

MEDICINAL PLANT COMMUNICATIONS

Med Plant Commun

3 (3): 33 - 37 (2020) - <https://doi.org/10.37360/mpc.20.3.3.8>

© / ISSN 2452 4433

Short Communication

Actividad antimicrobiana de siete especies de *Piper* de la ecorregión cafetera colombiana sobre bacterias multirresistentes[Antimicrobial activity of seven *Piper* species from Colombian coffee-growing Eco-region against multidrug resistant bacteria]Oscar M. Mosquera¹, Román Y. Ramírez-Rueda² y Aura M. Blandón¹¹Grupo de Biotecnología-Productos Naturales, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia²Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasilomosquer@utp.edu.co

Abstract: Species of *Piper* genus are known for their numerous biological activities and their diverse phytochemical composition. The object of this work was to evaluate the antibacterial activity of extracts obtained from seven Piperaceae species. Broth microdilution technique was used for biological evaluation and some phytochemical nuclei present in the bioactive extracts were identified by thin layer chromatography and characterization reactions. Among the most important results, it is highlighted the inhibitory effect of the methanolic extract from *Piper pesaresanum* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATTC 43300, with minimum inhibitory concentration of 62.5 µg/mL. Additionally, secondary metabolites such as alkaloids, phenols and flavonoids were detected in this extract. In conclusion, the species *P. pesaresanum* showed high potential for bioguided search of antibacterial compounds against multidrug resistant *S. aureus*.

Keywords: Antimicrobial; Bacterial resistance; Phytopharmacology; Piperaceae; Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Resumen: Las especies del género *Piper* son conocidas por sus numerosas actividades biológicas y su diversa composición fitoquímica. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de siete especies de la familia Piperaceae. Se utilizó la técnica de microdilución en caldo para la evaluación de la actividad biológica y se identificaron algunos núcleos fitoquímicos presentes en los extractos bioactivos mediante cromatografía de capa delgada y reacciones de caracterización. Entre los resultados más importantes se destaca el efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Piper pesaresanum* frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (ATTC 43300) con una concentración mínima inhibitoria de 62,5 µg/mL. Adicionalmente, fueron detectados metabolitos secundarios como alcaloides, fenoles y flavonoides en este mismo extracto. En conclusión, la especie *P. pesaresanum* mostró un alto potencial en la búsqueda bioguiada de compuestos antibacterianos activos frente a *S. aureus* multirresistente.

Palabras clave: Antimicrobiano; Fitofarmacología; Piperaceae; *Staphylococcus aureus* resistente a metilina; Resistencia bacteriana.

Received: 18 de Marzo de 2020

Accepted: 17 de Julio de 2020

Published online: 30 de Septiembre de 2020

This article must be cited as: Mosquera OM, Ramírez-Rueda RY, Blandón AM. 2020. Actividad antimicrobiana de siete especies de *Piper* de la ecorregión cafetera colombiana sobre bacterias multirresistentes *Med Plant Commun* 3 (3): 33 – 37.

Trabajo de incorporación como miembro de Solaplamed por 3 años de Oscar M Mosquera (Colombia)

INTRODUCCIÓN

El género *Piper* (*Piperaceae*) es considerado como uno de los mayores géneros entre las angiospermas; comprende alrededor de 2000 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales [1]. Es común encontrar las especies de este género en bosques secos, sabanas y zonas de manglares en América tropical, así como en los bosques tropicales húmedos alrededor del mundo [2]. Colombia es uno de los países con mayor distribución de especies del género *Piper*, encontrándolas principalmente en la región Caribe, el Chocó, Valle del Cauca y Cundinamarca [3].

Las especies del género *Piper* son reconocidas por su amplia diversidad química; fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, flavonoides, amidas y protoflavonoides, entre otros tipos de compuestos, han sido aislados de diversas especies de este género, razón por la cual han cobrado gran importancia comercial [4]. Adicionalmente, gran variedad de propiedades medicinales ha sido atribuidas a especies del género *Piper*, entre ellas, se destaca la actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas y microorganismos resistentes a los antibióticos [5].

El aumento continuo y acelerado de la resistencia microbiana a los antibióticos es un problema de salud pública a nivel mundial, por esta razón, persiste la investigación de nuevos compuestos químicos activos frente a bacterias resistentes [6]. Esta búsqueda ha ido retornando hacia los productos naturales, debido al constante desarrollo de mecanismos de resistencia frente a los antibióticos sintéticos [7].

En este estudio se evalúa la actividad antibacteriana de extractos de diferente polaridad obtenidos a partir de siete especies del género *Piper* frente a bacterias resistentes a diversos antibióticos.

METODOLOGÍA

Las partes aéreas de las plantas fueron recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumari (PRNU), las cuales fueron identificadas y clasificadas por el taxónomo Francisco Javier Roldán. Un voucher de cada especie fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia. Las especies de *Piper* estudiadas fueron las siguientes: *Piper umbellatum* (FJR 4012), *Piper glanduligerum* (FJR 4026), *Piper eriopodon* (FJR 4007), *Piper calceolarium* (FJR 4048), *Piper pesaresanum* (FJR 3996), *Piper daniel-gonzalezii* (FJR 4051) y *Piper crassinervium* (FJR 4021).

El material vegetal (hojas y tallo) fue secado en un horno con aire forzado a 50 °C durante 72 h. El material seco y molido fue sometido a extracción por maceración pasiva durante 48 h con solventes en gradiente de polaridad (hexano, diclorometano, y metanol). Los extractos se concentraron por rotaevaporación a 45 °C y se mantuvieron a -10 °C hasta su utilización [2].

Las cepas bacterianas utilizadas para el ensayo fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 (betalactamasa positiva).

La técnica usada en la determinación de la actividad antibacteriana fue microdilución en caldo siguiendo el protocolo M07-A9 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El extracto fue diluido en agua destilada estéril previa dilución en DMSO cuya concentración final fue 2,5%. La concentración final del extracto durante el tamizaje fue 1 mg/mL, posteriormente, los extractos que presentaron bioactividad frente a alguna de las cepas bacterianas fueron diluidos de manera sucesiva desde 1 mg/mL hasta 0,0078 mg/mL para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Como controles fueron usados: control de inhibición (Cloranfenicol 100 µg/mL), control de diluyente (DMSO 2,5%), control de esterilidad (caldo Muller Hinton sin inocular) y control de crecimiento (caldo Muller Hinton inoculado sin adición de extracto). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Después de incubar las microplacas por 24 h a 37°C se agregó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) al 5% y se dejó en incubadora a 37°C por 60 minutos, tiempo después del cual la absorbancia fue leída a 570 nm en un espectrofotómetro Synergy LX Multi-Mode Reader (BioTek®).

Para el estudio fitoquímico cualitativo, los extractos crudos fueron sometidos a una marcha fitoquímica a través de

cromatografía de capa delgada de acuerdo al método propuesto por Wagner y Bladt. [8]. Como eluentes fueron empleadas mezclas hexano-acetato de etilo (70:30) y acetato de etilo:metanol:agua (100:13.5:10) para los extractos en diclorometano y metanol, respectivamente. Los núcleos fitoquímicos fueron detectados a través de reacciones de caracterización: Dragendorff, anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina 1% en ácido sulfúrico-etanol, cloruro férrico al 1% y tricloruro de aluminio al 2% para la identificación de alcaloides, esteroides, terpenos, saponinas, fenoles y flavonoides, respectivamente. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y en cada caso se emplearon patrones de comparación de los metabolitos secundarios analizados con el fin de corroborar la presencia de grupos fitoquímicos específicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las siete especies de *Piper* estudiadas, tres extractos fueron activos frente a *S. aureus* ATCC 43300, mientras que frente a las cepas bacterianas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. faecalis* ATCC 51299 ninguno de los extractos presentó bioactividad (Tabla 1). Las concentraciones mínimas inhibitorias son presentadas en la tabla 2 y el estudio fitoquímico cualitativo de los extractos obtenidos de estas especies exhibieron la presencia de los núcleos químicos mostrados en la tabla 3.

Tabla N° 1
Actividad de los extractos de algunas especies de *Piper* frente a microorganismo resistentes

Especie Microorganismo	<i>P. umbellatum</i>		<i>P. glanduligerum</i>		<i>P. eriopodon</i>		<i>P. calceolarium</i>		<i>P. pesaresanum</i>		<i>P. daniel-gonzalezii</i>		<i>P. crassinervium</i>	
	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M	D	M
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D: extracto en diclorometano; M: extracto en metanol; +: activo; -: inactivo

Tabla N° 2

Concentración mínima inhibitoria de los extractos activos de *Piper* frente a *S. aureus* resistente a meticilina

Especie/Extracto	CMI (µg/mL)
<i>P. pesaresanum</i> (M)	62.5
<i>P. daniel-gonzalezii</i> (D)	125
<i>P. crassinervium</i> (D)	250

M: extracto en metanol; D: extracto en diclorometano

Tabla N° 3

Grupos fitoquímicos principales presentes en los extractos activos de *Piper* frente a *S. aureus* resistente a meticilina

Especie/Extracto	Grupo fitoquímico
<i>P. pesaresanum</i> (M)	Alcaloides, fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas
<i>P. daniel-gonzalezii</i> (D)	Esteroides, saponinas, fenoles, taninos
<i>P. crassinervium</i> (D)	Saponinas, fenoles, flavonoides, taninos, lactonas

M: extracto en metanol; D: extracto en diclorometano

El género *Piper* es el más estudiado dentro de la familia *Piperaceae* y alberga el mayor número de especies con actividad farmacológica. En la medicina tradicional, las especies de *Piper* son utilizadas para diversas enfermedades como infecciones cutáneas y del tracto urinario, dolores de cabeza y fiebre [9].

Por otro lado, numerosas investigaciones han enfocado su estudio en plantas pertenecientes a este género,

comprobando una importante variedad de actividades biológicas, entre ellas actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria [10]. Asimismo, diversos metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas han sido aislados e identificados de plantas del género *Piper* [9].

Diferentes estudios han reportado actividad antibacteriana de extractos de las especies del género *Piper* frente a bacterias gram-positivas, como el extracto en diclorometano de *Piper nigrum*, el cual fue activo frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis* con CMI de 125, 62,5 y 125 ppm, respectivamente [11]. Por otro lado, extractos y fracciones de variada polaridad de *P. hayneanum* fueron activos frente a *S. aureus* en concentraciones desde 1.0 a 500 µg por el método de difusión con disco [12].

El extracto etéreo de *Piper aduncum* se reportó como fuertemente activo frente a *B. subtilis*, *E. coli* y *M. luteus*, sin embargo, presentó débil actividad antifúngica [13]. Por otro lado, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper hispidum* fue activo frente a *S. aureus* y *C. albicans* con una CMI de 62.5 µg/mL para cada microorganismo [14]. Asimismo, se reportó actividad del extracto hidroalcohólico de *Piper umbellatum* frente a *E. faecalis* con una CMI de 12.5 µg/mL, en este caso, la actividad antimicrobiana fue relacionada con la presencia de flavonoides [15].

El aceite esencial de *Piper hispidum* fue reportado como activo frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *E. faecalis* con valores de CMI entre 6.25-12.5 µg/mL, en este extracto fueron encontrados principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, compuestos que, adicionalmente, fueron relacionados con la actividad citotóxica de este aceite esencial [16].

En este estudio, fue encontrado que los extractos de tres especies del género *Piper* inhibieron el crecimiento de *S. aureus* multirresistente, con valores de CMI que varían desde 62.5 a 250 µg/mL; cabe destacar que esta bacteria es reconocida como uno de los más importantes patógenos responsable de un gran espectro de infecciones [17], por lo que el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas cobra gran importancia.

Otro estudio reportó que el extracto etanólico de *P. pesaresanum* contiene principalmente terpenos, esteroides, fenoles y cumarinas [18], tipos de compuestos que también fueron detectados en este estudio fitoquímico cualitativo.

CONCLUSIÓN

La especie *Piper pesaresanum* ha sido poco estudiada, solo algunas investigaciones llevadas a cabo en Colombia han comprobado la actividad antioxidante y la inhibición de acetilcolinesterasa de sus extractos. En este estudio, el extracto metanólico de *P. pesaresanum* reveló la mayor capacidad de inhibición de crecimiento de *S. aureus* resistente a la meticilina con una CMI de 62.5 µg/mL; el contenido de alcaloides, flavonoides y fenoles en él podría estar relacionado con la actividad antibacteriana frente a este microorganismo.

El fraccionamiento bioguiado del extracto metanólico obtenido de esta especie, con el fin de separar e identificar los compuestos químicos responsables de la actividad, será objeto de estudios futuros.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión de la Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.

REFERENCIAS

- [1] M Quijano-Abril et al., 2006. J Biogeogr 33: 1266.
- [2] Y Correa et al., 2015. Rev Cuba Plantas Med 20: 167.
- [3] JO Rangel-Ch, 2015. Rev la Acad Colomb Ciencias Exactas, Físicas y Nat 39: 176.
- [4] EE Mgbeahuruike et al., 2017. South African J Bot 112: 54.
- [5] JG da Costa et al., 2010. Pharmacogn Mag. 6: 331.
- [6] JCO Sardi J de CO et al., 2017. J Med Microbiol. 66: 816.
- [7] AL Harvey et al., 2015. Nat Rev Drug Discov 14: 111.
- [8] H Wagner et al., 1996. Plant drug analysis: thin layer chromatography atlas. Springer, Berlin, Germany.
- [9] AA Durant-Archibold et al., 2018. J Ethnopharmacol 217: 63.

- [10] R Ghosh et al., 2014. Int J Pharma Res Rev IJPRR 3: 67.
- [11] PV Karsha et al., 2010. Indian J Nat Prod Resour 1: 213.
- [12] M Bastos et al., 2011. J Chem Pharm Res 3: 213.
- [13] FG Braga et al., 2007. J Ethnopharmacol 111: 396.
- [14] GM Costa et al., 2016. J Mycol Med 26: 217.
- [15] IF Silva et al., 2014. J Ethnopharmacol 151: 137.
- [16] A Morales et al., 2013. J Appl Pharm Sci 3: 16.
- [17] C Cruz et al., 2006. Médicas UIS 19: 27.
- [18] L Nitola et al. 2016. Rev Cuba Plantas Med 21: 1.