

Actividad antimicrobiana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. (pimienta) sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas

Antimicrobial activity of aqueous, ethanolic and chlorophormic extracts of *Piper nigrum* L. (Black Pepper) on the growth of Gram-negative bacteria

M.D. Cabello Navas¹, G. Belloso², J. Colivet B.² y J. Méndez³

¹Universidad de Oriente, Unidad de Estudios Básicos.

²Escuela de Zootecnia.

³Escuela de Agronomía, Núcleo Monagas.

Resumen

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. Los extractos se elaboraron utilizando dos métodos: Goldfish y Soxhlet. La actividad antibacteriana fue evaluada por el método de difusión en placa de agar. El extracto acuoso no tuvo efecto antimicrobiano. Se evaluaron cuatro tratamientos (dos métodos x dos solventes). Se aplicó un análisis de Kruskal-Wallis y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). El mayor halo de inhibición (15 mm) lo presentó *E. coli* con Goldfish etanólico y *Proteus* sp. (12 mm) con Soxhlet clorofórmico. Goldfish fue mejor para la extracción etanólica y Goldfish etanólico provocó mayor efecto inhibitorio sobre las bacterias. *E. coli* obtuvo el mayor halo de inhibición.

Palabras clave: *Piper nigrum*, extracto vegetal, actividad antimicrobiana.

Abstract

The purpose of this research was to evaluate the antimicrobial activity of aqueous, ethanolic and chlorophormic extracts of *Piper nigrum* L (Black Pepper) on the growth of Gram negative bacteria. Extracts were obtained by using two methods: Goldfish and Soxhlet. Microbial activity was evaluated by agar-plate diffusion method. Aqueous extract didn't have any antimicrobial effect. Four treatments were evaluated (two methods x two solvents). An analysis of Kruskal-

Wallis and Tukey's Test were applied ($P \leq 0.05$). The greater inhibition haul (15 mm) was showed by *E. coli* with ethanolic Goldfish and *Proteus* sp. (12 mm) with the chlorophormic Soxhlet. Goldfish method was better for ethanolic extraction and ethanolic extract by Goldfish produced the greater antimicrobial effect on the evaluated bacteria. *E. coli* had the biggest inhibition haul.

Key words: *Piper nigrum*, plant extract, antibacterial activity.

Introducción

La búsqueda de nuevos fármacos antibióticos que contrarresten la resistencia de microorganismos a los ya existentes se identificaron en extractos etéreos, acetona y etanol de *Melia azedarach* L., *Syzygium aromaticum* (L.) (Merr. et L. M. Perry) y *Cinnamomun zeylanicum* Blume) por Soxhlet, observándose actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhi* y *Bacillus cereus* (2), microorganismos causantes de salmonelosis y gastroenteritis severas. Entre otras de las propiedades atribuidas a los compuestos presentes en plantas pueden señalarse, efectos antioxidantes, regulación del sistema hormonal, actividad antibacteriana y antiviral (5). Los grupos funcionales de aceites volátiles, entre ellos, carvacrol, eugenol, geraniol, citral, en diferentes géneros de plantas, como *Piper nigrum*, inhibieron el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* (1). La presencia de compuestos fenólicos,

como los flavonoides extraídos de *Zuccagnia punctata* Cav., se ha determinado que son responsables de la inhibición de bacterias Gram negativas (6). En un experimento se observó que los polvos de especias tales como *Piper nigrum* L. y *Capsicum annum* indujeron una mayor vida útil en chorizos frescos (3).

Plantas con actividad antibacteriana se emplean como condimento en alimentos y bebidas, como las carnes, embutidos y salsas, entre los que se usan más comúnmente están el ají picante (*C. annum*) y ají dulce (*C. chinensi.*). Debido a los pocos trabajos que existen en la aplicación de extractos antibacteriales y considerando el uso de esta especia en productos manufacturados, en el presente trabajo se plantea determinar el efecto inhibitorio de los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico de pimienta, aplicados a bacterias Gram negativas.

Materiales y métodos

Las semillas de *Piper nigrum* L. (pimienta negra) variedad Singapur se recolectaron de plantas cultivadas en la localidad de Río Caribe, Estado Sucre. Fueron secadas a temperatura

ambiente, bajo sombra por 8 días, hasta obtener semillas de color negro y se molieron en un molino Willy. Se prepararon los extractos, acuoso, clorofórmico y etanólico por los métodos Goldfish y

Soxhlet, utilizando 3 y 30 g de pimienta negra molida, respectivamente, así como 30 y 200 mL de cada uno de los solventes, respectivamente. El reflujo se realizó por 6 horas con una temperatura de extracción de 100°C para los extractos obtenidos por Goldfish y 100, 60 y 78°C para los extractos acuosos, clorofórmico y etanólico, respectivamente obtenidos por Soxhlet. La evaluación antimicrobiana de los extractos se realizó sobre bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Proteus* sp.), mediante el método de difusión en placa de agar y utilizando 30 µl del extracto para im-

pregnar discos de papel de filtro Whatman 1 de 10 mm de diámetro. Se evaluaron cuatro tratamientos (la combinación de los dos métodos, *id est*, Goldfish y Soxhlet y dos solventes, *id est*, cloroformo y etanol, debido a que el extracto acuoso por ambos métodos no presentó actividad antimicrobiana). Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis con tres repeticiones. Las diferencias entre los cuatro tratamientos se detectaron mediante la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey. El nivel de significación fue 5%.

Resultados y discusión

En el cuadro 1 se observa el efecto de los métodos de extracción (Goldfish y Soxhlet) empleando dos solventes (cloroformo y etanol), medido como halo de inhibición sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas (*E. coli* y *Proteus* sp.). La prueba de promedios determinó que el método Goldfish empleando etanol tuvo un mayor efecto inhibitorio del crecimiento de ambas bacterias superando a los métodos Goldfish con extracto clorofórmico y Soxhlet con extracto etanólico ($P \leq 0,05$), pero similar a aquel de Soxhlet con extracto clorofórmico.

En el cuadro 2 se expresan los resultados obtenidos en la evaluación de actividad antibacteriana de los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico de *P. nigrum* L., los cuales refieren una mayor actividad antibacteriana del extracto etanólico obtenido por Goldfish, observándose un mayor halo

de inhibición (15 mm) para *E. coli*, mientras que para *Proteus* sp. fue 13 mm. Cuando se utilizó el método Soxhlet el mayor halo de inhibición lo presentaron *E. coli* con el extracto etanólico (12 mm) y *Proteus* sp. con el extracto clorofórmico (11 mm). Aunque el método Goldfish reportó los mayores halos de inhibición, solo se obtuvieron con etanol mientras que con el método Soxhlet se logró obtener inhibición tanto con etanol como con cloroformo. El extracto acuoso obtenido por ambos métodos de extracción no reportó inhibición sobre *E. coli* y *Proteus* sp. Los resultados de esta investigación están en concordancia con estudios anteriores realizados con *Piper auritum* H.B.K, donde no se observó actividad inhibitoria sobre *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Pseudomonas aeruginosa* cuando se evaluaron extractos acuosos de hojas de esta especie (4).

Cuadro 1. Prueba de Kruskal – Wallis y prueba de comparación de Tukey para el halo de inhibición de *Escherichia coli* y *Proteus sp.*, bajo dos métodos de extracción de metabolitos de *Piper nigrum* L. (pimienta).

Método	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus sp.</i>	Ámbito †
	Rango		
Goldfish etanólico	21,0	19,33	A
Soxhlet clorofórmico	16,0	12,67	AB
Goldfish clorofórmico	6,50	9,00	B
Soxhlet etanólico	6,50	9,00	B
H de Kruskal-Wallis (P≤0, 05)	21,78	13, 44	

†Comparación Múltiple de Tukey. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes (P≤0, 05).

Cuadro 2. Diámetro de inhibición máxima (mm) de extractos de *Piper nigrum* L (pimienta) sobre las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Proteus sp.* utilizando dos métodos de extracción y tres solventes.

	Diámetro de inhibición máxima (mm)*								
	Método Goldfish			Método Soxhlet			Solvente (sin extractos)		
Bacteria	EA	EC	EE	EA	EC	EE	A	C	ET
<i>Escherichia coli</i>	–	–	15	–	11	12	–	–	–
<i>Proteus sp</i>	–	–	13	–	12	–	–	–	–

EA: Extracto Acuoso, EC: Extracto Clorofórmico, EE: Extracto EtanólicoA: Agua destilada, C: Cloroformo al 99,4%, ET: Etanol al 99,8% - : Negativo (Sin halo de inhibición).

Conclusiones

El extracto etanólico por Goldfish causó mayor efecto de inhibición sobre las bacterias Gram ne-

gativas *Escherichia coli* y *Proteus sp.* y el mayor halo de inhibición fue obtenido en *E. coli*.

Literatura citada

1. Dorman, J.C. y S.G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial of plant volatile oils. *J. of Applied Microbiol.* 88:308-316.
2. Márquez, B. A., Oranday C. Rivas y M. Verde. 2003. Identificación de compuestos de *Melia azedarach* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et L. M. Perry y *Cinnamomun zeylanicum* Blume con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. *Ciencia UANI.* 6(3):333-338.
3. Martínez, L., I. Cilla, J. Beltran y P. Roncales. 2006. Effect of *Capsicum annuum* (Red Sweetand Cayenne) and *Piper nigrum* (Black and White). Pepper powders on the shelf life of fresh for sausages packaged in modified atmosphere. *J. Food Sci.* 71(1):48-53.
4. Martínez, M.J, J. Betancourt, A. Alonso y A. Jauregui. 1996. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J of Ethnopharmacology* 52. 171-174.
5. Vasconcellos, J.A. 2001. Los alimentos del futuro. (Parte II). Alimentación Latinoamericana N° 239. 22p.
6. Zampini, I.C. M. Vattuone y M.I. Isla. 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. Ethanolic extracts. *J. of Ethnopharmacology* 102:450-456.