

Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de *Piper auritum* Kunth

Phytochemical and antibacterial properties of *Piper auritum* Kunth

Aymara Luisa Valdivia Avila, Yasmery Rubio Fontanills, Conrado Camacho Campos, Odelin Brea Maure, Madyu Matos Trujillo, Maryla Sosa del Castillo, Yunel Pérez Hernández*

Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Centro de Estudios Biotecnológicos, Cuba
Autopista a Varadero, Km 3 ½,
Ciudad de Matanzas, Cuba
Autor de correspondencia: yunel.perez@umcc.cu

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de hojas y raíces de plantas de *Piper auritum* Kunth, presentes en el municipio de Matanzas, Cuba. Las hojas y las raíces de plantas adultas fueron lavadas, secadas y pulverizadas. Se realizaron extracciones con etanol 96% y agua destilada, las mezclas se filtraron y concentraron en un rotaevaporador. Se determinó la cantidad relativa de varias familias de metabolitos secundarios y se cuantificó el contenido de fenoles solubles, azúcares reductores, carbohidratos y proteínas solubles. Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico mediante la técnica de los pocillos, contra dos especies bacterianas estándar y otras asociadas a mastitis. Como resultado se observó la presencia de terpenos, flavonoides, cumarinas, taninos y glucósidos cardiotónicos en extractos de hojas y raíces, los cuales poseen diversas actividades farmacéuticas. Las hojas mostraron una concentración elevada de fenoles solubles. Los extractos etanólicos de hojas y raíces de

Abstract

The objective of the present work was to evaluate the phytochemical and antibacterial properties of leaf and root's extracts of *Piper auritum* Kunth plants, present in the municipality of Matanzas, Cuba. Leaves and roots of adult plants were washed, dried and pulverized. Extractions were made with 96% ethanol and distilled water, the mixtures were filtered and concentrated in a rotary vacuum evaporator. The relative quantity of various families of secondary metabolites was determined and the content of soluble phenols, reducing sugars, carbohydrates and soluble proteins was quantified. The antibacterial activity of the ethanolic extract was evaluated by means of the well diffusion method, against two standard bacterial species and others associated with mastitis. As a result, the presence of terpenes, flavonoids, coumarins, tannins and cardiac glycosides in leaf and root extracts was observed, which have diverse pharmaceutical activities. Leaves showed a high concentration of soluble phenols. The ethanolic extracts of leaves and root

Piper auritum tuvieron un efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Con respecto a la actividad antibacteriana contra cepas asociadas a mastitis, los mejores resultados se obtuvieron con los extractos de hojas, lo que sugiere el uso potencial de los extractos de *Piper auritum* para el tratamiento de la mastitis u otros trastornos infecciosos e inflamatorios en animales. La presencia de compuestos polifenólicos de naturaleza antioxidante, pueden explicar la actividad antiinflamatoria atribuida a esta especie.

Palabras clave

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, mastitis, metabolitos secundarios.

of *Piper auritum* have an antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Concerning the antimicrobial activity against mastitis related strains; the best results were obtained with the leaf extract, which suggests the potential use of *Piper auritum* extracts for the treatment of mastitis or other infectious and inflammatory disorders in animals. The presence of polyphenolic compounds with antioxidant nature, may explain the anti-inflammatory activity conferred to this species.

Keywords

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, mastitis, secondary metabolites.

Introducción

La naturaleza constituye una fuente inagotable de agentes bioactivos con principios farmacéuticos diversos, que han estado a disposición del hombre desde la antigüedad. Gran parte de las poblaciones en los países tropicales y en vías de desarrollo, utilizan la medicina tradicional como base para mejorar la salud (Chrinius *et al.*, 2011). Además, en la farmacopea moderna, un 25% de las drogas son derivadas de plantas y muchas otras son sintéticos análogos construidos a partir de compuestos prototipos aislados de vegetales (Tamilselvan *et al.*, 2014).

A pesar de las posibilidades ilimitadas que ofrece el reino vegetal para la identificación y desarrollo de nuevos fármacos, se realizan pocos trabajos interdisciplinarios acerca de la validación científica y antropológica de los remedios tradicionales (Maxia *et al.*, 2005). Como resultado, los estudios etnoveterinarios contribuyen solamente a la investigación sobre el empleo de extractos vegetales para el tratamiento de las patologías animales.

La búsqueda de sustitutos fitoterapéuticos o alimentarios, válidos para la salud de los animales, constituye un tema vigente en el sector agropecuario. Esta situación se hace patente debido a que el uso indiscriminado de antibióticos convencionales provoca el desarrollo de cepas bacterianas patógenas con resistencia a estas drogas, lo que dificulta el tratamiento de los animales afectados. Por esta razón se han impulsado las investigaciones hacia la búsqueda de sustancias de origen vegetal con actividad antibacteriana para combatir enfermedades infecciosas en animales (Farhan *et al.*, 2013). El objetivo del presente trabajo fue evaluar las propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos etanólicos y acuosos de hojas y raíces de *Piper auritum* (Piperaceae).

Materiales y métodos

Material vegetal

Se colectaron 1.5 kg de hojas y raíces frescas de plantas adultas sanas de *Piper auritum* presentes en el campus de la Universidad de Matanzas, Cuba. La identificación taxonómica de la especie se realizó por especialistas del Jardín Botánico de Matanzas. La colecta se realizó en el mes de octubre de 2016 entre 8:00 y 9:00 am.

Preparación de los extractos

Las hojas y raíces fueron lavadas primeramente con agua destilada para eliminar el polvo. Las muestras fueron secadas en una estufa (Boxun) a 45°C y posteriormente pulverizadas en un molino eléctrico (Daytron).

La caracterización fitoquímica se realizó con extractos etanólicos (90%) y acuosos. Para ello se mezclaron 5 g de polvo de hojas y raíces secas en 50 ml de ambos solventes, en matraces de 250 ml, y se colocaron en agitación sobre una zaranda orbital (HDL® Apparatus) a 160 rpm por 24h. Posteriormente, las muestras fueron filtradas con papel de filtro Whatmann # 40. Los extractos fueron conservados en frascos ámbar a 4°C para los ensayos fitoquímicos. Para el experimento de actividad antibacteriana se utilizaron 100 g de polvo de ambos órganos y la extracción se realizó en etanol 90% (3L) durante 48 h. Los extractos fueron filtrados de igual forma, concentrados en un rotoevaporador y posteriormente se secaron en una estufa a 50°C (Mohammed *et al.*, 2013).

Estudio fitoquímico

Contenido de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se determinó con el método del ácido dinitrosalisílico y se empleó la D-glucosa (Sigma) como azúcar patrón (Miller, 1959). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 456 nm.

Contenido de carbohidratos solubles totales

La cuantificación de carbohidratos en las muestras se realizó colorimétricamente mediante el método del fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), con el uso de D-glucosa como azúcar patrón. Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 490 nm.

Contenido de proteínas solubles totales

El contenido proteico se determinó colorimétricamente mediante el método descrito por Lowry *et al.* (1951), con el uso de albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Los valores de absorbancia se obtuvieron a 750 nm y las concentraciones (mg/ml) se determinaron mediante la curva patrón.

Contenido de fenoles solubles

La extracción de los fenoles solubles se realizó según el método descrito por Quiñones *et al.* (2015). Se mezcló 0.1g de polvo de hojas secas y metanol (3 veces hasta volumen final 1 ml). La mezcla se agitó vigorosamente, se centrifugó a 15 000 rpm durante 5 minutos y se colectó el sobrenadante. El precipitado se homogenizó en hidróxido de sodio 2 mol l⁻¹ para la extracción de los fenoles ligados a las paredes celulares, y luego se neutralizó

en igual volumen de ácido clorhídrico 2 mol l⁻¹. La concentración de fenoles solubles se determinó con el uso de ácido clorogénico (0.05 mol/l) como patrón y los valores de absorbancia fueron determinados a 725 nm.

Contenido relativo de metabolitos secundarios

Para la determinación de los metabolitos secundarios se utilizó la metodología descrita por Chigodi *et al.* (2013). Se evaluaron de manera cualitativa los extractos etanólico y acuoso de hojas y raíces.

Antocianinas: se mezcló 1 ml de cada extracto con 3 ml de agua destilada y posteriormente se adicionó 1 ml de ácido clorhídrico (HCl) 2 mol l⁻¹ y de solución amoniacal 0.5 mol l⁻¹ a 1 ml de la mezcla anterior. La presencia de un color rosado-rojo que se torna azul-violeta indicó la presencia de antocianinas.

Terpenoides: se mezcló 1 ml de cada extracto con 1 ml de cloroformo (CHCl₃) y a continuación se adicionaron 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. La coloración rojo-parda en la interfase indicó la presencia de terpenoides.

Flavonoides: se adicionó 1 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 mol l⁻¹ a 1 ml de cada extracto y posteriormente se agregó igual volumen de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 mol l⁻¹. La formación de un color amarillo en la solución indicó la presencia de flavonoides.

Taninos: se mezcló 1 ml de cada extracto con 2 ml de agua destilada y la mezcla se calentó en un baño termostataado. Posteriormente se le adicionaron dos gotas de solución de cloruro férrico al 1% en metanol. La presencia de taninos se identificó mediante la formación de un color verde oscuro en la solución.

Saponinas: se mezcló 1 ml de cada extracto con 3 ml de agua destilada, se agitó con vigor y posteriormente la mezcla se calentó a 100°C. La formación de espuma con pequeñas burbujas mostró la presencia de saponinas.

Antraquinonas: se mezclaron 2 ml de cada extracto con 3 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 10% y la mezcla se calentó a 100°C durante 3 minutos en baño termostataado. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Seguido se adicionó igual volumen de cloroformo (CHCl₃) y a continuación unas gotas de solución amoniacal al 10% y se volvió a calentar la mezcla. La formación de una coloración rosada indicó la presencia de antraquinonas.

Glucósido cardiotónico: se mezcló 1 ml de cada extracto con 1 ml de ácido acético glacial que contenía una gota de solución de cloruro férrico al 1%. A cada mezcla se adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo de ensayo 1 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄). La presencia de desoxiazúcares característicos de los compuestos cardiotónicos se observaron por la formación de un anillo pardo en la interfase junto a un anillo púrpura.

Flobataninos: se mezcló 1 ml de cada extracto con una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 2% y se calentó a 100°C. La presencia de flobataninos se determinó por la formación de un precipitado rojo.

Esteroides: se mezcló 1 ml de cada extracto con 3 ml de cloroformo (CHCl₃) y se agitó la mezcla. Posteriormente se adicionaron cuidadosamente 2 ml de H₂SO₄ concentra-

do por los lados del tubo de ensayo. La formación de un color rojo en la capa superior y una coloración verde en la capa de H_2SO_4 indicó la presencia de esteroides en el extracto.

Emodinas: se mezcló 1 ml de cada extracto con 1 ml de hidróxido de amonio (NH_4OH) y 2 ml de benceno. La formación de una coloración roja indicó la presencia de emodinas.

Cumarinas: se mezcló 1 ml de cada extracto con 1 ml de hidróxido de sodio ($NaOH$) al 10%. La formación de una coloración amarilla indicó la presencia de cumarinas en el extracto.

La presencia de los metabolitos se determinó de manera cualitativa a través del sistema no paramétrico de cruces (MINSAP, 1997). Presencia: +++ = abundante; ++ = moderado; + = bajo y - = ausencia.

La determinación cualitativa de los metabolitos secundarios y las lecturas de absorbancia para las cuantificaciones bioquímicas se realizaron por triplicado.

Actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos se evaluó frente a dos bacterias de referencia (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922), así como cepas salvajes aisladas e identificadas previamente, presentes en fluidos de ubres de vacas con mastitis: *S. aureus*, *S. epidermidis* (Gram positivas), *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Gram negativas). El ensayo se realizó mediante la técnica de difusión en pocillos (Pérez *et al.*, 1990).

Las cepas bacterianas fueron resembradas previamente sobre medio Agar Cerebro de Corazón a 37°C. Se inoculó el medio Agar Mueller-Hinton con células de turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland con el uso de un hisopo estéril. Los pocillos se realizaron con la ayuda de un orador estéril de 8 mm de diámetro y se les adicionaron 150 μL de cada extracto (100 mg.ml⁻¹). Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C. Como control positivo se utilizó la tetraciclina (45 μg) y como control negativo la solución hidroalcohólica. La actividad antibacteriana se obtuvo a partir del diámetro de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. Se realizaron tres réplicas por cada extracto evaluado (Parekh y Chanda, 2006).

Diseño experimental y análisis estadístico

Los ensayos de actividades antibacteriana se realizaron mediante un diseño completamente aleatorizado. Los datos correspondientes a los análisis bioquímicos cuantitativos y a la actividad antibacteriana fueron procesados con el paquete SPSS versión 15.0 para Windows. Se determinó el ajuste de los datos a una distribución normal mediante la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov-Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett (Sigarroat, 1985). En caso de que los datos cumplieran los requisitos exigidos fueron procesados mediante ANOVA de clasificación simple y se realizó la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey HSD para la comparación entre las medias. Los datos que no cumplieron con estas premisas fueron analizados mediante la Prueba de Kruskal-Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Kwels (SNK).

Resultados

Evaluación fitoquímica

Se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos y etanólicos de hojas y raíces de *Piper auritum*. Se observó la presencia de terpenos, flavonoides, taninos y glucósidos cardiotónicos en ambos órganos, mientras que las cumarinas sólo se detectaron en hojas. El extracto etanólico fue más eficaz en la extracción de terpenos en raíz, flavonoides en hojas y glucósidos cardiotónicos en raíz, en comparación con el acuoso. En el resto de los casos no se apreciaron diferencias entre los solventes (cuadro 1).

Cuadro 1

Contenidos relativos de metabolitos secundarios en extractos acuosos y etanólicos de hojas y raíces de *Piper auritum*.

Metabolito secundario	Hoja		Raíz	
	E. Ac	E. Et	E. Ac	E. Et
Terpenoides	++	++	+	++
Flavonoides	+	++	+	+
Antocianinas	-	-	-	-
Esteroides	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-
Cumarinas	++	++	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Glucósidos cardiotónicos	+	+	+	+++
Flobataninos	-	-	-	-
Emodinas	-	-	-	-

E. Ac: extracto acuoso; E. Et: extracto etanólico; contenido: +++ = abundante, ++ = moderado, + = bajo, - = ausencia

El contenido de carbohidratos solubles totales, azúcares reductores y proteínas solubles totales se muestra en el cuadro 2. En general, las hojas mostraron valores superiores comparados con los de la raíz en carbohidratos, azúcares reductores y proteínas solubles. Las concentraciones más elevadas de estos compuestos se observaron en los extractos etanólicos de ambos órganos.

Cuadro 2

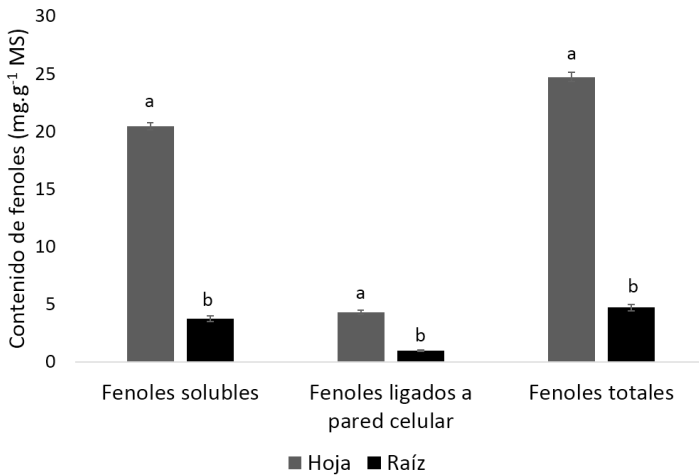
Contenido de carbohidratos solubles totales (CST), azúcares reductores (AR) y proteínas solubles totales (PST) en extractos acuosos y etanólicos de hoja y raíz de *Piper auritum*.

Extracto	CST (mg.ml ⁻¹)	AR (mg.ml ⁻¹)	PST (mg.ml ⁻¹)
Hoja (etanol)	7.32 ^a ± 0.12	2.21 ^a ± 0.05	11.14 ^a ± 0.27
Hoja (agua)	1.71 ^c ± 0.08	0.89 ^c ± 0.04	6.63 ^b ± 0.21
Raíz (etanol)	2.50 ^b ± 0.23	1.63 ^b ± 0.09	3.87 ^c ± 0.16
Raíz (agua)	0.94 ^c ± 0.11	0.21 ^d ± 0.02	1.12 ^d ± 0.07

Letras diferentes indican diferencias significativas según Test de Tukey (P≤0.05). Los valores representan las medias de tres repeticiones y el error estándar.

Los contenidos más elevados de polifenoles totales se obtuvieron en las hojas (figura 1). En este órgano los valores de fenoles solubles, ligados a la pared celular y totales, fueron de 20.43, 4.27 y 24.70 mg.g⁻¹, respectivamente; mientras que en las raíces los valores correspondientes fueron de 3.74, 0.96 y 4.70 mg.g⁻¹ de masa seca.

Figura 1
Contenido de fenoles solubles, ligados a pared celular y totales en hoja y raíz de *Piper auritum*.



Letras diferentes indican diferencias significativas entre órganos según Test Student-Newman-Keuls ($P \leq 0.05$).

Actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antimicrobiana muestran un efecto antibacteriano de los extractos de hojas y raíces de *Piper auritum*, contra las diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas que se enfrentaron (cuadro 3). La actividad antibacteriana ante las cepas de referencias fue mayor que la observada frente a las cepas salvajes. Además, la inhibición de *S. aureus* resultó mayor en comparación a los valores obtenidos con *E. coli*. Tanto el extracto de hoja como de raíz mostraron una actividad inhibitoria semejante frente a *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (salvaje), *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* (salvaje); sin embargo, frente a *S. epidermidis* y *K. pneumoniae*, solamente el extracto de hojas mostró efectividad, aunque estadísticamente los resultados fueron inferiores al control.

Al comparar la inhibición del crecimiento de las cepas Gram positivas y Gram negativas frente a los extractos utilizados, se observó una mayor actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas.

Cuadro 3

Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de hojas y raíces de *Piper auritum* frente bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas.

Controles/extractos	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. aureus</i> (salvaje)	
	DZI (mm)	± EE	DZI (mm)	± EE
Hoja	19.5 ^a	0.05	15.0 ^a	0.13
Raíz	6.8 ^c	0.13	4.0 ^b	0.12
Tetraciclina	15.5 ^b	0.03	18.3 ^a	0.09
Solución hidroalcohólica	0.0 ^d	0.00	0.0 ^c	0.00
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>E. coli</i>	
	DZI (mm)	± EE	DZI (mm)	± EE
Hoja	7.2 ^b	0.04	10.75 ^b	0.49
Raíz	5.0 ^b	0.07	12.25 ^b	0.43
Tetraciclina	14.5 ^a	0.25	24.33 ^a	1.45
Solución hidroalcohólica	0.0 ^d	0.00	0.0 ^d	0.00
	<i>S. epidermidis</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
	DZI (mm)	± EE	DZI (mm)	± EE
Hoja	12.1 ^b	0.03	8.3 ^b	0.04
Raíz	0.0 ^c	0.00	0.0 ^c	0.00
Tetraciclina	17.0 ^a	0.05	17.5 ^a	0.15
Solución hidroalcohólica	0.0 ^c	0.00	0.0 ^c	0.00

DZI: diámetro de la zona de inhibición. Los datos representan medias de tres réplicas. Letras diferentes indican diferencia significativa según Test de Tukey HSD ($P \leq 0.05$).

Discusión

Estudio fitoquímico

La presencia de compuestos flavonoides y terpenoides fue descrita previamente en varias especies dentro del género *Piper* como *P. aduncum*, *P. hispidum*, *P. sanctum*, *P. amalago*, *P. auritum* (Carmona-Hernández *et al.*, 2014), *P. crocatum* (Saputra *et al.*, 2016) y *P. callosum* (Silva *et al.*, 2017). De manera similar, los taninos se encontraron en otras piperáceas como *P. nigrum* (Kumar *et al.*, 2014), *P. guineense* (Chinwendu *et al.*, 2016) y *P. callosum* (Silva *et al.*, 2017). En la presente investigación no se detectaron saponinas en los órganos evaluados, lo cual coincide con Saputra *et al.* (2016). Sin embargo, estos compuestos fueron detectados en otras piperáceas como *P. nigrum* (Kumar *et al.*, 2014) y *P. Guineense* (Chinwendu *et al.*, 2016), lo cual puede estar relacionado con diferentes factores ambientales o el método utilizado para la determinación de tales sustancias.

Los glucósidos cardiotónicos y las cumarinas también fueron referidas por otros autores dentro del género *Piper*. Ganesh *et al.* (2014) observaron la presencia de glucósidos cardiotónicos en extractos etanólicos y clorofórmicos de hojas de *P. nigrum* L., mientras que las cumarinas fueron encontradas en los extractos de *P. hispidum*, *P. umbellatum*, *P. nudumand* y *P. psilorhachis* (Carmona-Hernández *et al.*, 2014). Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con los observados por Car-

mona-Hernández *et al.* (2014) quienes no detectaron la presencia de cumarinas en extractos etanólicos de hojas de *P. auritum*, aunque observaron estos compuestos en otras especies como *P. hispidium*, *P. nudum*, *P. psilorhachis*, *P. umbellatum*.

La presencia de terpenoides y flavonoides en los extractos evaluados pueden indicar un uso potencial de éstos en diferentes patologías, debido a las propiedades antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, antisépticas y antiinflamatorias referidas a dichos compuestos (Craft *et al.*, 2012). La capacidad antioxidante de los flavonoides y los terpenoides sugiere el uso de *Piper auritum* como planta con potencialidades para el tratamiento de patologías asociadas con el estrés oxidativo, como la aterosclerosis, la trombosis, las enfermedades neurodegenerativas, la *Diabetes mellitus*, el cáncer, las enfermedades coronarias, entre otras (Ugusman *et al.*, 2012; Zubair *et al.*, 2013). Las propiedades antioxidantes de los flavonoides fueron asociadas con la capacidad para eliminar las especies reactivas del oxígeno, así como con la acción quelatante de metales de transición como el cobre y el hierro; los cuales, en presencia de peróxido de hidrógeno, pueden generar otros radicales más potentes que afectan el funcionamiento de numerosas macromoléculas esenciales y estructuras celulares (Alam *et al.*, 2012).

La presencia de cantidades notables de glucósidos cardiotónicos en los extractos de *P. auritum*, específicamente en las raíces, sugiere un uso de esta especie como fuente de estas sustancias que tienen diversas actividades farmacológicas en especial como citostáticos (Mijatovic *et al.*, 2012; Calderon-Montano *et al.*, 2013). De manera similar, las cumarinas y sus derivados bioactivos también son compuestos que presentan diversas propiedades farmacológicas y constituyen esqueletos carbonados de los cuales se pueden sintetizar nuevos fármacos. Estos metabolitos poseen diferentes principios bioactivos como actividad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, bacteriostática y anticoagulante, por lo cual se asocian con efectos beneficiosos como la reducción al riesgo de padecer diferentes patologías como el cáncer, la diabetes, trastornos cardiovasculares y cerebrales (Al-Majedy *et al.*, 2017). Nitiema *et al.* (2012) evaluaron el efecto antibacteriano de cumarinas contra diferentes microorganismos y observaron un efecto inhibitorio contra *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*.

La presencia de carbohidratos solubles en extractos etanólicos fue observada con anterioridad en otras piperáceas como *Piper nigrum* y *Piper umbellatum* (Kumar *et al.*, 2014; Nwauzoma *et al.*, 2013). De manera similar, la presencia abundante de proteínas solubles en hojas de *Piper auritum* también fue referida dentro del género por Nwauzoma *et al.* (2013).

Los contenidos de polifenoles en las hojas de *P. auritum*, sugieren un uso potencial de esta especie en el tratamiento de patologías asociadas al estrés oxidativo en humanos y animales, ya que estos compuestos mostraron una correlación fuerte con la actividad antioxidante (Keerthana *et al.*, 2014; Mesa-Vanegas *et al.*, 2015). Además, la presencia de estos metabolitos secundarios de naturaleza antioxidante, justifica las propiedades antiinflamatorias atribuidas a las hojas de *Piper auritum* (Pérez *et al.*, 2012).

Los compuestos polifenólicos tienen funciones importantes en la reducción de las especies reactivas del oxígeno (Chahar y Sharma, 2017). Estos radicales atacan y modifi-

can un rango amplio de macromoléculas que tienen funciones vitales a nivel celular como las enzimas, los ácidos nucleicos y los lípidos de membranas. Esto provoca cambios en las propiedades biológicas de estos compuestos y su mal funcionamiento a nivel celular, lo cual puede exacerbar el desarrollo de patologías como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, los procesos inflamatorios, las enfermedades cardiovasculares, entre otras (Mohammed y Abbas, 2016; Jun *et al.*, 2016).

De manera general, los metabolitos secundarios encontrados en extractos de hojas y raíces de *Piper auritum*, muestran un uso potencial en la medicina humana, animal y en el sector agropecuario, lo cual se atribuye a que la mayoría de los componentes identificados fueron referidos como agentes terapéuticos o para el control de plagas y enfermedades en plantas y animales.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana encontrada en los extractos de hojas y raíces de *P. auritum*, puede estar relacionada con la presencia de determinados metabolitos secundarios identificados en las pruebas bioquímicas, como los flavonoides, los terpenos y los taninos, a los cuales se les atribuyó actividades antimicrobianas (Reena *et al.*, 2012).

En estudios realizados por Rojas *et al.* (2014) se observó una actividad antibacteriana contra *Pectobacterium carotovorum*, la cual fue asociada con la presencia de mono-terpenos, los que pueden provocar daños estructurales y funcionales a las membranas lipídicas. Estos metabolitos interactúan con proteínas de membrana e inducen cambios en la polaridad de esta estructura, lo que provoca la liberación de material intracelular de las bacterias (Hyldgaard *et al.*, 2012; Rajendran *et al.*, 2014).

Los taninos pueden reaccionar con proteínas ricas en prolina para formar complejos irreversibles que provocan la inhibición de la síntesis de proteínas, de ahí que estos compuestos posean actividad antibacteriana. Las plantas que presentan taninos como componente astringente principal, se utilizan para el tratamiento de desórdenes intestinales como diarreas y disenterías (Vu *et al.*, 2017).

La actividad inhibitoria inferior de los extractos frente a las cepas Gram negativas, pudo estar relacionada con la mayor complejidad que presentan las paredes celulares de estas bacterias Gram negativas en comparación con las Gram positivas. Las primeras poseen, además de la capa de peptidoglicano, una capa de lipopolisacáridos que puede constituir un obstáculo para la entrada de metabolitos secundarios de peso molecular elevado hacia el interior de la célula, los cuales son asociados con la acción antibacteriana (Madigan *et al.*, 2015).

Trabajos similares sobre evaluación de la actividad antibacteriana contra bacterias asociadas con la mastitis, evidenciaron un uso potencial de los extractos vegetales para el control de dicha enfermedad (Toribio *et al.*, 2009; Voigt *et al.*, 2013). A pesar de haber obtenido resultados positivos con relación al efecto antibacteriano de los extractos contra cepas asociadas a mastitis, es importante realizar estudios *in vivo* para determinar la efectividad del producto. En un trabajo similar realizado por Leal (2014) con extractos de diferentes especies vegetales para el control de la mastitis, se observó un efecto bac-

tericida frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*; sin embargo, cuando se realizó la aplicación de los biopreparados (extractos vegetales y propilenglicol como vehículo) a los animales afectados con mastitis, los resultados obtenidos por estos autores no fueron los esperados y se observaron reacciones adversas.

Los ensayos antibacterianos realizados en la presente investigación demuestran el uso potencial de *Piper auritum*, como fuente de agentes terapéuticos naturales para combatir infecciones de origen bacteriano. Las propiedades antibacterianas de los extractos de hojas de *Piper auritum* contra cepas bacterianas salvajes aisladas de vaca con mastitis, indican la posibilidad de utilizar estos extractos para el control y prevención de esta enfermedad común en el ganado bovino, aunque se requieren de ensayos posteriores *in vivo*.

Conclusiones

Se observó la presencia de flavonoides, terpenos, taninos, cumarinas y glucósidos cardiotónicos en los extractos acuosos y etanólicos de hojas y raíces de *Piper auritum*, los cuales son de interés en la industria farmacéutica y agropecuaria. Se cuantificó una concentración elevada de compuestos polifenólicos solubles en las hojas de *P. auritum*, que puede justificar el efecto antiinflamatorio referido para esta especie.

La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de hojas de *Piper auritum* frente a bacterias de referencia internacional y cepas patógenas asociadas a mastitis, sugieren un uso potencial de esta planta para el tratamiento de esta enfermedad en el ganado vacuno.

Literatura citada

- Alam, N.; Hossain, M.; Mottalib, M.A.; Suliman, S.A.; Gan, S.H. and Khalil, I. (2012). Methanolic extracts of *Withania somnifera* leaves, fruits and roots possessantioxidant properties and antibacterial activities. *Complementary and Alternative Medicine* 12(175): 2-8.
- Al-Majedy, Y.; Al-Amiery, A.; Kadhum, A.A.; and Mohamad, A.B. (2017). Antioxidant Activity of Coumarins. *Sys Rev Pharm.* 8(1): 24-30.
- Calderon-Montano, J.M.; Burgos-Moron, E. and Lopez-Lazaro, M. (2013). The *in vivo* antitumor activity of cardiac glycosides in mice xenografted with human cancer cells is probably an experimental artifact. *Webmed Central Cancer* 4(7): 1-12.
- Carmona-Hernández, O.; Fernández, M.; Palmeros-Sánchez, B.; y Lozada, J.A. (2014). Actividad insecticida de extractos etanólicos foliares de nueve piperáceas (*Piper* spp.) en *Drosophila melanogaster*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 30: 67-73. <http://www.redalyc.org/html/370/37033725008/> (Consulta: el 7 de enero de 2017).
- Chahar, S. and Sharma, J. (2017). Phytochemical screening, total flavonoid and phenolic content assays and antioxidant activity of *Momordica charantia* L. leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 6(3): 60-69.
- Chigodi, M.O.; Samoei, D.K. and Muthangya, M. (2013). Phytochemical screening of *Agavesisalana* Perrine leaves (waste). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 4(4): 200-204.
- Chinwendu, S.; Ejike, E.N.; Ejike, B.U.; Oti, W. and Nwachukwu, I. (2016). Phytochemical properties of Uziza leaf (*Piper guineense*). *European Journal of Pure and Applied Chemistry* 3(2): 12-15.
- Chrinus, H.; Yebpella, G.G.; Shallangwa, G.A.; Magomya, A.M. and Agbaji, A.S. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisalana*. *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research* 68(4): 535-539.

- Craft, B.D.; Adrian, L.K.; Ryszard, A. and Ronald, B.P. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11(2): 148-173.
- Dubois, M.K.; Gilles, A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal Chem.* 28(3): 350-356.
- Farhan, A.M.U.; Lee, P.C.; How, S.E. and Jualang, A.G. (2013). Antibacterial activities of *Agave angustifolia* and *Pittosporum ferrugineum*. *Environmental Microbiology and Toxicology* 1(1): 15-17.
- Ganesh, P.; Kumar, R.S. and Saranraj, P. (2014). Phytochemical analysis and antibacterial activity of Pepper (*Piper nigrum* L.) against some human pathogens. *Central European Journal of Experimental Biology* 3(2): 36-41.
- Hyldgaard, M.; Mygind, T. and Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* 3: (12): 1-24.
- Jun, Y.; Jian-Guo, W.; Yan-Bin, W. and Wei, P. (2016). Antioxidant and Anti-proliferative Activities of Flavonoids from *Bidens pilosa* L var radiata Sch Bip. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 15(2): 341-348.
- Keerthana, K.; Deepa, A.; Shobana, G.; Jothi, G. and Sridharan, G. (2014). Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant potential of *Euphorbia heterophylla* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(8): 550-553.
- Kumar, S.P.; Rahul, B.; Sumit, V. and Rashmi, A. (2014). Phytochemical investigation of ethanolic extract of *Piper nigrum*, *Zingiber officinale* and *Allium sativum* and spectrophotometric detection of piperine, gingerol and allicin. *International Research Journal of Pharmacy* 5(11): 814-816. ISSN 2230-8407.
- Leal, M. (2014). Eficacia antibacteriana de extractos de plantas: aplicación clínica en mastitis bovina. *Rev. U.D.CA Act. & Div. Cient.* 17(1): 179-187.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R. (1951). Protein measurement the Folinphenol reagent. *J. Biol Chem.* 193(1): 265-275.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, A. and Stahl, D.A. (2015). *Brock Biology of Microorganism*. Pearson Education. 14th Ed. USA. P. 41-48.
- Maxia, A.; Lancioni, C.; Mura, L. y Mongiano, P.D. (2005). Plantas usadas en la práctica etnoveterinaria en el Nuorese (Cerdeña, Italia). *Revista de Fitoterapia* 5(2): 155-161.
- Mesa-Vanegas, A.M.; Zapata-Urbe, S.; Arana, L.M.; Zapata, I.C.; Monsalve, Z. y Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 14(1): 1-10.
- Mijatovic, T.; Dufrasne, F. and Kiss, R. (2012). Cardiotonic steroids-mediated targeting of the Na⁽⁺⁾ / K⁽⁺⁾ - ATPase to combat chemoresistant cancers. *Curr. Med. Chem.* 19(5): 627-646.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- MINSAP (Ministerio de Salud Pública de Cuba). (1997). *Guía metodológica para la investigación en plantas medicinales*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.
- Mohammed, M.T. y Abbas, S.I. (2016). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effect of Fruit Juice of *Annona muricata* L (Soursop) During Ischemia Reperfusion Injury in Rats. *The Iraqi Postgraduate Medical Journal* 15(1): 118-123.
- Mohammed, M.; Musa, A.M.; Adeiza, A.A.; Musa, S. H. and Lande, L. (2013). Bioactive Caffeic Glycoside Ester and Antimicrobial Activity of Various Extracts from the Leaf of *Stachytarpheta angustifolia* Mill Vahl (Verbenaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2(3): 77-85.
- Nitiema, L.W.; Savadogo, A.; Simpore, J.; Dianou, D and Traore, A.S. (2012). In vitro Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strains. *International Journal of Microbiological Research* 3(3): 183-187.
- Nwauzoma, A.; Dawari, B. y Songo, D.L. (2013). Study on the phytochemical properties and proximate analysis of *Piper umbellatum* (Linn) from Nigeria. *American Journal of Research Communication.* 1(7): 164-177.

- Parekh, J. and Chanda, S. (2006). Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. *African Journal of Biomedical Research* 10: 175-181.
- Pérez, C.; Paul, M. and Bazerque, P. (1990). An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Acta Bio. Med. Exp.* 15: 113- 115.
- Pérez-Ruiz, K.M.; Romero-Ávila, M.; Tinajero-Delgado, V.; Flores-Alamo, M. and Iglesias-Arteaga, M.A. (2012). "BF₃.Et₂O-induced stereo selective aldol reaction with benzaldehyde, and steroid saponin and its application to a convenient synthesis of dinorcholanic lactones". *Steroids*. 77(7): 819-828.
- Quiñones, J.; Sosa, D.; Demey, J.R.; Alemán, S.; Sosa, M.; Parra, D.; Móvil, O.; Trujillo, R.; Capdesuñer, Y.; Quirós, Y.; Hernández, M. and Infante, D. (2015). Caracterización bioquímica de hojas de clones de *Theobroma cacao* y su relación con los tricomas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 17(2): 33-43.
- Rajendran, M.P.; Pallaiyan, B.B. and Selvaraj, N. (2014). Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves. *AJP* 4(21): 200-214.
- Reena, J.; Nidhi, K.; Vijay, K.; Amit, K.S.; Swati, G. and Shrotri, C.K. (2012). *In Vitro* Antibacterial Potential of Different Extracts of *Tagetes erecta* and *Tagetes patula*. *J. Natural Sci. Res.* 2(5): 84-90.
- Rojas, M.M.; Corzo, M.; Sánchez, Y.; Brito, D.; Montes de Ocall; R., Martínez, Y. and Pino, O. (2014). Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. *Rev. Protección Veg.* 29(3): 197-203.
- Saputra, A.; Andayani, S. and Nursyam, H. (2016). Total Quantity of Phenol and Isolation Methanol Tannin Extract of Red Betel Leaf (*Piper crocatum*). *International Journal of Pharm Tech Research* 9(7): 146-153.
- Sigarroa, A. (1985). *Biometría y Diseño Experimental*. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba. 743 p.
- Silva, R.J.F.; De Aguiar-Dias, A.C.A.; Do Faial, K. and De Mendonc, M.S. (2017). Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: valuable assessment for its quality control. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27(1): 20-33.
- Tamilselvan, N.; Thirumalai, T.; Shamala, P. and David, E. (2014). A review on some poisonous plants and their medicinal values. *Journal of Acute Disease* 10: 85-89.
- Torbio, M.S.; Oriani, S.D.; Toso, R.E.; Tortone, C.A. and Fernández, J.G. (2009). *Staphylococcus aureus* sensible a extractos metanólicos obtenidos de plantas nativas de la provincia de la Palma, Argentina. *Ciencia Veterinaria* 11(1): 74-18.
- Ugusman, A.; Zakaria, Z.; Hui, Ch.K.; Nordin, A.M.M. and Mahdy, Z.A. (2012). Flavonoids of *Piper sarmentosum* and its cytoprotective effects against oxidative stress. *EXCLI Journal*. 11:705-714. http://www.excli.de/vol11/Zakaria11_2012/Zakaria_09112012_proof.pdf (Consultada el 18 de diciembre de 2017).
- Voigt, F.; Damé, L.F.; Lambrecht, C.; Faccin, A.; Bender, D.; Bohm, B.C. y Ferreira, L. (2013). Actividad antibacteriana de los extractos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolán) frente a los microorganismos asociados a la mastitis bovina. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18(3): 495-501.
- Vu T.T.; Kim H.; Tran, V.K.; Vu, H.D.; Hoang, T.X.; Han, J.W.; Choi, Y.H.; Jang, K.S.; Choi, J.G. and Kim, J.Ch. (2017). Antibacterial activity of Tannins isolated from *Sapium baccatum* extract and use for control of tomato bacterial wilt. *PLoS ONE* 12(7): 1-12.
- Zubair, S.M.; Rasool, N.; Mansha, A.; Anjum, F.; Munawar, I.; Muhammad, M. and Muhammad, S. (2013). Antioxidant, antibacterial, antifungal activities and phytochemical analysis of dagger (*Yucca aloifolia*) leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 7(6): 243-249.

Recibido 18 de enero de 2018

Envío a arbitraje: 24 de enero de 2018

Dictamen: 22 junio de 2018

Aceptado: 22 julio de 2018



Título: *Piper Auritum* Kunth

Autora: Marisol Herrera Sosa

Técnica Acuarelas

Dimensiones: 12.5 cm x 17.5 cm