

## ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper arboreum* AUBL. EM ASSOCIAÇÃO COM LUZ DE LED AZUL

Ana Cristina Albuquerque da Silva<sup>1</sup>, Jefferson de Salles Diodato<sup>2</sup>,  
Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>3</sup>

**Resumo:** A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem crescido bastante nas últimas décadas, por tratar-se de uma alternativa eficaz e barata. *Piper arboreum* é conhecida popularmente como pau-da-angola, apresenta atividade antifúngica, atibacteriana. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Piper arboreum* (OEPar) associado a 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  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol como componente principal. O OEPar apresentou MIC de 512  $\mu\text{g/mL}$  contra *S. aureus* e  $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$  contra *E. coli*. A combinação do OEPar com antibióticos apresentou efeito sinérgico contra *S. aureus* que foi potencializado na presença do LED azul e, antagônico com amicacina contra *E. coli*, que foi revertido na presença da luz de LED azul. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que o óleo essencial obtido de *Piper arboreum* interfere na ação de antibióticos contra bactérias e, quando expostas ao LED azul essa atividade pode ser potencializada. Assim, pesquisas adicionais são necessárias para elucidar os mecanismos subjacentes a esses efeitos, abrindo espaço para desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica. *Piper arboreum*. Atividade antibacteriana.

### 1. Introdução

A família *Piperaceae* engloba 12 gêneros com cerca de 2000 espécies. *Piper* se caracteriza como maior gênero desta família 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 arboreum* Aubl. conhecida popularmente como pau-de-angola, jaborandi, pimenta do mato de acordo com estudos presentes na literatura apresenta atividade antifúngica, tripanocida, antibacteriana e anti-oxidante (VASQUEZ et al., 2002; REGASINI et al., 2009; LUIS et al., 2008).

---

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

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

3 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). Estudos anteriores mostraram a capacidade inibitória de LED's azuis frente a diversas cepas bacterianas incluindo *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis*, *Helicobacter pylori*, e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) (KAWADA et al., 2002; NITZAN et al., 2004).

## 2. Objetivo

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

## 3. Metodologia

O material vegetal foi coletado no Vale do Ribeira na Reserva Biológica BOM JESUS. A exsiccata 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 396412. A extração do óleo essencial de *Piper arboreum* (OEPAr) 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 subdivididas 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 *eppendorf* contendo cada um deles as substâncias em volume correspondente a concentração sub-inibitória (CIM/8), quantidade de BHI 10 % variável de acordo

# XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

com o volume da concentração sub-inibitória e 150 µL da suspensão bacteriana (correspondente a 10% da solução). Para o controle foram preparados tubos *ependorf* com 1,5 mL de solução contendo 1.350 µL de BHI (10 %) e 150 µL de suspensão de microrganismos. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em seguida, feita a microdiluição seriada com 100 µL 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 arboreum* teve um rendimento de 0,23%. Foram identificados 15 componentes, representando 83,58% da composição, dos quais 5,57% são monoterpenos oxigenados, 44,57% são sesquiterpenos oxigenados, 33,43% são sesquiterpenos não oxigenados, tendo como principais constituintes  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol 31,38% e muurola-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol 17,32%. Tal resultado diverge com o encontrado por Silva et al (2014), que identificaram biciclogermacreno (28,7%) como componente majoritário nesta espécie.

O óleo essencial de *P. arboreum* apresentou MIC = 512 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* padrão e resistente e  $\geq 1024$  µg/mL contra *Escherichia 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. Na presença do óleo essencial houve sinergismo com amicacina e gentamicina frente *S. aureus*, para *E. coli* a combinação mostrou efeito sinérgico com amicacina e antagônico com gentamicina (Figura 1). Este antagonismo pode ser justificado pela ligação dos componentes do óleo essencial aos sítios de ligação para o antibiótico ou a quelação da droga, reduzindo seu espectro de ação (COUTINHO et al., 2008).

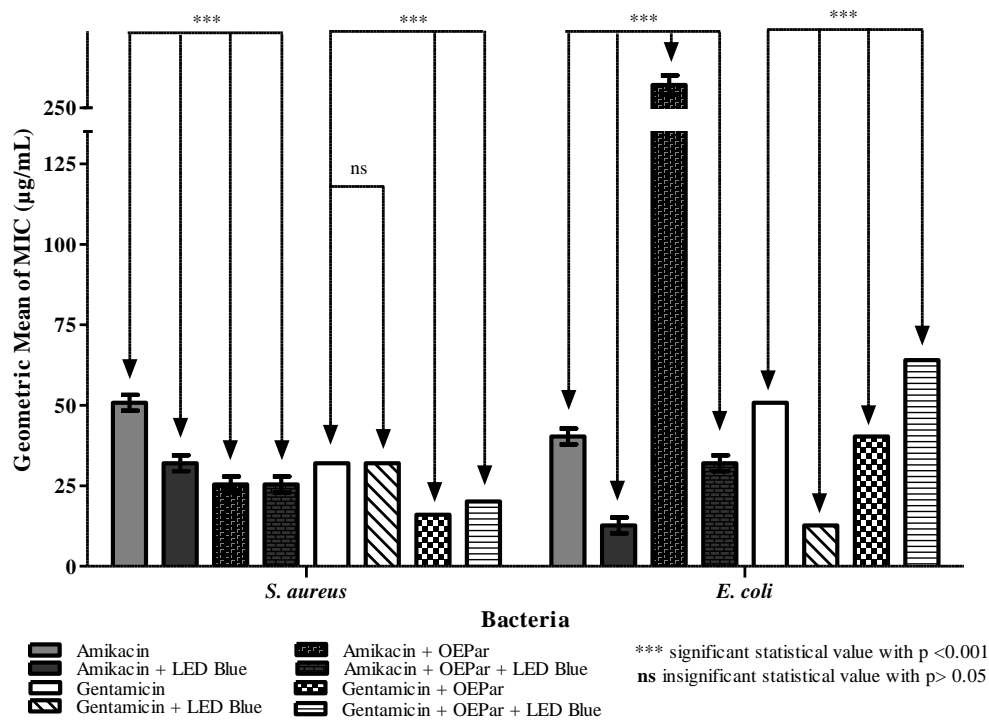


Figura 1: Óleo essencial de *Piper arboreum* (OEPAr) em associação com antimicrobianos e LED azul contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Neste estudo demonstramos que a exposição à luz de LED azul teve efeitos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, o que se assemelha ao encontrado por Pereira et al. (2017), onde a luz azul apresentou modulação sinérgica quando associada a antibióticos, inativando bactérias gram-positivas e gram-negativas.

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 arboreum* possui atividade contra *S. aureus* e, a associação com a luz de LED azul promove a potencialização no efeito dos antibióticos. Esses achados se tornam importantes na busca por novas terapias eficazes para infecções desencadeadas por bactérias multirresistentes.

## 6. Referências

## XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

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.

LUIS, O.R, et al. Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Lat Am J Pharm.*, v. 27, p. 900-3, 2008.

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.

PEREIRA. N. L.F., et al. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 174, n. 1, p. 144-149, 2017.

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.

SILVA, J. A., et al. Antioxidant activity of *Piper arboreum*, *Piper dilatatum*, and *Piper divaricatum*. *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, v.16, 2014.

STENSTROM, A. G. et al. Photodynamic inactivation of yeast cells sensitized by hematoporphyrin. *Photochem Photobiol*; v. 32, p. 349-52, 1980.

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

VASQUES DA SILVA, R. et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, v. 59,p. 521-527, 2002.