

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum* L. EM ASSOCIAÇÃO COM LUZ DE LED AZUL

Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa¹, Ana Cristina Albuquerque da Silva², Jefferson de Salles Diodato, Henrique Douglas Melo Coutinho⁴

Resumo: A resistência bacteriana tem se tornado cada vez mais crescente, se tornando um problema de saúde com grande impacto na indústria farmacêutica, uma vez que muitos antibióticos se tornaram resistentes. A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem crescido bastante nas últimas décadas, por tratar-se de uma alternativa eficaz e barata. *Piper aduncum* é conhecida popularmente como pimenta-de-macaco possui atividade antibacteriana. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPad) associado à luz de LED azul. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em aparelho tipo Clavenger. A análise antibacteriana foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, que foram expostas ao LED por 20 minutos. A composição química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, onde foi identificado germacrene A como componente principal. O OEPad apresentou MIC $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$ contra *S. aureus* e *E. coli*. A combinação do OEPad com antibióticos apresentou efeito sinérgico contra *S. aureus* e *E. coli* que foi potencializado na presença do LED azul. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o óleo essencial obtido de *Piper aduncum* interfere na ação de antibióticos contra bactérias expostas ao LED azul. Todavia, faz-se necessário a realização de pesquisas adicionais para elucidar os mecanismos subjacentes a esses efeitos, abrindo espaço para desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas.

Palavras-chave: Fototerapia. *Piper aduncum*. Atividade antibacteriana.

1. Introdução

Muitas plantas medicinais apresentam grande quantidade de compostos bioativos, como compostos fenólicos, terpenoides, compostos nitrogenados, vitaminas e diversos outros metabólitos secundários e, desde os primórdios da humanidade têm sido utilizadas para fins terapêuticos (KAMILOGLU et al., 2014).

Piper se caracteriza como maior gênero da família *Piperaceae* com aproximadamente 700 espécies, das quais 266 ocorrem no Brasil (YUNCKER, 1972). Muitas espécies deste gênero produzem óleo essencial que apresentam em sua composição monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, aldeídos, cetonas e alcoóis de cadeia longa (CYSNE et al., 2005).

Piper aduncum L. conhecida popularmente como jaborandi do mato, pimenta-de-macaco, erva de jaboti possui atividades antibacteriana, antifúngica (BASTOS et al. 2004), antiprotozoário, larvicida, inseticida (FAZOLIN et al., 2005).

1 Universidade Regional do Cariri, email: cristinase75@gmail.com

2 Universidade Regional do Cariri, email: ana.cristina.erivanda@gmail.com

3 Centro Universitário Leão Sampaio, email: jeffersondesalesbr@hotmail.com

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

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

Na terapia fotodinâmica antimicrobiana (AmPDT) uma luz não ionizante é utilizada em associação com um fotossensibilizador para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO's), que induzem danos aos componentes celulares levando a destruição da mesma (CHAN et al., 2017; ZOLFAGHARI et al., 2009).

2. Objetivo

Este trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana e o efeito modulador do óleo essencial de *Piper aduncum* L. em associação com luz de LED azul.

3. Metodologia

O material vegetal foi coletado no Vale do Ribeira na Reserva Biológica BOM JESUS. A exsicata foi transportada até o Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM) e Herbário das Faculdades Integradas Espírita (HFIE) (LAWRENCE, 1951) e identificada com o número 396411. A extração do óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPad) foi realizada por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (WASICKY, 1963). A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). O aparelho utilizado durante o procedimento experimental foi o *Light Emithing Diodes- LED*. Foi utilizada a luz azul, com um comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho, de 415nm. Foram utilizadas linhagens padrão e resistentes das bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus aureus* 10. Para os testes de CIM e modulação foi utilizado o óleo essencial na concentração de 1024 µg/mL. As culturas de bactérias foram diluídas em tubos de ensaio contendo BHI identificados, em triplicata e, comparada a turbidez da solução com um controle de *McFarland*. Os *Eppendorfs* do teste foram preparados em triplicata para cada bactéria e para cada substância, cada um contendo 5 mL de BHI a 10% + 500 µl do inóculo (correspondente a 10% da solução total) para a CIM (NCCLS, 2003). Os antibióticos utilizados no teste foram amicacina e gentamicina, na concentração inicial de 1024 µg/mL.

Para determinação da CIM foram adicionados 100 µl dos inóculos em cada poço da placa contendo 96 poços e, em seguida feita a microdiluição seriada, em triplicata, com a solução de 100 µL de cada óleo, por coluna, variando nas concentrações de 512-0,5 µg/mL. As placas foram subdividas em dois grupos: o primeiro foi submetido à luz de LED azul e, o segundo grupo não foi submetido às luzes de LED. As placas foram incubadas a 35 ± 2 ° C, durante 24h. A determinação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se a adição de 25 µL de resazurina em cada poço e observação ocular após 20 minutos. Para verificar a modulação do efeito antibacteriano dos antibióticos foi utilizado o método proposto por Coutinho et al. (2008). Foram preparados tubos *ependorf* contendo cada um deles as substâncias em volume correspondente a concentração sub-inibitória (CIM/8), quantidade de BHI 10 % variável de acordo com o volume da concentração sub-inibitória e 150 µL da suspensão

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

bacteriana (correspondente a 10% da solução). Para o controle foram preparados tubos *ependorf* com 1,5 mL de solução contendo 1.350 μ L de BHI (10 %) e 150 μ L de suspensão de microrganismos. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 μ L desta solução em cada poço. Em seguida, feita a microdiluição seriada com 100 μ L do antibiótico. As placas foram subdivididas em dois grupos: o primeiro foi submetido à luz de LED azul e o segundo grupo não foi submetido às luzes de LED e incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, durante 24h. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *Tukey*, usando o *Software GraphPad Prism*. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4. Resultados

O óleo essencial de *Piper aduncum* L. teve um rendimento de 0,35%. Foram identificados 54,07% dos constituintes, correspondendo a 16 compostos, sendo 3,38% monoterpenos hidrocarbonados, 23,66% sesquiterpenos não oxigenados e 27,07% sesquiterpenos oxigenados, apresentando como principais constituintes germacrene A 13,33%, β -macrocarpene 13,13% e β -copaen-4- α -ol 12,36%. Almeida et al. (2018) identificou dillapiole (76%) como principal componente do óleo essencial de *P. aduncum*, divergindo com o resultado encontrado neste estudo.

O óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPad) apresentou MIC ≥ 1024 μ g/mL contra *S. aureus* e *E. coli* padrão e resistente. Salleh et al. (2014), encontraram fraca atividade do óleo essencial de *Piper abbreviatum* contra *S. aureus*. O óleo essencial mostrou fraca atividade contra *E. coli*, tal achado pode ser explicado pela presença da membrana externa na célula gram-negativa, que dificulta a passagem dos componentes presentes nos óleos essenciais e de outras moléculas como antibióticos (OLADIMEJI et al., 2004; HOLLEY; PATEL, 2005).

Na associação dos antibacterianos com o LED azul, na ausência do óleo essencial, foi observado efeito sinérgico para *S. aureus* utilizando amicacina, para gentamicina esta associação não apresentou resultado significativo, mostrando-se indiferente, enquanto que para *E. coli* observou-se sinergismo com dois antibióticos.

A combinação do óleo essencial de *P. aduncum* com o antibiótico gentamicina sob efeito da luz azul provocou diminuição da CIM contra *S. aureus* e *E. coli*. Com amicacina foi observado diminuição da CIM contra *E. coli*, entretanto contra *S. aureus* não houve resultado significativo.

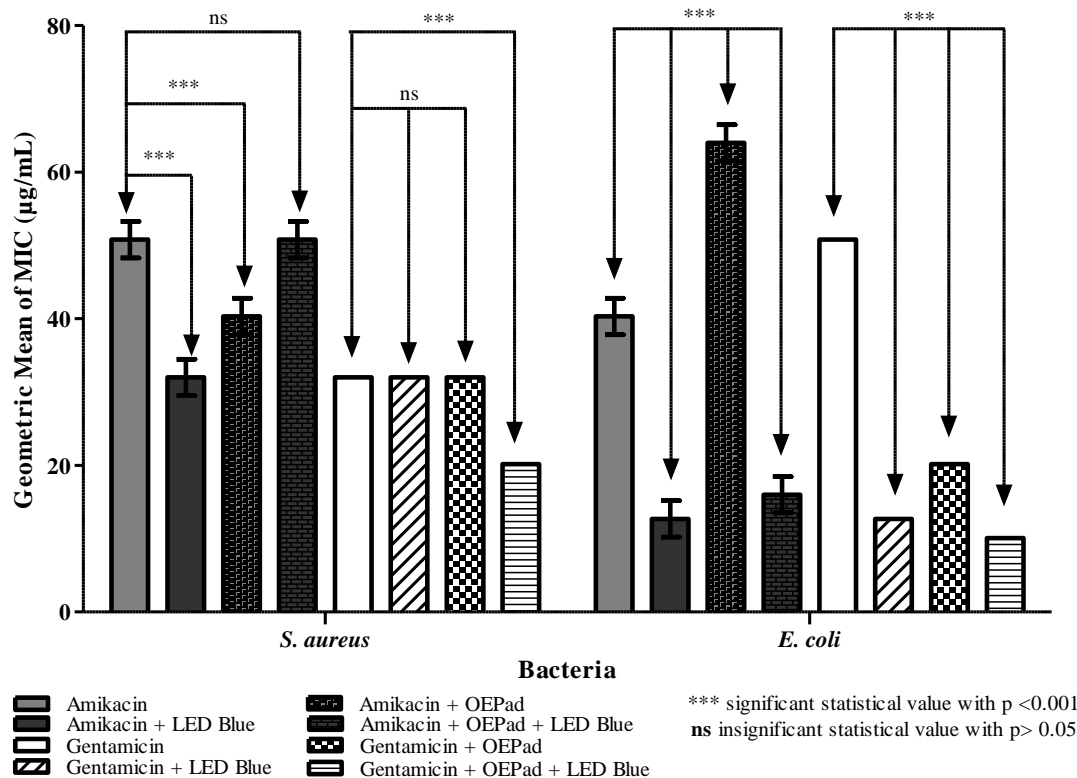


Figura 1: Óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPad) em associação com antimicrobianos e LED azul contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Neste estudo demonstramos que a exposição à luz de LED azul teve efeitos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. De acordo com relatos na literatura a luz de LED azul possui ação bactericida, através do estresse oxidativo, tal efeito foi observado em um estudo semelhante utilizando *Propionibacterium acne* (DAI et al., 2013).

O sinergismo obtido com os aminoglicosídeos pode ser justificado pela ação antimicrobiana via indução ao estresse oxidativo. A luz emitida pelo LED provoca a formação de radicais livres que, por sua vez promovem o estresse oxidativo, resultando na destruição celular. A formação de radicais como hidroxil, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete altamente reativo desencadeiam uma série de reações oxidativas que culminam com a destruição da célula-alvo (STENSTROM et al., 1980).

5. Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o óleo essencial de *Piper aduncum* não possui atividade significativa contra *S. aureus* e *E. coli*, entretanto, quando associado à luz de LED azul promove efeito antibacteriano, bem como potencializa o efeito dos aminoglicosídeos. Esses achados se tornam importantes na busca por novas terapias eficazes para infecções desencadeadas por bactérias multirresistentes.

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

6. Referências

ALMEIDA, C. A., et al. Piper Essential Oils Inhibit *Rhizopus oryzae* Growth, Biofilm Formation, and Rhizopuspepsin Activity. *Canadian Journal of Infectious Disease and Medical Microbiology*. 2018.

BASTOS, C.N. et al. Efeito do Óleo de *Piper aduncum* no Controle em Pós-colheita de *Colletotricum musae* em Banana. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, n.5, p.555-557, 2004.

CHAN, M. H., et al. Minimizing the heat effect of photodynamic therapy based on inorganic nanocomposites mediated by 808 nm near-infrared light, *Small*, v. 13, p. 1–12, 2017.

COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. *Revista brasileira de farmacognosia*, João Pessoa, v.18, p. 670-675, 2008.

CYSNE, J. B. et al. Leaf essential oils of four Piper species from the state of Ceará - northeast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.16, n.6, p.1378-1381, 2005.

Dai, T., et al. Blue Light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond, *Drug esist Updat*, v. 15, p. 223–236, 2013.

KAMILOGLU, S. et al. Investigating the antioxidant potential of Turkish herbs and spices. *Qual. Assur. Saf. Crop. Food*, v. 6, p. 151–158, 2014.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil. I. Piper - Group I, II, III, IV. *Hoehnea*, v.2, p.19- 366, 1972.

REGASINI, L. O. Et al. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, 199-203, 2009.

SALLEH, W. M. N. H. W. et al. Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Piper abbreviatum*, *P. erecticaule* and *P. lanatum* (Piperaceae). *Natural Product Communications*. v. 9, p. 1795-1798, 2014.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. *Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica*, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81, 1963.