

# Actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de *Piper cubeba* (Piperaceae)

*Antioxidant and antibacterial activity of the extracts of Piper cubeba (Piperaceae)*

CHITNIS R, ABICHANDANI M, NIGAM P, NAHAR L, SARKER SD\*

School of Biomedical Sciences, University of Ulster, Cromore Road, Coleraine BT52 1SA,  
Co. Londonderry, Irlanda del Norte, Reino Unido  
Autor de contacto: s.sarker@ulster.ac.uk

## RESUMEN

*Piper cubeba* L. (Piperaceae), conocida comúnmente como 'cubeb', es autóctona de Indonesia y también se encuentra en muchos otros países del sureste de Asia, así como en algunos países africanos.

Esta planta se ha utilizado como un popular aditivo alimentario y, en la medicina tradicional, para tratar diversas dolencias, especialmente infecciones bacterianas. Para evaluar la actividad antioxidante (barrido de radicales libres) y la actividad antibacteriana de los extractos de *n*-hexano, diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) de las bayas secas (fruto) de esta planta, se llevó a cabo un ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y un ensayo antimicrobiano basado en microtitulación que incorporaba resazurina como indicador del crecimiento celular, respectivamente. Aunque todos los extractos mostraron actividad antioxidante en el ensayo cualitativo, la actividad antioxidante más destacada se observó con el extracto de MeOH en el ensayo cuantitativo con un valor de  $RC_{50}$  de  $2,71 \times 10^{-1}$  mg/mL.

La potencia antioxidante del extracto de DCM fue aproximadamente 3 veces menor ( $RC_{50} = 6,50 \times 10^{-1}$  mg/mL) que la del extracto de MeOH.

Ninguno de los extractos mostró propiedades antibacterianas frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* resistente a la ampicilina. Aunque ambos extractos, el *n*-hexano y el DCM, inhibieron el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, el extracto de MeOH sólo mostró actividad frente a *B. cereus* y *P. aeruginosa*. El extracto de *n*-hexano fue el que mostró mayor potencia antibacteriana frente a *B. cereus*, con un valor de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1,56 mg/mL. Se observó que todas las actividades antibacterianas de los extractos resultaron más bacteriostáticas que bactericidas.

PALABRAS CLAVE: *Piper cubeba*. Piperaceae. Sureste de Asia. Antioxidante. Antibacteriano.

## ABSTRACT

*Piper cubeba* L. (Piperaceae), commonly known as 'cubeb', is native to Indonesia, and also found in many other countries of the South-East Asia, and in some African countries. This plant has been used as a popular food additive, and in folklore medicine to treat various ailments, particularly bacterial infections. The *n*-hexane, dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) extracts of the dried berries (fruit) of this plant were assessed for their antioxidant (free radical scavenging) and antibacterial activities using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and the micro titre based antimicrobial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, respectively. While all extracts showed antioxidant activity in the qualitative assay, the most prominent antioxidant activity was observed with the MeOH extract in the quantitative assay with a  $RC_{50}$  value of  $2.71 \times 10^{-1}$  mg/mL. The antioxidant potency of the DCM extract was about 3 fold less ( $RC_{50} = 6.50 \times 10^{-1}$  mg/mL) than that of the MeOH extract. None of the extracts showed any antibacterial property against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and ampicillin resistant *Escherichia coli*. While both the *n*-hexane and the DCM extracts inhibited the growth of *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, the MeOH extract was active only against *B. cereus* and *P. aeruginosa*. The most potent antibacterial activity was displayed by the *n*-hexane extract against *B. cereus* with an MIC value of 1.56 mg/mL. All antibacterial activities of the extracts were found to be bacteriostatic rather than bactericidal.

KEY WORDS: *Piper cubeba*. Piperaceae. South-Esat Asia. Antioxidant. Antibacterial.

Fecha de recepción: 24-10-2007

Fecha aceptación: 21-11-2007

## INTRODUCCIÓN

*Piper cubeba* L. (Piperaceae), conocida comúnmente como 'cubeb', es autóctona de Indonesia (principalmente de las regiones de Java y Sumatra) y también se encuentra en muchos otros países del sureste de Asia, así como en algunos países africanos. Esta planta se ha utilizado como un popular aditivo alimentario y en la medicina tradicional como afrodisíaco, antiséptico, bactericida, carminativo, diurético, expectorante, sedante y protector estomacal, así como para tratar diversas dolencias, entre las que se incluyen asma, bronquitis, cólera, cistitis, dispepsia, disentería, gonorrea, fiebre reumática y otras infecciones urogenitales.<sup>1,2</sup> Los estudios fitoquímicos previos sobre *P. cubeba* revelaron la presencia predominante de varios tipos de amidas, lignanos, monoterpenos y sesquiterpenos.<sup>2-4</sup> También se han identificado diversas bioactividades como, por ejemplo, actividad antileishmania<sup>4</sup>, clastogénica<sup>5</sup>, inhibidora de enzimas CYP<sup>6</sup>, estimuladora de la melanogénesis<sup>7</sup>, anti-inflamatoria, antinociceptiva<sup>8</sup> y actividades inhibitorias de la proteasa del virus de la hepatitis C (HCV) de los extractos y/o compuestos aislados de estas especies. Como parte de nuestros estudios continuados sobre fitoquímica y bioactividad en plantas del sureste de Asia<sup>10-20</sup>, informamos en este caso sobre la actividad antibacteriana *in vitro* y la actividad antioxidante (barrido de radicales libres) de los extractos de *Piper cubeba* mediante el ensayo DPPH<sup>21</sup> y el ensayo recién creado basado en microtitulación que incorpora resazurina, respectivamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Materiales de la planta:** Los frutos secos (bayas) de *Piper cubeba* L. se adquirieron a Seasoned Pioneers Ltd., Unit 8 Stadium Court, Bromborough, Wirral CH62 3RP, Reino Unido (dirección Web: <http://www.seasonedpioneers.co.uk/>). Un espécimen de catálogo (RC-SS07-01) representativo de esta adquisición se ha conservado en School of Biomedical Sciences, University of Ulster, Reino Unido.

**Extracción:** La extracción Soxhlet de los frutos, secos y molidos, de *P. cubeba* (230 g) se realizó, sucesivamente, con *n*-hexano, diclo-

## INTRODUCTION

*Piper cubeba* L. (Piperaceae), commonly known as 'cubeb', is native to Indonesia (mostly in Java and Sumatra), and also found in many other countries of the South-East Asia, and in some African countries.<sup>1</sup> This plant has been used as a popular food additive, and in folklore medicine as an aphrodisiac, antiseptic, bactericide, carminative, diuretic, expectorant, sedative and stomachic and to treat various ailments, including asthma, bronchitis, cholera, cystitis, dispepsia, dysentery, gonorrhoea, rheumatic fever, and other urogenital infections.<sup>1,2</sup> Previous phytochemical studies on *P. cubeba* revealed the presence of, predominantly, various types of amides, lignans and mono- and sesqui-terpenes.<sup>2-4</sup> Various bioactivities, e.g. antileishmanial<sup>4</sup>, clastogenic<sup>5</sup>, CYP enzymes inhibitory<sup>6</sup>, melanogenesis stimulatory<sup>7</sup>, anti-inflammatory and antinociceptive<sup>8</sup>, and hepatitis C virus (HCV) protease inhibitory<sup>9</sup> activities of the extracts and/or isolated compounds from this species have also been reported. As a part of our on-going phytochemical and bioactivity studies on plants from South-East Asia<sup>10-20</sup>, we now report on the antioxidant (free radical scavenging) and *in vitro* antibacterial activity of the extracts of *Piper cubeba* using the DPPH<sup>21</sup> and the newly developed resazurin micro-titre assays<sup>22</sup>, respectively.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant Materials:** The dried fruits (berries) of *Piper cubeba* L. were purchased from Seasoned Pioneers Ltd., Unit 8 Stadium Court, Bromborough, Wirral CH62 3RP, UK (Web address: <http://www.seasonedpioneers.co.uk/>). A Voucher specimen (RC-SS07-01) representing this purchase has been maintained in the School of Biomedical Sciences, University of Ulster, UK.

**Extraction:** The dried and ground fruits of *P. cubeba* (230 g) were Soxhlet-extracted sequentially with *n*-hexane, dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) (0.9 L each). Filtered extracts were dried using a rotary evaporator at 45° C. Extracts were re-suspended in MeOH to achieve the stock concentration 10 mg /mL.

rometano (DCM) y metanol (MeOH) (0,9 L de cada uno). Los extractos filtrados se secaron con un evaporador rotativo a 45 °C. Los extractos se volvieron a introducir en suspensión de MeOH para obtener la concentración madre de 10 mg/mL.

**Ensayo de DPPH:** Fluka Chemie AG Bucks se encargó del suministro del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), fórmula molecular  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ . Sigma-Aldrich UK ([http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Europe\\_Home/UK.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/UK.html)) se encargó del suministro de Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-ácido carboxílico). Se adoptó el método utilizado por Takao et al.<sup>23</sup> con las modificaciones oportunas<sup>21</sup>. El DPPH (8 mg) se disolvió en MeOH (100 mL) para obtener una concentración de 80 µg/mL.

**Análisis cualitativo:** Las muestras de prueba se colocaron en una placa de CCF y se pulverizaron con solución DPPH mediante un atomizador. Se dejó desarrollar durante 30 minutos y se registraron los cambios de color (púrpura sobre blanco).

**Análisis cuantitativo:** Se realizaron diluciones en serie con las soluciones madre (10 mg/mL) de extractos de la planta para obtener concentraciones de  $5 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-9}$  y  $5 \times 10^{-10}$  mg/mL. Las soluciones diluidas (2 mL de cada una) se mezclaron con DPPH (2 mL) y se dejaron reposar durante 30 minutos para que se produjera cualquier reacción. La absorbancia UV se registró a 517 nm. El experimento se realizó por duplicado y se registró la absorción media de cada concentración. Se siguió el mismo procedimiento para el control positivo Trolox®. El valor de  $RC_{50}$ , que es la concentración del material de prueba que reduce el 50% de la concentración de radicales libres, se calculó en mg/mL.

**Actividad antibacteriana:** Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos con respecto a siete cepas bacterianas, *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (NCTC 10400), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Escherichia coli* resistente a la ampicilina (NCTC 10418), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6750), *Staphylococcus aureus* (NCTC 1803) y *Salmonella typhi* (NCTC 10203), obtenidas de Biotechnology Laboratory,

**The DPPH assay:** 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), molecular formula  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ , was obtained from Fluka Chemie AG, Bucks. Trolox® (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was obtained from Sigma-Aldrich, UK ([http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Europe\\_Home/UK.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/UK.html)). The method used by Takao et al.<sup>23</sup> was adopted with suitable modifications<sup>21</sup>. DPPH (8 mg) was dissolved in MeOH (100 mL) to obtain a concentration of 80 µg/mL.

**Qualitative analysis:** Test samples were applied on a TLC plate and sprayed with DPPH solution using an atomiser. It was allowed to develop for 30 min. The colour changes (purple on white) were noted.

**Quantitative analysis:** Serial dilutions were carried out with the stock solutions (10 mg/mL) of the plant extracts to obtain concentrations of  $5 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-10}$  mg/mL. Diluted solutions (2 mL each) were mixed with DPPH (2 mL) and allowed to stand for 30 min for any reaction to occur. The UV absorbance was recorded at 517 nm. The experiment was performed in duplicate and the average absorption was noted for each concentration. The same procedure was followed for the positive control Trolox®. The  $RC_{50}$  value, which is the concentration of the test material that reduces 50% of the free radical concentration, was calculated as mg/mL.

**Antibacterial activity:** The antibacterial activity of the extracts were assessed against seven bacterial strains, *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (NCTC 10400), *Escherichia coli* (ATCC 8739), Ampicillin-resistant *Escherichia coli* (NCTC 10418), *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6750), *Staphylococcus aureus* (NCTC 1803) and *Salmonella typhi* (NCTC 10203), obtained from the Biotechnology Laboratory, School of Biomedical Sciences, University of Ulster. Active cultures were generated by inoculating a loopful of culture in separate 100 mL nutrient broths and incubating on a shaker at 37 °C overnight. The cells were harvested by centrifuging at 4000 rpm for 5 min, washed with normal saline, spun at 4000 rpm for 5 min again and diluted in normal saline to obtain  $5 \times 10^5$  cfu/mL.

School of Biomedical Sciences, University of Ulster. Se generaron cultivos activos mediante la inoculación de un asa de cultivo en 100 mL de caldo de cultivo separado y se incubó en un agitador a 37 °C durante la noche. Las células se extrajeron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos, se lavaron con solución salina normal, se volvieron a centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos y se diluyeron en solución salina normal para obtener  $5 \times 10^5$  cfu/mL.

*Ensayo de difusión en disco:* Para realizar una evaluación inicial del potencial antibacteriano de los extractos se utilizó el método convencional de difusión en disco<sup>24,25</sup>. Se impregnaron discos blancos estériles de 6,0 mm de diámetro (BBL, Cocksville, EE. UU.) con sustancias de prueba a una dosis de 500 µg/disco. Estos discos se colocaron, junto con los discos de control positivo (ciprofloxacina, 10 µg/disco) y los discos de control negativo, en placas de Petri que contenían un medio de ágar adecuado sembrado con los organismos de prueba con una aguja de transferencia estéril y se conservaron a 4 °C para facilitar una difusión máxima. Las placas se conservaron en un incubador (37 °C) para favorecer el crecimiento de la bacteria. Las actividades antibacterianas de los agentes de prueba se determinaron mediante la medición del diámetro de la zona de inhibición en milímetros.

*Ensayo basado en microtitulación con incorporación de resazurina:* Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos activos se utilizó el ensayo<sup>22</sup> basado en microtitulación de 96 pocillos, publicado recientemente, y se empleó resazurina como indicador del crecimiento de las células.

*Evaluación de las propiedades bacteriostáticas/bactericidas:* La placa de ágar se sembró con la mezcla del pocillo que estaba justo antes que el pocillo de la CIH con una aguja de transferencia estéril y se conservó a 4 °C para facilitar una difusión máxima. Las placas se conservaron en un incubador (37 °C) para favorecer el crecimiento de la bacteria. Cualquier crecimiento bacteriano indicaría la propiedad bacteriostática del extracto; un crecimiento nulo sería indicador de actividad bactericida.

*Disc diffusion assay:* Conventional disc diffusion method<sup>24,25</sup> was employed for the initial assessment of antibacterial potential of the extracts. Sterile 6.0 mm diameter blank discs (BBL, Cocksville, USA) were impregnated with test substances at a dose of 500 µg/disc. These discs, along with the positive control disks (ciprofloxacin, 10 µg/disc) and negative control disks were placed on Petri dishes containing a suitable agar medium seeded with the test organisms using sterile transfer loop and kept at 4 °C to facilitate maximum diffusion. The plates were kept in an incubator (37 °C) to allow the growth of the bacteria. The antibacterial activities of the test agents were determined by measuring the diameter of the zone of inhibition in terms of millimetre.

*Resazurin microtitre assay:* The recently published 96-well microtitre assay<sup>22</sup> using resazurin as the indicator of cell growth was employed for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the active extracts.

*Assessment of bacteriostatic/bactericidal property:* The agar plate was seeded with the mixture from the well which was just before the well of the MIC, using sterile transfer loop and kept at 4 °C to facilitate maximum diffusion. The plates were kept in an incubator (37 °C) to allow the growth of the bacteria. Any bacterial growth would indicate the bacteriostatic property of the extract, and no growth would be an indicator of bactericidal activity.

## RESULTS AND DISCUSSION

The *n*-hexane, dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) extracts of the dried berries (fruit) of this plant (yields 15.4, 12.3 and 11.8%, respectively) were assessed for their antioxidant (free radical scavenging) and antibacterial activities using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay<sup>21,23</sup> and the micro titre based antimicrobial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth<sup>22</sup>, respectively.

All extracts showed antioxidant activity in the qualitative assay by displaying yellowish white spots against purple background after the TLC plate being sprayed with the DPPH solution and developed for 30 min. The most prominent an-

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la actividad antioxidante (barrido de radicales libres) y la actividad antibacteriana de los extractos de *n*-hexano, diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) de las bayas secas (fruto) de esta planta (rendimientos de 15,4, 12,3 y 11,8%, respectivamente) se utilizaron un ensayo<sup>21,23</sup> de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) y un ensayo antimicrobiano basado en microtitulación que incorpora la resazurina como indicador de crecimiento celular<sup>22</sup>, respectivamente.

Todos los extractos mostraron actividad antioxidante en el ensayo cualitativo al presentar puntos blancos amarillentos contra el fondo púrpura después de pulverizar la placa de CCF con la solución de DPPH y dejarla desarrollar durante 30 minutos. La actividad antioxidante más destacada se observó con el extracto de MeOH en el ensayo cuantitativo, con un valor de  $RC_{50}$  de  $2,71 \times 10^{-1}$  mg/mL (Tabla 1). La potencia antioxidante del extracto de DCM fue aproximadamente 3 veces inferior ( $RC_{50} = 6,50 \times 10^{-1}$  mg/mL) a la del extracto de MeOH. El índice de máxima inhibición o reducción de la absorbancia de DPPH con el extracto de *n*-hexano fue sólo del 46% en la mayor concentración de análisis de 10 mg/mL. El valor de  $RC_{50}$  del control positivo Trolox® fue de  $2,60 \times 10^{-3}$  mg/mL. Aunque la actividad antioxidante de los extractos fue considerablemente inferior al control positivo, este fenómeno suele ocurrir con extractos crudos. El control positivo es un compuesto puro, mientras que los extractos son mezclas de varios compuestos. Los compuestos, que eran los verdaderos responsables de las actividades antioxidantes de los extractos, estaban presentes en concentraciones mucho menores que las concentraciones de los extractos crudos. Por tanto, se podría asumir que el aislamiento y la purificación de constituyentes activos de estos extractos activos fomentarían que los compuestos antioxidantes tuvieran una actividad comparable a la del Trolox®.

tioxidant activity was observed with the MeOH extract in the quantitative assay with a  $RC_{50}$  value of  $2.71 \times 10^{-1}$  mg/mL (Table 1). The antioxidant potency of the DCM extract was about 3 fold less ( $RC_{50} = 6.50 \times 10^{-1}$  mg/mL) than that of the MeOH extract. The maximum inhibition or reduction of the DPPH absorbance with the *n*-hexane extract was only 46% at the highest test concentration of 10 mg/mL. The  $RC_{50}$  value of the positive control Trolox® was  $2.60 \times 10^{-3}$  mg/mL. Although the antioxidant activity of the extracts was considerably lower than the positive control, this is often the case with crude extracts. The positive control is a pure compound whereas the extracts are mixtures of several compounds. The compounds which were actually responsible for the antioxidant activities of the extracts were present in much lower concentrations than the concentrations of the crude extracts. Therefore, it could be assumed that isolation and purification of active constituents from these active extracts would lead to antioxidant compounds with comparable activity to that of Trolox®.

**TABLA 1.** Actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de *Piper cubeba*.  
**TABLE 1.** Antioxidant and antibacterial activities of the extracts of *Piper cubeba*.

Extractos Extracts	Actividad antioxidante <sup>a</sup> Antioxidant activity <sup>a</sup>		Actividad antibacteriana Antibacterial activity									
	Cualitativo Qualitative	Cuantitativo (RC <sub>50</sub> en mg/mL) Quantitative (RC <sub>50</sub> in mg/mL)	Ensayo de difusión en disco (zona de inhibición en mm) Disc diffusion assay (Zone of inhibition in mm)							Ensayo con resazurina (CIM <sub>50</sub> en mg/mL) Resazurin assay (MIC in mg/mL)		
			BC	BS	CE	AEC	PA	SA	% ST	BC	PA	SA
<i>n</i> -hexano <i>n</i> -Hexane	+	*	12	-	-	-	10	17	-	1,56	50,0	50,0
DCM DCM	+	6,50 x 10 <sup>-1</sup>	23	-	-	-	8	16	-	25,0	25,0	25,0
MeOH MeOH	+	2,71 x 10 <sup>-1</sup>	11	-	-	-	8	-	-	25,0	25,0	-
Trolox Trolox	+	2,60 x 10 <sup>-3</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ciprofloxacina Ciprofloxacin	NA	NA	27	28	27	27	27	28	26	2,5 x 10 <sup>-8</sup>	2,5 x 10 <sup>-7</sup>	2,5 x 10 <sup>-7</sup>

<sup>a</sup>Determinado por el ensayo de DPPH; \*Sólo se observó una reducción del 46% al utilizar la máxima concentración (10 mg/mL); - = No se detectó actividad en las concentraciones del análisis; + = Actividad; NA = No aplicable

BC = *Bacillus cereus* (ATCC 11778), BS = *Bacillus subtilis* (NCTC 10400), EC = *Escherichia coli* (ATCC 8739), AEC = *Escherichia coli* resistente a la ampicilina (NCTC 10418), PA = *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6750), SA = *Staphylococcus aureus* (NCTC 1803) y ST = *Salmonella typhi* (NCTC 10203).

<sup>a</sup>Determined by the DPPH assay; \*Only 46% reduction was observed with the maximum concentration (10 mg/mL) used; - = No activity detected at test concentrations; + = Activity; NA = Not applicable

BC = *Bacillus cereus* (ATCC 11778), BS = *Bacillus subtilis* (NCTC 10400), EC = *Escherichia coli* (ATCC 8739), AEC = Ampicillin-resistant *Escherichia coli* (NCTC 10418), PA = *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 6750), SA = *Staphylococcus aureus* (NCTC 1803) and ST = *Salmonella typhi* (NCTC 10203).

El ensayo antioxidante DPPH se basa en la capacidad del 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), un radical libre estable, para decolorarse en presencia de barridos de radicales libres (antioxidantes). El electrón impar del radical de DPPH es responsable de la absorbancia a 517 nm y también del color púrpura oscuro visible.<sup>21</sup> Cuando DPPH acepta un electrón donado por un compuesto antioxidante, el DPPH se decolora y puede medirse cuantitativamente por los cambios en la absorbancia.

Ya que las propiedades antioxidantes más significativas de *P. cubeba* se asociaban a sus extractos de DCM y MeOH (Tabla 1), se puede sugerir que los compuestos antioxidantes presentes en esta planta son de polaridad media o de naturaleza polar. Dado que se sabe que la *P. cubeba* produce varios tipos de lignanos fenólicos<sup>2-4</sup>, se puede asumir que las propiedades antioxidantes de los extractos activos se debieron posiblemente a estos compuestos fenólicos. Las propiedades antioxidantes de los extractos detectadas en este estudio también son conformes con el estudio publicado por Choi y Hwang (2005)<sup>26</sup>, en el que se demostró que el extracto del fruto de *P. cubeba*

The DPPH antioxidant assay is based on the ability of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), a stable free radical, to decolourise in the presence of free radical scavengers (antioxidants). The odd electron in the DPPH radical is responsible for the absorbance at 517 nm, and also for visible deep purple colour.<sup>21</sup> When DPPH accepts an electron donated by an antioxidant compound, the DPPH is decolourised which can be quantitatively measured from the changes in absorbance.

As the most significant antioxidant properties of *P. cubeba* was associated with its DCM and MeOH extracts (Table 1), it can be suggested that the antioxidant compounds present in this plant are of medium polarity or polar in nature. As *P. cubeba* is known to produce various types of phenolic lignans<sup>2-4</sup>, it can be assumed that the antioxidant properties of the active extracts were possibly due to these phenolic compounds. The antioxidant property of the extracts found in this study is also in line with that published by Choi and Hwang (2005)<sup>26</sup> where *P. cubeba* fruit extract was shown to increase the activity of the antioxidant enzymes, e.g. superoxide dismutase and catalase, in the experimental rat model.

umentaba la actividad de las enzimas antioxidantes, tales como el superóxido dismutasa y catalasa, en el modelo experimental con ratas.

Ninguno de los extractos mostró propiedades antibacterianas frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* resistente a la ampicilina en las concentraciones del análisis (Tabla 1). Aunque ambos extractos, el *n*-hexano y el DCM, inhibieron el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, el extracto de MeOH sólo mostró actividad frente a *B. cereus* y *P. aeruginosa*. El extracto de *n*-hexano fue el que mostró mayor potencia antibacteriana frente a *B. cereus*, con un valor de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1,56 mg/mL. Como también es reconocido que esta planta produce monoterpenos y sesquiterpenos,<sup>2</sup> que son mayoritariamente apolares o de polaridad media, y se espera que estén presentes en los extractos de *n*-hexano y de DCM, es probable que estos terpenoides contribuyeran a la actividad antibacteriana de los extractos. Todas las actividades de los extractos fueron más bacteriostáticas que bactericidas, ya que la suspensión, dispuesta en placas de ágar nutritivo, mostró crecimiento tras la incubación. La actividad antibacteriana de los extractos detectada en este estudio también se corresponde con los resultados de un informe reciente de Silva et al (2007)<sup>27</sup>, en el que se demostró la actividad bacteriostática del extracto de etanol de las semillas de *P. cubeba*, (-)-cubebin y sus derivados semi-sintéticos, frente a los patógenos orales *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *Enterococcus faecalis*.

El presente estudio confirmó las actividades antioxidantes y antibacterianas de los extractos de los frutos de *P. cubeba*. Estas actividades respaldan, al menos hasta cierto punto, los usos de esta planta en la medicina tradicional para tratar diferentes dolencias, entre ellas las infecciones bacterianas.

None of the extracts showed any antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and ampicillin resistant *E. coli* at test concentrations (Table 1). While both the *n*-hexane and the DCM extracts inhibited the growth of *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, the MeOH extract was active only against *B. cereus* and *P. aeruginosa*. The most potent antibacterial activity was displayed by the *n*-hexane extract against *B. cereus* with an MIC value of 1.56 mg/mL. As this plant is also known to produce mono- and sesqui-terpenes,<sup>2</sup> which are mostly nonpolar or of medium polarity in nature and expected be present in the *n*-hexane and the DCM extracts, the antibacterial activity of these extract were probably contributed by these terpenoids. All antibacterial activities of the extracts were found to be bacteriostatic rather than bactericidal, since the suspension streaked across nutrient agar plates showed growth following incubation. The antibacterial activity of the extracts found in this study is also inline with the recent report by Silva et al. (2007)<sup>27</sup> where the bacteriostatic activity of the ethanol extract of *P. cubeba* seeds, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against the oral pathogens *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* and *Enterococcus faecalis* was demonstrated.

The present study confirmed the antioxidant and antibacterial activities of the extracts of the fruits of *P. cubeba*. These activities support, at least to some extent, the traditional medicinal uses of this plant to treat various disease conditions including bacterial infections.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. GRIN Taxonomy Database. USDA, ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, USA. 2007. Available on-line at: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?28578>
2. Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. USDA, ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, USA. 2007. Available on-line at: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/ethnobot.pl?ethnobot.taxon=Piper%20cubeba>
3. Elfahmi RK, Batterman S, Bos R, Kayser O, Woerdenbag HJ, Quax WJ. Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. *Biochem. Syst. Ecol.* 2007; 35: 397-402.

4. Bodiwala HS, Singh G, Singh R, Dey CS, Sharma SS, Bhutani KK, Singh IP. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. *J. Nat. Med.* 2007; 61: 418-421.
5. Junqueira APF, Perazzo FF, Souza GHB, Maistro EL. Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. *Genetics and Mol. Biol.* 2007; 30:656-663.
6. Usia T, Iwata H, Hiratsula A, Watabe T, Kadota S, Tezuka Y. CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. *Phytomedicine.* 2006; 13: 67-73.
7. Matsuda H, Hirata N, Kawaguchi Y, Naruti S, Takata T, Oyama M, Inuma M, Kubo M. Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by Kava (*Piper methysticum*) rhizome extract and kavalactones. *Biol. Pharm. Bull.* 2006; 29: 834-837.
8. Choi EM, Hwang JK. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 89: 171-175.
9. Hissein G, Miyashiro H, Nakamura N, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytotherapy Res.* 2000; 14: 510-516.
10. Uddin SJ, Shilpi JA, Alam SMS, Alamgir M, Rahman MT, Sarker SD. Antidiarrhoeal activity of the methanol extract of the barks of *Xylocarpus molucensis* in castor oil and magnesium sulphate-induced diarrhoea models in mice. *J. Ethnopharmacology.* 2005; 101: 139-143.
11. Shilpi SJ, Uddin SJ, Rouf R, Billah MM. Central nervous system depressant activity of *Diospyros peregrina* bark. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine.* 2004; 4:249-252.
12. Uddin SJ, Shilpi JA, Barua J, Rouf R. Antinociceptive activity of *Ceriops decandra* leaf and pneumatophore. *Fitoterapia.* 2005; 76:261-263.
13. Uddin SJ, Shilpi JA, Delazar A, Nahar L, Sarker SD. Free radical scavenging activity of some Bangladeshi plant extracts. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine.* 2004; 4:185-193.
14. Rouf R, Uddin SJ, Shilpi JA, Rahman MT, Ferdous MM, Sarker SD. Anti-diarrhoeal effects of *Diospyros peregrina* in the castor oil-induced diarrhoea model in mice. *ARS Pharmaceutica.* 2006; 47: 81-89.
15. Uddin SJ, Shilpi JA, Rahman MT, Ferdous MM, Rouf R, Sarker SD. Assessment of neuropharmacological effects of *Pandanus foetidus* (Pandaceae) in mice. *Die Pharmazie.* 2006; 61: 262-264.
16. Datta BK, Nahar L, Rahman MM, Gray AI, Auzi AA, Sarker SD. Polygosomic acid, a new cadinane sesquiterpene, from *Polygonum viscosum* inhibits the growth of drug-resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* (MRSA) *in vitro*. *J. Nat. Med.* 2007; 61:391-396.
17. Saha A, Masud MA, Bachar SC, Kundu JK, Nahar L, Datta BK, Sarker SD. Analgesic and anti-inflammatory activities of the extracts of *Phyllanthus reticulatus* in mice model. *Pharm. Biol.* 2007; 45: 355-359.
18. Uddin SJ, Shilpi JA, Rouf R, Ferdous MM, Nahar L, Sarker SD. Neuropharmacological properties of *Xylocarpus molucensis*. *Fitoterapia* 2007; 78: 107-111.
19. Uddin SJ, Shilpi JA, Byres M, Middleton M, Shoeb M, Nahar L, Sarker SD. Swarnalin and *cis*-swarnalin, two new tetrahydrofuran derivatives with free radical scavenging activity, from the aerial parts of *Cuscuta reflexa*. *Nat. Prod. Res.* 2007; 21: 663-668.
20. Mondal S, Paul SK, Uddin SJ, Nahar L, Auzi AA, Sarker SD. A comparative study on the *in vitro* antibacterial activity of the pneumatophores of *Heritiera fomes* and *Xylocarpus molucensis*. *ARS Pharmaceutica.* 2007; (in press).
21. Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Screening seeds of some Scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytotherapy Res.* 2007; 21: 615-621.
22. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42: 321-324.
23. Takao T, Watanabe N, Yagi I, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994; 58: 1780-1783.
24. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M. Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966; 45: 493-496.
25. Cruickshank R. *Medical microbiology: A guide to diagnosis and control of infection.* E. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 1968; p.888.
26. Choi EM, Hwang JK. Effect of some medicinal plants on plasma antioxidant system and lipid levels in rats. *Phytotherapy Res.* 2005; 19: 382-386.
27. Silva MLA, Coimbra HS, Pereira AC, Almeida VA, Lima TC, Costa ES, Vinholis AHC, Royo VA, Silva R, Filho AAS, Cunha WR, Furtado NAJC, Maryins CHG, Carvalho TC, Bastos JK. Evaluation of *Piper cubeba* extract, (-)-cubebin and its semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Phytotherapy Research.* 2007; 21: 420-422.