperina superior al extracto de *P. nigrum* mediante análisis espectrofotométrico, dados estos interesantes resultados se propuso la presente investigación para profundizar el estudio de las especies de *Piper amalago*, *Piper jacquemontianum* y *Piper retalhuleuense*, aislando sus alcaloides y determinando la concentración de piperina y derivados, esto con el fin de estimar el potencial de estas plantas como fuente de piperina, una molécula de amplio uso comercial.

De los extractos obtenidos únicamente se consiguió la recristalización de los extractos etanólicos de raíces y hojas de *P. amalago*. Los demás no formaron cristales debido a interferentes químicos que no permitieron el aislamiento de los alcaloides, por lo que los extractos de *P. jacquemontianum* y *P. retalhuleuense* se purificaron para obtener sus oleorresinas.

El rendimiento más alto para la formación de cristales de alcaloides se presentó en las hojas *P. amalago* (1.21%). Para los extractos purificados de alcaloides el rendimiento más alto se presentó en las hojas de *P. retalhuleuense* (10.32%), seguido de las hojas *P. jacquemontianum* (9.50%), puede notarse que el rendimiento de los extractos de hojas es superior al de las raíces, las hojas poseen pigmentos y otros compuestos que son extraídos juntamente con los alcaloides con etanol, dichos interferentes no están presentes en las raíces. (Ver cuadro 8.1 y anexo 13.3)

La mayor concentración de alcaloides totales se presentó en las hojas de *P. retalhuleuense* ($74.83 \pm 0.31\%$) seguido de las hojas de *P. amalago* ($58.91 \pm 0.48\%$), el extracto que contenía una menor concentración de alcaloides totales fue la raíz de *P. retalhuleuense* ($10.77 \pm 0.49\%$) junto con la raíz de *P. amalago* ($10.88 \pm 3.13\%$). (Ver cuadro 8.2). En la naturaleza no se observa una distribución específica de alcaloides en algún órgano de la planta, sino que dependiendo de la especie estos metabolitos se pueden encontrar en uno u otro órgano dependiendo de cada especie. En el presente estudio se puede concluir que hay mayor cantidad de alcaloides en las hojas.

En la caracterización de principios picantes por cromatografía en capa fina se observa que solamente una banda, la de raíces de *Piper retalhuleuense* coincide con la del estándar de piperina, es importante notar que posteriormente se identificó piperetina en este extracto; ambos alcaloides, la piperina y la piperetina tienen el mismo factor de retención (Wagner & Bladt, 1996), por lo que puede usarse el estándar de piperina para caracterizarlos (Ver cuadro 8.3 y fotografía).

A partir de sus características ópticas, se determinó que la mayoría de las muestras presentaban picos máximos de absorbancia en longitudes de onda que no corresponden a la piperina ni a sus isómeros, como se puede ver en el cuadro 8.4. Únicamente los cristales obtenidos de *P. nigrum* y el estándar de piperina presentan su pico máximo en 343nm que es el reportado en la literatura. El extracto de las raíces de *P. retalhuleuense* presentó su máxima absorbancia en 364nm, dicha longitud de onda pertenece al alcaloide piperetina.

La piperina foto-isomerizada cual dio como resultado dos picos de absorbancia (329nm y 257nm), inexistentes en el estándar; el pico de 329nm es reportado en la literatura como la absorbancia máxima de la isochavicina, es decir, el isómero geométrico 2E,4Z de la piperina. Este no fue observado en ninguna de las muestras por lo que se concluye que no hubo foto-isomerización que pudiera afectar a los resultados.

En la cuantificación de alcaloides derivados de la piperina se determinó que el órgano que posee una concentración mayor de alcaloides piperínicos son las raíces de *P. retalhuleuense* con 22.94 partes por millar.

En el ensayo cualitativo de actividad antioxidante por cromatografía en capa fina presentado en el cuadro 8.6 se observa que únicamente los extractos ricos en alcaloides presentaron actividad antioxidante; los cristales de hojas y raíces de *P. amalago* así como el estándar de piperina no presentaron ninguna actividad inhibitoria en esta prueba, ya que se trata de alcaloides purificados y estos, por lo general no poseen actividad antioxidante *in vitro*. Los cinco estándares utilizados: rutina, quercetina, vitamina C, TBHQ y trolox mostraron una intensa actividad antioxidante en esta prueba. (Ver anexo 13.4)

Los resultados del método cuantitativo por 2,2-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) se presentan en la cuadro 8.7 y en la gráfica 8.3, expresándose los resultados en CI50 (mg/ml) que indica la concentración que inhibe el 50% de los radicales que forman la oxidación, a menor CI50 mejor actividad antioxidante. El extracto que mostró una mayor actividad antioxidante es el de la raíz *P. jacquemontianum* (CI50=0.9915±0.0050), seguido por el extracto de hoja *P. jacquemontianum* (CI50=1.0149±0.0055), y el que de menor actividad fue el de la raíz *P. retalhuleuense* (CI50=4.1299±0.0422). Este método se aplica para la detección de moléculas con actividad antioxidante de tipo polar.

Al analizar los resultados obtenidos por el segundo método cuantitativo para actividad antioxidante, el del 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), presentados en la cuadro 8.8 y gráfica 8.4, se puede observar que la cantidad de extracto necesario para inhibir el 50% del catión es cuatro veces superior en la raíz *P. retalhuleuense* (CI50=4.6456±0.1633) que en la raíz *P. jacquemontianum* (1.0897±0.0244). Por lo que se concluye que la mejor actividad antioxidante la ostenta la raíz *P. jacquemontianum*.

Se observa una diferencia entre los resultados de actividad antioxidante por DPPH y ABTS, debido a que DPPH es más sensible a metabolitos polares y ABTS a compuestos apolares, la realización de las dos pruebas permite un análisis selectivo de metabolitos.

Al comparar los resultados de los extractos con los estándares de referencia (trolox, TBHQ, rutina, quercetina, vitamina E, y vitamina C) se encuentra que los estándares presentan una actividad antioxidante muy superior a los extractos analizados. Esto se debe a que estos son ricos en alcaloides y no presentan actividad antioxidante y la poca actividad que presentan se pueden deber a metabolitos como flavonoides.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. Por medio de la cromatografía para la caracterización de principios picantes se determinó que únicamente el extracto etanólico de las raíces de *P. retalhuleuense* contenía piperina o alguno de sus derivados.
- 10.2. De los tres extractos etanólicos obtenidos de las especies de *Piper* evaluadas por sus características ópticas en espectrofotometría ultravioleta-visible, únicamente en las raíces *P. retalhuleuense* se pudo identificar un alcaloide derivado de la piperina, la piperetina.
- 10.3. Se determinó que el mejor método de extracción de alcaloides tipo piperina fue la maceración con etanol al 95%, seguido de concentración en evaporador rotatorio y recristalización inducida con éter etílico.
- 10.4. La mayor concentración de alcaloides se encontró en las hojas de *P. retalhuleuense*, seguido de las hojas de *P. amalago*, el extracto que contenía una menor concentración de alcaloides fue la raíz de *P. retalhuleuense* junto con la raíz de *P. amalago*.
- 10.5. El órgano que presentó una concentración mayor de alcaloides piperínicos fueron las raíces de *P. retalhuleuense* con 22.94 partes por millar.
- 10.6. En la raíz y hojas de las especies *P. Jacquemontianum* y *P. retalhuleuense* se observó actividad antioxidante en la cromatografía de capa fina, en *P. amalago* no se observó esta actividad.
- 10.7. El extracto etanólico que mostró una mayor actividad antioxidante por el método de DPPH, fue la raíz *P. Jacquemontianum*, seguido por el extracto de hoja *P. Jacquemontianum*, hoja *P. retalhuleuense* y el que presentó la menor actividad fue el de la raíz *P. retalhuleuense*.
- 10.8. Las hojas de *P. Jacquemontianum* presentaron la mayor actividad antioxidante por el método de ABTS.
- 10.9. Se observa una diferencia entre los resultados de actividad antioxidante por DPPH y ABTS, debido a que DPPH es más sensible a metabolitos polares y ABTS a compuestos apolares, la realización de las dos pruebas permite un análisis selectivo de metabolitos.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Evaluar otros tipos de métodos de purificación y extracción en los extractos que permitan el aislamiento y elucidación de los constituyentes presentes en las especies.
- 11.2. Continuar con el estudio de otras especies de *Piper* para la detección de piperina y derivados de interés.
- 11.3. Evaluar la actividad antioxidante por otros métodos y proponer un posible uso de los extractos.

12. REFERENCIAS

- Ahmad, N. e. (2012). Biological role of Piper nigrum L. (Black pepper): A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 10.
- Arango, G. J. (Noviembre de 2002). *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Recuperado el 24 de Noviembre de 2012, de Universidad de Antioquia: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides2001.pdf>
- Cacéres, A. (2009). *Caracterización de la Actividad Antioxidante de Extractos de Especies Nativas del Género Piper y Cuantificación de Metabolitos Secundarios con Potencial de Desarrollo*. Guatemala: CONCYT-USAC.
- Climent, M. (2005). *Experimentación en química*. España: Universidad Politécnica Valencia.
- Córdova, D., & Menéndez, C. (2009). *Determinación y Cuantificación de la actividad antioxidante de especies nativas y su posible fuente para el desarrollo de nutricoséuticos*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Duke, J. (1998). *La Farmacia natural*. Estados Unidos: Prevention Health.
- Eliel, E. L., & Wilen, S. H. (1994). *Stereochemistry of Organic Compounds*. Wiley.
- Epstein, W. W., Netz, D. F., & Seidel, J. L. (1993). Isolation of Piperine from Black Pepper. *Journal of Chemical Education*, 70(7), 598-599.
- Gennaro, A. (2003). *Remington:Farmacia*. México: Médica Panamericana.
- Griffin, R. (1991). *Química Orgánica Moderna*. España: Editorial Reverté .
- Gudiel, L. (2009). *Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de Polypodium triseriale SW. (calahuala)*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Gülcin, I. (2005). The Antioxidant Scavenging Activities of Black Pepper (Piper nigrum) Seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 7(56), 491-499.
- Gurdip, S., Marimuthu, P., Catalan, C., & deLampasona, M. P. (2004). Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*(84), 1878-1884.
- Hashimoto, K., Yaoi, T., Koshiba, H., Yoshida, T., Maoka, T., Fujiwara, Y., . . . Mori, K. (1996). Photochemical Isomerization of Piperine, a Pungent Constituent in Pepper. *Food Science and Technology International*, 2(1), 24-29.

- Hussain, K., Ismail, Z., Sadikun, A., & Ibrahim, P. (2009). Proximate and Qualitative Analysis of Different parts of *Piper sarmentosum* and Quantification of Total Amides in Various Extracts. *Pharmacognosy Research*, 1, 113-119.
- Jansz, E. R., Pathirann, I. C., & Packiyasoathy, E. V. (1983). Determination of Piperine in Pepper. *Journal of National Science Council*, 1(11), 129-138.
- Klages, F. (1968). *Tratado de química orgánica*. España: Reverte.
- Kormos, C. M., & Fair, J. D. (21 de Noviembre de 2008). Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. (ELSEVIER, Ed.) *Journal of Chromatography A*, 1211(1), 49-54.
- Lambert, J. B. (1998). *Organic Structural Spectroscopy*. Prentice Hall.
- Marcano, D. &. (2002). *Fitoquímica Organica*. Venezuela: Torino.
- Parmar, V. S., Jain, S. C., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., . . . Wengel, J. (1998). Polyphenols and Alkaloids from Piper Species. *Phytochemistry-Elsevier*, 49(4), 1069-1078.
- Re, R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*(26), 1231-1237.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (Abril de 2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Sreevidya, N., & Mehorotra, S. (2003). Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's Reagent in Plant Materials. *Journal OFAOAC International*, 1124-1127.
- Suresh, D., Manjunatha, H., & Srinivasan, K. (2007). Effect of heat processing of spices on the concentrations of their bioactive principles: Turmeric (*Curcuma longa*), red pepper (*Capsicum annuum*) and black pepper (*Piper nigrum*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 346-351.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. Berlin: Springer Verlag.
- Wood, A. B., Maureen, L., & James, D. J. (1988). Piperine Determination in Pepper (*Piper nigrum* L.) and its Oleoresins. *Flavour and Fragrance Journal*, 1, 55-64.
- Zachariah, T. J., Safeer, A. L., Jayarajan, K., Leela, N. K., Vipin, T. M., Saji, K. V., . . . Mammooty, K. P. (2010). Correlation of metabolites in the leaf and berries of selected black pepper varieties. *Scientia Horticulturae*, 418-422.

13. ANEXOS

13.1. MATERIAL VEGETAL COLECTADO

Hoja *P. amalago*Raíz *P. amalago*Hoja *P. jacquemontianum*Raíz *P. jacquemontianum*Hoja *P. retalhuleuense*Raíz *P. retalhuleuense*

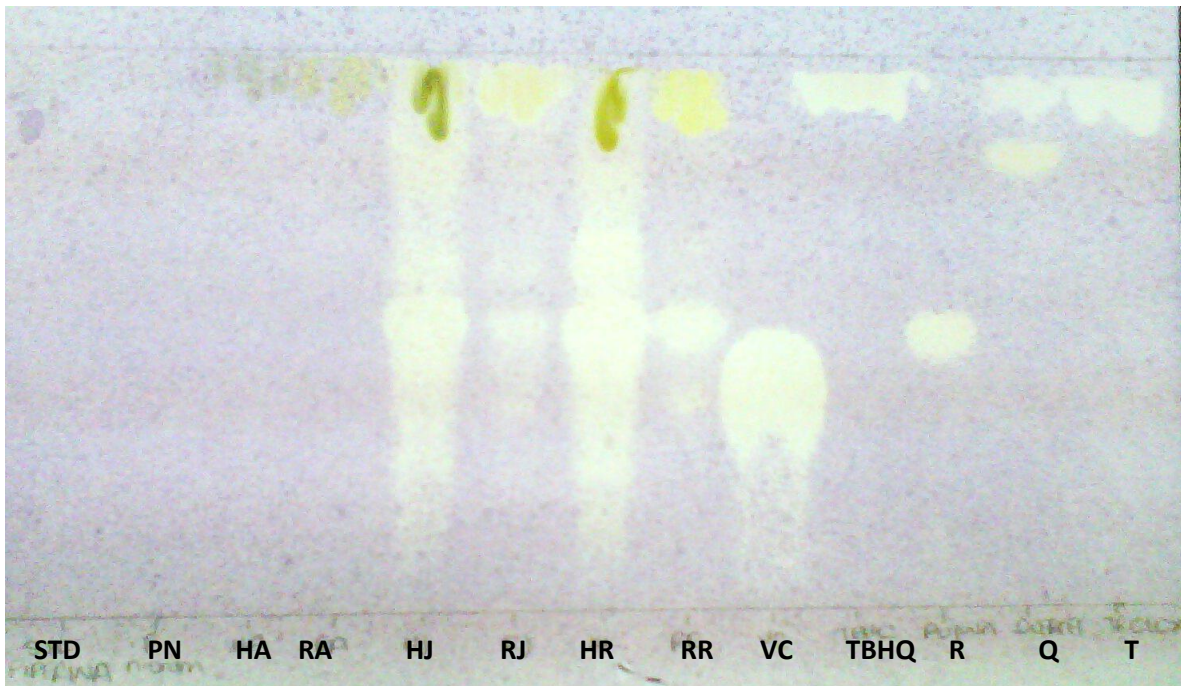
13.2. CRISTALES DE ALCALOIDES OBTENIDOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO



Raíz *P. amalago*

Hoja *P. amalago*

13.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE



Fase móvil: Acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:26)

Revelador: DPPH

Interpretación: Decoloración en la cromatopla indica la presencia de actividad antioxidante en las muestras.

STD: Piperina

PN: Semilla *P. nigrum*

HA: hoja *P. amalago*

RA: raíz *P. amalago*

HJ: hoja *P. jacquemontianum*

RJ: raíz *P. jacquemontianum*

HR: hoja *P. retalhuleuense*

RR: raíz *P. retalhuleuense*

VC: Vitamina C

TBHQ

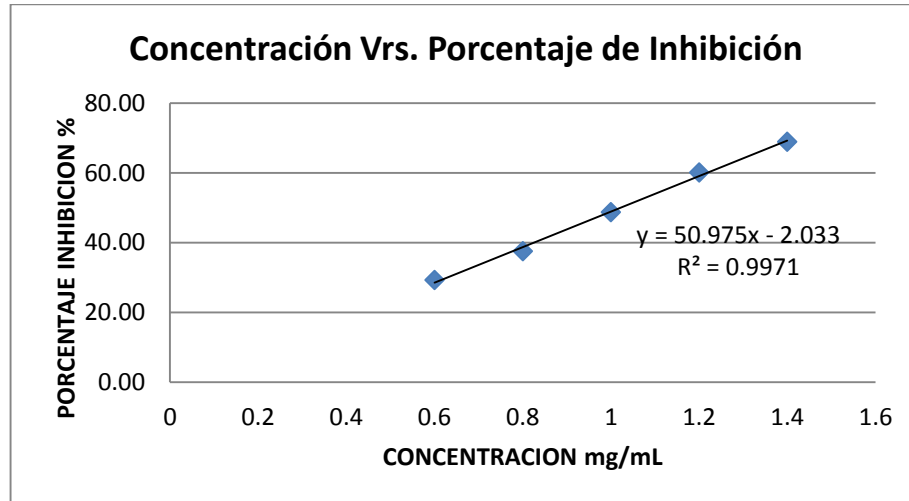
R: Rutina

Q: Quercetina

T: Trolox

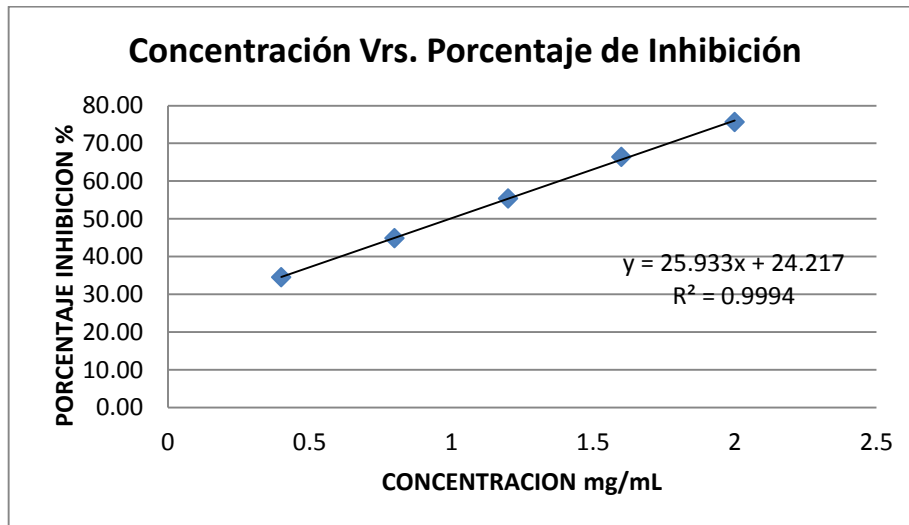
13.4. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ESTÁNDARES, USADAS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH

13.4.1. Extracto etanólico de hoja *P. jacquemontianum*

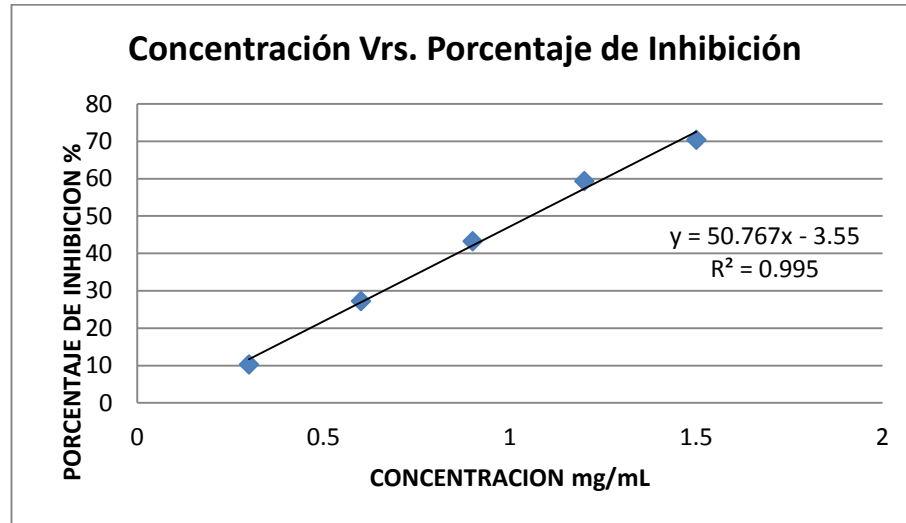


Fuente: datos experimentales

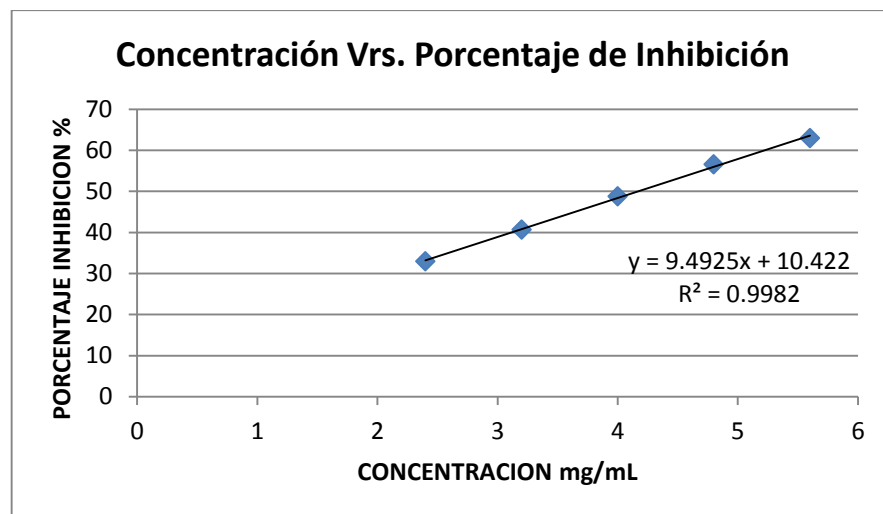
13.4.2. Extracto etanólico de raíz *P. jacquemontianum*



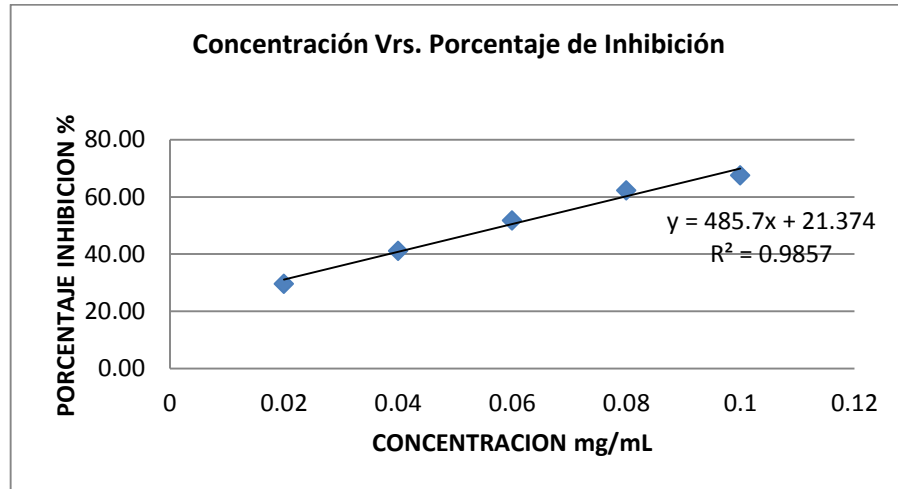
Fuente: datos experimentales

13.4.3. Extracto etanólico de hoja *P. retalhuleuense*

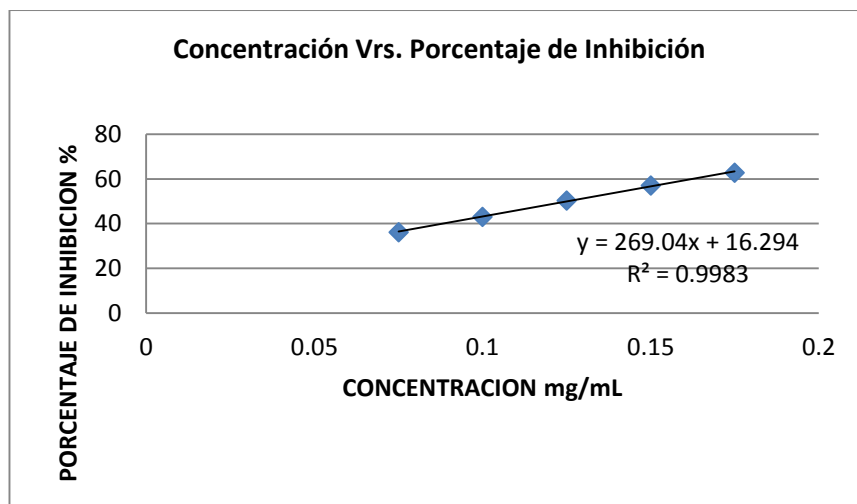
Fuente: datos experimentales

13.4.4. Extracto etanólico de raíz *P. retalhuleuense*

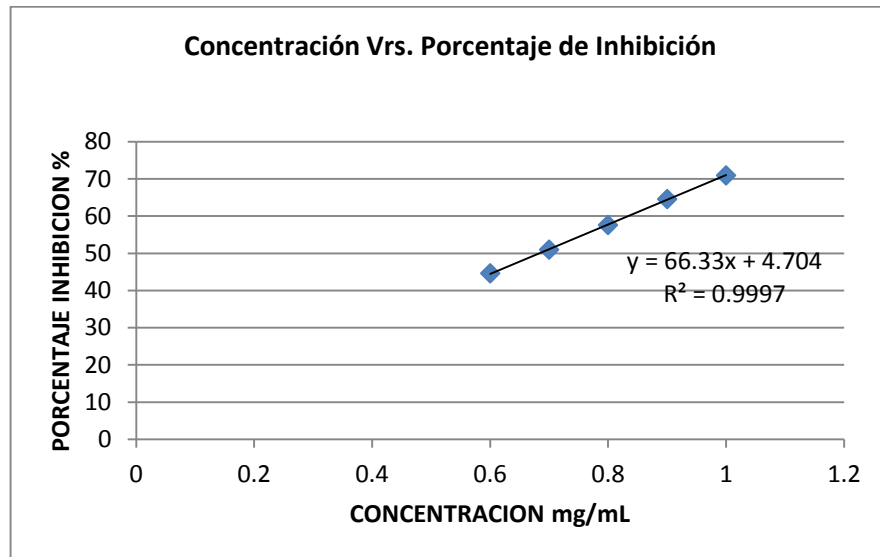
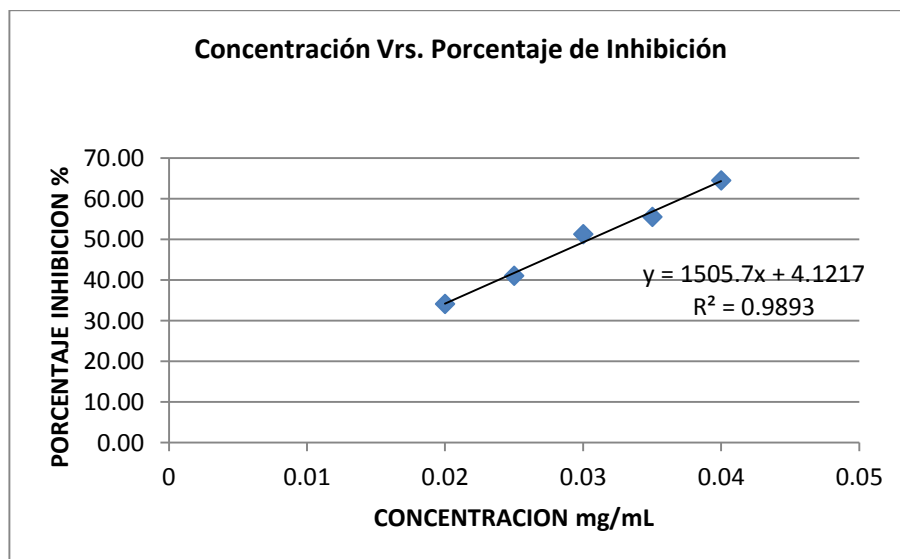
Fuente: datos experimentales

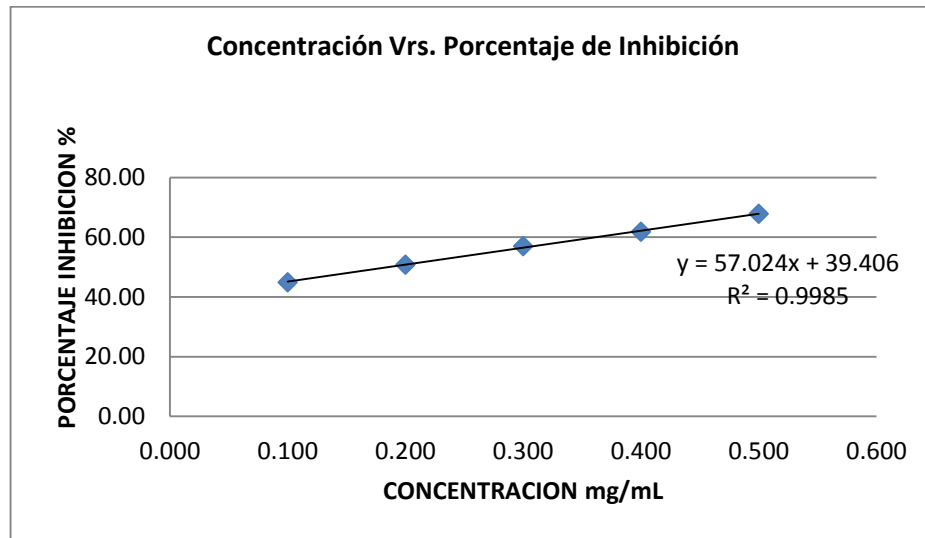
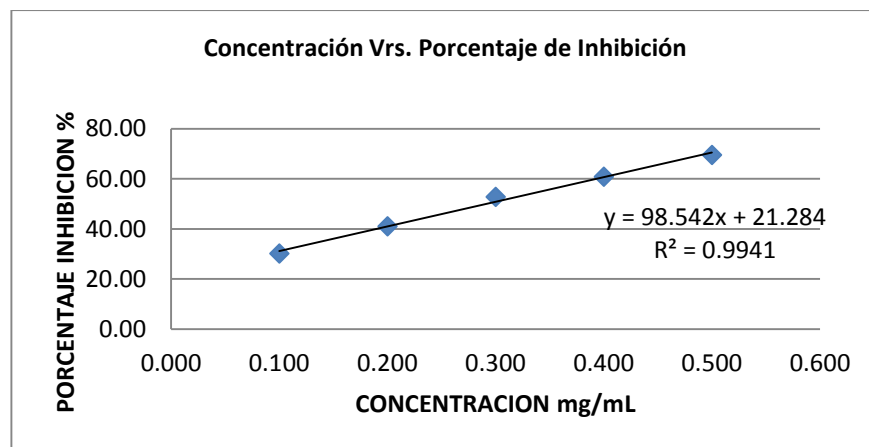
13.4.5. Rutina

Fuente: datos experimentales

13.4.6. Quercetina

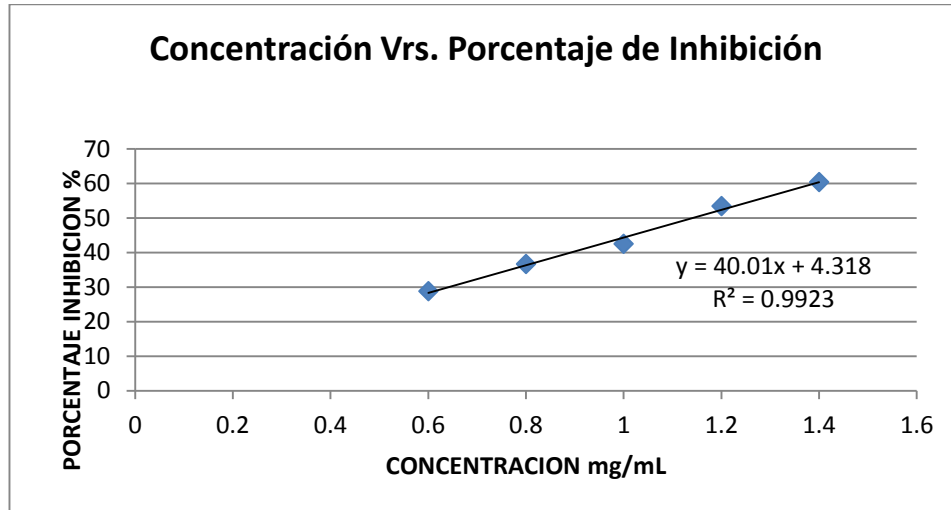
Fuente: datos experimentales

13.4.7. Vitamina E**13.4.8. Vitamina C**

13.4.9. Terbutil-hidroxiquinona (TBHQ)**13.4.10. Trolox**

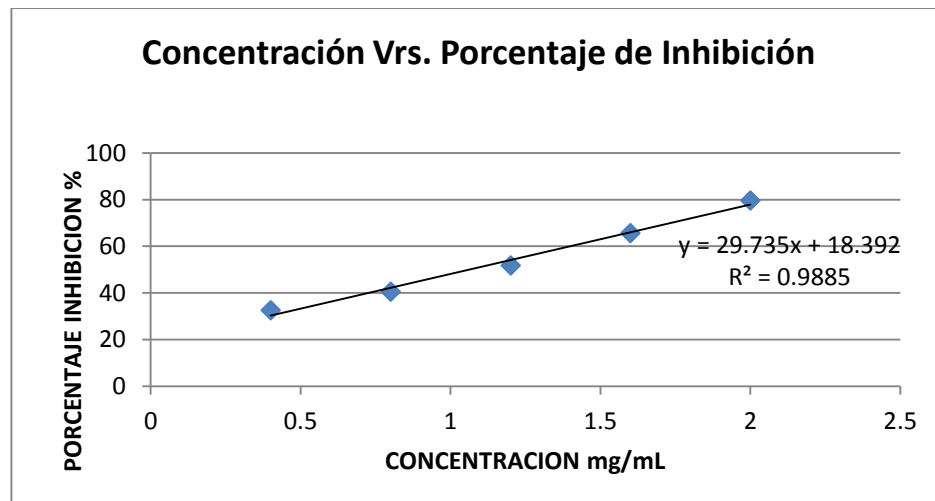
13.5. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LAS MUESTRAS Y ESTÁNDARES, USADAS EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE ABTS

13.5.1. Extracto etanólico de hoja *P. jacquemontianum*

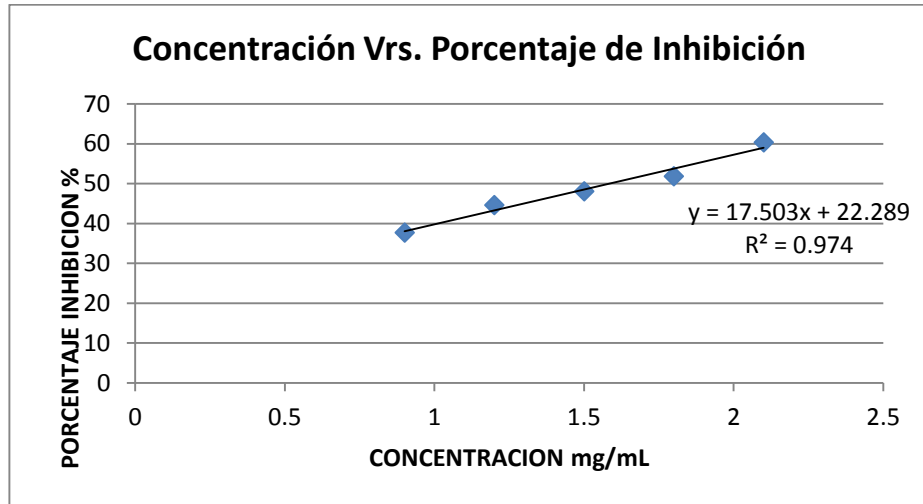
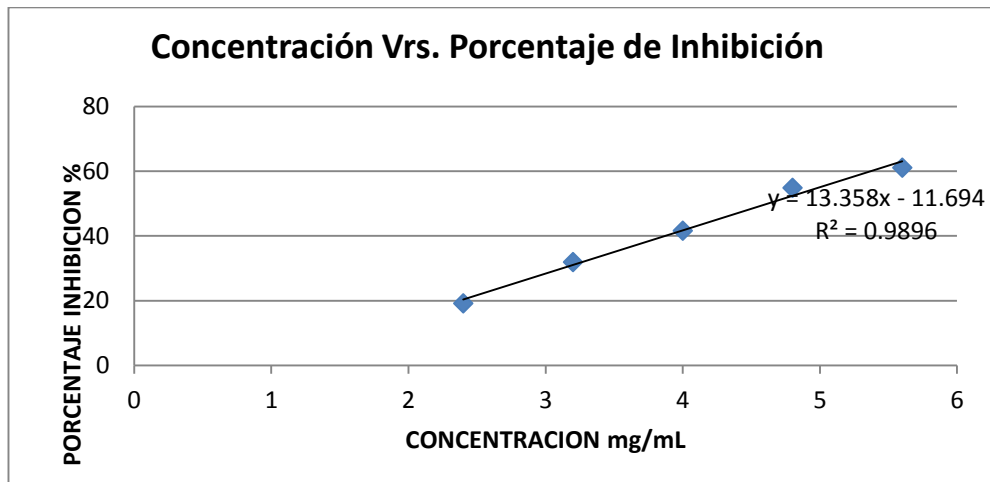


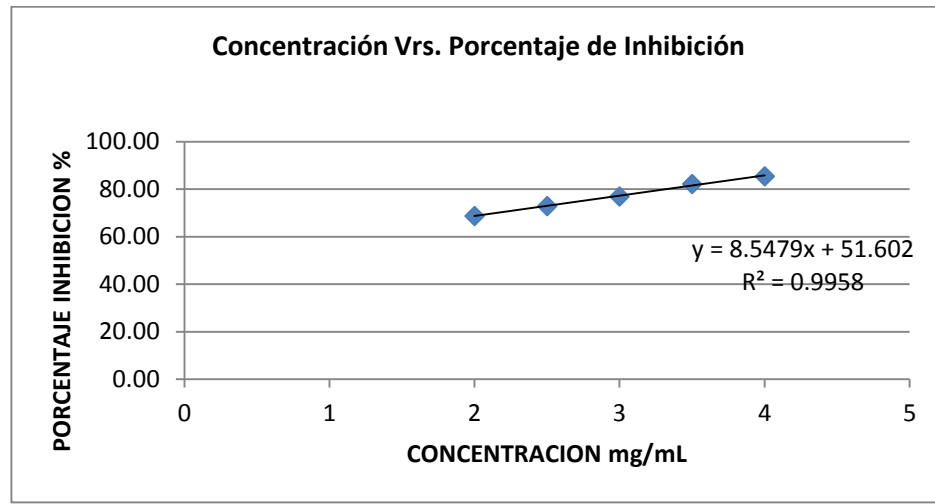
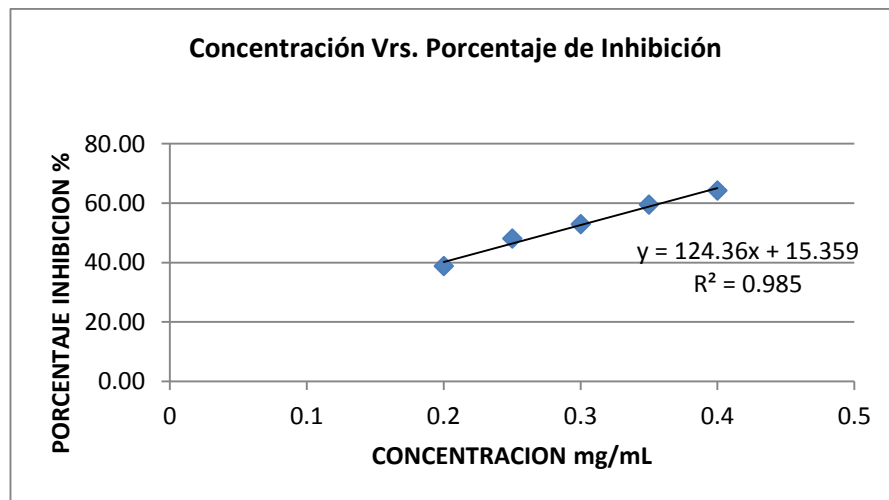
Fuente: datos experimentales

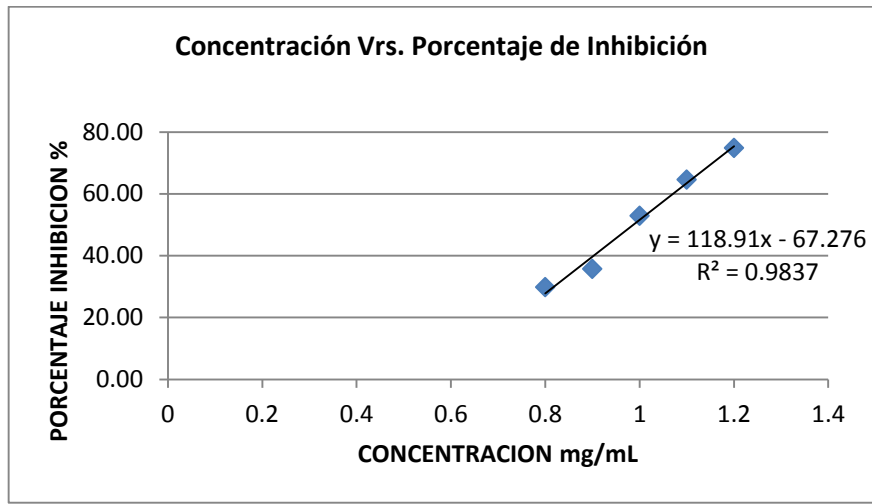
13.5.2. Extracto etanólico de raíz *P. jacquemontianum*



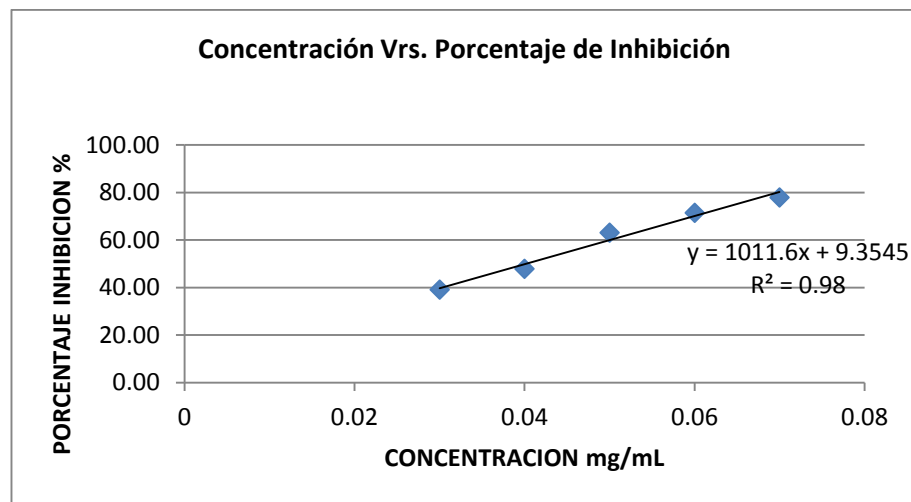
Fuente: datos experimentales

13.5.3. Extracto etanólico de hoja *P. retalhuleuense***13.5.4. Extracto etanólico de raíz *P. retalhuleuense***

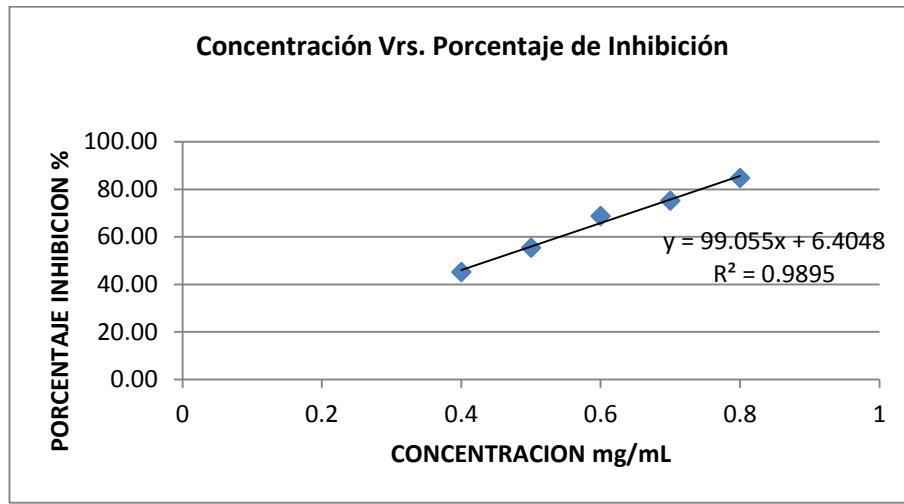
13.5.5. Rutina**13.5.6. Quercetina**

13.5.7. Vitamina E

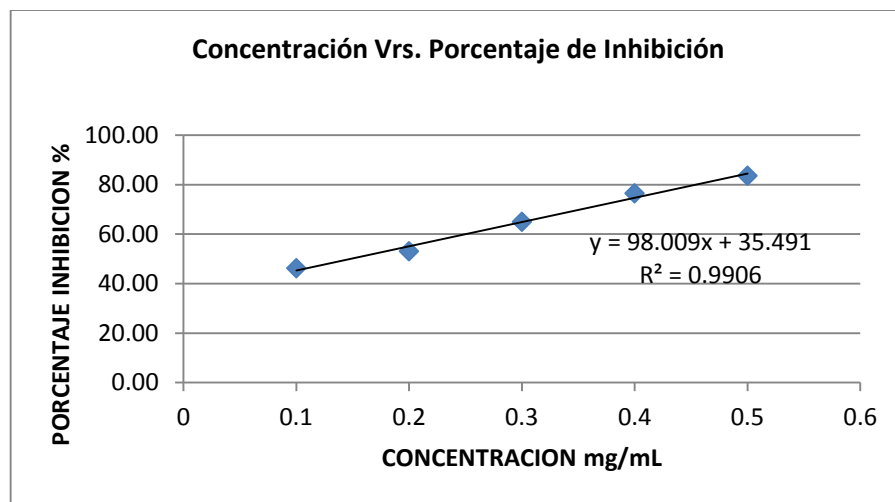
Fuente: datos experimentales

13.5.8. Vitamina C

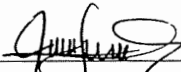
Fuente: datos experimentales

13.5.9. Terbutil-hidroxiquinona (TBHQ)

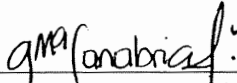
Fuente: datos experimentales

13.5.10. Trolox

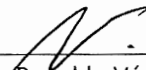
Fuente: datos experimentales



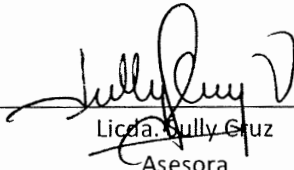
Jessica Esmeralda Morales
Estudiante



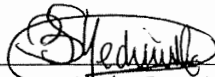
Gloria María Sanabria
Estudiante



Allan Ronaldo Vásquez
Estudiante



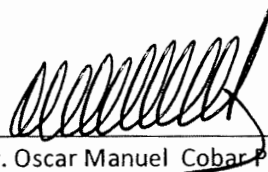
Licda. Gully Cruz
Asesora



Licda. Beatriz Medinilla
Revisora



Licda. Lucrecia Martínez de Haase
Directora



Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto
Decano