



Facultad de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad del Valle



Encapsulation of the Piperine Present in *Piper tuberculatum* Species Using Multilamellar Vesicles and Determination of its Antioxidant Power

Lina M. Reyes Solís
Universidad del Valle

Rubén A. Sánchez
Universidad del Valle

Jaime Restrepo
Universidad del Valle

Received: August 17, 2017

Accepted: October 25, 2017

pág 11 - 28

Abstract

The piperine is an alkaloid present in the vegetal species pipilongo (*Piper tuberculatum*). Antioxidant properties are associated to this plant. It was encapsulated in multilamellar vesicles (MLV). For that, the validation of the extraction methodology through calibration curves of standard piperine by high resolution liquid chromatography (HPLC) was performed, using a column of C₁₈, mobile phase MetOH: H₂O (70:30) and detected by UV to 340nm with a fluency rate of 0.7 mL/min. The lineal and non-lineal ranges were found between 1 and 300 ppm, with R² of 0.995. During the extraction of the pipilongo fruit, the effect of two factors, solvents and ultrasound power, was studied, for the optimization of conditions and higher extraction of piperine in pipilongo. The maximum concentration of piperine (246.50 ppm) was found, using ethanol as extraction solvent. The piperine was isolated from its extract, using a solution of KOH with 10 % ethanol. It was purified and characterized by melting point, IR, GC-MS y RMN ¹H. Once the extract was obtained, it was proceeded to the formation of liposomes. The phosphatidylcholine and cholesterol vesicles were prepared with extract and with piperine at different concentrations and hydrated with buffer pH 7.40. The average size of the particles formed, measured by dynamic light scattering (DLS), was in a range of 299.7–531.9 nm. For the study of antioxidant activity, a solution of DPPH 0.2 mM was prepared and a reaction was carried out with the extract and piperine liposomes and their corresponding free forms. The IC₅₀ calculated for the extract and piperine were 2.8±0.2 and 21333±1499 ppm, respectively. These values of IC₅₀ were compared against a standard of reference Quercetin, prepared under the same conditions. The test with DPPH showed that the released form possesses greater antioxidant activity while in encapsulation form, it attenuates and stabilizes this capacity.

Keywords: *Piper tuberculatum*, piperine, Antioxidant activity, encapsulation, vesicles, Phosphatidylcholine.

DOI: 10.25100/rc.v21i2.6696

Encapsulación de la piperine presente en la especie *Piper tuberculatum* utilizando vesículas multilamelares y determinación de su poder antioxidante

Resumen

La piperina, alcaloide presente en la especie vegetal pipilongo (*Piper tuberculatum*) a la cual se le asocian propiedades antioxidantes, fue encapsulada en vesículas multilamelares (MLV). Para ello se realizó la validación de la metodología de extracción a través de curvas de calibración de piperina estándar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna C_{18} , fase móvil MetOH:H₂O (70:30) y detectada por UV a 340 nm con una tasa de flujo de 0.7 mL/min. El rango lineal y linealidad fueron halladas entre 1 a 300 ppm, con R^2 de 0.995. En la extracción del fruto de pipilongo se estudió el efecto de dos factores, disolventes y potencia de ultrasonido, para la optimización de condiciones y mayor extracción de piperina en pipilongo. La máxima concentración de piperina (246.50 ppm) fue encontrada en las condiciones de ultrasonido (US 20 KHz a 175W, 40 min) utilizando etanol como disolvente de extracción. Del extracto, se aisló la piperina utilizando una solución de KOH 10% etanólico. Fue purificada y caracterizada mediante punto de fusión, IR, GC-MS y RMN ¹H. Una vez obtenido el extracto, se procedió a la formación de liposomas. Las vesículas de fosfatidilcolina y colesterol fueron preparadas con extracto y con piperina a diferentes concentraciones e hidratadas con buffer PBS a pH 7.40. El tamaño promedio de las partículas formadas, medido por dispersión de luz dinámica (DLS), estuvo en un rango de 299.7–531.9 nm. Para el estudio de la actividad antioxidante, se preparó una solución de DPPH 0.2 mM y se llevó a reacción con los liposomas de extracto y de piperina y sus correspondientes formas libres durante 60 min, medidos a 520 nm. El IC_{50} calculado para el extracto y la piperina fueron 2.8 ± 0.2 y 21333 ± 1499 ppm, respectivamente. Estos valores de IC_{50} fueron comparados frente a un estándar de referencia preparado bajo las mismas condiciones, quercetina (IC_{50} 2.5 ± 0.1 ppm). El ensayo con DPPH mostró que la forma liberada posee mayor actividad antioxidante mientras que en la encapsulación atenúa y estabiliza esta capacidad.

Palabras clave: *Piper tuberculatum*, piperina, actividad antioxidante, encapsulación, vesículas, fosfatidilcolina

1 Introducción

La piperina (1-piperoilpiperidina), sustancia picante nitrogenada, es un alcaloide presente en especies de la familia *Piperaceae*. Ésta se encuentra presente en la especie vegetal pipilongo (*Piper tuberculatum*) la cual se utiliza comúnmente como especia en el hogar ya sea como aditivo alimentario o condimento ⁽¹⁾. La estructura química de la piperina (Figura 1) la sitúa en el grupo de cinamamidas lo cual le confiere varias actividades biológicas útiles ^(2,3).

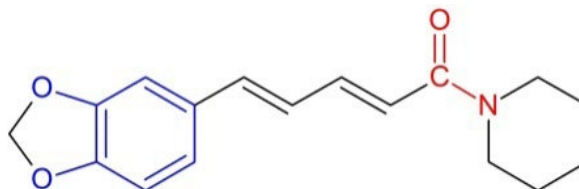


Figura 1. Estructura química de la piperina (1-[5-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-oxo-2,4-pentadienil]piperidina).

La piperina no posee una actividad antioxidante significativa una vez es separada del extracto de la planta proveniente ⁽¹⁾, además puede ser fotosensible y degradarse fácilmente bajo ciertas condiciones. Estudios revelan que la degradación puede observarse cuando

la piperina se somete a hidrólisis básica, hidrólisis neutral, hidrólisis térmica y a la luz solar ^(4,5). En consecuencia, Tripathi *et al* ⁽⁴⁾ investigaron el papel neuroprotector de la piperina irradiada y no irradiada con UV-B, con el fin de observar mejora o atenuación de la eficacia de la propiedad antioxidante de ésta. Se concluyó que la piperina no irradiada presentó una acción neuroprotectora a través de la reducción del volumen de infarto y escalas neurológicas. Mientras que en la piperina irradiada, la eficacia neuroprotectora se atenuó a través de la disminución de la regulación de la enzima de defensa antioxidante, aumentando el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) ⁽⁴⁾.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y compuestos reactivos intermedios metabólicos generados a partir de diversos químicos carcinógenos juegan un papel importante en el daño celular, en la iniciación y progresión de la carcinogénesis. Muchos eliminadores de radicales, como antioxidantes naturales, se han encontrado para ser eficaces en la inhibición de la inducción de la carcinogénesis. Estudios también indican que diversos principios de especias son un grupo importante de antioxidantes ⁽⁶⁾ como es el caso del pipilongo debido a la piperina presente.

Entre los diferentes enfoques en el campo de la nanomedicina para superar la incapacidad de la mayoría de las terapias convencionales de entregar las concentraciones terapéuticas de medicamentos sin provocar efectos tóxicos graves en los órganos y tejidos normales, los sistemas vesiculares han recibido la máxima atención durante las últimas décadas ^(7,8). Las vesículas, especialmente liposomas (vesículas basadas en lípidos, generalmente fosfatidilcolina), son los sistemas de escala nanométrica, clínicamente establecidos, más utilizados para la administración de fármacos y para el desarrollo de nuevos nanomedicamentos ⁽⁷⁾.

Como sistemas de protección y entrega, los liposomas exhiben muchas ventajas como biocompatibilidad, no toxicidad, tamaño ajustable, mejora en la estabilidad química y física de moléculas, la capacidad de encapsular moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas y entrega controlada ^(9,10). La incorporación de colesterol (Chol), tiene una contribución importante en la organización, la dinámica y función de la membrana. El colesterol reduce la libertad de rotación de las cadenas de hidrocarburos de fosfolípidos, que ayudan a disminuir la pérdida de materiales hidrófilos y también estabilizan la bicapa lipídica ⁽¹¹⁻¹³⁾.

En particular, la encapsulación es una posible solución para preservar la actividad antioxidante de moléculas hasta su consumo, para asegurar una vida útil prolongada o para evitar el sabor desagradable de alta concentración de algunas moléculas (astringencia, amargura) ^(9,14).

Esta investigación exhibe la optimización de extracción asistida por ultrasonido, la preparación de vesículas liposomales sintetizadas a partir de fosfatidilcolina mediante la hidratación con buffer PBS pH 7.40, la encapsulación del extracto y piperina provenientes de la planta pipilongo (*Piper tuberculatum*) y la evaluación del poder antioxidante del extracto y piperina, libres y encapsulados, a través de la reacción de diferentes concentraciones de éstos frente al reactivo radical sintético DPPH.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

El pipilongo se adquirió en cultivos orgánicos del corregimiento La Buitrera del municipio de Cali, Colombia. La Buitrera se extiende desde 1000 hasta 2000 metros sobre el nivel del mar con latitud (φ): N 3° 23' 38,4770" y longitud (λ): W 76° 34' 47,23608" La muestra de pipilongo se secó al horno a una temperatura no mayor a 60°C. El contenido de humedad de la materia prima aproximado fue de 7%. La piperina estándar Sigma Aldrich 97%, el etanol absoluto y hexano grado analítico fueron adquiridos de Scientific Products, Cali. Agua desionizada y Metanol grado HPLC (Scientific Products, Cali) se utilizaron como disolvente para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.2 Equipos

La extracción asistida por ultrasonido se realizó en una sonda de ultrasonido (Sonic Dismembrator modelo 505 Fisher Scientific™) con una frecuencia de 20KHz y potencia máxima de 500 W.

Para la medida del espectro UV-Vis se utilizó el espectrofotómetro UV-1700 marca SHIMADZU, que trabaja con un ancho de banda de 1 nm en la región de 190 a 1100 nm.

El Zetasizer S90 (Instrumentos Malvern), instrumento utilizado para la determinación del tamaño de partícula y tamaño molecular, posee un rango de medición de 0.3 nm–5 micras (diámetro). La principal forma de mediciones es a través de dispersión de luz dinámica (DLS) en un ángulo de dispersión dinámica de 90 grados.

2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La piperina se analizó utilizando cromatografía líquida de alta resolución. Se utilizó el instrumento de HPLC marca SHIMADZU el cual posee un sistema LCSolutions 2010, que es un tipo de bomba del sistema en serie de doble émbolo y como detector de UV. La columna utilizada fue C₁₈ (fase reversa), la columna vértice de la sección transversal de 150 x 3.9 mm empacada con sílica. La longitud de onda se fijó en 340 nm, la fase móvil utilizada fue MetOH:H₂O (70:30), el volumen de inyección fue 20 μ L y la tasa de flujo fue de 0.7 mL/min. El tiempo de retención estuvo en un rango de 2.7 – 2.8 min.

2.4 Extracción Soxhlet

La extracción fue llevada a cabo partiendo de 5 g de *Piper tuberculatum* seco y molido en un aparato convencional Soxhlet. Una vez finalizó el tiempo de extracción, se recuperó, por destilación, parte disolvente del balón. Se utilizaron 200 mL de disolvente en cada ensayo. 5 mL de los extractos resultantes, se tomaron para ser analizados mediante HPLC. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. *Diseño experimental – Método Soxhlet (S).*

	Etanol	Hexano
4 Horas	1S	3S
2 Horas	2S	4S

2.5 Extracción asistida por ultrasonido

La extracción se realizó en un recipiente de vidrio con fondo plano mantenido en un baño maría durante 10 minutos antes de ser sometidos a la sonda de ultrasonido. 5 g de *Piper tuberculatum* se mezclaron con 50 mL de disolvente en el recipiente de vidrio. El *Piper tuberculatum* se irradió por ultrasonido durante el tiempo establecido con un pulso de 10 segundos de sonicación y 5 segundos de espera. Se tomaron 5 mL de los extractos resultantes para ser analizados mediante HPLC. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. *Diseño experimental – Método Ultrasonido (US)*

	125W (25%)	175W (35%)
30 minutos	1US	3US
40 minutos	2US	4US

2.6 Aislamiento de la piperina

Se llevó a sequedad el extracto y se eliminaron residuos con éter etílico.⁽¹⁵⁾ Tras la adición de etanol y KOH 10% etanólico, se dejó en reposo la solución durante 2 horas. Se decantó el sobrenadante y éste se dejó en reposo un periodo de 48 horas. Posteriormente, se recogieron los cristales de piperina. Estos fueron purificados por recristalización de acetona:hexano (3:2).

2.7 Preparación de liposomas vesículas multilamelares tipo cebolla (MLV)

Inicialmente se preparó un buffer fosfato (PBS) 0.1 M a pH 7.4 con Na_2HPO_4 y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada. Se prepararon soluciones del extracto de pipilongo y piperina a 20, 200 y 2000 ppm en cloroformo. Se tomó 0.3 g de lecitina y 0.1 g de colesterol⁽¹⁶⁾, se adicionó individualmente cada solución preparada y mediante un baño maría a $\sim 70^\circ\text{C}$, se eliminó por evaporación el disolvente agitando suavemente, promoviendo la formación de la bicapa lipídica. Se realizaron varios ciclos de secado en el baño, asegurando la evaporación total del cloroformo. 10 mL del buffer PBS fueron calentados en el mismo baño y se adicionaron a la bicapa lipídica. Para evitar la formación de sólidos y la hidratación completa de la bicapa, se sometió la emulsión a sonicación en un baño de ultrasonido y posteriormente a agitación magnética. La purificación de los liposomas se realizó, centrifugando a 3500 rpm.

2.8 Actividad antioxidante

Las actividades antioxidantes de las muestras fueron determinadas, usando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhirazil (DPPH). Clásicamente, el DPPH es disuelto en metanol y

su ensayo se realiza en un rango entre 517 y 520 nm. En este caso, una solución a 0.2 mM de DPPH fue preparada en MetOH:H₂O (75:25)⁽⁹⁾. Las muestras de extracto de pipilongo y piperina se disolvieron en metanol solamente, garantizando la completa dilución, ya que la piperina es insoluble en agua y la formación de partículas generaría interferencias en el espectrofotómetro UV. Concentraciones de 20, 200, 2000 ppm fueron preparadas tanto para el extracto aceitoso, la piperina y el estándar de referencia, quercetina. Para los estudios en el extracto, piperina y quercetina, 1.5 mL de DPPH (0.2 mM) se mezclaron con 1.5 mL de la muestra seleccionada. En las vesículas MLV se realizó una dilución de 50 µL en 10 mL con agua desionizada. La misma proporción muestra:DPPH (1:1) fue utilizada.

El extracto de la especie *Piper tuberculatum* utilizado para la preparación de vesículas y extracto libre para los análisis, fue aquel que contenía mayor cantidad de piperina.

La absorbancia a 520 nm se determinó después de 60 min de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad. La actividad de inhibición fue calculada de la siguiente forma:

$$I(\%) = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

donde A_0 es la absorbancia de control (DPPH sin adición de muestra), A_1 es la absorbancia de la muestra. Los resultados se presentan como el promedio de análisis por triplicado.

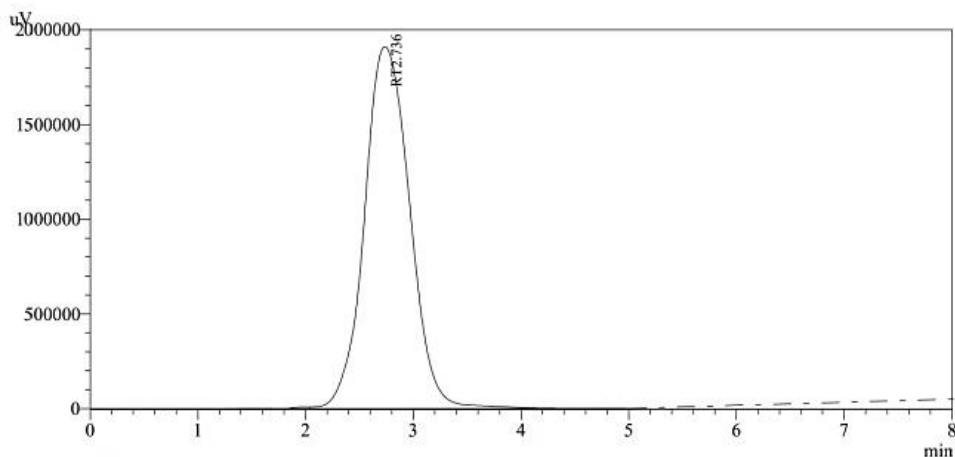
2.9 Análisis de tamaño de partícula

Las vesículas fueron medidas utilizando un Zetasizer Nano S90 (Instrumentos Malvern), con una escala de medida de 0.1 a 10,000 nm (diámetro). Las soluciones se prepararon tomando 500 µL de liposomas MLV en 50 mL de agua desionizada.

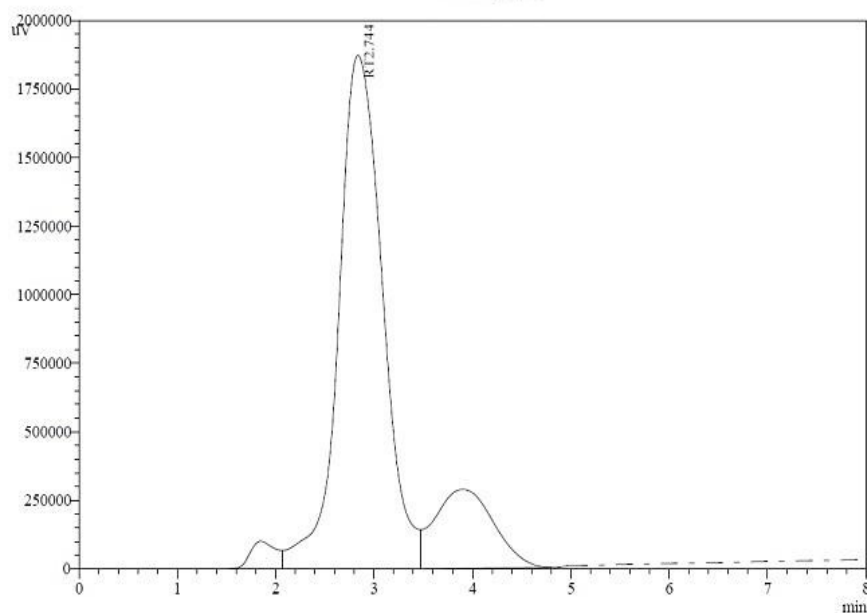
3 Resultados y discusión

3.1 Validación de metodología de extracción

La preparación de las muestras se realizó tomando alícuotas de 500µL de extracto llevados a aforo con etanol absoluto en un balón aforado de 5 mL. Las soluciones estándar fueron de igual forma preparadas en balones de 5 mL con etanol absoluto. Todas las muestras fueron filtradas en membranas 0.47 µm antes de ser inyectadas en el HPLC. La Figura 2a muestra el análisis HPLC de la piperina estándar y la Figura 2b, el extracto etanólico, en un tiempo de retención cercano a 2.7 min.



(a) Análisis HPLC de piperina estándar.

(b) Análisis HPLC de extracto etanólico de *Piper tuberculatum***Figura 2.** Análisis por cromatografía HPLC.

Inicialmente, se preparó una curva de calibración a 1, 170, 350, 500 y 1000 ppm de piperina estándar. Con concentraciones superiores a 350 ppm se saturó el detector. Por tal, la linealidad se estudió en un rango de concentración 1 ppm–300 ppm. Se prepararon tres curvas de calibración de 1-100 ppm, 120-200 ppm y 220-300 pm. Mediante una prueba t-student se determinó que las pendientes de las tres curvas no diferían significativamente. Por tal motivo, se trabajó como una sola curva de 1 a 300 ppm. El coeficiente de determinación R^2 para esta curva fue 0.995 que responde a la ecuación de regresión lineal como lo muestra la Figura 3.

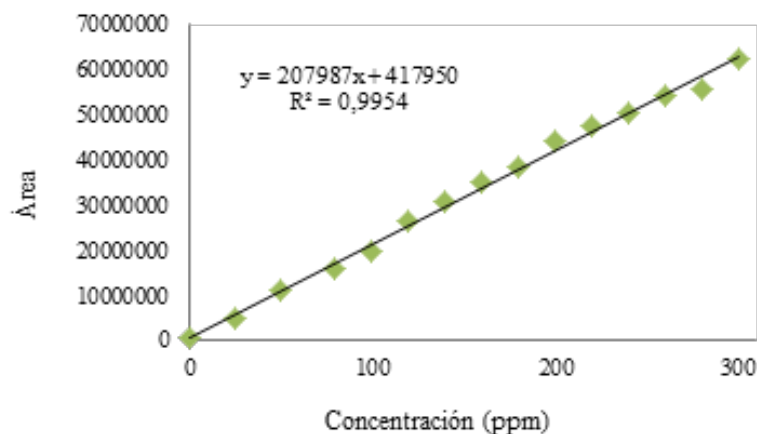


Figura 3. Curva de calibración de rango lineal y linealidad de 1 a 300 ppm.

En la precisión del método, la reproducibilidad se obtuvo inyectando 7 extractos aleatorios de ambos diseños experimentales y para la repetitividad se inyectó uno de los extractos escogidos 7 veces, independientemente, en el equipo de HPLC, todas por triplicado. Se realizó la comparación de la desviación estándar de la precisión con el valor hallado en la ecuación de Horwitz ($\%RSD = 2^{1-0.5\log C}$) para verificar la precisión del método. Se encontró que éste es preciso. Los resultados están expresados como desviación estándar relativa (RSD).

La sensibilidad del método, límite de detección (LDD) y límite de cuantificación (LDC), fue determinada realizando una pequeña curva de calibración de tres puntos 0.01, 1 y 5 ppm con piperina estándar. Los valores de los parámetros se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de validación por cromatografía HPLC

Parámetro	Resultados
Rango lineal/Linealidad	1-300ppm
R ²	0.9954
Precisión	
Reproducibilidad	3.2%
Repetitividad	0.3%
Sensibilidad	
LDD	1.1 ppm
LDC	2.7 ppm

La exactitud del método se determinó dopando uno de los extractos con una cantidad conocida de piperina estándar (50%, 100% y 150%). El porcentaje de recuperación se calcula dividiendo el valor medio entre el valor real. Se realizó la prueba de t-student para determinar si había diferencias significativas entre la recuperación media y el 100%. Se encontró que el método es exacto. Cada muestra dopada se inyectó por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentajes de recuperación de piperina

% Recuperación	Piperina (ppm)	Recuperado (ppm)	% Recuperado
50%	42	41.5	99.7
100%	84	81.1	98.6
150%	126	96.2	87.2

3.2 Efecto de dos diferentes disolventes

La selección del disolvente más adecuado para la extracción de los compuestos de interés de la muestra es un paso crucial para cualquier método de extracción, particularmente para extracción asistida por ultrasonido (UAE). Se evaluaron dos disolventes diferentes (etanol y hexano) para la extracción de piperina de la especie *Piper tuberculatum* por el método Soxhlet. La Tabla 5 muestra varias propiedades de los disolventes seleccionados ⁽¹⁷⁾.

Tabla 5 ⁽¹⁷⁾. Propiedades fisicoquímicas de disolventes.

Disolvente	Tensión superficial (mN/m)	Índice de polaridad	Presión de vapor (kPa)	Viscosidad (cP)
Etanol	23.3	5.2	5.2	1.2
Hexano	18.4	0.001	17.3	0.3

Los parámetros de la extracción por Soxhlet se mantuvieron constantes. Tales como: 5g de la muestra seca molida, temperatura alrededor de 100°C y proporción de sólido a disolvente de 1:40. El tiempo de extracción depende del diseño experimental.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. La máxima concentración de piperina se obtuvo en **1S** (222.76 ppm - etanol) seguida por **2S** (209.46 ppm - etanol) en comparación con **3S** (66.62 ppm - hexano) y **4S** (49.73 ppm - hexano). El rendimiento de la extracción se ve afectada por la polaridad y viscosidad del disolvente ⁽¹⁷⁾, como se observa en la Tabla 5. El índice de polaridad del etanol es mayor, por tal razón, reacciona con más afinidad con la piperina presente en la especie *Piper tuberculatum* en comparación con el hexano que es un disolvente apolar.

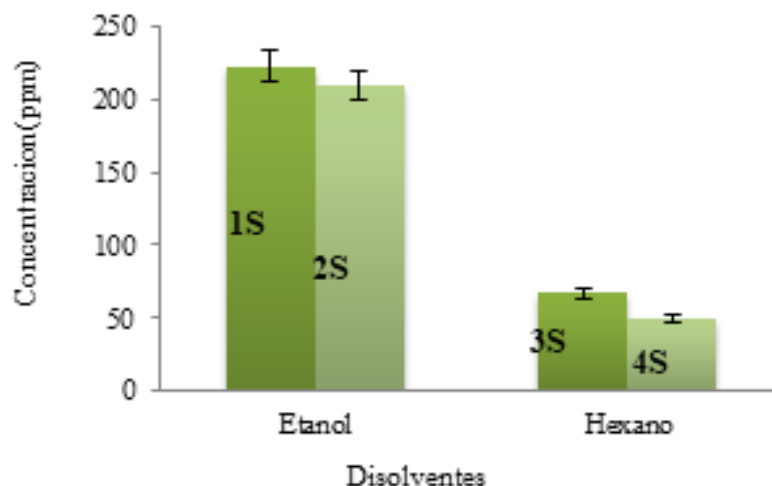


Figura 4. Efecto de diferentes disolventes en la concentración del extracto de *Piper tuberculatum* (Método Soxhlet proporción solido/disolvente 1:40, temperatura ~100°C).

3.3 Efecto de potencia en ultrasonido

El efecto de dos diferentes potencias, i.e. 125 W y 175 W sobre la cantidad de piperina extraída de *Piper tuberculatum* asistida por ultrasonido a 20kHz están reportados en la Figura 5. Los resultados obtenidos a 175 W (3US - 216.59 ppm y 4US - 246.50 ppm) son mayores que a 125 W (1US - 210.11 ppm y 2US - 201.74 ppm). Con el aumento de la potencia de ultrasonido, existe mayor amplitud de las ondas que viajan a través del medio líquido y las burbujas colapsan de forma más violenta ⁽¹⁸⁾, lo cual conlleva a una mayor extracción. De igual forma, el aumento de tiempo en la zonificación también promueve mayor extracción en la muestra.

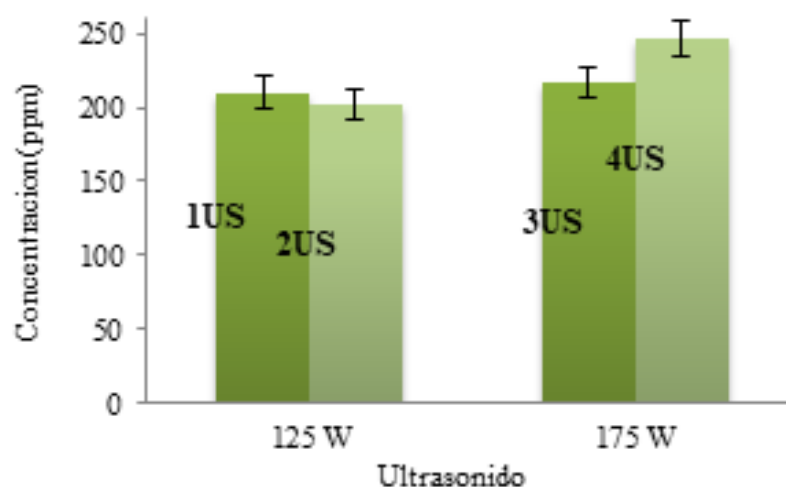


Figura. 5. Efecto de potencia de ultrasonido sobre la concentración de extracto etanólico de *Piper tuberculatum* (Método US proporción solido/disolvente 1:10, frecuencia 20kHz).

En presencia de ultrasonido, la variación en el rendimiento de la piperina también se atribuye a su diferente solubilidad y las propiedades físico-químicas, es decir, la tensión superficial, la viscosidad y presión de vapor. Generalmente, la presión de vapor de los

disolventes juega un papel importante en la generación de la cavitación y se ha encontrado que el disolvente de presión de vapor más baja genera pocas burbujas que implosionan, pero con una fuerza superior. De esta manera, el disolvente que tiene menor presión de vapor ayuda a extraer más soluto ⁽¹⁷⁾.

La cuantificación de la piperina por el método HPLC, mostró que la mayor concentración de piperina en los extractos se obtuvo vía ultrasonido (246.50 ppm **4US**) y corresponde a un rendimiento de 24.65mg/g.

3.4 Caracterización de la piperina aislada

En la Figura 6 se muestra el espectro IR, identificando las bandas más importantes de la piperina aislada de la extracción de pipilongo y en la Figura 7, se muestra el espectro RMN protónico de la piperina.

Sólido amarillo. P.f 131-133°C. **IR** $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3009.0 (=C-H, tensión), 1610.6-1581.6-1491.0 (-C=C- Ar, tensión), 1631.8 (-CO-N, tensión). Grupo metilendioxi: 2918.8-2862.4 (-CH₂ *as, sim*, tensión), 1435.0 (-CH₂ flexión), 1249.9-1193.9 (=C-O-C *as*, tensión), 1030.0 (=C-O-C *sim*, tensión), 925.8 (C-O, tensión), 1134.1 (C-H, flexión), 995.3 (-CH=CH- *trans*, flexión), 846.8-829.4-804.3 (C-H 1-2-4-trisust, flexión). **RMN** ¹H (400 MHz, EtOD) δ 1.63 (s, 4H). 1.71-1.74 (m, 2H), 3.69-3.64 (m, 4H), 6.01 (s, 2H), 6.67 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 14.6, 10.4$ Hz, 1H).

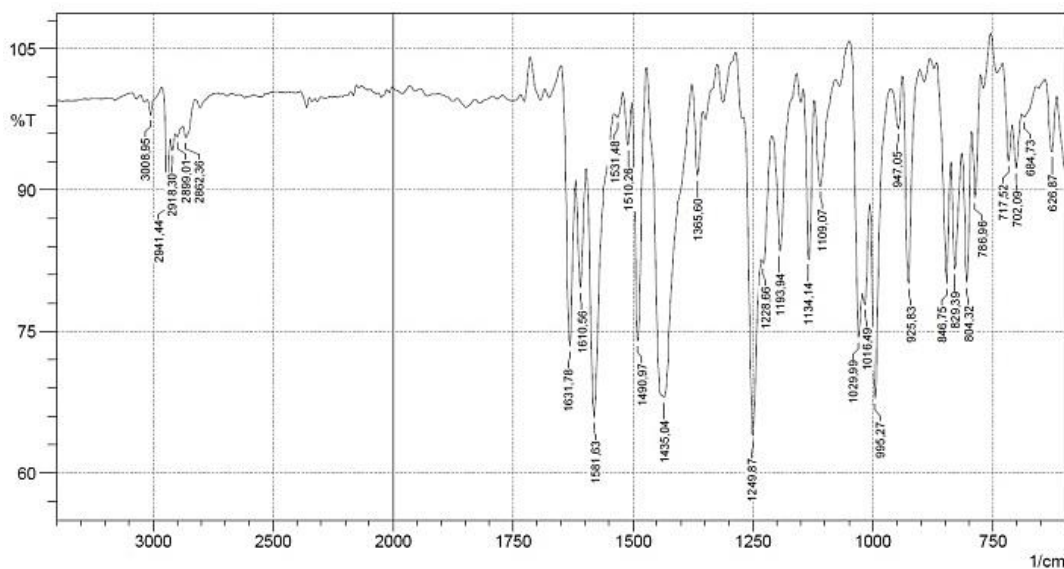


Figura 6. Espectro IR de la piperina.

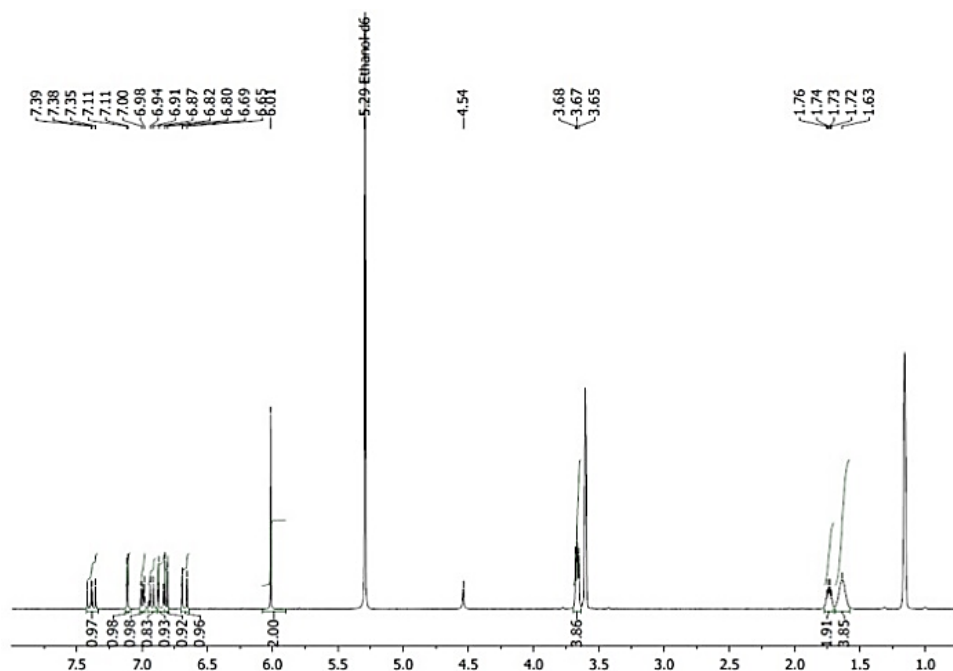


Figura 7. Espectro de la piperina (RMN ¹H, 400 MHz, EtOD).

El espectro de Masas de la piperina se muestra en la Figura 8. La molécula de la piperina (Figura 1) tiene un peso molecular de 285 que corresponde al primer ion formado. La fragmentación molecular de los iones más representativos de la piperina se muestra en la Figura 9.

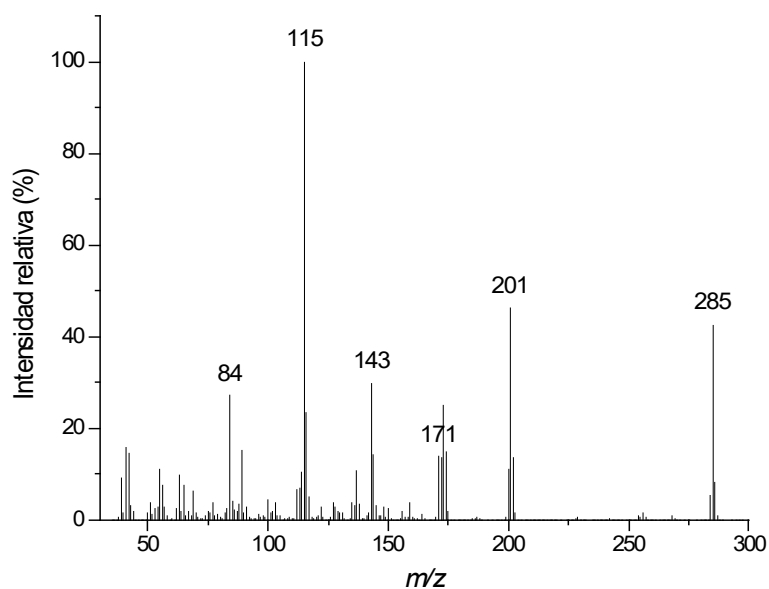


Figura 8. Espectro MS de la piperina (70 eV).

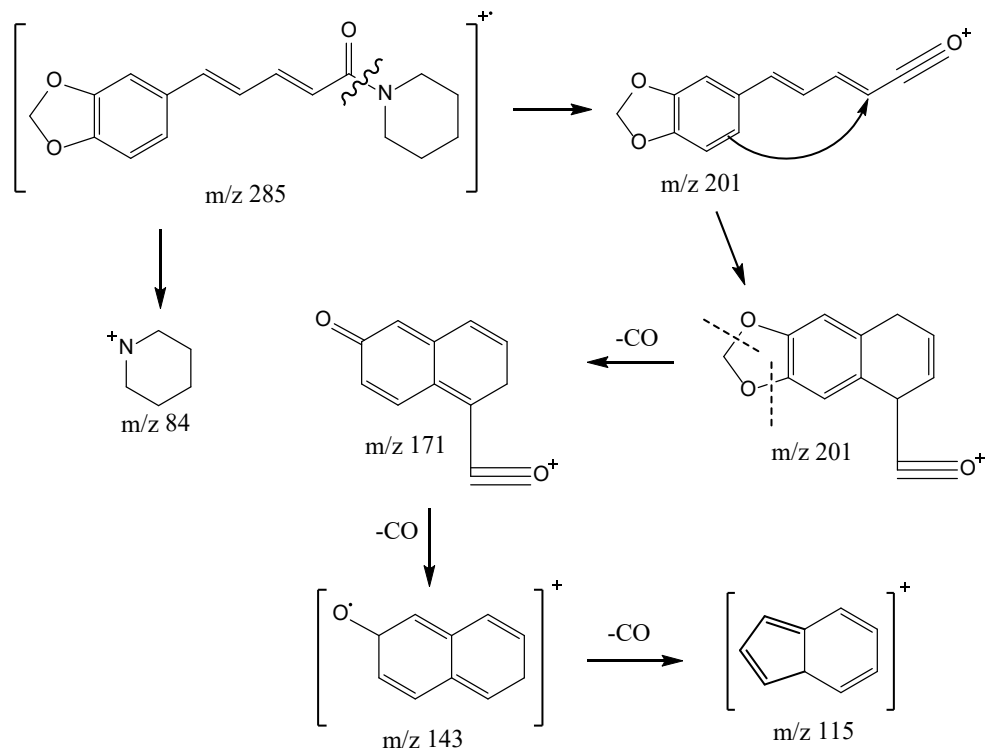


Figura 9. Fragmentación molecular de la piperina.

3.5 Caracterización de las vesículas

Los resultados del tamaño del diámetro hidrodinámico (nm) se muestran en la Figura 10. En la Tabla 6 se encuentran los valores del promedio Z, definido como la intensidad ponderada tamaño hidrodinámico medio de la colección de conjunto de partículas medido por difusión dinámica de luz (DLS) y los valores del índice de polidispersión (PDI), los cuales dan indicio sobre la diversidad de moléculas dentro de la emulsión. El PDI igual a 1 indica que las moléculas son del mismo tamaño (monodispersa) y éste se asocia a una distribución de tamaño de vesícula diferente ⁽¹⁹⁾.

El valor promedio Z del blanco es el menor, ya que son los liposomas preparados sin ninguna molécula dentro de su estructura coloidal. Por ello, el aumento de este promedio indica el encapsulamiento de material en su estructura.

El promedio de diámetro en los liposomas con extracto varía alrededor de 35 nm. Mientras mayor sea la concentración de piperina en los liposomas, menor es el promedio de diámetro hidrodinámico y menor PDI.

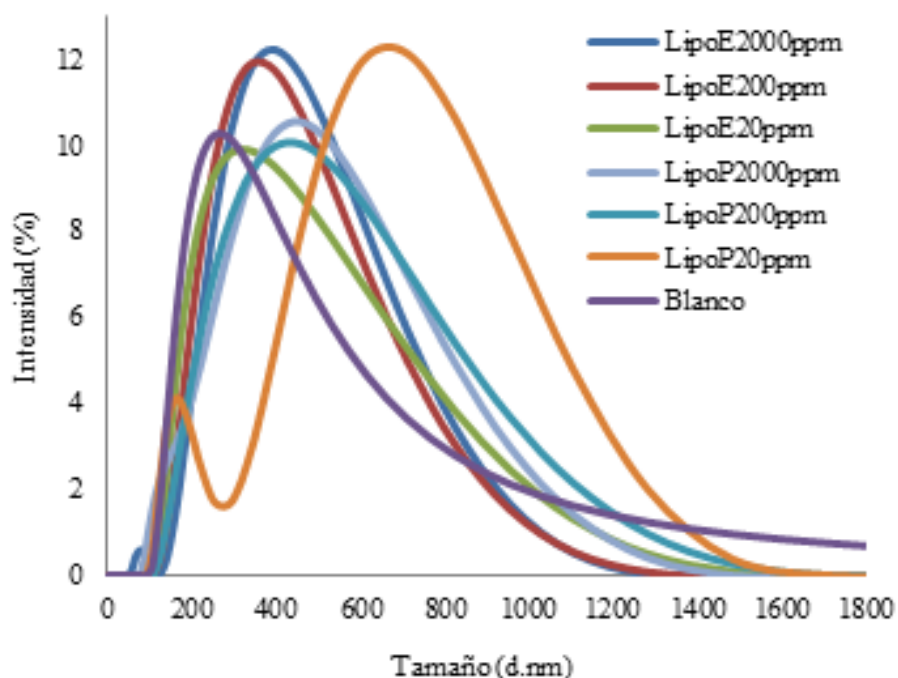


Figura 10. Determinación de tamaño de partícula de vesículas MLV.

Tabla 6. Tamaño promedio de vesículas MLV

Muestra	Z-Average (d.nm)	PDI
LipoE2000ppm	373	0.24
LipoE200ppm	338.9	0.21
LipoE20ppm	342.2	0.25
LipoP2000ppm	355.8	0.25
LipoP200ppm	409.4	0.27
LipoP20ppm	531.9	0.56
Blanco	299.7	0.22

Se observó buen resultado en los liposomas preparados con 20 ppm de piperina. El valor promedio Z y el PDI son mayores, es decir que mostraron una mejor tendencia a encapsular todo el material de muestra y estar compuestos por liposomas de un solo tamaño ⁽¹⁹⁾, por lo cual, su curva en la Figura 10 es más ancha.

3.6 Actividad antioxidante: Ensayo con radical libre DPPH

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es un radical libre estable con absorbancia característica entre 517–520 nm. Es uno de los sustratos comúnmente utilizados para evaluar la actividad antioxidante. Este ensayo se basa en la capacidad del DPPH de aceptar un radical de hidrógeno o de algún grupo R, resultando en la reducción de DPPH[•] (violeta) a DPPHH (amarillo). La disminución de la absorbancia, evidencia de la reducción del DPPH, se utiliza para evaluar el potencial de barrido del radical de las muestras ⁽²⁰⁾.

La capacidad de reducir radicales DPPH de la piperina presente en el extracto (4US) fue determinado mediante la absorción UV a 520 nm. La Figura 11 muestra el porcentaje de actividad inhibido en las diferentes concentraciones preparadas de extracto, piperina y sus respectivas vesículas MLV cargadas.

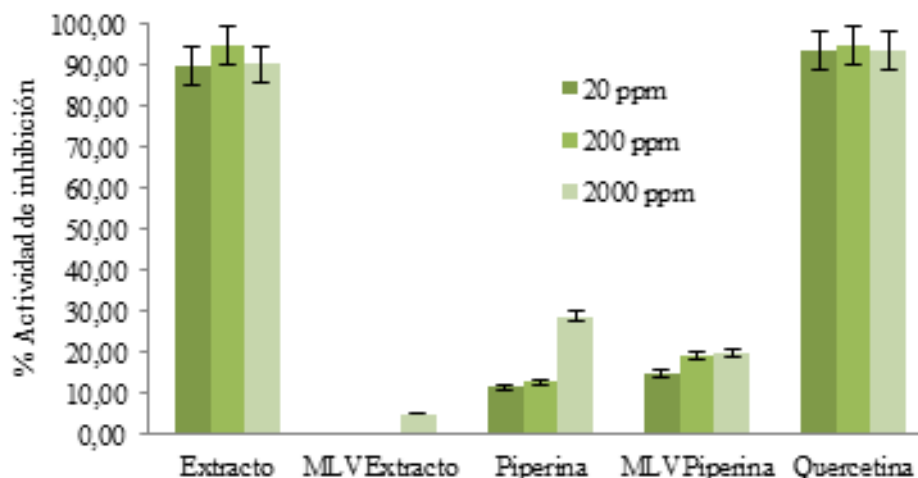


Figura 11. Determinación del porcentaje de actividad inhibitoria en el extracto, piperina, respectivas vesículas MLV y quercetina frente al radical DPPH 0.2 mM

En el extracto se observó un alto porcentaje de inhibición, mientras que en la piperina libre solo la muestra más concentrada exhibe un porcentaje significativo. Se calculó el valor IC_{50} (half maximal inhibitory concentration por sus siglas en ingles) en las muestras libres, Tabla 7.

Tabla 7. Valores de IC_{50} del extracto, piperina y quercetina

	Extracto	Piperina	Quercetina
Promedio IC_{50}	2.8	2133	2.5
Desviación	0.2	1499	0.1

El valor de IC_{50} del extracto se comparó con la quercetina; un estándar de referencia preparado bajo las mismas condiciones. Este análisis mostró que el extracto de pipilongo posee una buena actividad antioxidante.

Experimentalmente, los resultados corroboran que la piperina no posee una actividad antioxidante significativa una vez es separada del extracto de la planta proveniente ^(1,6).

Las muestras de extracto y piperina encapsuladas difieren en sus resultados. Mientras que en el extracto las vesículas logran atenuar casi por completo el porcentaje de inhibición protegiendo la muestra y previniendo la medida de actividad antioxidante, en la piperina las vesículas MLV tienden a mantener constante el porcentaje de actividad inhibitoria en las tres distintas concentraciones. Cabe resaltar que, en la muestra preparada con piperina libre, se tomó una alícuota directa de las soluciones para reaccionar con DPPH, a diferencia de los MLV que fueron diluidos, obteniéndose valores de absorbancias cercanas

a la absorbancia de control (A_0). El valor de IC_{50} para las vesículas cargadas con extracto no fue calculado, su porcentaje de actividad inhibitoria fue muy baja. Al igual que en la piperina libre, en las vesículas cargadas con piperina se obtuvo un promedio de IC_{50} muy alto y desviación grande.

4 Conclusiones

Se optimizaron exitosamente las condiciones de extracción de piperina en la especie *Piper tuberculatum* asistida por Ultrasonido, disminuyendo tiempo de extracción y cantidad de disolvente empleado.

Mediante cromatografía líquida de alta resolución, se validó el método de extracción. Éste fue preciso, sensible y exacto para la determinación de piperina en el extracto de la especie *Piperaceae*.

Se logró aislar, caracterizar e identificar la piperina presente en *Piper tuberculatum* a través de técnicas espectroscópicas.

El extracto de pipilongo presentó una actividad antioxidante frente al DPPH de 2.8 ± 0.2 ppm similar a la quercertina (2.5 ± 0.1 ppm).

El encapsulado de extracto de pipilongo y de la piperina en vesículas multilamelares presentaron disminuciones de la actividad antioxidante con DPPH debido a la protección molecular.

Agradecimientos. A la Universidad del Valle y a la Vicerrectoría de Investigaciones por el apoyo logístico para la realización de éste proyecto.

Referencias Bibliográficas

1. Restrepo J, Colmenares A, Mora L, Sánchez R. Extraction, chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of pipilongo (*Piper tuberculatum*) using supercritical carbon dioxide. *Rev. Cienc.* 2013; 17(Especial Química): 45-56.
2. Wattanathorn J, Chonpathompikunlert P, Muchimapura S, Priprem A, Tankamnerdthai O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(9): 3106–3110.
3. Pei YQ. A Review of Pharmacology and Clinical Use of Piperine and Its Derivatives. *Epilep.* 1983; 24(2): 177–182.
4. Tripathi, AK Ali, S., Mishra DP. Attenuated Antioxidant property of UV-B Irradiated Piperine in Ischemia-Reperfusion Injury in SD rat. *G-J Enviro Sci Techno.* 2013; 1(2):29-36.

5. Bose-Kotte SC, Dubey PK, Murali PM. Identification and characterization of stress degradation products of piperine and profiling of a black pepper (*Piper nigrum L.*) extract using LC/QTOF-dual ESI-MS. *Anal Methods*. 2014; 6:8022-8029.
6. Srinivasan K. Black Pepper and its Pungent Principle-Piperine: A Review of Diverse Physiological Effects. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007;47(8): 735-748.
7. Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Córdoba A, Sala S, Veciana J, *et al.* Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine. *Pro Mol Biol Transl Sci*. 2011; 104: 1–52.
8. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Nanomedicine-challenge and perspectives. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(5): 872–897.
9. Kerdudo A, Dingas A, Fernandez X, Faure C. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2014;159: 12–19.
10. Maherani B, Arab-Tehrany E, Kheiriloom A, Geny D, Linder M. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*. 2013;95(11): 2018–2033.
11. Eloy JO, Claro de Souza M, Petrilli R, Barcellos JP, Lee RJ, Marchetti JM. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014; 123:345–363.
12. Taylor K.MG, Taylor G, Kellaway IW, Stevens J. Drug entrapment and release from multilamellar and reverse-phase evaporation liposomes. *Int J Pharm*. 1990; 58(1):49–55.
13. Manojlovic V, Winkler K, Bunjes V, Neub A, Schubert R, Bugarski B, Lenewit G. Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein. *Colloids Surf. B:Biointerfaces*. 2008;64(2): 284–296.
14. McClements DJ. Design of nano-laminated coatings to control bioavailability of lipophilic food components. *J Food Sci*. 2010; 75(1): 30–42.
15. Epstein WW, Netz DF, Seidel JL. Isolation of piperine from Black pepper. *Journal of Chemical Education*. (1993); 70(7): 598-599.
16. Wena Z, Liua B, Zhenga Z, Youa X, Pua Y, Qiong Li Q. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. *ICHEM*. 2010; 88(8): 1102–1107.
17. Rathod SS, Rathod, VK. Extraction of piperine from *Piper longum* using ultrasound. *Industrial Crops and Products*. 2014;58: 259–264.
18. Dey S, Rathod VK. Ultrasound assisted extraction of beta-carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013; 20(1): 271–276.

19. Pereira-Lachataignerais J, Pons R, Panizza P, Courbin L, Rouch J, López O. Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2006;140(1-2): 88–97.
20. Zarai Z, Boujelbene E, Salem NB, Gargouri Y, Sayari A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - Food Science and Technology*. 2013; 50(2), 634–641.

Dirección de los autores

Lina M. Reyes Solís

Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - Colombia

lina.reyes@correounivalle.edu.co

Jaime Restrepo

Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - Colombia

jaime.restrepo@correounivalle.edu.co

Rubén A. Sánchez

Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - Colombia

ruben.sanchez@correounivalle.edu.co