

***Piper regnellii* (MIQ) C. DC.: EFEITO INTRÍSECO E ASSOCIADO A
FÁRMACOS FRENTE A *Staphylococcus aureus***

**Naiza Saraiva Farias ¹, Ana Laís Braga ², Thiago Sampaio de Freitas ³,
Janaina Esmeraldo Rocha ⁴, Luiz Everson da Silva ⁵, Henrique Douglas
Melo Coutinho ⁶, Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga ⁷.**

Resumo

A resistência bacteriana aos antimicrobianos existentes tem se tornado um problema recorrente. Um dos principais patógenos resistentes é a bactéria *Staphylococcus aureus* e, por conta disso, há necessidade por novos compostos antimicrobianos que sejam eficazes no combate a esse microrganismo. *Piper regnellii* é uma planta arbustiva que tem apresentado atividades biológicas contra diversos patógenos. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial anti-estafilocócico do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* sozinha e em combinação com os fármacos antibacterianos. Para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) do óleo essencial sozinha e dos fármacos foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo apresentando MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Para a verificação do efeito combinado com os fármacos, o óleo foi ensaiado em concentração subinibitória (CIM/8), sendo verificado efeito antagônico, reduzindo a eficiência dos antibióticos. O óleo demonstrou efeito clinicamente irrelevante e sua associação com os fármacos gentamicina e norfloxacin não é vantajosa.

Palavras-chave: Óleo essencial. Piperaceae. Resistência bacteriana.

1. Introdução

Nos últimos anos a utilização de plantas medicinais tem se tornado crescente por pesquisadores de diversas partes do mundo. Estudos apontam que as plantas medicinais possuem atividades biológicas que podem ser utilizadas com eficiência no tratamento de diversas doenças inclusive no combate a resistência microbiana (GUPTA; BIRDI, 2017).

A família Piperaceae está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul (BERNUCI *et al.*, 2016). As espécies do gênero *Piper* são conhecidas na medicina popular mundial por possuírem atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e antiinflamatória (SALEHI *et al.*, 2019). *Piper regnellii* é espécie arbustiva, nativa e não endêmica do Brasil localizada principalmente nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Cerrado e Mata atlântica (FLORA DO BRASIL, 2020), suas folhas possuem

1 Universidade Regional do Cariri, email: naiza.saraiva15@gmail.com

2 Universidade Regional do Cariri, email: ana.lays@hotmail.com

3 Universidade Regional do Cariri, email: thiagocrato@hotmail.com

4 Universidade Regional do Cariri, email: janainaesmeraldo@gmail.com

5 Universidade Federal do Paraná, email: luizeverson@ufpr.br

6 Universidade Regional do Cariri, email: hdmcoutinho@gmail.com

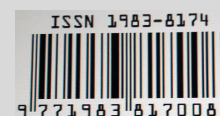
7 Universidade Regional do Cariri, email: flavianamoraib@yahoo.com.br

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



potencial antibacteriano, antifúngico além de apresentar atividade antiparasitária contra *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania spp.* (BRAMBILLA *et al.*, 2017).

Com o aumento da resistência microbiana a comunidade farmacêutica busca por novas alternativas no combate aos patógenos e uma alternativa que tem demonstrados bons resultados são os Óleos essenciais (OEs), metabólitos secundários voláteis derivados de plantas aromáticas (DHIFI *et al.*, 2016), que tem apresentado atividades anti-sépticas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, sendo considerados ferramentas promissoras como antimicrobianos (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

A resistência bacteriana traz forte ameaça à saúde pública, o uso frequente e exacerbado de antibióticos pela população tem sido uma das causas mais significativas do surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes (SILVA; AQUINO, 2018). *Staphylococcus aureus*, bactéria geralmente encontrada na pele e nas fossas nasais, pode causar infecções de leves a graves. Esse patógeno encontra-se em ampla variedade de nichos hospedeiros e tem se tornado cada vez mais resistente a antibióticos (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2017), sendo necessárias novas estratégias de combate à sua resistência.

2. Objetivo

- Investigar o potencial anti-estafilocócico do óleo essencial das folhas da espécie *Piper regnellii* sozinha e em combinação com fármacos antibacterianos norfloxacin e gentamicina.

3. Material e métodos

O óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* foi cedido pelo Prof. Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná. A pesquisa foi realizada no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri, Crato, CE. Para a avaliação microbiológica foi utilizada bactéria de linhagem resistente: *Staphylococcus aureus* 10.

A linhagem foi reavivada em meio de cultura Heart Infusion Ágar (HIA) por 24 h (37 °C) e, antes dos testes, foi suspensa em tubos de ensaio contendo 0,3 mL de solução salina a 0,9% estéril, tendo sua turbidez comparada segundo escala de Mc Farland (NCCLS, 2002). Como drogas de referência foram utilizados os fármacos Norfloxacin e Gentamicina diluídos em água destilada e estéril (1.024µg/mL).

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo. Foi preparada em *ependorfs* 1.500 µL de solução, sendo 1.350 µL do meio de cultura e 150 u/L do inóculo. Logo após foi retirado 100 µL da solução e distribuídos em uma placa de 96 poços, sendo realizada a microdiluição do produto natural em triplicata em concentrações variando de 0,5 a 512 µg/mL. Após a incubação (24 h - 37 °C), acrescentou-se 20 µL de rezasurina em cada poço para leitura com observação visual após uma hora (JAVADPOUR *et al.*, 1996).

Na Verificação do efeito combinado óleo/fármaco, o óleo foi usado em concentração subinibitória (CIM/8). A solução contida nos tubos *ependorfs* (produto natural + meio cultura + inóculo) foi adicionada em cada poço da placa, sendo procedida a microdiluição com 100 μ L do fármaco (0,5 a 512 μ g/mL). Após a incubação (24 h - 37 °C), foi feita leitura com rezasurina (COUTINHO *et al.*, 2008). A potencialização do fármaco indica sinergismo e o prejuízo no efeito deste, antagonismo. Na análise estatística os valores do CIM foram obtidos por regressão não linear para a finalidade de interpolação de valores a partir de curvas padrão (usando o software GraphPad Prism, V. 7.0).

4. Resultados

A atividade intrínseca do óleo essencial das folhas de *P. regnellii* foi ≥ 1024 μ g/m e, de acordo com Houghton (2007), não apresenta relevância clínica. Para efeito comparativo também foram verificados efeito dos fármacos pertencentes aos grupos dos aminoglicosídeos (Gentamicina), e quinolonas (Norfloxacina) sozinhos e em combinação com o óleo essencial. A CIM destes antibióticos foi 16 μ g/mL e 51 μ g/mL, respectivamente e quando combinado ao óleo, o efeito dos antibióticos foi reduzido, sendo necessárias maiores concentrações (25 e 256 μ g/mL, respectivamente) para inibir o crescimento bacteriano.

O Clinical and Laboratory Standards Institute (2015), utiliza as três seguintes classificações para a sensibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* aos fármacos gentamicina e norfloxacina ambos apresentam as mesmas concentrações: sensível (CIM ≤ 4 μ g/mL), intermediário (CIM 8 μ g/mL) e resistente (CIM ≥ 16 μ g/mL). Portanto, a combinação do óleo com os fármacos não conseguiu reverter a resistência de *Staphylococcus aureus* 10 apresentando efeito antagônico. Na figura 1 é possível verificar esses resultados.

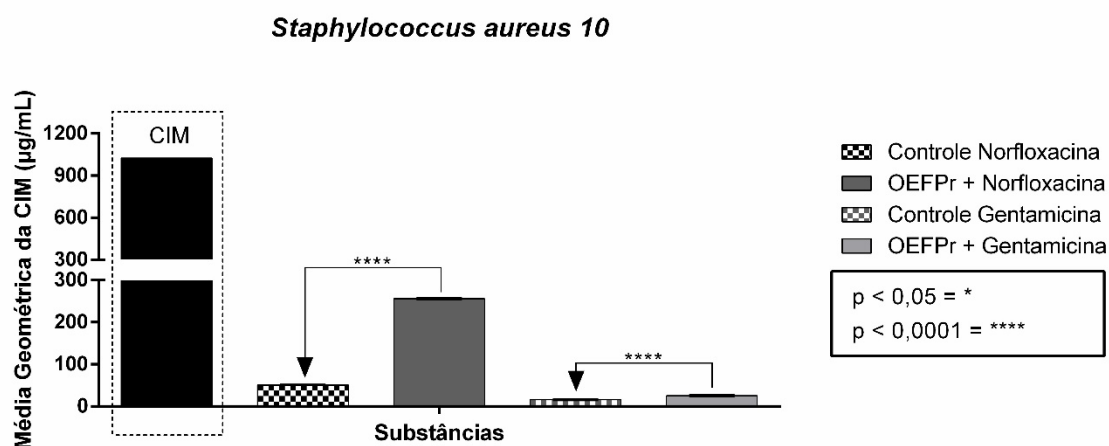


Figura 1: Efeito do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* sozinho e combinado com os antibióticos frente a *Staphylococcus aureus*.

A espécie *Piper regnellii* tem sido estudada por pesquisadores que avaliam seu potencial biológico. Holetz *et al.* (2002) e Felipe *et al.* (2008), relataram

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



atividade antibacteriana de folhas de *Piper regnellii* contra as bactérias gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis*. O efeito antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *P. regnellii* puro foi investigado por Constantin *et al.* (2001), utilizando o método de difusão em ágar, sendo observada a uma zona de inibição de 15.1 mm. Entretanto, é importante observar que no primeiro estudo os pesquisadores avaliaram atividade de diferentes extratos da planta e não do óleo essencial, sendo possível obter resultados diferentes, e no segundo, foi utilizada uma técnica diferente, considerada menos eficiente que microdiluição em caldo (BENKOVA *et al.*, 2020). Em relação ao efeito dos produtos naturais oriundos da espécie e sua combinação com os fármacos, não há registro na literatura, sendo este um trabalho pioneiro.

5. Conclusão

O óleo essencial da espécie *Piper regnellii*, de forma intrínseca, não apresentou atividade antibacteriana relevante contra *Staphylococcus aureus* 10. O estudo contribui demonstrando que o óleo prejudica o efeito de norfloxacin e gentamicina quando associado a estes antibióticos, não sendo indicada a combinação durante o tratamento de doenças relacionadas a *Staphylococcus aureus*.

6. Referências

BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 1, 2017.

BENKOVA, M.; SOUKUP, O.; MAREK, J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. **Journal of Applied Microbiology**. v. 129, n. 4, p. 806-822, 2020.

BERNUCI, K. Z. *et al.* Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of *Piper* Species. **Molecules**, v. 21, n. 12, 2016.

BRAMBILLA, L. *et al.* Anti-biofilme activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 112-117, 2017.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils – present status and future perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, 2017.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI Norma M100-S25 (ISBN 1-56238-990-4). CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

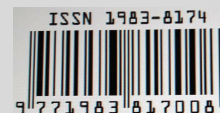
COSTANTIN, M. B. *et al.* Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta Medica**. v. 67, n 08, p. 771-773, 2001.

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



COUTINHO, *et al.* Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p.328–330, 2008.

DHIFI, *et al.* Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, 2016.

FELIPE, D. F. *et al.* Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 4, p. 618-20, 2008.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12835>. Acesso em: 06 nov. 2020.

GUPTA, P. D.; BIRDI, T. J. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**. v. 8, n. 4, p. 266-275, 2017.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, n. 3, p. 391-400, 2007.

JAVADPOUR, M. M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras;** Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

SALEHI, B. *et al.* *Piper* species: a comprehensive review on their phytochemistry biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

SILVA, M. O.; AQUINO, S. Resistência os antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. São Paulo, v. 8, n. 4, 2018