

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA

**“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD
ANTIBIÓTICA DE LA PIPERINA OBTENIDA DEL
PIPER NIGRUM FRENTE AL STAPHYLOCOCCUS
AUREUS, PARA LA ELABORACIÓN DE UNA CREMA
DE USO TÓPICO CONTRA EL IMPÉTIGO”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA
EN FARMACIA**

CHANTAL SOLANO HIDALGO

Tutor:

Dr. Edgar Hernández Mora.

San José, Costa Rica.

CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	21
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	22
Objetivos.....	22
Objetivo general.....	22
Justificación	24
Antecedentes.....	27
Internacionales	27
Nacionales.....	31
Proyecciones.....	34
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	35
Piper nigrum	35
Hábitat.....	35
Clasificación	36
Descripción de la planta.....	36
Usos.....	38
Piperina.....	42
Métodos de destilación	43
Soxhlet	44
Método de extracción.....	46
Maceración.....	46
Métodos de identificación	47
Cromatografía por capa fina	47
Espectroscopia	49

Infecciones.....	56
Impétigo.....	57
Staphylococcus aureus.....	58
Antibióticos	61
Prueba de sensibilidad a antibióticos (PSA)	63
Emulsiones.....	65
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	67
Enfoque.....	67
Diseño.....	67
Instrumentos	68
Equipo y materiales para la destilación de pimienta negra con equipo Soxhlet.....	70
Capítulo IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS	84
Obtención de piperina por el método de maceración.....	84
Obtención de piperina por el método de Soxhlet.....	88
Prueba de identificación de alcaloides.....	91
Prueba de identificación con Cromatografía por capa fina.....	92
Identificación de la piperina obtenida de la pimienta negra mediante espectroscopia infrarroja.....	94
Método para la determinación cuantitativa de piperina en el extracto de pimienta negra por espectroscopia ultravioleta.....	100
Evaluación de la capacidad inhibitoria de la piperina obtenida del piper nigrum mediante un antibiograma o prueba de sensibilidad a antibióticos (PSA).....	107
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	111
Referencias	116

Figuras	Página
Figura 1. Componentes volátiles y aromáticos en el Piper Nigrum.....	38
Figura 2. Estructura de la pimienta y sus isómeros.....	40
Figura 3. Usos tradicionales y modernos de la pimienta negra.....	41
Figura 12. Estructura molecular de la piperina.	43
Figura 4. Equipo Soxhlet.....	45
Figura 5. Razón de frentes.....	47
Figura 6. Cromatografía ascendente en capa fina.	48
Figura 7. Bandas de absorción de algunos grupos funcionales.	50
Figura 8. Espectro IR de la Acetofenona.	51
Figura 9. Vibraciones moleculares causadas por radiación infrarroja.	52
Figura 10. Ecuación de absorbancia.....	53
Figura 11. Espectro ultravioleta del tolueno en hexano.	53
Figura 13. Capas de la piel y estructuras en ella.	54
Figura 15. Impétigo en fosa nasal y área superior del labio.....	58
Figura 16. Staphylococcus aureus, tinción de gram.....	60
Figura 17. Staphylococcus aureus: cultivo en Agar sangre.	60
Figura 18. Antibiograma por difusión con discos en el que se observa presencia de halos de inhibición.....	64
Figura 14. Permeabilidad y absorción percutánea de los fármacos.	66
Figura 19. Mortero con pimienta negra.....	69
Figura 20. Pimienta negra en maceración con etanol absoluto.	69
Figura 21. Filtración con embudo de espiga.	70
Figura 22. Equipo de extracción Soxhlet.	72
Figura 23. Extracto con KOH y agua.	72
Figura 24. Cámara ultravioleta y material para la cromatografía por capa fina.....	74
Figura 25. Vial con estándar de piperina.....	76
Figura 26. Balanza analítica con 40mg de estándar de piperina.	76
Figura 27. Espectrofotómetro UV, con soluciones patrón.	77
Figura 28. Equipo ultrasónico.	78

Figura 29. Equipo de lectura de espectroscopia IR.....	79
Figura 30. Medio de cultivo Mueller-Hinton y la sepa Staphylococcus aureus.	80
Figura 31. Placas con una pipeta de 5microlitros.....	80
Figura 32. Reactivos pesados en beakers de manera separada.	82
Figura 33. Fase I y II para la elaboración de la crema.	83
Figura 34. Piperina obtenida por el método de maceración.....	86
Figura 35. Cálculos de porcentajes de rendimiento de piperina obtenida por método de maceración.	87
Figura 36. Cálculos de porcentajes de rendimiento de la piperina obtenida por método de Soxhlet.	90
Figura 37. Prueba positiva para la identificación de alcaloides en pimienta negra.	91
Figura 38. Cromatografía por capa fina por método de Soxhlet.....	92
Figura 39. Cromatografía por capa por método de maceración.....	92
Figura 40. Cálculo de la relación de frentes de las muestras.	93
Figura 41. Estructura 3D de piperina.	94
Figura 42. Espectro infrarrojo obtenido del estándar de piperina.	94
Figura 43. Espectro infrarrojo de la piperina obtenida por el método de Soxhlet.	95
Figura 44. Espectro infrarrojo de la piperina obtenida por método de maceración.....	95
Figura 45. Curva de calibración de la piperina determinada por espectroscopia ultravioleta a una longitud de onda de 270nm.	100
Figura 46. Cálculos para la cuantificación de la piperina por espectroscopia.	101
Figura 47. Cálculo de la concentración de las muestras diluidas de piperina obtenida por método de maceración.....	103
Figura 48. Cálculo del porcentaje masa/masa de piperina obtenida por método de maceración.	104
Figura 49. Calculo de la concentración de las muestras diluidas de piperina obtenida por método de Soxhlet.....	105
Figura 50. Cálculo del porcentaje masa/masa de piperina obtenida por método de Soxhlet.....	106
Figura 51. Halos de inhibición obtenidos en un medio de cultivo Mueller-Hinton con las diluciones de piperina.....	108

Figura 52. Halos de inhibición obtenidos en un medio de cultivo Mueller-Hinton con la crema realizada al 2%.109

Tablas	Página
Tabla 1. Partes que constituyen a la pimienta negra.	37
Tabla 2. Proceso de extracción por maceración.	84
Tabla 3. Resumen de las características organolépticas del extracto obtenido por método de maceración.	85
Tabla 4. Resumen de los extractos obtenidos por el método de maceración,	86
Tabla 5. Resumen de porcentajes de rendimiento de la piperina obtenida por método de maceración.	87
Tabla 6. Proceso de extracción con equipo Soxhlet.	88
Tabla 7. Resumen de los extractos obtenidos por el método Soxhlet.	89
Tabla 8. Resumen de porcentajes de rendimiento de la piperina obtenida por el método de Soxhlet.	90
Tabla 9. Resumen de los cálculos Rf.	93
Tabla 10. Señales obtenidas en los espectros infrarrojos del estándar de piperina y la piperina obtenida por los métodos elegidos.	96
Tabla 11. Coeficiente de correlación, pendiente e intersección de la curva de calibración de la piperina obtenida por espectroscopia ultravioleta a 270nm.	100
Tabla 12. Concentración de los patrones de referencia, junto con sus absorbancias.	101
Tabla 13. Concentración y absorbancias de las muestras de piperina obtenidas por método de maceración.	102
Tabla 14. Concentración y porcentaje masa/masa de las muestras de piperina obtenida por el método de maceración.	103
Tabla 15. Concentración y absorbancia de las muestras de piperina obtenida por método de Soxhlet.	105
Tabla 16. Concentración y porcentaje masa/masa de las muestras de piperina obtenida por el método de Soxhlet.	106
Tabla 17. Medida de los halos de inhibición obtenidos en medio de cultivo Mueller-Hinton con cada dilución de pimienta negra.	108
Tabla 18. Medida de los halos de inhibición formados con la crema elaborada y el control positivo.	109

Resumen

La pimienta negra (*Piper nigrum*) es popular en la industria alimentaria como especie para condimentar los alimentos pero de igual manera se ha utilizado como inhibidor de crecimiento de microorganismos no deseados en los alimentos, pero los estudios sobre el efecto antibacteriano de esta planta son reducidos, por lo tanto, en este proyecto se determinó el efecto inhibitorio del alcaloide mayoritaria de esta siendo la piperina, la cual fue obtenida por el método de Soxhlet y por maceración con etanol, el cual se alcalinizó y por último se recrystalizó. Se realizaron pruebas como la cromatografía por capa fina, prueba de dragendorff, espectroscopia IR y UV. Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron placas con agar Mueller-Hinton y cultivo de la sepa de *Staphylococcus aureus*, en las que se obtuvo 20mm como halo máximo de inhibición para las diluciones realizadas y 23mm para la crema elaborada al 2% de piperina.

Abstract

Black pepper (*Piper nigrum*) is popular in the food industry as a species to flavor food but has also been used as an inhibitor of growth of unwanted microorganisms in food, but studies on the antibacterial effect of this plant are small. , therefore in this project was determined the inhibitory effect of the major alkaloid of this being the piperine, which was obtained by the Soxhlet method and by maceration with ethanol, which was alkalized and finally recrystalized. Tests were carried out such as thin layer chromatography, dragendorff test, IR and UV spectroscopy. For the evaluation of antibacterial activity were used with plates with Mueller-Hinton agar and culture of the *Staphylococcus aureus*, in which 20mm was obtained as maximum inhibition halo for the dilutions made and 23mm for the cream made at 2% of piperine.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se desarrollará el planteamiento del problema, la hipótesis de la investigación, los objetivos, tanto el general, como los específicos, la justificación y por último los antecedentes nacionales e internacionales. Se utilizaron artículos y estudios obtenidos de la base de datos de la Universidad Iberoamericana, del Binass y de las bibliotecas de la Universidad Internacional de las Américas.

Planteamiento del problema

Las lesiones cutáneas ocurren muy comúnmente en personas de cualquier edad, las cuales se pueden presentar desde lesiones simples, hasta lesiones más complicadas que se pueden inclusive infectar con microorganismos como bacterias y llegar a producir padecimientos más graves que ameriten la utilización de medicamentos hasta la hospitalización del paciente por complicación de la infección de la lesión.

El impétigo es una patología que se caracteriza por la infección de la piel, esta se da comúnmente en los niños. Dicha patología es molesta, porque esta provoca comezón en el área afectada y al rascarse la lesión ayuda a la diseminación de la misma, ya que aumenta la puerta de entrada de la bacteria *Staphylococcus aureus*, un agente provocador de la enfermedad. Como menciona Cole, y Gazewood, en "Diagnóstico y tratamiento del impétigo" (2007), el impétigo se transmite mediante el contacto directo, se puede diseminar una vez que las escoriaciones han sido infectadas y los niños se infectan frecuentemente por el contacto con otros niños infectados.

El uso de plantas medicinales a través de la historia es muy reconocido, aún en la actualidad la utilización de estos mismos es muy popular, como lo mencionan Bidyasagar,

Tripathi y Mishra(2017), "En los últimos años, los usos de plantas medicinales son cada vez más solicitados a través de los tradi-practioners para el tratamiento de diferentes dolencias de las comunidades", tanto que muchas personas tienden a obtener sus productos "naturales" con distribuidores que no tienen permisos ni verificación de calidad del producto. Por lo que el impulso de la elaboración de productos naturales con fines medicinales pero con conocimientos probados puede ser una alternativa positiva.

Por esta razón se presenta la siguiente pregunta: ¿cuál será la efectividad de la piperina obtenida de la pimienta negra contra la bacteria *Staphylococcus aureus* como tratamiento del impétigo?

Hipótesis

La piperina obtenida de *piper nigrum* presenta actividad antibiótica frente al *Staphylococcus aureus*.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antibiótica de la piperina frente al *S. aureus*, para la elaboración de una crema de uso tópico contra el impétigo.

Objetivos específicos.

Extraer piperina de la pimienta negra mediante el método de Soxhlet y maceración para elegir el mejor método para elaborar una crema de uso tópico.

Formular una crema con la piperina obtenida por destilación con equipo Soxhlet o maceración.

Identificar el componente principal de *Piper nigrum* al comparar respecto de un patrón de piperina mediante espectroscopía IR y UV.

Determinar la posible actividad de la piperina obtenida de la pimienta negra en el impétigo con una prueba de sensibilidad de antibióticos contra *Staphylococcus aureus*.

Justificación

El presente proyecto es importante, ya que debido al incremento en la resistencia a los fármacos, ha aumentado de igual manera la búsqueda de tratamientos alternativos. Según Kigigha y Kalunta.(2017), el desarrollo de agentes antibacterianos es necesario debido a la aparición de organismos resistentes a los medicamentos, esto debido al uso irracional y excesivo de antibióticos, la falta de completar un tratamiento y la versatilidad genética de los microbios.

Según el artículo de la nación " Bacterias infectan a 5.000 al año en hospitales de CCSS", unas 5.000 personas se infectan cada año con bacterias que atacan en los centros hospitalarios de la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS). Dentro de las cuales aproximadamente 630 casos se le atribuyen a *S. aureus*, por lo tanto, al prestar atención se nota que esta bacteria es una de las más frecuentes que se encuentra en los hospitales, por lo cual los tratamientos alternativos son importantes para considerarlos dentro de las posibilidades.

De igual manera es importante mencionar que los beneficiarios del estudio de estas bacterias y por ende de los resultados de la presente investigación serán los pacientes que se encuentran en hospitalización y también los pacientes que tengan una infección en la piel que se pueda complicar por la resistencia del *S. aureus* al tratamiento, ya que según el artículo de La Nación "OMS revela lista de las superbacterias más peligrosas por su resistencia a los antibióticos" la bacteria anteriormente mencionada figura entre las resistentes.

Staphylococcus aureus es una patología muy infecciosa que se encuentra dentro de la flora bacteriana habitual del ser humano y animal, esta puede colonizar algunas zonas como la piel y el tracto gastrointestinal cuando las barreras mecánicas son destruidas. Por lo cual el

estudio de esta bacteria tiene implicaciones trascendentales para otros problemas como podrían ser las infecciones asociadas a esta misma que pueden provocar endocarditis, neumonía necrotizante, destrucción tisular e infecciones metastásicas, impétigo y sepsis.

Con esta investigación se puede generalizar los resultados a principios más amplios, ya que el *Staphylococcus aureus* no es solo es patógeno causante del impétigo, sino que esta bacteria es la causal de otras patologías mucho más graves y preocupantes que pueden conllevar a la pérdida de la vida del portador, por lo tanto se podrían extrapolar los resultados para realizar terapias en otras presentaciones farmacéuticas con el fin de utilizarlos como nuevas alternativas.

Se espera obtener con los resultados de esta investigación cual será la efectividad de la piperina obtenida de la pimienta negra contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, ya que esta planta es conocida mayormente por sus efectos antiespasmódicos, antifatulentos, digestivos, antioxidantes y de utilidad gastronómica, pero es muy poco conocida por sus propiedades antibióticas.

Cabe destacar que Aparicio. (2012, p.2), hace mención de cómo una atención ambulatoria o primaria que no es suficientemente eficiente conlleva a una posible hospitalización. La cual en un principio pudo ser corregida desde el primer nivel si se hubiera prevenido desde un inicio la enfermedad, si se detecta desde un principio la patología del paciente y con esto utilizar el tratamiento más eficaz en cada caso. Por lo cual con la presente investigación se podría conocer en mayor medida el comportamiento de la patología que presenta el *S.aureus*, los lugares más frecuentes donde se encuentra y los cuidados que pueden tener los pacientes para no infectarse con esta misma y así prevenir desde el primer nivel la infección con esta bacteria.

La evaluación del funcionamiento de la atención primaria se basa en diversos estudios que han demostrado la hipótesis de que las tasas elevadas de hospitalización por “Problemas de Salud Susceptibles de Cuidados Ambulatorios” (PSSCA), son indicación de una atención ambulatoria subóptima. Es decir, una atención inadecuada en tipo, localización, intensidad u oportunidad para el problema de salud que está siendo tratado (Aparicio, 2012.p.2).

El presente funcionará como aporte de datos a futuras investigaciones relacionadas al tema, ya que relaciona la utilidad del piper nigrum (pimienta negra) contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, esta misma es de común aparición en infecciones dentro de los hospitales y el uso de este material vegetal es poco conocido a nivel nacional para esta utilidad, por ende la información recolectada en este proyecto ayudarán a futuros investigadores a tener una referencia para elaborar otros productos con piperina que tengan efecto contra esta misma sepa.

Por los motivos anteriormente expuestos, se ha planteado evaluar las propiedades antibióticas que puede presentar la piperina obtenida de la pimienta negra (*piper nigrum*) al utilizarlo por vía tópica como posible alternativa para el tratamiento del impétigo, frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*, mediante la formulación de la forma farmacéutica de una crema y se comprueba su actividad mediante pruebas de eficacia en agar.

Antecedentes

Internacionales

Cabello, Belloso, Clivet y Méndez (2007). Investigaron la "Actividad antimicrobiana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. (pimienta) sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas", en la Universidad de Oriente, escuela de agronomía, en Venezuela. El objetivo fue determinar el efecto inhibitorio de extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. (pimienta negra) sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas. Se recolectaron plantas de Rio Caribe, se utilizó extractos por método Goldfish y Soxhlet. Se evaluó la actividad antimicrobiana con el método de difusión en placa de agar. En conclusión el extracto que tuvo un efecto mayor de inhibición fue el etanólico.

De igual manera, en la misma universidad, Cabello y Belloso en el 2009 realizaron la investigación "Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L" con el objetivo de comparar el efecto inhibitorio de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum*, contra el crecimiento de bacterias Gram positivas. Se utilizó dos equipos de extracción (Goldfish y Soxhlet) y se midió el efecto antibacteriano mediante el método de difusión en placa de agar. Se concluyó que el extracto etanólico tuvo más eficacia frente Gram positivas.

Gracias a estas dos investigaciones anteriormente citadas se logró observar una buena opción para elegir el solvente para extraer el componente antibacterial del *Piper nigrum* con mucho mejor eficacia.

Zarringhalama, Zaringhalam, Shadnoush, Safaeyan y Tekieh (2012). Investigaron el "Efecto Inhibidor de los Extractos de Pimienta (negra y roja), Tomillo y de sus Aceites Esenciales sobre *Escherichia coli* Enterohemorrágica y Actividad de la DNasa de *Staphylococcus aureus*.", en la Universidad de Ciencias Médicas, Iran. Se tenía como objetivo determinar la actividad antibacteriana contra *E.coli* y *S.aureus*, para este se utilizó el material vegetal hecho polvo con etanol y luego se destiló, por último se probó la actividad antimicrobiana en una prueba de dilución inhibitoria mínima. Se determinó que ambos extractos tuvieron efecto importante sobre ambas bacterias pero los aceites esenciales tuvieron mayor potencia de inhibición y también fueron eficaces en la inhibición de la actividad DNasa.

Shanmugapriya, Savaravana, Payal y Williams (2012). Observaron el "Potencial antioxidante de las hojas de pimienta y su potencial contra algunos microbios patógenos." en la Escuela de biotecnología, India. Tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante, antimicrobial, los constituyentes físico-químicos de la pimienta negra en tres distintos solventes. Para esta se utilizó etanol, metanol y acetona, las hojas se secaron a la sombra y luego con cada solvente se colocaron en el equipo Soxhelt y luego en el Rotavapor. Estos extractos se probaron contra *S.aureus*, *E.coli*, *Enterobacter* y *Haemophilus*. Estos se colocaron en placas de agar para hacer la prueba por difusión, donde se concluyó que la pimienta negra es un agente de amplio espectro ya que actúa tanto sobre bacterias Gram negativas como Gram positivas y también en hongos.

Ejaz1, Ashfaq e Idrees (2014). Estudiaron la " Antimicrobial potential of Pakistani medicinal plants against multi-drug resistance *Staphylococcus aureus*". (Potencial antimicrobiano de las plantas medicinales paquistaníes contra la resistencia a múltiples fármacos *Staphylococcus aureus*), en la Universidad de Gobierno Universidad Faisalabad, Pakistán. Se determinó patrones

de resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados de diferentes áreas de Pakistán y para identificar agentes antimicrobianos que son resistentes a múltiples fármacos. Se tomaron muestras de diferentes áreas de Pakistán las cuales dieron positivo a *S.aureus*, estas se evaluaron y presentaron resistencia a los antibióticos, luego se evaluó el efecto de 29 plantas medicinales frente a esta bacteria usando discos de agar. Se concluyó que 5 plantas presentaron actividad antibacterial frente *S.aureus* dentro de las cuales se encuentra la pimienta negra.

Aziz, Tehreem y Ghufrana (2016). Estudiaron la "Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Metanólico de Cúrcuma (*Curcuma longa*) y Pepper (*Piper nigrum*)."

(Evaluation of Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of Turmeric (*Curcuma longa*) and Pepper (*Piper nigrum*)). El objetivo del estudio es evaluar la actividad antimicrobiana de las dos especias "Pepper (*Piper nigrum*)" y "Cúrcuma (*Curcuma longa*)", que pueden utilizarse en diferentes medicinas y terapias con base en hierbas. Se utilizaron ambas plantas para evaluar la actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, estas se comprobaron por método de difusión en agar. Donde se observó que para *P. aeruginosa* el más eficaz fue la pimienta negra, en *E.coli* fue el extracto de cúrcuma y en *S.aureus* fue la pimienta negra.

Estas últimas cuatro investigaciones son de gran ayuda para la presente, ya que afirman el efecto inhibitorio de la pimienta negra contra el *S. aureus*.

Gómez, Borrego, Lavin, Valdés, Battistoni, Guiametr. (2012). Observaron "Productos ambientalmente amigables de origen vegetal empleados en el control de microorganismos intervinientes en el biodeterioro del patrimonio cultura", en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Cuba. El objetivo de esta investigación fue

obtener los aceites esenciales y extractos vegetales de varias plantas y con estos hacer pruebas para observar la inhibición bacteriana y fúngica de estas mismas. Las plantas se secaron en estufa y luego se maceraron. Luego se obtuvieron extractos y aceites por hidrodestilación con un equipo de destilación tipo clevenger, estos se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a espectroscopia de masas. Por último se utilizó la técnica de los hoyos y se midieron los halos de inhibición en milímetros. Se concluyó en que la mayoría de aceites utilizados frente a bacterias y hongos tuvieron un efecto biocida, por ende se deduce el uso prometedor de productos amigables con el ambiente para el control de microorganismos.

Sepehri, Bagheri, mohasseli, Javadian, Anbari, Nasiri, Kiani,Shahi and Sohil (2014) Analizaron la "Antibacterial Activity of Cuminum cyminum and Piper nigrum against antibiotic resistant Klebsiella pneumonia." (Actividad antibacteriana de Cuminum cyminum y Piper nigrum contra la neumonía por Klebsiella resistente a los antibióticos). El presente estudio se realizó para determinar el efecto antibacteriano potencial de extractos de etanol y de Cuminum cyminum y Piper nigrum contra Klebsiella pneumoniae que es resistente a los antibióticos. Se recolectó fruta y esta se secó, luego se pulverizó y se introdujo en etanol, por último se filtró y se evaporó el solvente. Se tomó muestra de los cultivos de orina de pacientes hospitalizados con K.pneumonie y con este se prepararon tres cultivos. Se obtuvo que el extracto de piper nigrum presente un efecto inhibitorio mayor cuando el extracto se hizo con etanol. Por lo cual esta investigación es de importancia porque muestra una opción de solvente adecuado para extraer la pimienta negra.

Sotelo (2016). Indago sobre el " Estado del arte en el uso potencial de extractos vegetales del género *Piper* para el control de plagas agrícolas", en la Universidad Nacional Abierta y a Distancia Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, Colombia. Esta investigación tiene como objetivo realizar una recopilación de la base documental, en el uso

potencial de los extractos vegetales con actividad biológica del género Piper, en el control de plagas agrícolas. La información del tema fue obtenida de artículos en revistas, textos académicos, tesis y trabajos de investigación e información de internet. En este se concluyó que las especies de Piper tienen diferentes metabolitos secundarios, con actividad biológica contra plagas, insectos, larvas, virus, hongos, bacterias y enfermedades causadas por estas. La importancia de este estudio es que confirma la actividad bactericida de la pimienta negra y que esta podría convertirse en una alternativa para productos menos tóxicos.

Drotman (2017). Averiguo sobre " Enfermedades Infecciosas Emergentes" Centro para enfermedades, control y prevención, Atlanta. El objetivo de este libro es recopilar información de las enfermedades infecciosas emergentes. Estos recopilaron artículos e información en temas como el ebola, neumonía, influenza, seguridad alimentaria, zika entre otras, estas. En cada tema se concluyó por aparte, pero en general ultimando diciendo que de cada tema expuesto se debe dar más información a la población para que puedan prever una de estas enfermedades y cómo actuar si alguien fue infectado. Esta investigación es de ayuda puesto que menciona como el staphylococcus aureus es una de estas patologías infecciosas más frecuentes.

Nacionales

Zamora, Herrera y Arguedas (1997). Examinó en un " Estudio Abierto No Comparativo con Mupirocina en el Tratamiento de Pacientes Pediátricos con Infecciones de la Piel y Tejidos Blando", en el Acta Pediátrica Costarricense. En la investigación se tuvo como objetivo analizar la eficacia clínica y bacteriológica de la mupirocina en el tratamiento de pacientes pediátricos con infecciones de piel y tejidos blandos. Se incluyeron pacientes con edades entre 6 meses y 12 años que eran atendidos en la consulta externa del Hospital Nacional de Niños. Fueron candidatos

niños que presentaban signos locales compatibles con un proceso infeccioso en la piel o tejido subcutáneo, se les tomó una muestra para cultivo del área afectada y a estas se le realizaron pruebas de susceptibilidad a la mupirocina. Se concluyó que de 32 pacientes 29 casos tuvieron un diagnóstico de impétigo y 3 de piodermatitis, las bacterias obtenidas al inicio del estudio fueron *S. aureus* en 14 pacientes. Al final del tratamiento 87% de los pacientes tuvo mejora y 13% tuvieron fallo terapéutico. Este estudio es significativo porque demuestra la alta incidencia de la bacteria *S. aureus* en niños, que esta provoca la patología del impétigo en la mayoría y que estas pueden llegar a ser resistentes a tratamientos actualmente utilizados.

Marín (2008), Exploró las " Causas y Efectos de la Saturación del Servicio de Emergencias de la Clínica de Chomes, Puntarenas", en el Instituto Centroamericano de Administración Pública – ICAP, Costa Rica. Se tuvo como objetivo analizar las causas que producen la saturación del servicio de emergencias de la Clínica de Chomes y su efecto en la atención médica de este servicio en un periodo de tres meses. Se tomó como población de estudio a los pacientes que asisten a la consulta de emergencias, el estudio se hizo en seis meses de consulta. Se utilizaron las hojas de puerta de atención al usuario, cuestionarios y entrevistas, además de las estadísticas mensuales del total de consultas. Se concluyó que el servicio tiene consultas que en su mayoría no son consideradas emergencia, también que la falta de equipos necesarios para atender urgencias enlentece el proceso. Este antecedente es importante ya que gracias a este se logró observar cuáles son las patologías que más se consultan en esta clínica.

Aparicio (2012), Sondeo una " Serie sobre hospitalizaciones evitables y fortalecimiento de la atención primaria en salud", en el Sector Social División de Protección Social y Salud. Costa Rica. El objetivo fue calcular el número de hospitalizaciones por condiciones sensibles a atención primaria asociadas a cada uno de los grupos diagnósticos establecidos y la proporción de estas en

relación al total de hospitalizaciones en el año. Para obtener información se calcularon las tasas de hospitalización por ACSC para el período 1997-2010 para cada grupo de código diagnóstico. Los datos por área de salud se separaron por sexo y se agruparon en 15 intervalos de cinco años y tres categorías adicionales: menor de un año, 1-4 años y una última categoría que agrupa las hospitalizaciones de personas de 80 años y más. Se concluyó que los resultados del estudio aportan información para establecer estrategias y priorizar intervenciones para disminuir las tasas de hospitalización evitables, dado que se identificaron los seis grupos de enfermedades que concentran el 68.7% de las hospitalizaciones evitables, las zonas con patrones persistentes de sobrehospitalización y las áreas de salud con riesgo creciente de hospitalización.

Castillo y Gonzáles (2014). Determinó el " Aislamiento y cuantificación de la piperina a partir de la pimienta negra (*Piper nigrum*) un alcaloide en el tratamiento para la pigmentación de la piel", en la Universidad de Iberoamericana. Esta investigación tiene como objetivo demostrar que los frutos de la pimienta negra que se cultivan en Costa Rica, por el alto contenido de piperina, deben ser aprovechados para elaborar formas farmacéuticas útiles para tratar el vitíligo, dejar el fumado, mejorar la dificultad de tragar en pacientes que sufren apoplejía y prevenir varios tipos de cáncer. Se aplicaron dos tipos de extracción: maceración y extracción continua con equipo de Soxhelt. Una vez que se obtuvo el extracto se hicieron pruebas con el cromatógrafo y luego con la espectroscopia IR y UV/VIS identificaron los componentes, por último se preparó una crema con posibles efectos sobre el vitíligo. Se concluyó que los métodos que se utilizaron de extracción usando un solvente de creciente polaridad fueron muy eficaces en extraer la piperina.

Garita y Hernández (2015). Realizó la " Investigación de piperina en frutos de *Piper nigrum* y su impacto como droga medicinal", en la Universidad de Iberoamericana. Tiene como

objetivo obtener y evaluar el contenido porcentual de piperina presente en la pimienta negra. En este utilizaron un rota vapor para obtener el extracto y luego con la espectroscopia IR y UV/VIS identificaron los componentes. Se obtuvo que la piperina es el principal alcaloide de la pimienta negra. También que la piperina se concentra únicamente en el hexano y el cloroformo. Este alcaloide estimula la proliferación de melanocitos y formación de dendritas in-vitro y tiene efectos carminativos, tónico estomacal, insecticida y como antibacterial.

Estos estudios son importantes para la investigación ya que nos dan información de las posibles actividades que tiene la piperina y también de los métodos de extracción que pueden ser utilizados para obtener esta de la pimienta negra eficazmente.

Proyecciones

Con los resultados de esta investigación se pretende realizar un artículo científico con la ayuda de los datos obtenidos de la misma, con el fin de ser publicado en la revista de la Universidad Internacional de las Américas.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

En este capítulo se dará una breve explicación de algunos temas principales como lo son piper nigrum, métodos de extracción, métodos de identificación, piperina, piel, emulsiones, infecciones, antibióticos, impétigo, Staphylococcus aureus.

Piper nigrum

Hábitat

La planta de la pimienta negra o Piper nigrum, es una planta ampliamente utilizada y conocida a nivel mundial, según CIMED (2002) se ha utilizado de manera popular como condimento, además de ser conocido en medicina sus efectos como antioxidante, antibacterial, antiinflamatorio entre otros.

Según Pavithra (2014), esta planta es una hierba trepadora, nativa del sur de India y se cultiva en regiones tropicales. Tiene hojas simples, alternadas, de un verde oscuro, tiene solo una semilla y tiene longitudes variadas. También es una planta que se adapta muy bien a los cambios climáticos y tipos de tierra, lo que crea diversidad entre especies.

Damanhoury y Ahmad (2014) explican que la planta Piper nigrum crece en muchas regiones tropicales como Brazil, Indonesia e India. Esta es usada en diferentes comidas y también como medicamento, es una de las especies más famosas y comunes utilizadas a través del mundo entero, se considera el rey de las especies por su valor medicinal y por sus usos culinarios.

Clasificación

El autor anterior expone la clasificación taxonómica de la planta de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Nombre científico: Piper nigrum L

Familia: Piperaceae.

Nombre común: pimienta negra

Descripción de la planta

El CIMED (2002) refiere que la piperina se puede extraer de sus partes, tales como: frutos maduros y no maduros del todo, tallo, hojas. Dice que los lugares que contienen más concentración de piperina son las hojas y los frutos de la planta.

Damanhoury y Ahmad (2014), describe que el principal componente de la Piper nigrum es la piperina, a la cual se le atribuyen diversas actividades farmacológicas y se ha utilizado en la medicina tradicional con diferentes funciones como: analgésico, antiinflamatorio, hepatoprotector, antidiarreico, antiespasmódico, antioxidante, antitumoral, antimutagénico, insecticida y antibiótico.

También según Damanhoury y Ahmad (2014), la planta Piper nigrum es una vid trepadora que crece fácilmente en la sombra en los árboles, los enrejados o los postes de soporte hasta la altura máxima de 4 metros. La longitud de los picos va hasta 7-15 cm. Los frutos de la pimienta negra son pequeños (de 3 a 4 mm de diámetro) llamados drupa. Una fruta contiene una sola semilla. Un solo tallo contiene 20-30 espigas de frutas.

Tabla 1.Partes que constituyen a la pimienta negra.

Pericarpio	Semilla
Epicarpio	Tegumentos Seminales
Mesocarpio externo	Perispermo
Mesocarpio Interno	Cavidad seminal +/- desarrollada
Haces	Albumen
Libero	Embrión con 2 cotilenoideas
Leñoso	
Endocarpio	
Seudo pedúnculo	
Micrópilo	

Fuente: Cano, Chávez, Godínez y Monzón (2002).

Además, Rani (2013), refiere que investigaciones fitoquímicas de la planta demuestran que esta contiene ácido tartárico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, pectina, azúcares, taninos, alcaloides, flavonoides, glucósidos y sesquiterpenos. Donde el picante de la pimienta según este autor se da por la presencia de la piperina que es un alcaloide bioactivo que se acumulan en la piel y en las semillas de la fruta.

Carretero (Sf), describe que aproximadamente un 3% de los frutos de pimienta contienen aceite esencial, responsable de su aroma. Este está formado principalmente hidrocarburos terpénicos: 50-74% de monoterpenos (beta-pineno, limoneno, etc.) y 20-35% de sesquiterpenos (beta-cariofileno, etc.) y además una proporción mucho menor de terpenoides oxigenados (13 %).

Carmona (2013) comenta “que la actividad biocida del género Piper (insecticida, fungicida y bactericida) asociada a la toxicidad, radica en los diferentes metabolitos secundarios

(flavonoides, terpenos, cumarinas, compuestos fenólicos, saponinas y esteroides) es atribuible a la presencia de 22 alcaloides, a las piperamida”.

Figura 1. Componentes volátiles y aromáticos en el Piper Nigrum

Monoterpenes	Sesquiterpenes	Other compounds
α -Thujene	α -Copaene	Eugenol
α -Pinene	β -Caryophyllene	Methyleugenol
Sabinene	β -Bisabolene	Myristicin
β -Pinene	Caryophyllene oxide	Safrole
1,8-Cineole	α -Cis-Bergamotene	Benzaldehyde
Limonene	α -Trans- Bergamotene	trans-Anethole
Camphene	β -bisabolene	Piperonal
δ^3 -Carene	δ -Cadinene	<i>m</i> -Methyl acetophenone
Myrcene	γ -Cadinene	<i>p</i> -Methyl acetophenone
Cis-Ocimene	Calamenene	<i>n</i> -Butyrophenone
α -Phellandrene	α -Copaene	Phenyl acetic acid
β -Phellandrene	α -Cubebene	Cinnamic acid
α -Terpinolene	β - Cubebene	Piperonic acid
γ -Terpinene	<i>ar</i> -Curcumene	
Terpinolene	β -Elmenes	
	α -Selinenes	

Fuente: Meghwal y Goswami (2013).

Usos

Según Ahmad, Fazal, Haider, Farooq, Ali y Khan (2012), el componente activo de esta planta, que es la piperina puede simular a las enzimas digestivas del páncreas y de los intestinos, también se le atribuye aumentar la secreción de ácidos biliares cuando se administra de manera oral. Y se ha señalado que el consumo humano de esta incrementa el tiempo del tránsito oralcecal.

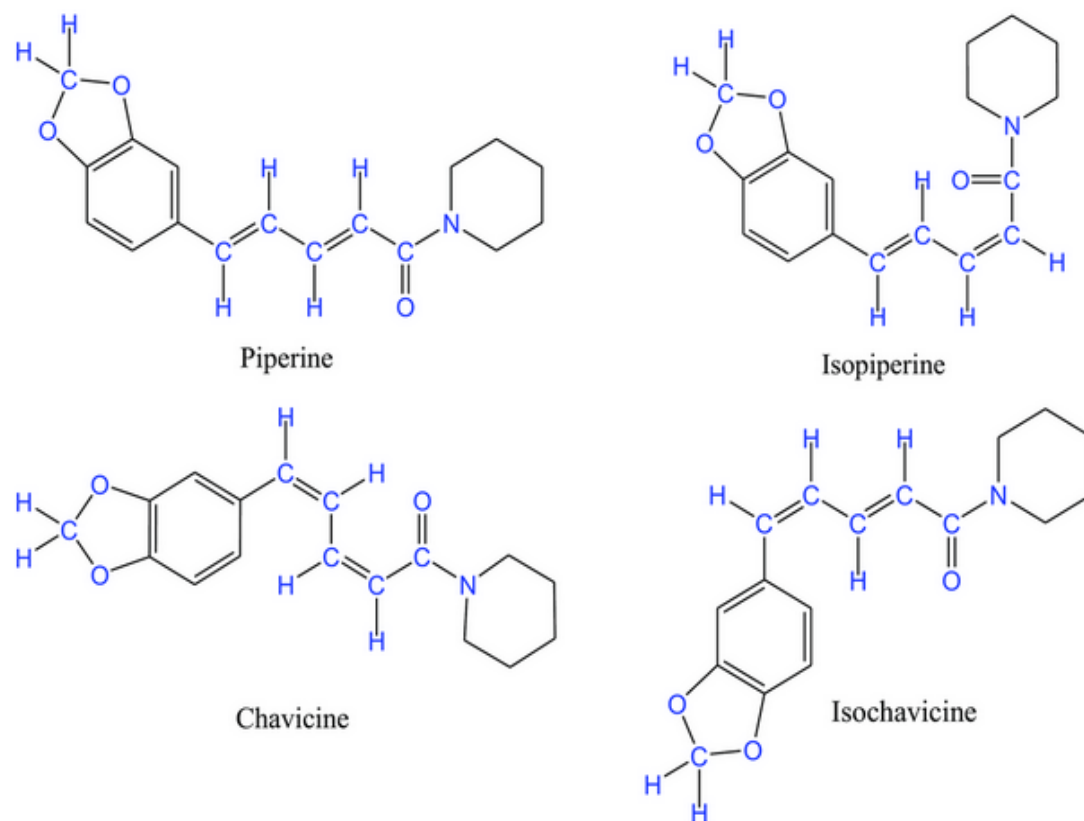
Karsha y Lakshmi (2009), menciona que los extractos de la planta y sus metabolitos secundarios tienen actividad antifúngica, antibacteriana y antiviral. De igual manera alude que el aceite esencial de la pimienta negra se utiliza para tratar el vértigo, asma, indigestión crónica, obesidad, sinusitis, fiebre y diarrea

En el estudio de Shanmugapriya, Savaravana, Payal y Williams (2012), dice que la pimienta negra es una fuente importante de nutrientes en la dieta del ser humano, ya que aporta vitamina A y C, componentes fenólicos ácidos y neutros, los cuales son antioxidantes importantes. Los extractos de esta planta son conocidos por sus propiedades antimicrobiales y son de uso terapéutico significativo.

También Zarringhalama, Zaringhalam, Shadnoush, Safaeyan, y Tekieh (2012), afirma que los extractos de la pimienta negra son tradicionalmente utilizados para tratamiento de enfermedades infecciosas. Este contiene algunos componentes antimicrobiales como terpenos, α -pineno, β -pineno, Linalool and Terpeneol.

Cabe destacar que según Damanhoury y Ahmad (2014), uno de los mayores usos de esta planta es como condimento en los alimentos, los frutos de esta misma se secan al sol para separar los granos de pimienta de donde están adheridos, las frutas verdes maduras recién cosechadas pueden secarse al sol para hacer la pimienta negra o la piel roja de los frutos de maduración se elimina y las semillas se secan al sol para hacer pimienta blanca

Figura 2. Estructura de la pimienta y sus isómeros



Fuente: Gorgani, Mohammadi, Najafpour y Nikzad (2016).

La pimienta negra, debido a su aceite esencial y sus componentes, se describen varios posibles efectos beneficiosos, además de los usos ya mencionados previamente.

Se ha descrito que puede utilizarse como estimulante del apetito por su olor agradable y la digestión, así como puede funcionar como carminativo, otorgando beneficios ante cólicos para la disminución de gases en el sistema gastrointestinal.

Entre ellos, se ha descrito la capacidad antiséptica, principalmente ante bacterias y hongos, aunque también se cree que posee cierta eficacia contra virus.

Figura 3. Usos tradicionales y modernos de la pimienta negra



Fuente: Meghwal y Goswami (2013).

Piperina

La pimienta negra son los frutos secos que están totalmente desarrollados pero sin llegar a estar maduros, que han pasado por un proceso de secado ya sea al sol, en hornos o tostados. Estos frutos contienen al menos 2,5% de piperina cuando es calculado según la materia seca. (USP 38. 2015).

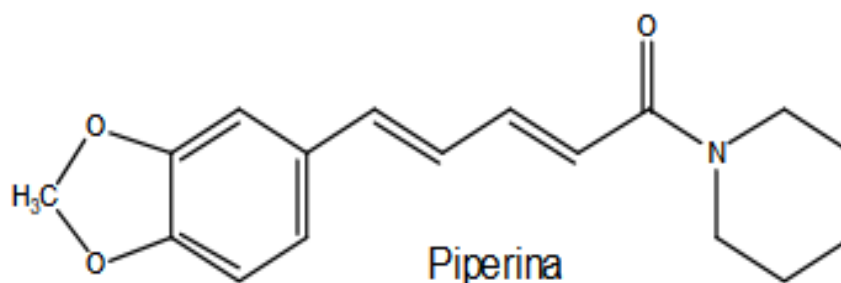
Según Rani (2013), la piperina es el componente mayoritario de la pimienta negra y esta es la responsable del sabor amargo que contiene, también dice que el extracto proveniente de las hojas de esta planta ha presentado actividad antimicrobiana.

Ahmad, Fazal, Haider, Farooq, Ali y Khan (2012), describe que la piperina previene y minimiza la diarrea provocada por varios aceites y químicos. Estimula la secreción de ácidos gástricos, la producción de saliva y la activación de la amilasa de la saliva.

Damanhoury y Ahmad (2014), refiere que el alcaloide principal de la pimienta negra es la piperina (1-peperoil piperidina) que tiene actividades farmacológicas como lo es: antihipertensivo, antiagregante, antioxidante, antitumoral, antipirético, analgésico, antiinflamatorio, antidiarreico, antiespasmódico, ansiolítico, hepato-protector, inmunomodulador, Antibacteriano, anti fúngico.

Cabe destacar que Pavita (2014), comprueba que la actividad bactericida de la piperina sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas dio un resultado positivo. Los alcaloides como la piperina pueden tener una gran responsabilidad de la actividad antibacterial.

Figura 4. Estructura molecular de la piperina.



Fuente: Carretero (Sf).

Métodos de destilación

La destilación es un proceso que consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y luego, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. Se tiene como objetivo

separar mezclas utilizando la diferencia de volatilidad de cada componente. (Tenorio, 2007, p.43).

Esta misma autora describe que cuando el material vegetal son semillas o frutos estos deberían de ser triturados para que la superficie de contacto sea mayor y sea más fácil obtener el aceite.

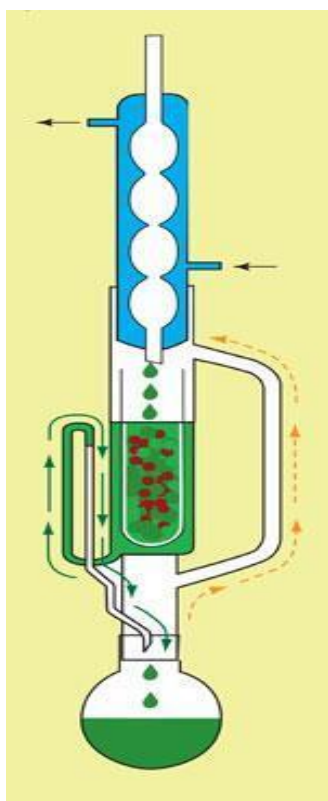
También según Villalobos (2012) este sistema se emplea para purificar sustancias contaminadas por grandes cantidades de impurezas resinosas y para separar disolventes de alto punto de ebullición de sólidos que no se arrastran.

Soxhlet

Según Wiley (2004), "el Soxhlet es la técnica más antigua para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Esta se lleva a cabo con un disolvente orgánico que refluye a través de la muestra". Dentro de las limitaciones que tiene este método es el tiempo necesario para completar la extracción y que el material vegetal quede agotado, ya que en comparación con otros métodos es elevado.

Para este tipo de extracción se toma una muestra del material vegetal y se coloca en el sistema de destilación pertinente que tiene el disolvente que se elige previamente, este se calienta y el vapor se condensa, cayendo gota a gota donde se encuentra el material vegetal, este proceso pasa hasta que se extrae el compuesto bioactivo completamente. (Gorgani, Mohammadi, Najafpour y Nikzad (2017).

Figura 5. Equipo Soxhlet



Fuente: Sella (2007)

Método de extracción

Maceración

La técnica de maceración se puede clasificar en: agotamiento sin agitación o sea solo por difusión de los metabolitos de la droga vegetal inmóvil al solvente (maceración estática) y el otro método es procurar el agotamiento por la agitación de la droga vegetal en el seno del solvente (maceración dinámica) obviamente esto dependerá de disponer de un medio de agitación continuo (mecánico) o discontinuo (manual). (Cano, Chávez, Godínez y Monzón, 2002).

El mismo autor describe que la selectividad del etanol es más relevante por su naturaleza polar (es miscible en hexanos como en agua) lo que permite la extracción absoluta de materiales hidrófilos e hidrófobos con lo que ayuda a agotar la droga vegetal de una mejor manera. Un aspecto a considerar es que su punto de ebullición es relativamente mayor que otros solventes orgánicos, debido a ser un líquido asociado por los puentes de hidrógeno que se establecen entre las moléculas de etanol.

Métodos de identificación

Cromatografía por capa fina

La cromatografía en capa fina permite una identificación cualitativa de metabolitos específicos así como una confirmación por la propiedad de su relación de recorrido (rf) que resulta siendo una propiedad característica dependiente de la fase inmóvil y del solvente transportador. Además, se puede lograr una separación de otros metabolitos mediante retirar de la cromatoplaça la mancha específica y realizar un microanálisis en posterior proceder. (Cano, Chávez, Godínez y Monzón, 2002).

Figura 6. Razón de frentes

Se calcula entonces la razón:

$$\frac{(\text{distancia recorrida por el sustrato})}{(\text{distancia recorrida por el disolvente})} = R_f$$

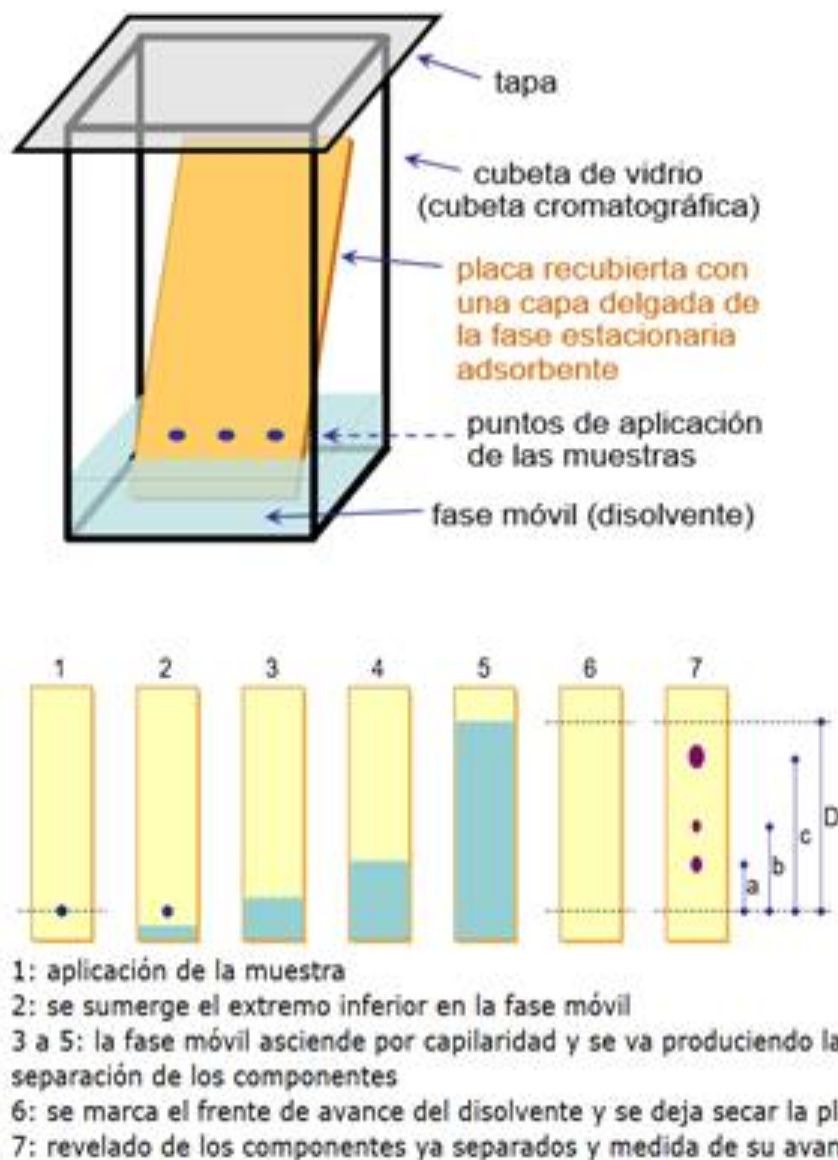
Fuente: Walton y Reyes (2005).

Esta está constituido por una fase estacionaria que normalmente es una hoja de papel filtro y una capa de absorbente, tambien por una fase movil o revelador. El metodo consiste en colocar una gota del material a identificar en el borde de la fase estacionaria, se deja secar y por ultimo se

introduce este borde dentro de la capa móvil hasta que este este cerca de llegar al borde superior.

(Walton y Reyes. 2005).

Figura 7. Cromatografía ascendente en capa fina.



$$\text{Componente 1: } R_f = a / D$$

$$\text{Componente 2: } R_f = b / D$$

$$\text{Componente 3: } R_f = c / D$$

Fuente: Herráez (2000).

Espectroscopia

Skoog (2001), menciona que la espectroscopia es una ciencia que estudia las interacciones que suceden entre la radiación y la materia, además también mide la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies atómicas o moleculares que se analizan. Y se puede clasificar según la región del espectro electromagnético en que se utiliza para hacer la medición, esta división es: Rayos Ultravioleta (UV), Visible, Infrarrojo (IR), Gamma, Rayos X, microondas y radiofrecuencias (RF) (P.567).

El autor anterior menciona la clasificación del espectro de radiación electromagnética en diferentes intervalos según su longitud de onda en: “la región ultravioleta se encuentra desde los 180nm hasta los 380nm aproximadamente, la región visible de los 380nm a los 780nm, el infrarrojo cercano de los 0.78 μ m hasta los 2.5 μ m y por último el infrarrojo medio de los 2.5 μ m a los 50 μ m”. (P.571)

La espectroscopia identifica átomos o moléculas por medio de sus espectros, esto se determina mediante el uso de las longitudes de onda a las cuales la especie pueda absorber la mayor cantidad de luz o radiación posible.

Otro aspecto importante a tomar en cuenta a la hora de realizar las determinaciones analíticas, es el grado de absorbancia más óptimo. Entre valores de absorbancia de 0,4 a 0,8 corresponden al margen más adecuado para una determinación por espectroscopia en química analítica.

Para la identificación de especies moleculares se utiliza la resonancia magnética nuclear (RMN), la cual utiliza estas regiones del espectro de radiación electromagnética comúnmente aunque el espectro completo es mucho más complejo y clasificado.

Absorción de radiación infrarroja.

Esta es una de las técnicas de análisis más comúnmente empleadas en química orgánica. Según Skoog (2008) la absorción de radiación en la región IR puede dar información sobre la naturaleza o identidad de los compuestos, a partir de la presencia de grupos funcionales y estructura de las moléculas.

Figura 8. Bandas de absorción de algunos grupos funcionales.

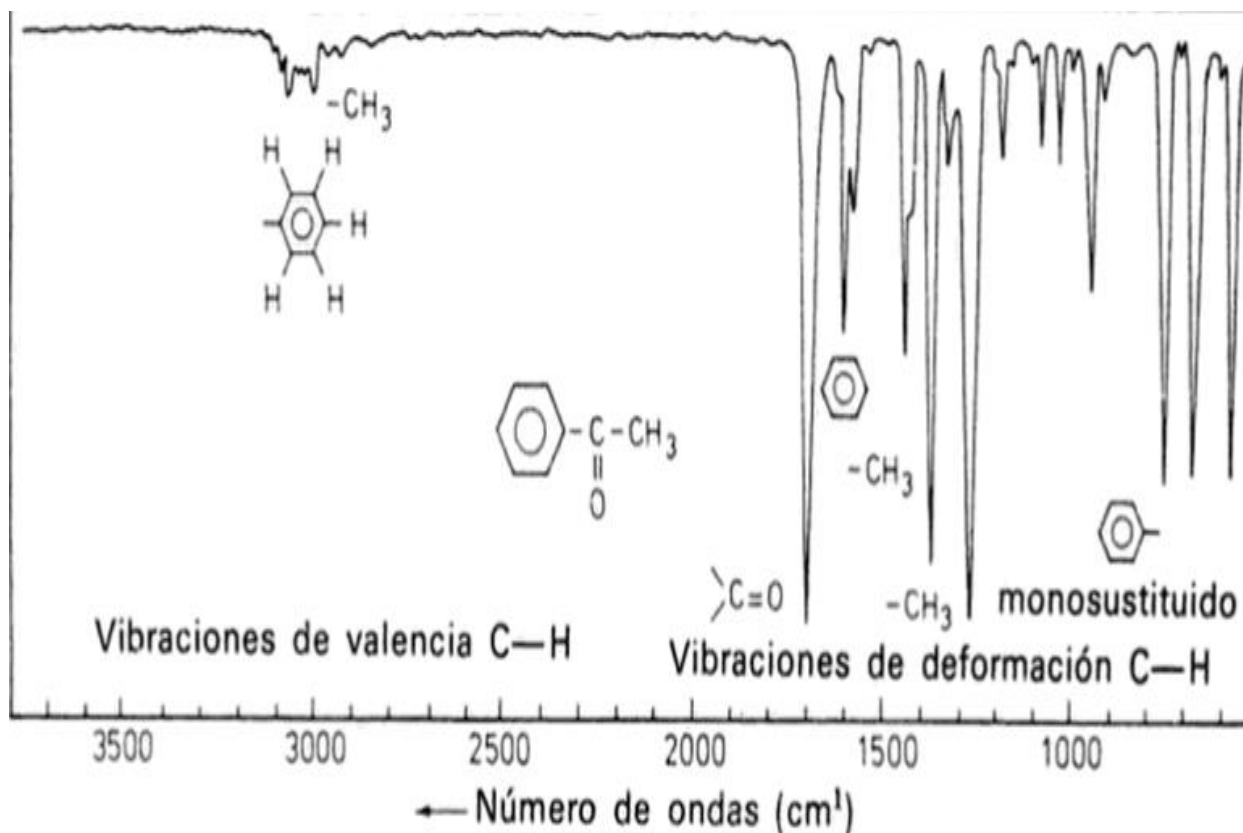
Tipo de compuesto	Vibraciones de valencia (v)	Número de ondas (cm ⁻¹)
Alcano o grupo alquilo	$\begin{array}{c} \\ -C-H \\ \end{array}$	3100 – 2800 (f)
	$\begin{array}{c} \\ -C-D \\ \end{array}$	~ 2200 (f)
	$\begin{array}{c} \quad \\ -C-C- \\ \quad \end{array}$	1200 – 750 (v)
Alqueno, aromáticos	$\begin{array}{c} \\ =C-H \end{array}$	3100 – 3000 (m)
	$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=C \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	1690 – 1600 (v)
Alquino	$\equiv C-H$	~ 3300 (f)
	$-C \equiv C-$	2260 – 2050 (v)
Alcohol, fenol,	$-O-H$	3700 – 3400 (v)
Aldehído, cetona, Ácido carboxílico Derivados de ácido carboxílico	$-O-H$ (asociado)	3400 – 3200 (f) ancha
	$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=O \end{array}$	1800 – 1600 (f)
Amina, amida	$\begin{array}{c} H \\ \diagup \quad \diagdown \\ N \\ \diagdown \quad \diagup \\ H \end{array}, \quad \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ N-H \end{array}$	3600 – 3300 (m)
	$\begin{array}{c} H \\ \diagup \quad \diagdown \\ N \\ \diagdown \quad \diagup \\ H \end{array}, \quad \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ N-H \\ \text{(asociado)} \end{array}$	3400 – 3100 (f) ancha
Azometina, oxima	$\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=N- \\ \diagdown \end{array}$	1680 – 1630 (v)
Nitrilo (carbonitrilo)	$-C \equiv N$	2400 – 2200 (v)
Diazocompuesto	$\begin{array}{c} \oplus \quad \ominus \\ =N=N \end{array}$	2200 – 2100 (f)
Sal de diazonio	$\begin{array}{c} \oplus \\ -N \equiv N \end{array}$	2310 – 2230 (f)

Fuente: Hans y Wolfgang (1987).

Según Hart, Hart y Craine. (1999), la frecuencia infrarroja se expresa en unidades de número de onda, o en número de ondas por centímetro, esta se utiliza principalmente para determinar el tipo de enlace que está presente en la molécula a analizar. Normalmente es una prueba rápida que se obtiene con muy poca cantidad de muestra.

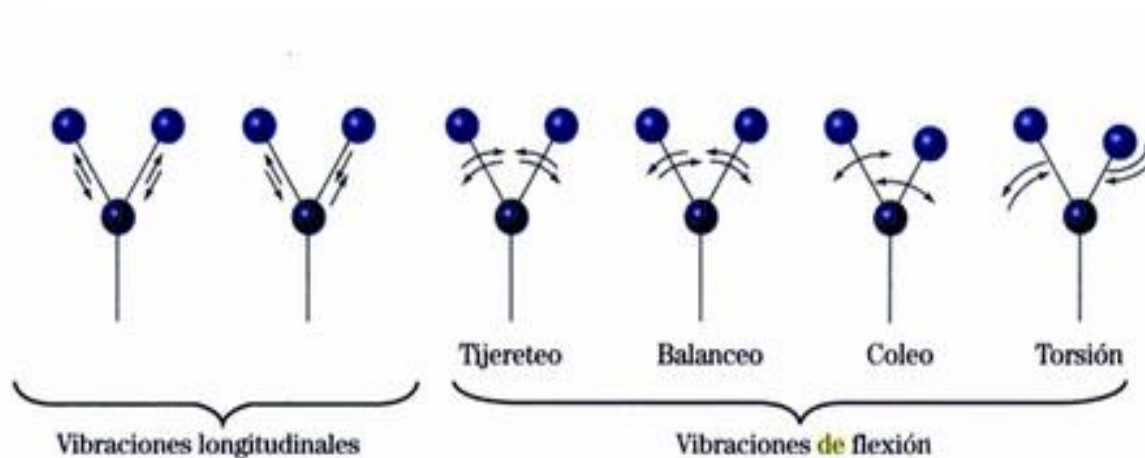
Este mismo autor describe que los instrumentos corren una frecuencia aproximadamente de 700 a 5000cm^{-1} y que estas frecuencias pueden aportar de 2 a 12kcal/mol , cantidad que es suficiente para afectar las vibraciones de los enlaces (alargamiento y flexión de los enlaces).

Figura 9. Espectro IR de la Acetofenona.



Fuente: Hans y Wolfgang (1987).

Figura 10. Vibraciones moleculares causadas por radiación infrarroja.



Fuente: Bailey y Bailey. (1998, p.426)

Skoog (2008) destaca que el espectro IR es un instrumento para determinar la identidad de un compuesto, donde la región comprendida entre los 3600cm^{-1} a 1250cm^{-1} se utiliza para identificar grupos funcionales comunes, y la región que se encuentra entre los 1200cm^{-1} a 600cm^{-1} es conocida como “huella dactilar”, donde pequeñas diferencias en la estructura y la constitución de las moléculas dan lugar a cambios significativos en el espectro IR.

Espectroscopia ultravioleta.

Según Hart, Hart y Craine. (1999), menciona que el espectro de región visible para los humanos es de 400nm a 800nm y que la luz ultravioleta tiene una longitud de onda menor de 200nm a 400nm. La cantidad de energía que emite esta región esta de 75 a 150kcal/mol para la última mencionada. Estos espectros son utilizados para determinar las conjugaciones de las moléculas a evaluar.

Los datos de absorción se pueden presentar en forma de gráfica, donde se coloca la absorbancia o log del coeficiente de extinción frente a longitud de onda. Se representa por la

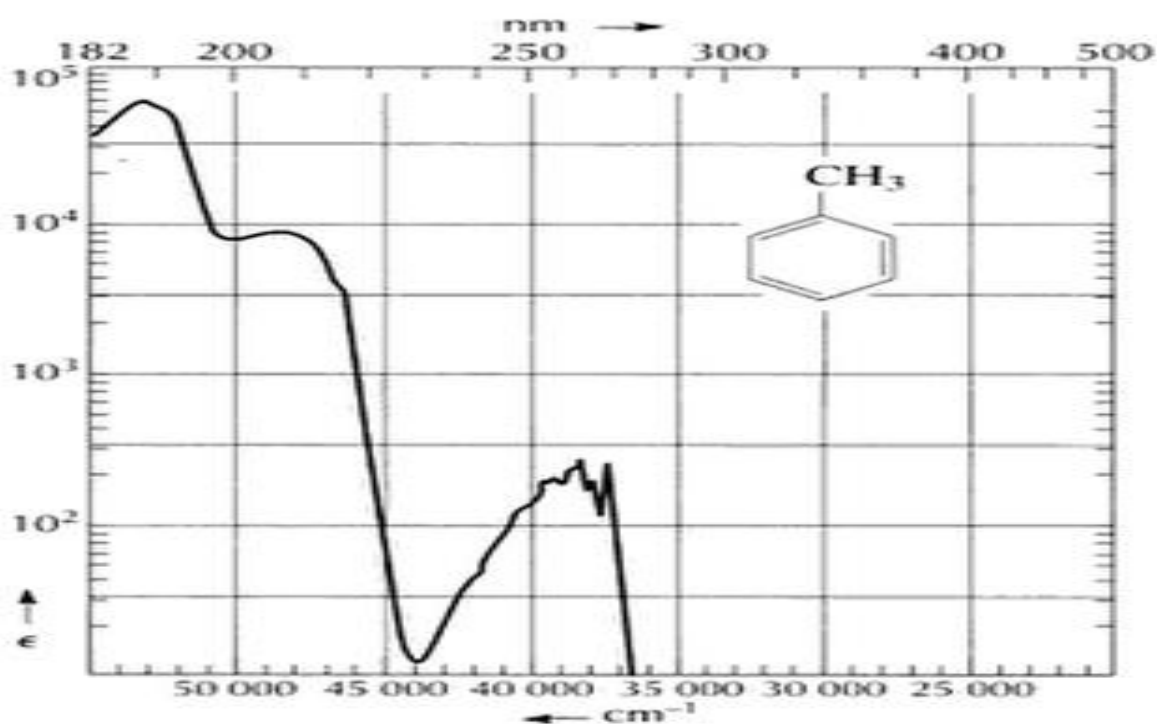
ecuación de la figura 11, donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, I es la intensidad de la luz transmitida, ϵ es el coeficiente de extinción, b el espesor de la cubeta en centímetros y c es la concentración en moles por litro. (Pasto y Johnson, 2003. p, 114).

Figura 11. Ecuación de absorbancia.

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot c = A$$

Fuente: Pasto y Johnson (2003).

Figura 12. Espectro ultravioleta del tolueno en hexano.



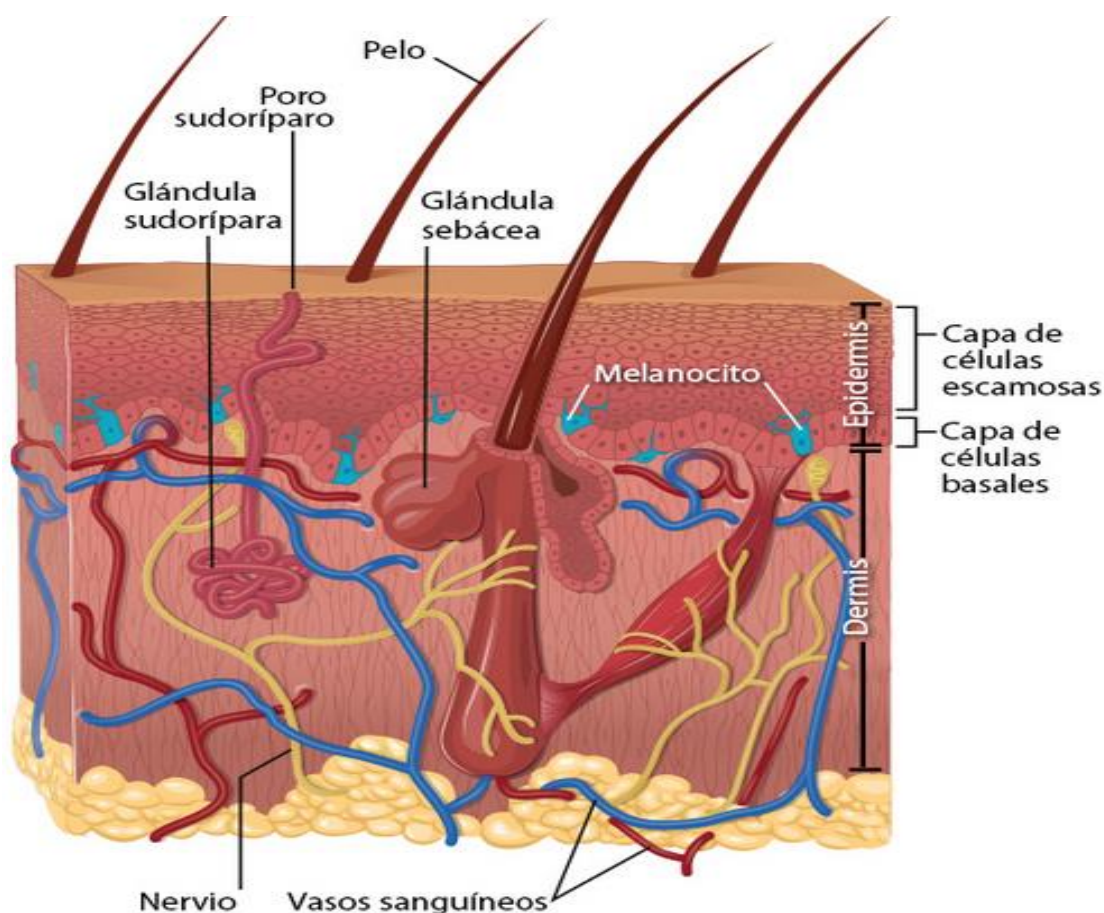
Fuente: Ege (1998.p, 1042).

Piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, pues cubre toda su superficie. Se compone de varias capas como lo es la epidermis, dermis y la capa de tejido graso subcutáneo, esta funciona como una barrera de protección entre el exterior y el interior del cuerpo contra agentes como lo pueden ser hongos, bacterias, virus y parásitos. (Velázquez, 2008, p. 1047).

Según Port y Grossman (2015), la piel corresponde casi al 16% del peso total corporal, su grosor puede cambiar de 1mm hasta más de 5mm dependiendo de la zona del cuerpo, como cubierta del cuerpo en ocasiones muestra lo que sucede en el interior del organismo y lo manifiesta de distintas maneras como por ejemplo trastornos cutáneos.

Figura 13. Capas de la piel y estructuras en ella.



Fuente: Centro para el control y prevención de enfermedades (2017).

La piel en condiciones óptimas tiene un pH de 5 la cual ayuda a evitar el ingreso de muchos microorganismos al interior del cuerpo humano. Dentro de estos microorganismos se encuentran los estafilococos, enterobacterias y levaduras como la *Cándida* son parte de la microbiota habitual de la piel y estos contribuyen en el fortalecimiento de esta barrera. Aunque el *Staphylococcus epidermis* se encuentra en la piel habitualmente también puede producir infecciones leves de la piel y las mucosas hasta algunas sepsis, endocarditis, neumonía, osteomielitis y también es una de las causas principales de infecciones hospitalarias. (Cárdenas, 2014).

Velázquez (2008), menciona que para que un medicamento tópico tenga una buena eficacia terapéutica hay una relación entre la potencia y la capacidad de atravesar hasta la piel enferma en concentraciones óptimas. Estas se ven influenciadas por etapas como lo puede ser la correcta aplicación, paso de la capa cornea y luego la continuidad de la penetración del tratamiento hacia las siguientes capas como epidermis, dermis, tejido celular subcutáneo hasta los vasos sanguíneos si es que logra traspasar las capas anteriores. Por lo que para formular un tratamiento tópico óptimo se debe de tomar en cuenta estos factores.

La epidermis, según Swarbrick (2007), consta de varias subcapas, las cuales son: el estrato basal o germinativo, el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y el estrato

córneo. De dichos estratos de la epidermis, y en general de la piel, estas capas poseen muchos componentes de tipo grasos, los cuales brindan protección. La droga presente en un formulado para uso tópico, debe ser capaz de atravesar dichos estratos, sin ocasionar una alteración o daño en la misma; en otras palabras, no ser irritante.

Al ser el estrato córneo, la primera capa por atravesar, resulta importante la composición química general, que esta posee, ya que ayuda a entender, que características químicas debe de poseer un fármaco por utilizar de forma tópica.

Infecciones

Mosby (2003), describe a las infecciones como la "invasión del organismo por microorganismos patógenos que se reproducen y multiplican, causando un estado morbooso por lesión celular local, secreción de una toxina o al provocar una reacción antígena – anticuerpo en el huésped".

También estas se pueden observar como cambios que existen en distintas partes del cuerpo que al producirse permiten que las bacteriana o virus colonicen el organismo, estas pueden ser agudas o crónicas. Para causar estas infecciones se deben de sobrepasar las barreras físicas e inmunes del cuerpo, por lo tanto puede ser que se den por falla de algún sistema de defensa. (Beers y Flectcher, 2003).

Algunas bacterias se consideran que son parte de la flora habitual de la piel por lo tanto no se observan como si fueran patógenos o dañinos para esta misma, sin embargo algunas de estas en situaciones de exposiciones abiertas de la piel son oportunistas y la infectan. Estas infecciones

se catalogan según la extensión o penetración de la bacteria, estas son las primarias y secundarias, donde en las primarias son infecciones cutáneas superficiales como por ejemplo el impétigo, y las secundarias son infecciones mucho más profundas como una úlcera infectada. (Port y Grossman, 2015).

Impétigo

El impétigo es una infección estreptocócica o estafilocócica de la piel que ocupa una puerta de entrada para que la bacteria logre colonizar (un corte, abrasión, punción, etc.), inicia con un eritema focal y progresa hasta producir vesículas pruriginosas, erosiones y costras melicéricas. La lesión suele localizarse en la cara y se extiende localmente. (Mosby ,2003).

Dentro de las infecciones bacterianas cutáneas, superficiales más comunes se encuentra el impétigo, el cual es causado normalmente por estafilococos, estreptococos β - hemolítico del grupo A o ambos. Se da frecuentemente en niños pequeños y menos frecuente en niños mayores o adultos aunque si se encuentran casos de estos. El momento en que se presenta más casos es en épocas de clima caliente y húmedo. (Port y Grossman, 2015).

Se puede distinguir dos tipos de impétigo, el ampolloso que es causado por la toxina exfoliativa o epidermolítica de *Staphylococcus aureus*, y el no ampolloso o contagioso, que puede ser causado por el mismo patógeno y el streptococcus o por los dos en el mismo momento. El primero se manifiesta con la aparición de ampollas grandes que se pueden persistir por 3 a 4 días, luego estas se rompen y cuando estas se secan aparece unas costras de color miel, se propaga por autoinoculación. Mientras que el no ampolloso como su nombre lo dice no produce

ampollas, este tipo produce unas vesículas que se rompen y repiten la patología del anterior. (Guerra, 2007).

Figura 14. Impétigo en fosa nasal y área superior del labio.



Fuente: Barco,L (2000).

Staphylococcus aureus

Según Negroni (2009), "las bacterias son microorganismos que pertenecen al reino procariota, presentan una estructura celular simple y sin membrana nuclear, integrantes al dominio Bacteria. Se reproducen por división simple o fisión binaria, lo que da origen a agrupaciones características". (p.11)

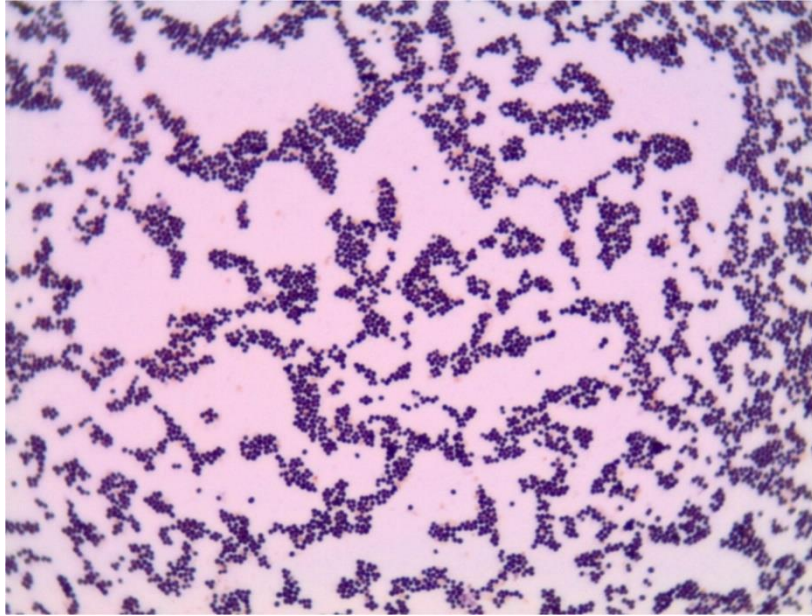
Pahissa (2009) describe que "El género *Staphylococcus* está ubicado en la familia Micrococaceos, que son cocos Gram positivos, que se disponen en grupos a modo de racimos irregulares (del griego *staphylé*, racimo de uvas), aunque se pueden encontrar aislados o formando parejas". Este mismo autor describe que los requerimientos nutricionales de estos son poco estrictos, pero que las condiciones en que crecen mejor son entre 30 y 37°C y un pH cercano a 7. Son microorganismos no móviles, aerobios o anaerobios facultativos, crecen en cualquier medio de cultivo pero tienen más crecimiento en medio sal manitol y en agar sangre. (p.15).

Las infecciones causadas por *S. aureus* van desde enfermedades menores de la piel, que pueden ser superficiales como infecciones de una herida, furúnculos e impétigo ampolloso, a enfermedades más graves que son invasivas locales como celulitis, osteomielitis, sinusitis y neumonía, hasta septicemia y meningitis potencialmente mortales. (Zarringhalama, Zarringhalam, Shadnoush, Safaeyan y Tekieh, 2012).

Una vez que *S. aureus* invade las estructuras más profundas, a menudo se propaga a otros sistemas de órganos, dando lugar a una infección metastásica. La endocarditis y la septicemia tienen morbilidad y mortalidad importantes a pesar de la terapia antimicrobiana agresiva. La intoxicación por estafilococos ocurre con un corto período de incubación de 2 a 6 h y se caracteriza por náuseas y vómitos, seguidos por calambres abdominales y diarrea, que pueden ser hemorrágicas. (Zarringhalama, Zarringhalam, Shadnoush, Safaeyan y Tekieh, 2012).

Esta bacteria es también una causa frecuente de infecciones intrahospitalarios que están relacionadas con dispositivos médicos y a cirugías. Aunque las infecciones cutáneas menores pueden resolverse de forma natural sin intervención antibiótica. (Ejaz, Ashfaq y Idrees, 2014)

Figura 15. *Staphylococcus aureus*, tinción de gram.



Fuente: Sabalet (2010).

Figura 16. *Staphylococcus aureus*: cultivo en Agar sangre.



Fuente: Sabalet (2010).

Antibióticos

Montoya (2008), refiere que “un antibiótico es cualquier agente que interfiera con el crecimiento y la actividad de las bacterias, estas pueden ser bactericidas si su fin es matar la bacteria y bacteriostático si produce la supresión del desarrollo de las bacterias”.

Según Chambers (2007). “Los antibióticos son sustancias antimicrobianas producidas por diversas especies de microorganismos (baterías, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, también se abarca a los antibióticos sintéticos como las sulfonamidas y quinolonas”. Cada antibiótico tiene su mecanismo de acción, propiedades físicas, químicas y su espectro antimicrobiano distinto, lo que es de suma importancia para combatir la gamma de microorganismos existentes.

Los antimicrobianos deberían presentar ciertas características como lo son una especificidad elevada, mínima toxicidad en las células humanas y que sea activo a concentraciones bajas, esto se expresa como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y se define como la concentración mínima de un agente antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo (García, Bermejo, Corrales y Cifredo, 2006, p, 165).

La CMI puede cuantificar la resistencia de una cepa frente a un antibiótico, esta puede ser causada comúnmente por mutaciones en las bacterias. Estos cambios generan una disminución en la efectividad del fármaco y se requiere una concentración de medicamento más elevada para realizar el mismo efecto. Mientras que la tolerancia es la capacidad de una batería para ser expuesta de manera temporal a antibióticos, sin importar que la CMI sea superada en gran

cantidad. Por lo tanto para eliminar una bacteria tolerante se requiere exponer durante más tiempo al fármaco para eliminar el microorganismo. (Brauner, Fridman, Gefen y Balaban,2016, p,320).

Para que un tratamiento sea satisfactorio debe alcanzar una concentración suficiente en el lugar de infección para lograr inhibir el crecimiento del microorganismo al que se enfrenta. Esta concentración debe ser lo suficientemente alta para parar el crecimiento de la bacteria pero al mismo tiempo que esté por debajo de los niveles tóxicos para las células humanas sino inhibiría ambas y traería repercusiones graves en el paciente. (Chambers, 2007).

Las bacterias en la actualidad están generando resistencia a los antibióticos actuales, más del 70% de las bacterias que producen infecciones intrahospitalarias como lo es *S.aureus* son resistentes a más de un fármaco que se utilizaba anteriormente para eliminarlas. Se dice que las razones para que se cree la resistencia hacia un antibiótico pueden ser que el fármaco no se distribuya de manera correcta y no llegue al lugar que se necesita, que el fármaco no sea correctamente utilizado y no sea activo frente a la bacteria que enfrenta y por último que el objetivo esté alterado, es decir que tenga algún tipo de mutación. (Chambers, 2007).

Gran cantidad de padecimientos cutáneos tienen como tratamiento de relevancia los antibióticos tópicos. Dentro de estos medicamentos se tiene la mupirocina, la cual se utiliza para infecciones bacterianas superficiales, este es activo frente a bacterias Gram positivas especialmente estafilococcus y la mayoría de estreptococcus, tiene presentación de ungüento y la principal indicación es el impétigo vulgar localizado. (Velázquez ,2008).

Prueba de sensibilidad a antibióticos (PSA)

Según Fernández, López, Ponce y Machado (2003), en la actualidad la producción de antibióticos nuevos ha ido en disminución y en consecuencia la resistencia a estos por la aparición de mecanismos de defensa de las bacterias, virus, hongos y protozoarios para evitar su destrucción. Por lo que se realizan la PSA, con el fin de utilizar el fármaco adecuado según la sensibilidad del microorganismo a eliminar.

La capacidad de las bacterias para modificar su material genético ya sea por cambios reales o por su expresión ante circunstancias adversas le permite adaptarse cuando hay un medio hostil y de esta manera crear resistencia a los antibióticos que se utilizan para intentar destruir estos microorganismos. (Negroni, 2009, p. 60)

Dentro de las pruebas que se deben de hacer para conocer el fármaco adecuado a utilizar frente a distintas bacterias es la de sensibilidad antimicrobiana de las cepas bacterianas, dentro de las pruebas existentes para medir la sensibilidad de las bacterias se encuentran la de difusión en disco, agar o caldo y pruebas automatizadas. (Chambers, 2007).

Según Malbrán (2001), la prueba de difusión en disco es de las más utilizadas para probar la sensibilidad de las bacterias, el método utiliza un reservorio que viene en discos de papel donde se encuentra una cantidad constante de antimicrobianos, este se aplica sobre la

superficie del agar donde se encuentra cultivado el microorganismo en cuestión, entonces por difusión se observará el grado de inhibición que tiene el reservorio al microorganismo que los rodea.

Figura 17. Antibiograma por difusión con discos en el que se observa presencia de halos de inhibición.



Fuente: Cercenado y Saavedra (2009).

De las razones por las cuales se recomienda realizar una prueba de sensibilidad se tiene la orientación para elegir un tratamiento eficaz contra un microorganismo, cuando se tiene una

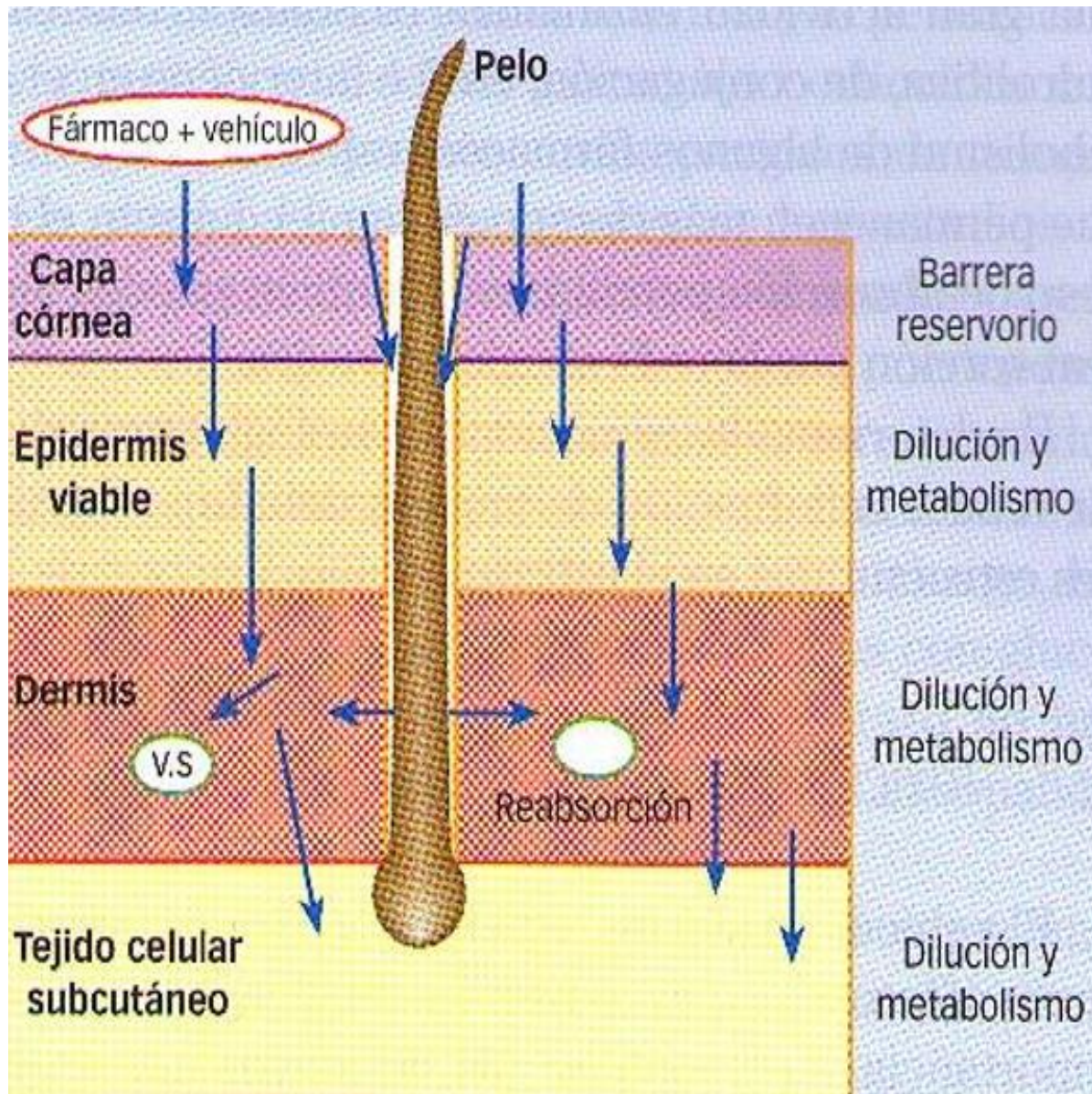
especie en estudio que puede presentar resistencia a los antibióticos que se utilizan normalmente, cuando un paciente es alérgico a algún antibiótico, con fines epidemiológicos de resistencia y por ultimo cuando se está estudiando nuevos antibióticos. (Malbrán ,2001).

Emulsiones

Según Remington (2003), las emulsiones "Son sistemas de dos fases formados por dos o más líquidos inmiscibles que no se separan gracias a un emulgente. Uno de los líquidos está disperso dentro del otro, denominado dispersante, pero requiere de un emulgente que disminuya la tensión superficial". Este también menciona que en algunas situaciones como lo es para las cremas la fase externa es oleosa y la fase dispersa es acuosa (W/O). (p,861).

Este mismo autor menciona que la eficacia terapéutica de un fármaco de aplicación tópica está relacionada con la potencia y capacidad de penetrar las capas de la piel hasta donde se necesite en concentración adecuada. Para la mayoría de los compuestos la barrera que limita la absorción cutánea se encuentra en la capa córnea (lugar donde se absorben y por gradiente de concentración se difunden los solutos a través de la membrana)

Figura 18. Permeabilidad y absorción percutánea de los fármacos.



Fuente: Velázquez (2008).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

En este capítulo se hará mención sobre el tipo de enfoque que muestra la investigación, se especificará el diseño de esta misma, de igual manera se puntualizaran los objetos de estudio y las variables de este. Se mencionará paso a paso los procedimientos para obtener los cristales de piperina de la pimienta negra hasta la preparación de la crema preparada con estos mismos.

Enfoque

El enfoque de la presente investigación es de carácter cuantitativo, ya que según Hernández, Fernández y Baptista (2014), este tipo de enfoque representa una serie de procesos los cuales se pueden medir y estimar. Se plantean diferentes fenómenos y se pretende demostrar con métodos estadísticos los resultados de estos.

Por lo tanto, esta investigación tiene un enfoque cuantitativo ya que se pretende recolectar información y con esta misma corroborar la hipótesis que se planteó en un principio sobre el efecto de la eficacia de la piperina del *Piper nigrum* frente al *Staphylococcus aureus*.

Diseño

Hernández, Fernández y Baptista (2014), menciona que un diseño consiste en un plan para obtener información con el fin de responder al planteamiento del problema. En los diseños experimentales el autor plantea que se manipula intencionalmente las variables para analizar las consecuencias de esa acción.

El diseño de esta investigación es de tipo experimental, ya que se pretende evaluar la acción antibiótica del *piper nigrum* sobre el *Saureus*, lo que implica el análisis de varias variables y con esto medir el efecto de estas.

Instrumentos

Para la extracción de la piperina y la formulación de la forma farmacéutica se utilizan materiales y reactivos encontrados en los laboratorios de química de la Universidad Internacional de las Américas, además, para realizar las pruebas microbiológicas se utilizan los materiales y reactivos del laboratorio Microlabs.

El material vegetal utilizado fue obtenido en una finca en Sarapiquí, Heredia. Dicho material es distribuido por una pequeña empresa local.

Equipo y materiales para extracción de pimienta negra por maceración.

- Beakers de 100mL, 200mL y 500ml
- Pastilla de agitación
- Espátula metálica
- Etanol absoluto.
- Hidróxido de potasio
- Mortero

Método para la extracción de pimienta negra por maceración.

Se procedió a morterizar 50g del material vegetal y este se sumergió en 300ml de etanol absoluto, el cual se mantuvo en agitación durante 5 horas seguidas y luego se dejó reposar durante 24horas. Después de un día en el proceso se procede a filtrar y luego a concentrar en un baño de agua a 100 rpm y con una temperatura de 78°C .Una vez concentrado el extracto se procede a mezclar con un gramo de hidróxido de potasio y pequeñas cantidades de agua hasta que toda la solución se torne color crema, esta solución se deja reposar por 24 horas en

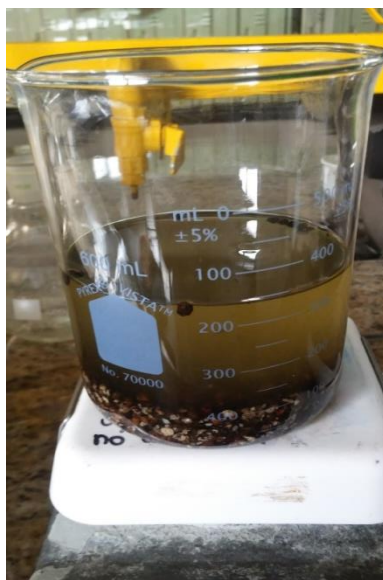
refrigeración y pasado este tiempo se filtra obteniendo una pasta la cual se diluye con la menor cantidad posible de etanol caliente para recristalizar.

Figura 19. Mortero con pimienta negra.



Fuente: Autora

Figura 20. Pimienta negra en maceración con etanol absoluto.



Fuente: Autora.

Figura 21. Filtración con embudo de espiga.



Fuente: Autora.

Equipo y materiales para la destilación de pimienta negra con equipo Soxhlet.

- Balón de 500mL
- Mortero
- Calentador/ agitador
- Mangueras para conexiones
- Balanza
- Espátula metálica
- Pizeta
- Soportes

- Prensas universales
- Condensador para la destilación
- Beakers de 100mL, 200mL y 500mL
- Probeta de 50mL
- Embudo de separación 500ml
- Papel filtro
- Embudo de espiga
- Equipo Soxhlet
- Gaza
- Pimienta negra : 50g
- Etanol absoluto

Método para la destilación de la pimienta negra por equipo Soxhlet.

Se colocaron 50 gramos del fruto seco y morterizado de piper nigrum envuelto en una gaza, esto se introdujo dentro del cartucho del equipo, luego en un balón de 500 ml limpio y seco se agrega aproximadamente 300ml de etanol absoluto.

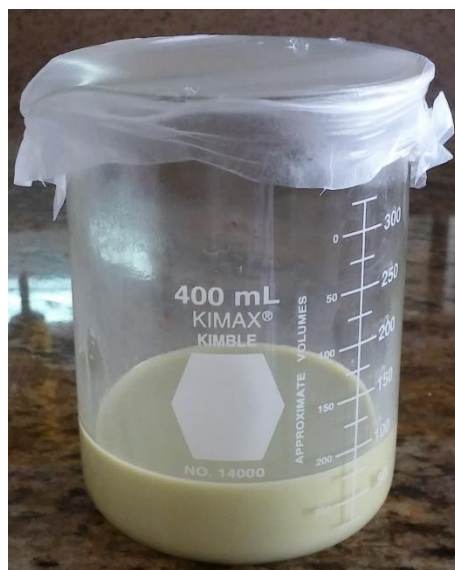
Posteriormente se procede a armar el sistema de destilación y a refluja durante 5h, seguido de filtrar el extracto obtenido y se repite el procedimiento que se utilizó en la maceración desde la filtración hasta la recristalización.

Figura 22. Equipo de extracción Soxhlet.



Fuente: Autora.

Figura 23. Extracto con KOH y agua.



Fuente: Autora.

Prueba de identificación de alcaloides en la pimienta negra.

Esta prueba consiste en evaluar la presencia de la piperina, ya que esta es la molécula a la cual se le atribuye la propiedad de antimicrobiano.

Equipo y materiales para prueba de identificación de alcaloides.

- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Goteros
- Reactivo Dragendorff
- Extracto de pimienta negra.

Método para análisis cualitativo de presencia de compuestos alcaloides en lapimienta negra.

En un beaker se coloca 10ml de HCl 5% a 60°C junto con una punta de espátula de los cristales de piperina y se coloca en un tubo de ensayo junto con 2 gotas de reactivo de Dragendorff. La prueba es positiva cuando se forma un precipitado de color anaranjado o rojizo. .

Equipo y materiales para cromatografía por capa fina.

- Beaker 600ml
- Cámara de luz ultravioleta
- Placas de silica gel 60 F₂₅₄
- Capilares
- Cristales de piperina.
- Acetato de etilo

Método para análisis cualitativo con cromatografía de capa fina para la identificación de unidades aromáticas y / u otros sistemas insaturados.

En placas de silica gel 60 F₂₅₄ aluminio de 3cm X 8cm se coloca una muestra de piperina con un solvente de acetato de etilo como fase móvil, para observar el resultado se utiliza una lámpara UV a una longitud de onda de 365nm.

Figura 24. Cámara ultravioleta y material para la cromatografía por capa fina.



Fuente: Autora.

Equipo y materiales para espectroscopia UV

- Espectrofotómetro UV-Vis
- Gotero
- Balanza analítica
- Beaker 250ml microespatula

- Patrón de referencia de piperina
- Piperina obtenida
- Etanol absoluto
- Balones aforados de 50mL
- Pipeta de 1mL,2ml, 3mL,4ml y 5ml

Evaluación cualitativa y cuantitativa por espectroscopía UltravioletaVisible

Método para la determinación cuantitativa de piperina en la pimienta negra por espectroscopía ultravioleta

Preparación de la solución estándar y patrones de referencia

Se debe pesar 40mg del estándar de piperina en una balanza analítica, el cual se depositó en un balón aforado de 50mL. Se disuelve con etanol llevándolo hasta la marca de aforo con el mismo solvente. Seguidamente se pipeteó de la solución anterior 2mL y se depositó en otro balón aforado de 50mL, se llevó a marca de aforo y por último se etiqueta como solución madre (concentración 0,032mg/ml).

Posteriormente se toma con pipeta de la solución madre, 1mL y se depositó en balón aforado de 50mL. Este último proceso se repite con pipetas de 2, 3, 4 y 5mL respectivamente, de manera que se obtuvieron 5 soluciones patrón para realizar la curva de calibración y así calcular la ecuación de la recta.

Figura 25. Vial con estándar de piperina.



Fuente: Autora.

Figura 26. Balanza analítica con 40mg de estándar de piperina.



Fuente: Autora.

Figura 27. Espectrofotómetro UV, con soluciones patrón.



Fuente: Autora.

Preparación de la muestra para la determinación de piperina en la pimienta negra por espectroscopia ultravioleta

Se pesó 40mg de la piperina obtenida por maceración y este se deposita en un balón aforado de 10mL. Se disolvió con etanol y la solución se colocó 15min en ultrasónico, por último se aforó con el mismo disolvente.

De la solución anterior, se pipeteó exactamente 2mL y se depositó la cantidad tomada, a un balón aforado de 100mL. Se disolvió y aforo con etanol. Seguidamente se toma una última alícuota de 3ml en un balón de 100ml (0,0024mg/ml). Este procedimiento se realiza por triplicado y también con la piperina obtenida por el método de Soxhlet.

Figura 28. Equipo ultrasónico.



Fuente. Autora.

Determinación de la absorbancia de los patrones de referencia de piperina y la piperina obtenida por ambos métodos.

Para el análisis, se utiliza como longitud de onda 270nm y etanol como blanco. Luego se realizan lavados a la celda con el patrón 1 y se llenó con este mismo, por último se midió la absorbancia. De igual manera se realizó para los patrones restantes y las muestras de piperina obtenida.

Equipo y materiales para espectroscopia IR

- Microespátula
- Acetona
- Piperina obtenida por ambos métodos.

- Estándar de piperina.

Identificación de la piperina en el extracto de pimienta negra mediante espectroscopia infrarroja

Para dicho análisis se utilizó una sustancia patrón de piperina con una pureza de 98,0% y la piperina previamente obtenida por método de maceración y el método de Soxhlet; luego se procedió a colocar las muestras en el equipo infrarrojo de la Universidad Internacional de las Américas para obtener los espectros y poder comparar las señales obtenidas según los grupos funcionales presentes.

Figura 29. Equipo de lectura de espectroscopia IR.



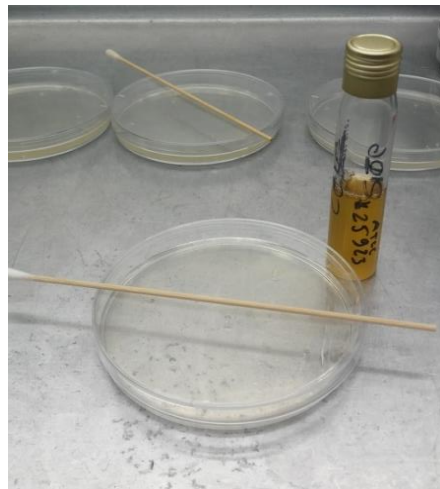
Fuente: Autora.

Evaluación de la capacidad inhibitoria de la piperina obtenida mediante la prueba de sensibilidad a antibióticos

Para evaluar la posible actividad de la piperina frente al *Staphylococcus aureus* se realizaron diluciones de la piperina obtenida por el método de maceración y seguidamente se formuló la crema con la que tiene mejor inhibición.

Las concentraciones realizadas fueron al 0.1, 0.5, 1 y 2% con aceite mineral como diluyente. Este análisis se realiza en el laboratorio Microlabs, en Guadalupe, en placas con el medio de cultivo Mueller-Hinton a las que se le realizaron agujeros donde se colocó 5µL las diluciones realizadas.

Figura 30. Medio de cultivo Mueller-Hinton y la sepa *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Autora.

Figura 31. Placas con una pipeta de 5microlitros.



Fuente: Autora.

Formulación de una crema con la piperina obtenida previamente

A partir de la piperina obtenida del material vegetal de la pimienta negra, se describe a continuación la formulación de una crema al 2% de la piperina obtenida.

Materiales y equipo necesario para la formulación de una crema al 2% de la piperina obtenida de pimienta negra.

Fase I

Alcohol cetílico 2,00g

Alcohol esteárico 7,00g

Aceite mineral liviano 20,00g

Fase II

Trietanolamina 2,00g

Glicerina 10,0g

Metilparabeno 0,15g

Propilparabeno 0,05g

Agua destilada csp 100g

Fase III

Piperina 2,00g

Dos calentadores-agitadores

Dos pastillas magnéticas

Dos termómetros

Espátula

Probeta

Dos beaker de 600ml

Método de preparación de la crema con la piperina obtenida.

Se procede inicialmente a fundir los ingredientes de la fase I, a una temperatura de 70°C en un beaker de 400ml, con una agitación constante junto con la fase III, luego disolver el propilparabeno y continuar calentando hasta una temperatura de 75°C durante 35 minutos. Al mismo tiempo calentar la fase II a 80°C y se mezcla por 30min.

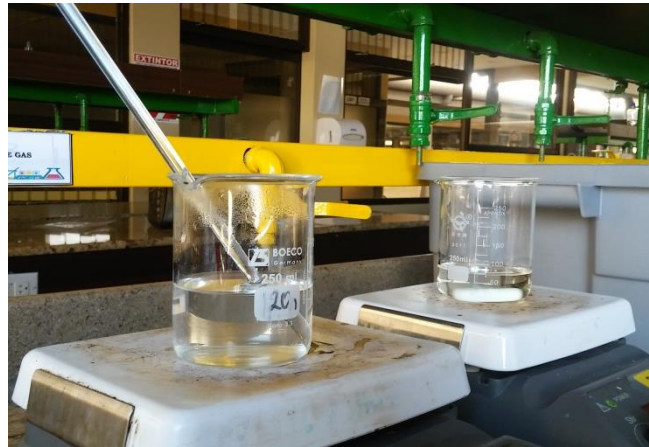
Se añade la fase I a la fase II con agitación constante, para formar la emulsión y se agita por 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se disminuye la temperatura entre 40 y 45°C.

Figura 32. Reactivos pesados en beakers de manera separada.



Fuente: Autora.

Figura 33. Fase I y II para la elaboración de la crema.

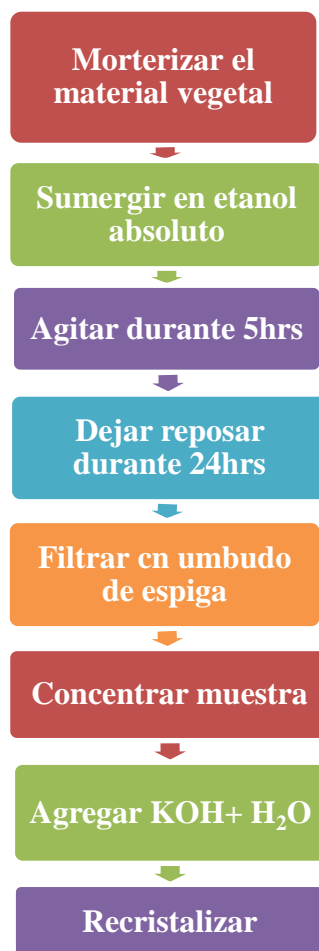


Fuente: Autora

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Obtención de piperina por el método de maceración.

Tabla 2. Proceso de extracción por maceración.



El método de extracción seleccionado es eficaz, ya que logra de una manera muy fácil arrastrar la piperina hacia el extracto obtenido. Pero el tiempo que se toma para realizar todo el proceso es bastante largo, ya que se inicia con 3 horas de agitación, seguidas de 24 horas de reposo, luego por el filtrado, concentrar el extracto, alcalinizar y por último por una recristalización.

Cabe destacar que con este método no se empleó calor, la maceración fue de tipo dinámica continua por las primeras 5 horas y por las últimas 24 horas fue maceración de tipo estática, lo que es beneficioso para que la muestra no se afecte por un proceso de oxidación o de una transformación de la molécula deseada siendo esta la piperina en otra no deseada.

De esta extracción se obtuvo una solución de aspecto verde musgo y líquida inmediatamente al momento que se sumergió en el etanol, el cual después de las 24 horas se tornó mucho más oscuro con olor leñoso, picante; características que se agudizaron al concentrar la muestra y la solución se tornó más viscosa hasta que con el tiempo llegó a ser un sólido. Lo que concuerda con Tenorio (2007), que describe "el aroma como fresco, seco, leñoso y picante, con una textura líquida móvil que se pone más viscosa con el tiempo".(p.56).

El extracto obtenido fue de 250ml de los cuales al momento de concentrar la muestra se convirtieron en 6ml de oleoresina, los que se solidificaron y pesaron 7g, esta muestra fue recristalizada donde se obtuvo un peso de 4g de cristales de piperina.

Tabla 3. Resumen de las características organolépticas del extracto obtenido por método de maceración.

Olor	leñoso, picante
Color	Verde musgo
Textura	Muy viscosa

Tabla 4. Resumen de los extractos obtenidos por el método de maceración,

Volumen inicial	250ml
Volumen final	6ml
Peso de la oleorresina	7g
Peso cristales de piperina	4g

Figura 34. Piperina obtenida por el método de maceración.

Fuente: Autora.

Con los valores de la tabla 4, se calculó el porcentaje de rendimiento de la piperina en la pimienta y de esta misma en la oleorresina. Según los valores teóricos que establece Cano, T, Chávez, B, Godínez, J y Monzón, D (2002), el porcentaje de piperina en la pimienta negra es de 2-9% y el de piperina en la oleorresina es de 53-57%, lo cual al calcular ambos porcentajes se

obtuvo para la muestra un porcentaje de piperina en la pimienta de 8% y de piperina en la oleorresina se obtuvo un 57%.

Figura 35. Cálculos de porcentajes de rendimiento de piperina obtenida por método de maceración.

Porcentaje de piperina en la muestra de pimienta negra para el método de maceración.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso de la piperina obtenida (g)}}{\text{peso de la muestra de pimienta (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{4 (g)}{50(g)} \times 100 = 8\%$$

Porcentaje de piperina en la oleorresina para el método de maceración.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso de la piperina obtenida (g)}}{\text{peso de la oleorresina (g)}} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{4 (g)}{7(g)} \times 100 = 57\%$$

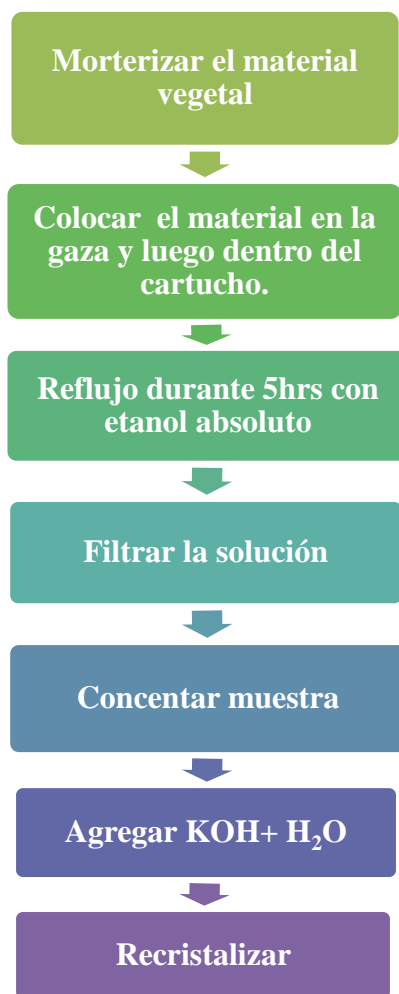
Fuente: Autora

Tabla 5. Resumen de porcentajes de rendimiento de la piperina obtenida por método de maceración.

Muestra	Porcentaje obtenido (%)
Piperina en la pimienta negra	8
Piperina en la oleorresina	57

Obtención de piperina por el método de Soxhlet

Tabla 6. Proceso de extracción con equipo Soxhlet.



La extracción con el equipo Soxhlet es un procedimiento que cumple con la mayoría de los parámetros de un método de extracción óptimo según Gorgani, Mohammadi, Najafpour y Nikzad (2017), los cuales son que este debe de ser fácil de entender, debe ser simple al utilizarlo y barato, tanto el equipo como los reactivos a utilizar. Pero su mayor desventaja es que el tiempo de extracción es muy lento.

Con el equipo utilizado no es necesario realizar una filtración al finalizar el proceso, sin embargo para asegurar que no quede ninguna partícula de la pimienta por el proceso inicial de morterizado se decidió filtrar todo el contenido y luego guardarlo en un envase de vidrio color ámbar para que la molécula no se isomerice.

El extracto obtenido fue de 280ml los cuales al momento de concentrar la muestra se convirtieron en 5ml de oleoresina, estos se cristalizaron y pesaron 6g. Una vez que se cristalizó la muestra fue recristalizada y se obtuvo un peso de 3g de cristales de piperina.

Tabla 7. Resumen de los extractos obtenidos por el método Soxhlet.

Volumen inicial	280ml
Volumen final	5ml
Peso de la oleoresina	6g
Peso cristales de piperina	3g

Gracias a los datos de la tabla 7 se calculó el rendimiento de la piperina en la pimienta y de esta misma en la oleoresina. lo cual al calcular ambos porcentajes se obtuvo para la muestra un porcentaje de piperina en la pimienta de 6 % y de piperina en la oleoresina se obtuvo un 50%.

Figura 36. Cálculos de porcentajes de rendimiento de la piperina obtenida por método de Soxhlet.

Porcentaje de piperina en la muestra de pimienta negra para el método de Soxhlet.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso de la piperina obtenida (g)}}{\text{peso de la muestra de pimienta(g)}} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{3 \text{ (g)}}{50 \text{ (g)}} \times 100 = 6\%$$

Porcentaje de piperina en la oleorresina para el método de Soxhlet.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso de la piperina obtenida (g)}}{\text{peso de la oleorresina(g)}} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{3 \text{ (g)}}{6 \text{ (g)}} \times 100 = 50\%$$

Fuente: Autora.

Tabla 8. Resumen de porcentajes de rendimiento de la piperina obtenida por el método de Soxhlet.

Muestra	Porcentaje obtenido (%)
Piperina en la pimienta negra	6
Piperina en la oleorresina	50

Prueba de identificación de alcaloides.

Figura 37. Prueba positiva para la identificación de alcaloides en pimienta negra.



Fuente: Autora.

Esta prueba de identificación de alcaloides consistió en añadir el reactivo de dragendorff a la piperina obtenida, primeramente acidificando el medio con ácido clorhídrico y con esto se forma una sal doble lo que se manifiesta como un cambio de coloración. Como se puede observar en la figura 37 al añadir una punta de espátula de piperina junto con el HCl en caliente y por último el reactivo de dragendorff se produjo un precipitado de una coloración de tonalidad

anaranjada lo que se puede describir como positiva y confirma la presencia de alcaloides en la piperina extraída.

Prueba de identificación con Cromatografía por capa fina.

Figura 38. Cromatografía por capa fina por método de Soxhlet.



Fuente: Autora.

Figura 39. Cromatografía por capa por método de maceración.



Fuente: Autora.

La prueba de cromatografía se realizó con la finalidad de calcular el valor de R_f de las muestras, para esto las placas se corrieron utilizando como fase móvil el acetato de etilo y se observaron con una lámpara UV a una longitud de onda de 365nm, las muestras expusieron una fluorescencia azul la cual al realizar los cálculos correspondientes los valores obtenidos fueron de 0,38 para el método de Soxhlet y 0,35 para el método de maceración, esto comparado con los datos teóricos descritos en la literatura por Reshmi, Sathya y Suganya(2010), el cual ubica la piperina entre el 0,35-0,41.

Figura 40. Cálculo de la relación de frentes de las muestras.

$$R_f = \frac{\text{distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{\text{distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$$

$$R_f \text{ Soxhlet} = \frac{2,3\text{cm}}{6\text{cm}} = 0,38$$

$$R_f \text{ maceración} = \frac{2,1\text{cm}}{6\text{cm}} = 0,35$$

Fuente: Autora.

Tabla 9. Resumen de los cálculos R_f

Muestra obtenida por maceración	0,35
Muestra obtenida por Soxhlet	0,38

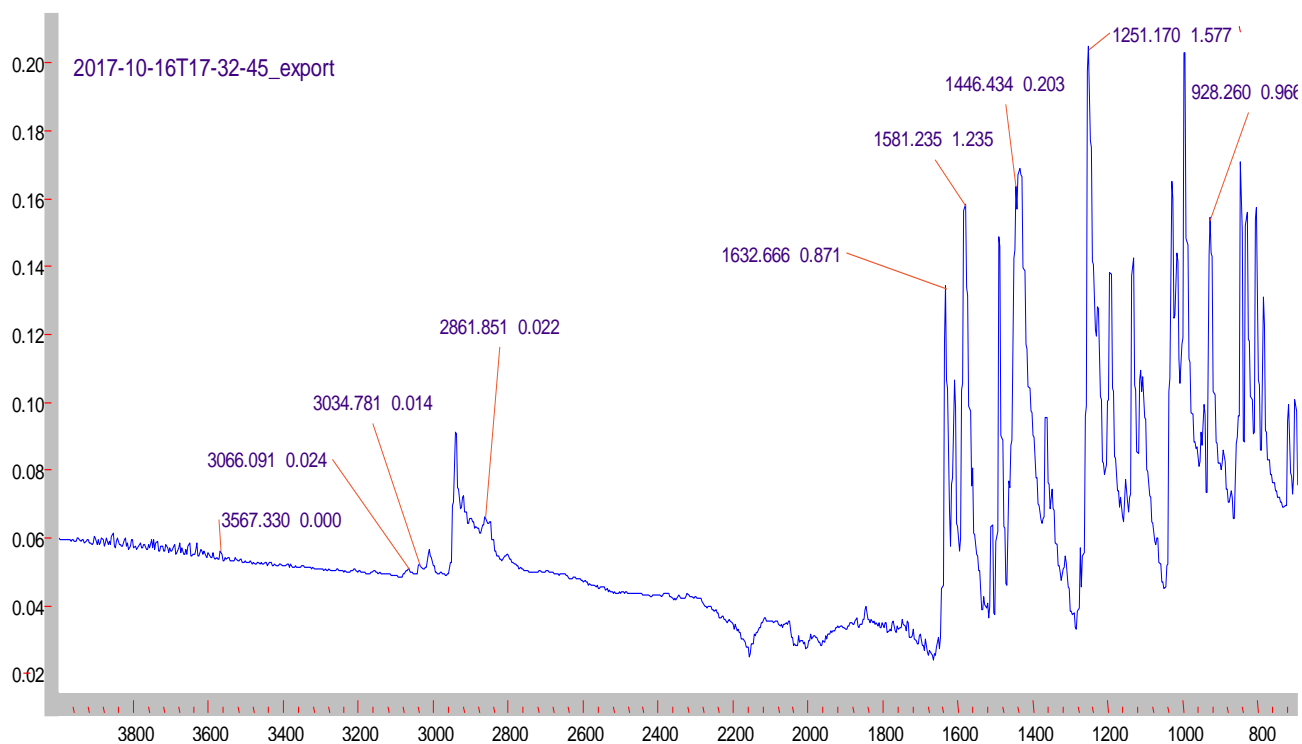
Identificación de la piperina obtenida de la pimienta negra mediante espectroscopia infrarroja.

Figura 41. Estructura 3D de piperina.



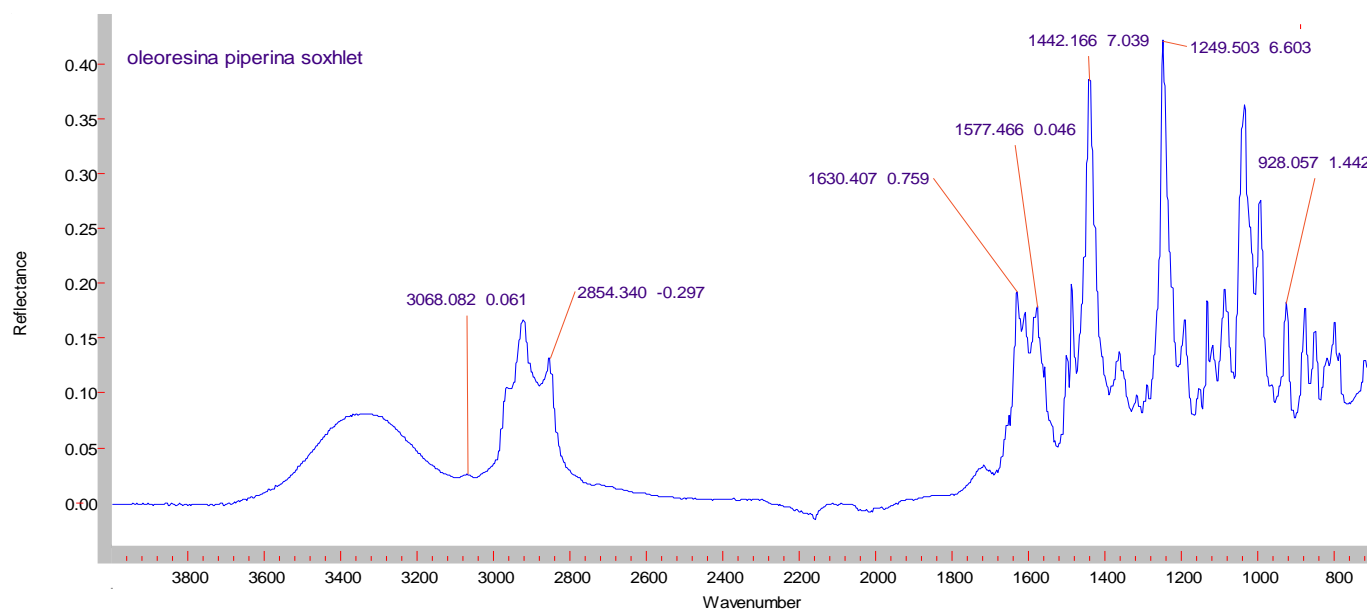
Fuente: PubChem.

Figura 42. Espectro infrarrojo obtenido del estándar de piperina.



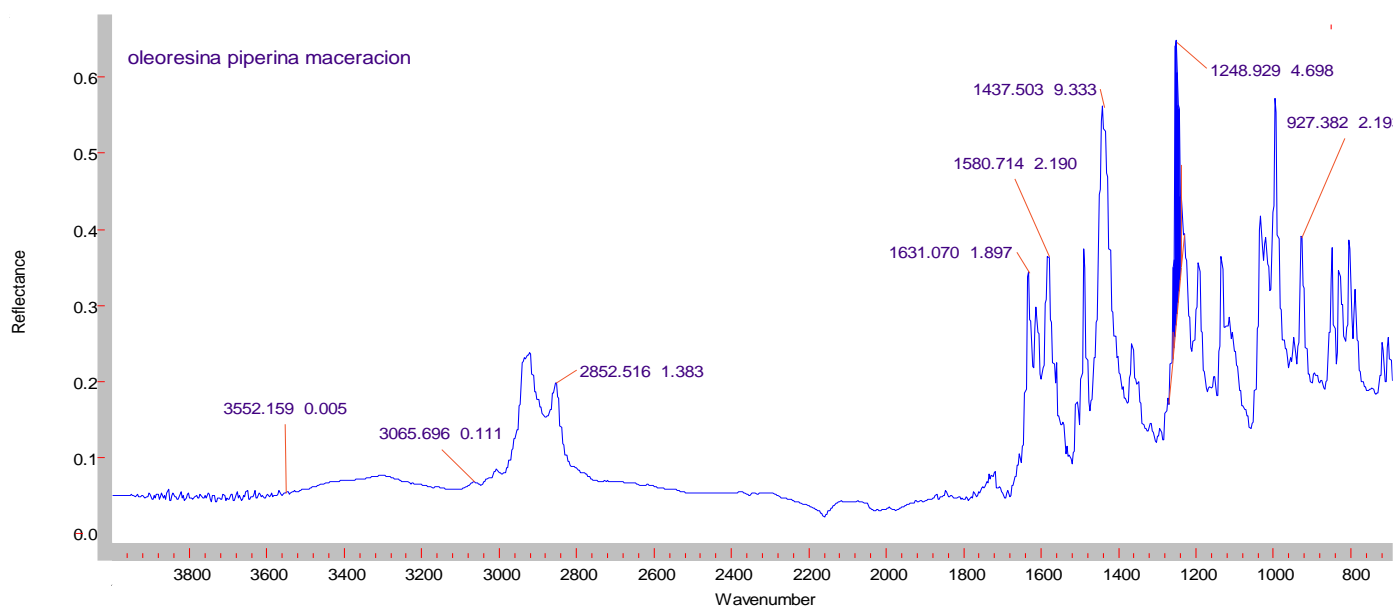
Fuente: Autora.

Figura 43. Espectro infrarrojo de la piperina obtenida por el método de Soxhlet.



Fuente: Autora.

Figura 44. Espectro infrarrojo de la piperina obtenida por método de maceración.



Fuente: Autora.

Con base en las figuras anteriores obtenidas por el equipo infrarrojo de la Universidad Internacional de las Americas se elaboró la tabla 10, en donde se enlista las señales detectadas y se organizó estas dentro del rango de posiciones teóricas de bandas que establece McMurry(2004), para identificar el grupo funcional al cual corresponde dichas señales.

Tabla 10. Señales obtenidas en los espectros infrarrojos del estándar de piperina y la piperina obtenida por los métodos elegidos.

Tipo de grupo funcional	Posición teórica de la banda (cm^{-1})	Señal detectada (cm^{-1})			Intensidad de absorción
		Patron	Soxhlet	Maceración	
Alcano C-H	2.850-2.970	2 861,851	2854,340	2852,516	Fuerte
	1.340-1.470	1446,434	1442,166	1437,503	Fuerte
Alqueno C-H. -C=C-H-	3.010-3.095	3034,481	-	3065,695	Media
	675-995	928,260	928,057	927,382	Fuerte
Anillos aromaticos C-H	3.010-3.100	3066,09	3068,082	3065,695	Media
	690-900				Fuerte

Alquenos C=C	1.610- 1.680	1632,66	1630,407	1631,070	Variable
Anillos aromaticos C=C	1.500-1.600	1581,235	1577,466	1580,714	Variable
Amidas N-H	3.300-3.500	3567,330	-	3567,043	Media
C-O Sp ²	1200	1251,170	1249,503	1248,928	Medio

Observando las figura 42,43 ,44 y la tabla 10 se puede evidenciar que los 3 espectros IR contienen señales que coinciden entre sí, esto se da porque el componente a evaluar, en este caso la piperina obtenida por ambos métodos y esta misma fue el patrón de referencia con la que se realizó la comparación.

Según el orden de la tabla anterior la primera señal a mencionar es la de los alcanos(C-H), la cual según McMurry(2004), se puede encontrar entre $2.850-2.970\text{ cm}^{-1}$ para las señales de vibración de tensión y entre $1.340-1.470\text{ cm}^{-1}$ para las señales de vibración de flexión. Para el patrón se obtuvo $2\ 861,851\text{ cm}^{-1}$ y $1\ 446,434\text{ cm}^{-1}$, en la piperina obtenida por el método de

Soxhlet $2854,340\text{ cm}^{-1}$ y $1442,166\text{ cm}^{-1}$ y por último para la piperina obtenida por el método de maceración se observó a $2852,516\text{ cm}^{-1}$ y $1437,503\text{ cm}^{-1}$ respectivamente en todos los datos, los cuales son característicos de las señales de enlaces sp^3 que se encuentran en el ciclo de la amida de la piperina.

Luego la señal para los alquenos (C-H) según la teoría se encuentra entre $3.010\text{-}3.095\text{cm}^{-1}$ y $675\text{-}995\text{ cm}^{-1}$ para los enlaces de tipo sp^2 los cuales están presentes en la molécula de la piperina. Las señales correspondientes para el patrón son de $3034,481\text{cm}^{-1}$ y $928,260\text{ cm}^{-1}$, en la piperina obtenida por el método de Soxhlet se obtuvo solo una señal de flexión a los $928,057\text{ cm}^{-1}$ y para la piperina obtenida por el método de maceración se observó a $3065,695\text{ cm}^{-1}$ y $927,382\text{ cm}^{-1}$.

De manera similar se encuentran las señales del anillo aromático (C-H), surgiendo entre $3.010\text{-}3.100\text{ cm}^{-1}$ y $675\text{-}995\text{ cm}^{-1}$, rango similar al de los alquenos ya que, estos también tienen una hibridación sp^2 . Por lo tanto, las señales adquiridas para el patrón fueron de $3066,09\text{ cm}^{-1}$, en la piperina conseguida por el método de Soxhlet fue de $3068,082\text{ cm}^{-1}$ y para la piperina lograda por el método de maceración se manifestó a los $3065,695\text{ cm}^{-1}$, estas señales son características del benceno presente en la molécula de piperina.

Además, se detectó una señal para el patrón a $1632,66\text{ cm}^{-1}$, para la piperina lograda por Soxhlet en $1630,407\text{ cm}^{-1}$ y para la piperina conseguida por el método de maceración es de $1631,070\text{ cm}^{-1}$, estas señales son características de los alquenos y corresponden al movimiento vibracional de flexión del enlace carbono-carbono con hibridación sp^2 , las cuales se encuentran teóricamente entre $1.610\text{-}1.680\text{ cm}^{-1}$ por lo tanto se identifica el alqueno en la molécula de la piperina.

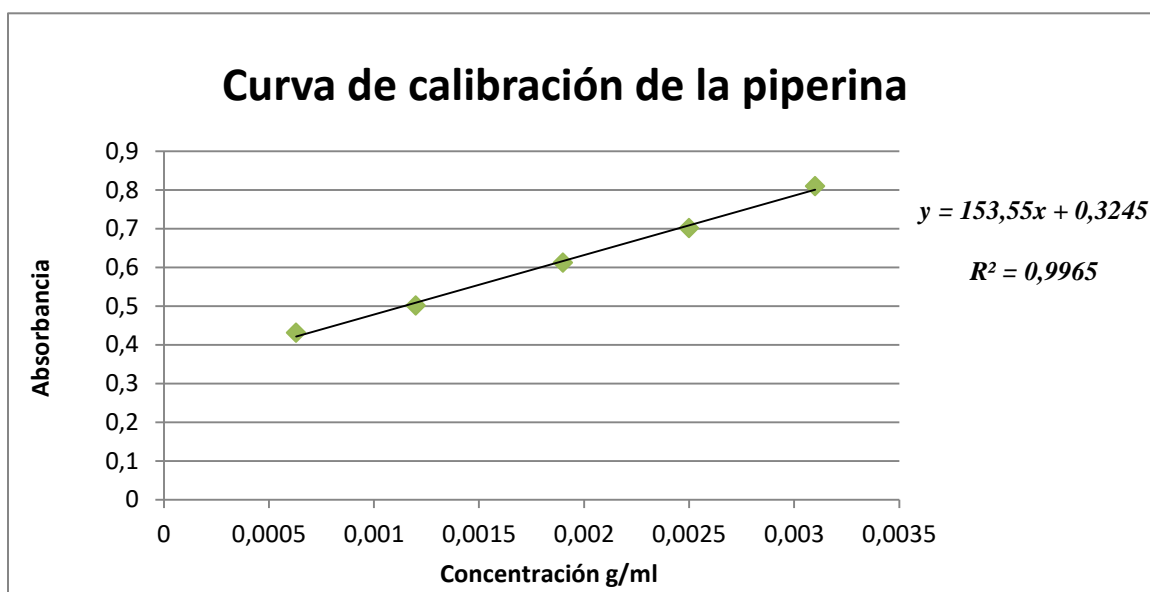
Otra de las señales detectada en los tres espectros fue la de C=C de anillos aromáticos, enlaces que tienen hibridación sp^2 , los cuales teóricamente se encuentra entre 1.500-1.600 cm^{-1} . Los datos que se mostraron para el patron fue de 1581,235 cm^{-1} , para el Soxhlet fue de 1577,466 cm^{-1} y por último la señal de la maceración fue de 1580,714 cm^{-1} , los cuales coinciden con los reseñas establecidos para este tipo de señal, afirmando la presencia de un anillo aromático dentro de las muestras.

Cabe destacar que tambien se detectaron señales para cada espectro entre el rango 3.300-3.500 cm^{-1} , las cuales son características para el grupo amida(N-H), estas señales fueron para el patron a 3567,330 cm^{-1} , para la muestra de Soxhlet no se observó señal ya que en rango donde esta debe aparecer se tiene una banda ancha e intensa característica de los alcoholes la cual aparece entre 3400 y 3650 cm^{-1} , por lo tanto, esta se puede atribuir a residuos de etanol en la muestra y por último la banda de absorción para la muestra obtenida por el método de maceración fue de 3567,043 cm^{-1} .

Como última banda a mencionar en la tabla se encuentra el enlace Carbono-Oxigeno con hibridación sp^2 , esta señal aparece típicamente a los 1200 cm^{-1} , en el caso de la piperina se tiene dos oxígenos dentro de un ciclo los cuales están enlazados al benceno. La banda correspondiente para el patron se encuentra a 1251,170 cm^{-1} , en el caso de la muestra obtenida por Soxhlet se presentó a 1249,503 cm^{-1} y la muestra alcanzada por maceración se logró a los 1248,928 cm^{-1} .

Método para la determinación cuantitativa de piperina en el extracto de pimienta negra por espectroscopia ultravioleta.

Figura 45. Curva de calibración de la piperina determinada por espectroscopia ultravioleta a una longitud de onda de 270nm.



Fuente: Autora.

Tabla 11. Coeficiente de correlación, pendiente e intersección de la curva de calibración de la piperina obtenida por espectroscopia ultravioleta a 270nm.

R	0,9965
m	153,55
b	0,3245

El cuadro muestra los resultados obtenidos de la curva de calibración de la piperina analizada a 270 nm, en donde se obtuvo entre los datos, un coeficiente de correlación de 0.9965, el cual se puede considerar como un valor que indica una linealidad de los datos alta.

El valor de linealidad permite determinar la confianza que se puede tener cuantitativamente de la cantidad de piperina presente en la muestra obtenida de pimienta negra y con esto se procede a calcular la concentración que se tiene en cada muestra.

Tabla 12. Concentración de los patrones de referencia, junto con sus absorbancias.

Patrón	Concentración (mg/ml)	Absorbancia
1	$6,30 \times 10^{-4}$	0,431
2	$1,20 \times 10^{-3}$	0,501
3	$1,90 \times 10^{-3}$	0,612
4	$2,50 \times 10^{-3}$	0,701
5	$3,10 \times 10^{-3}$	0,810

Figura 46. Cálculos para la cuantificación de la piperina por espectroscopia.

Pureza del estándar: 98,0%

$$\text{Factor de dilución} = \frac{50}{2} \times 50 = 1250 \text{ ml}$$

$$\text{Concentración de Solución madre} = \frac{0,04 \text{ g} \times 980 \text{ mg/g}}{1250 \text{ ml}} = 3,1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración patron 1: } 3,1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} \times \frac{1 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 6,3 \times 10^{-4} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración patron 2: } 3,1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} \times \frac{2 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración patron 3: } 3,1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} \times \frac{3 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración patron 4: } 3,1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} \times \frac{4 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración patron 5: } 3,1 \times 10^{-2} \text{ mg/ml} \times \frac{5 \text{ ml}}{50 \text{ ml}} = 3,1 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

Fuente: Autora.

Tabla 13. Concentración y absorbancias de las muestras de piperina obtenidas por método de maceración.

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia
1	$2,28 \times 10^{-3}$	0,6741
2	$2,22 \times 10^{-3}$	0,6649
3	$2,34 \times 10^{-3}$	0,6833

Figura 47. Cálculo de la concentración de las muestras diluidas de piperina obtenida por método de maceración.

$$y = mx + b$$

$$y = 153,55(x) + 0,3245$$

$$\text{Concentración} = \frac{y - 0,3245}{153,33} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración muestra 1} = \frac{0,6741 - 0,3245}{153,33} = 2,28 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración muestra 2} = \frac{0,6649 - 0,3245}{153,33} = 2,22 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración muestra 3} = \frac{0,6833 - 0,3245}{153,33} = 2,34 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

Fuente: Autora.

Tabla 14. Concentración y porcentaje masa/masa de las muestras de piperina obtenida por el método de maceración.

Muestra	Concentración(mg/mL) de muestra diluida	%m/m de piperina
1	$2,28 \times 10^{-3}$	95
2	$2,22 \times 10^{-3}$	92,5
3	$2,34 \times 10^{-3}$	97,5

Promedio	$2,28 \times 10^{-3}$	95
-----------------	-----------------------	----

Figura 48. Cálculo del porcentaje masa/masa de piperina obtenida por método de maceración.

$$\% m/m = \frac{\text{concentración muestra} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times \text{Factor de dilución} (ml)}{\text{masa muestra} (mg)} \times 100$$

$$\% m/m \text{ Muestra 1} = \frac{2,28 \times 10^{-3} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times 10ml \times \frac{100ml}{2ml} \times \frac{100ml}{3ml}}{40 mg} \times 100 = 95,0\%$$

$$\% m/m \text{ Muestra 2} = \frac{2,22 \times 10^{-3} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times 10ml \times \frac{100ml}{2ml} \times \frac{100ml}{3ml}}{40 mg} \times 100 = 92,5\%$$

$$\% m/m \text{ Muestra 3} = \frac{2,34 \times 10^{-3} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times 10ml \times \frac{100ml}{2ml} \times \frac{100ml}{3ml}}{40 mg} \times 100 = 97,5\%$$

Fuente: Autora

Tabla 15. Concentración y absorbancia de las muestras de piperina obtenida por método de Soxhlet.

Muestra	Concentracion (mg/ml)	Absorbancia
1	$2,04 \times 10^{-3}$	0,6373
2	$2,10 \times 10^{-3}$	0,6465
3	$2,10 \times 10^{-3}$	0,6465

Figura 49. Calculo de la concentración de las muestras diluidas de piperina obtenida por método de Soxhlet

$$y = mx + b$$

$$y = 153,55(x) + 0,3245$$

$$\text{Concentración} = \frac{y - 0,3245}{153,33} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración muestra 1} = \frac{0,6373 - 0,3245}{153,33} = 2,04 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración muestra 2} = \frac{0,6465 - 0,3245}{153,33} = 2,10 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Concentración muestra 3} = \frac{0,6465 - 0,3245}{153,33} = 2,10 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$$

Fuente: Autora.

Tabla 16. Concentración y porcentaje masa/masa de las muestras de piperina obtenida por el método de Soxhlet.

Muestra	Concentración(mg/mL) de muestra diluida	%m/m de piperina
1	$2,04 \times 10^{-3}$	85
2	$2,10 \times 10^{-3}$	87,5
3	$2,10 \times 10^{-3}$	87,5
Promedio	$2,10 \times 10^{-3}$	87,5

Figura 50. Cálculo del porcentaje masa/masa de piperina obtenida por método de Soxhlet.

$$\% m/m = \frac{\text{concentración muestra} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times \text{Factor de dilución} (ml)}{\text{masa muestra} (mg)} \times 100$$

$$\% m/m \text{ Muestra 1} = \frac{2,04 \times 10^{-3} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times 10ml \times \frac{100ml}{2ml} \times \frac{100ml}{3ml}}{40 mg} \times 100 = 85,0\%$$

$$\% m/m \text{ Muestra 2} = \frac{2,10 \times 10^{-3} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times 10ml \times \frac{100ml}{2ml} \times \frac{100ml}{3ml}}{40 mg} \times 100 = 87,5\%$$

$$\% m/m \text{ Muestra 3} = \frac{2,10 \times 10^{-3} \left(\frac{mg}{ml} \right) \times 10ml \times \frac{100ml}{2ml} \times \frac{100ml}{3ml}}{40 mg} \times 100 = 87,5\%$$

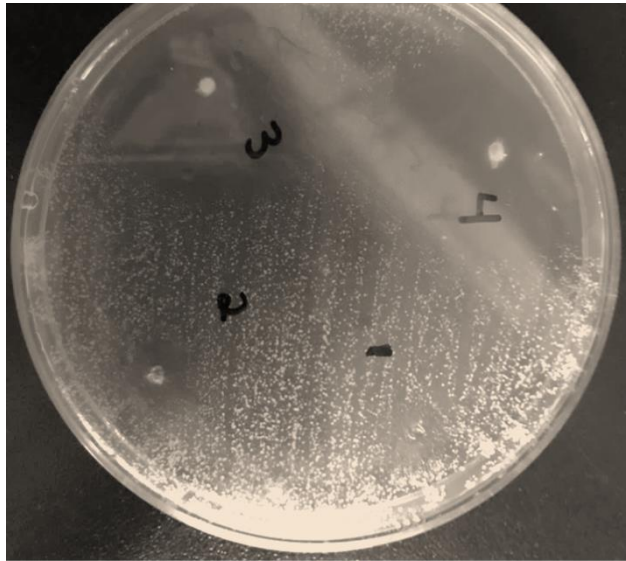
Fuente: Autora.

Con la curva de calibración se logró calcular la concentración de las muestras de piperina obtenidas por el método de maceración y por el de Soxhlet, una vez que se obtuvieron se procedió a calcular el porcentaje masa/masa de cada muestra y luego su promedio el cual fue de 95% para la maceración y 87,5% para Soxhlet. Información que es útil para realizar la crema con la piperina que sea pertinente.

Evaluación de la capacidad inhibitoria de la piperina obtenida del piper nigrum mediante un antibiograma o prueba de sensibilidad a antibióticos (PSA).

Para lograr evaluar la actividad de la piperina obtenida por el método elegido se procedió a realizar una prueba de sensibilidad antibiótica contra *Staphylococcus aureus* en medio de cultivo Muller-Hinton. Se realizaron diferentes diluciones de la piperina para obtener un aproximado del máximo y mínimo halo inhibitorio y con esto realizar la formulación de uso tópico, al cual de igual manera se le realizó una PSA para observar su efectividad dentro de la formulación.

Figura 51. Halos de inhibición obtenidos en un medio de cultivo Mueller-Hinton con las diluciones de piperina.



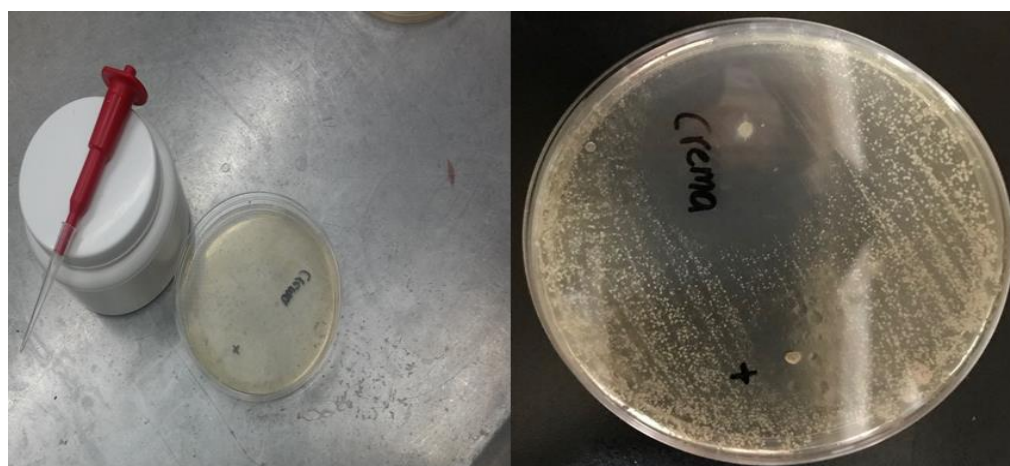
Fuente: Autora.

Tabla 17. Medida de los halos de inhibición obtenidos en medio de cultivo Mueller-Hinton con cada dilución de pimienta negra.

Muestra	Medida del halo de inhibición ($\pm 0,5$ mm)
1	0
2	5
3	15
4	20

Como se puede observar en la figura 51 y en la tabla 17, la piperina obtenida por el método de maceración obtuvo un halo mínimo inhibitorio de 5mm con una dilución a una concentración de 0,5% y un halo máximo de inhibición de 20mm con la dilución a 2% por lo que se puede afirmar que las bacterias de *Staphylococcus aureus* cultivadas en el medio de cultivo Mueller-Hinton son sensibles a la piperina obtenida por el método de maceración.

Figura 52. Halos de inhibición obtenidos en un medio de cultivo Mueller-Hinton con la crema realizada al 2%.



Fuente: Autora.

Tabla 18. Medida de los halos de inhibición formados con la crema elaborada y el control positivo.

Muestra	Medida del halo de inhibición ($\pm 0,5$ mm)
Control positivo	10
Crema al 2%	23

En la figura 52 se puede observar como la crema formulada al 2% con la piperina obtenida por el método de maceración tiene efecto inhibitorio aun dentro de la forma farmacéutica. Esta se comparó con un control positivo otorgado por el laboratorio Microlabs, con este se observó en halo inhibitorio de ambas formulaciones, donde el control positivo tuvo un halo de inhibición de 10mm y la crema al 2% tuvo uno de 23mm.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta la actividad antibiótica estudiada en el marco teórico y los resultados obtenidos de las pruebas realizadas, la piperina puede ser una excelente alternativa de antibiótico contra el *Staphylococcus aureus*. Al evaluar la crema elaborada con la piperina obtenida resultó de manera positiva inhibiendo con un halo de 23mm, lo que nos muestra que la piperina inhibe de igual manera dentro de la formulación realizada.

Al extraer piperina de la pimienta negra por ambos métodos seleccionados, siendo estos la maceración y el equipo de Soxhlet, se obtuvo mayor rendimiento con el método de maceración siendo este de un 8% de piperina en la muestra total de pimienta negra y 57% de piperina en la oleorresina de este mismo procedimiento. Ambos métodos fueron eficaces para obtener la molécula anteriormente mencionada, pero la maceración al no utilizar temperatura protege a la molécula de degradarse lo cual puede aumentar el rendimiento.

La crema elaborada se realizó con los cristales obtenidos por el método de maceración ya que estos tuvieron desde un principio un mayor rendimiento que los cristales obtenidos por el método de Soxhlet y al realizar las demás pruebas en específico la de espectroscopia ultravioleta-visible, estos mismos tuvieron mayor pureza, por lo cual al utilizar este método se asegura tanto pureza como mayor rendimiento en los cristales a obtener.

Gracias a la prueba de identificación por espectroscopia ultravioleta-visible se determinó la cantidad de piperina pura que se encontraba en los cristales de piperina obtenidos por los métodos seleccionados, los cálculos de esta prueba definieron la utilización de los cristales obtenidos por el método de maceración para la elaboración de la crema, los cuales al cuantificarse tuvieron un promedio de 95% m/m, ya que con la misma cantidad de material vegetal, solvente y sin utilización de equipo elaborado ni temperatura se obtuvo mayor cantidad de cristales de piperina.

Con base a los resultados de la espectroscopia infrarrojo con se observaron los grupos funcionales principales que identifican a la molécula de piperina obtenida por ambos métodos utilizados comparando contra un estándar de piperina con una pureza de 98,0%, estos grupos que se identificaron fueron: anillo aromático, el enlace carbono- oxígeno, enlace doble de alquenos, enlace carbono- carbono del ciclo existente y el enlace nitrógeno-hidrogeno de la amida existente.

Los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad de antibióticos contra *Staphylococcus aureus* fueron positivos tanto en la piperina como tal como de esta dentro de la formulación elaborada, obteniendo de las diluciones utilizadas un halo de inhibición máximo de 20mm para la dilución de concentración al 2% y un halo de inhibición mínimo de 5mm para una

concentración de 0,5%, lo que demuestra la existencia de la sensibilidad de dicha bacteria en contacto con la piperina.

La piperina es el principal alcaloide de la pimienta negra la cual tiene como grupo funcional de una amida cíclica, a esta molécula se le realizó la prueba de Dragendorff la cual resultó positiva mostrando un precipitado de coloración naranja comprobando la presencia de un alcaloide en los cristales obtenidos por ambos métodos.

Con la prueba de cromatografía por capa fina se logró calcular el valor de R_f de las muestras obtenidas por ambos metodos utilizados, donde según los datos obtenidos a una longitud de onda de 365nm , fueron de 0,38 para el metodo de soxhlet y 0,35 para el metodo de maceración,antecedentes que según Reshmi, Sathya y Suganya(2010) ubican a estas dentro del rango en que se puede encontrar la piperina el cual es de 0,35-0,41.

Recomendaciones

Realizar la destilación con el equipo Soxhlet, además, es recomendable no calentar directamente la muestra y no sobrecalentar esta misma para que esta no sufra cambios en general.

Envolver el equipo con papel aluminio o algún material que proteja el extracto de la luz para que este no tenga una isomerización. Esto cuando se realice el procedimiento de maceración y utilizar el equipo Soxhlet

Utilizar el equipo de Rotavapor o destilación simple, cuando se evapore el etanol, para evitar sobre calentar la muestra y que no sufra ningún tipo de degradación.

Para ayudar el proceso de formar el precipitado se deja reposar en una refrigeradora el extracto cuando a este se le agrega el hidróxido de potasio junto con el agua durante un día mínimo. Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente y una vez que los cristales se han empezado a formar se puede introducir en el refrigerador para mejorar el rendimiento. Esto al momento de la recristalización.

Realizarle pruebas a la crema formulada para verificar que cumple con estándares de USP, por ejemplo la estabilidad de activos, consistencia, extensibilidad, pérdida de agua y componentes volátiles, distribución de tamaño, contaminaciones y otros.

Probar la formulación en voluntarios para verificar tanto su utilidad como propiedades organolépticas de esta misma, siendo estas olor, color, textura.

Realizar los métodos seleccionados con otros solventes para observar la diferencia en la extracción de la piperina con solventes de distintas polaridades, por ejemplo cloroformo, hexano, isopropanol, dicloroformo, agua.

Formular otros tipos de formas farmacéuticas con piperina como ingrediente activo para ser utilizado en otras patologías, como puede ser en spray para utilizarse en infecciones en las amígdalas y también forúnculos.

Referencias

- Aparicio, A. (2012). Serie sobre hospitalizaciones evitables y fortalecimiento de la atención primaria en salud. Sector Social División de Protección Social y Salud. Costa Rica.
- Ahmad,N, Fazal,H, Haider,B, Farooq,S, Ali1,M y Khan, M.(2012). Biological role of Piper nigrum L. (Black pepper): A review. Departamento de biotecnología, Pakistan.
- Aziz, F, Tehreem,S y Ghufrana,N. (2016). " Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Metanólico de Cúrcuma (Curcuma longa) y Pepper (Piper nigrum)." (Evaluation of Antimicrobial Activity of Methanolic Extract of Turmeric (Curcuma longa) and Pepper (Piper nigrum)). Revista Mundial de Biología y Ciencias Médicas. Pakistan.
- Bailey,P y Bailey,C.(1998). Química organica: conceptos y aplicaciones. Pearson Education.
- Beers, M y Flectcher,A. (2003). El Manual Merck. Barcelona. España.
- Barco,L (2011). Atlas de fotografía Dermatologica Online.
<http://www.dermafoto.com/es/enfermedades/impetigo-2/>
- Brauner, A, Fridman, O, Gefen, O y Balaban, N (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Nature reviews/ microbiology.Mac Millan Publishers Limited.

Bidyasagar,S, Tripath,S, Mishra,B.(2017). Medicinal Plants and its Therapeutic Uses. OMICS Group eBooks. Meghalaya, India.

CIMED. (2002). *Plantas Medicinales Volumen II*. San José: UCR.

Cano, T, Chávez, B, Godínez, J y Monzón, D (2002). Obtención y caracterización del aceite esencial y oleorresina de la pimienta negra (*Piper nigrum* L.) cultivada en Guatemala. una alternativa de desarrollo agroindustrial para el agricultor guatemalteco. Facultad de Ingeniería. Guatemala.

Carretero,M.(S.f). Propiedades terapéuticas de la pimienta (*Piper nigrum*). Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME).

Carmona,O.(2013). Actividad insecticida de extractos foliares de nueve especies del género *Piper* L. (*Piperaceae*) sobre *Drosophila melanogaster*. Tesis. Universidad Veracruzana. Xalapa

CastilloM y Gonzalés,A. (2014). Aislamiento y cuantificación de la piperina a partir de la pimienta negra (*Piper nigrum*) un alcaloide en el tratamiento para la pigmentación de la piel. Costa Rica.

Cabello,M, Belloso,G, Clivet,B y Méndez, J.(2007). Actividad antimicrobiana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. (pimienta) sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas. Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, Venezuela.

Cabello, M y Belloso, G. (2009). Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, Venezuela.

Cercenado, E y Saavedra, J (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma, conceptos generales. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. España

Cole, C y Gazewood,J.(2007). "Diagnóstico y tratamiento del impétigo". University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, Virginia.

Chambers, H. (2007). Goodman & Gilman: bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill Interamericana.

Cárdenas, O. (2014). Biología celular y humana. Ecoe Ediciones. Colombia.

Centro para el control y prevención de enfermedades (2017). Atlanta.

Drotman,P. (2017).Enfermedades Infecciosas Emergentes. Centro para enfermedades, control y prevención, Atlanta.Gómez,S, Borrego,S, Lavin,P, Valdés,O, Battistoni,P, Guiamet,P.(2012). Productos ambientalmente amigables de origen vegetal empleados en el control de microorganismos intervinientes en el biodeterioro del patrimonio cultura. Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Cuba.

Damanhour, Z y Ahmad, A. (2014). A Review on Therapeutic Potential of Piper nigrum L.

(Black Pepper): The King of Spices. Departamento de farmacología, Universidad King

Abdulaziz, Arabia Saudita.

Ege,S.(1998). Química organica: estructura y reactividad,Volumen 2. Editorial Reverté.

Colombia.

Ejaz1,R, Ashfaq,U y Idrees,S.(2014). " Antimicrobial potential of Pakistani medicinal plants

against multi-drug resistance Staphylococcus aureus". (Potencial antimicrobiano de las

plantas medicinales paquistaníes contra la resistencia a múltiples fármacos

Staphylococcus aureus). Universidad de Gobierno Universidad Faisalabad, Pakistán.

Farmacopea de los Estados Unidos (USP) (2015). USP 38, NF-33, Volumen 4.

Fernández,F, López,J, Ponce, M y Machado, C (2003).Resistencia bacteriana. Revista Cubana de

Medicina Militar. Cuba

García, M, Bermejo, M, Corrales, J y Cifredo, E (2006). Técnico especialista en laboratorios del

servicio gallego de Salud. Editorial Mad, S.L. Sevilla, España.

Guerra, A. (2007). Manual y atlas de las enfermedades de la vulva. Editorial Glosa. España

Garita, A y Hernández, L. (2015). Investigación de piperina en frutos de *Piper nigrum* y su impacto como droga medicinal. Universidad de Iberoamericana. Costa Rica.

Gorgani, L, Mohammadi, M Najafpour, G y Nikzad, M (2017). Piperine- The Bioactive Compound of Black Pepper: From Isolation to Medical Formulations. DOI: 10.1111/1541-4337.12246.

Hans, B y Wolfgang, W (1987). Química Orgánica. Editorial Reverté. España.

Hart, H, Hart, D y Craine, L. (1999). Química orgánica. Mc Graw Hill, México.

Hernandez, R, Fernandez, C y Baptista, P. (2014). Metodología de la investigación. Mc Graw Hill. México.

Herráez, A. (2000). Cromatografía. Ciencias Químicas (Bioquímica), Universidad de Alcalá.

Karsha, P y Lakshmi, B. (2009). Antibacterial activity of black pepper (*Piper nigrum* L) with special reference to its mode of action on bacteria.

Kigigha, L y Kalunta, G. (2017). "Eficacia antimicrobial de extractos de *Piper nigrum* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*". Departamento de ciencias biológicas, Universidad Niger Delta, Nigeria.

Malbrán,C.(2001). Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Departamento de bacteriología, Ministerio de salud. Argentina.

Mosby-year Book Inc. (2003). Diccionario de Medicina Océano Mosby. 6ed. Barcelona. España.

Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.

Marín, J. (2008). Causas y Efectos de la Saturación del Servicio de Emergencias de la Clínica de Chomes, Puntarenas. Instituto Centroamericano de Administración Pública – ICAP, Costa Rica.

Montoya, H (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª Edición, Editorial Universidad de Antioquia. Colombia.

Meghwal, M y Goswami, T (2013). Piper nigrum and Piperine: An Update. Departamento de Ingeniería en agricultura y alimentos. India

McMurry,J(2004).Química Orgánica. Sexta edición, editorial Thomson. México.

Negroni, M (2009). Microbiología Estomatológica.2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Pahissa, A (2009). Infecciones producidas por Staphylococcus aureus.1^{era} edición. Barcelona, España.

Pavithra,G.(2014). Effect of Spices on Bacteria – A Short Review. Jornal of Pharmaceutical Sciences and Research. Chennai.

Remington, A (2003). Farmacia. Editorial Panaamericana. Uruguay.

Roca, P, Oliver,J, Rodriguez,A. (2004). Bioquímica: técnicas y métodos. Departamento de Biología, Universidad de las Islas Baleares, España.

Reshmi,S ,Sathya,E y Suganya, P(2010). Isolation of piperdine from *Piper nigrum* and its antiproliferative activity. Departamento de Biotecnologia.Tamilnadu (India)-642001, India.

Rani, S. (2013). Antimicrobial Activity of Black Pepper (*Piper nigrum*L.). Department of Botany, Osmania University College for Women, Koti, Hyderabad, India.

Skoog, W. H. (2001). *Química Analítica* (Séptima Edición ed.). DF: McGraw Hill.

Swarbrick, J. (2007). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.North Carolina: Pharmaceutech.

Sella, A(2007). Soxhlet extractor. University College London.

Skoog, H. C. (2008). *Principios de análisis instrumental* (Sexta edición ed.). México DF: Cengage Learning.

Sotelo, H. (2016). Estado del arte en el uso potencial de extractos vegetales del género *Piper* para el control de plagas agrícolas. Universidad Nacional Abierta y a Distancia Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, Colombia.

Sepehri,Z , Bagheri,G, Mohasseli,T, Javadian,F, Anbari,M, Nasiri,A, Kiani,Z ,Shahi,Z andSohil,B. (2014) "Antibacterial Activity of Cuminum cyminum and Piper nigrum against antibiotic resistant Klebsiella pneumonia." (Actividad antibacteriana de Cuminum cyminum y Piper nigrum contra la neumonía por Klebsiella resistente a los antibióticos). Departamento de biología, Universidad de ciencias de la salud. Iran.

Shanmugapriya,K , Savaravana,P , Payal,H y Williams,B. (2012). Potencial antioxidante de las hojas de pimienta y su potencial contra algunos microbios patógenos. Escuela de biotecnología, India.

Porth,C, y Grossman,S.(2015). Fisiología, alteraciones de la salud. Conceptos básicos. 9ª edición. Wolters Kluwer,

Sabalette,T (2010). Atlas de bacteriología. Recuperado de:
http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html.

Open chemistry data base. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Recuperado de:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/638024#section=Top>

Tenorio, M (2007). Obtención del aceite esencial de la pimienta de olor (*piper nigrum*) para elaboración de aromatizantes. Universidad Guayaquil.

Pasto, D y Johnson, C (2003). Determinaciones de estructuras orgánicas. Editorial Reverté, S.A. España.

Villalobos, A (2012). Laboratorio de química orgánica: destilación por arrastre de vapor. Universidad autónoma metropolitana, Unidad Iztapalapa. Recuperado de: <http://quimicaorganica1alejandraaguilar.blogspot.com/2012/02/practica-3-destilacion-por-arrastre-de.html>.

Velázquez, L. (2008). Farmacología básica y clínica. Editorial Médica Panamericana.

Wiley, J (2003). Sample preparation techniques in analytical chemistry. Estados Unidos.

Walter, H y Reyes, J (2005). Análisis químico e instrumental moderna. Departamento de química, Universidad de Colorado. Editorial Reverté, S.A

Zarringhalama, M , Zaringhalam, J , Shadnoush, M , Safaeyan, F , y Tekieh, E. (2012). "Efecto Inhibidor de los Extractos de Pimienta (negra y roja), Tomillo y de sus Aceites Esenciales sobre *Escherichia coli* Enterohemorrágica y Actividad de la DNasa de *Staphylococcus aureus*." Universidad de ciencias médicas, Iran.

Zamora,L, Herrera,M y Arguedas, A. (1997). Estudio Abierto No Comparativo con Mupirocina en el Tratamiento de Pacientes Pediátricos con Infecciones de la Piel y Tejidos Blando. Acta Pediátrica Costarricense.