

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

Ana Cristina Albuquerque da Silva¹, Jefferson de Salles Diodato²,
Henrique Douglas Melo Coutinho³

Resumo: *Piper gaudichaudianum* Kunth (*Piperaceae*) é uma planta com ampla distribuição no território brasileiro. Além de sua importância ecológica, é utilizada na medicina popular e muitas de suas atividades biológicas já foram comprovadas, é conhecida popularmente como pimenta-de-macaco possui atividade antibacteriana. A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem crescido bastante nas últimas décadas, por tratar-se de uma alternativa eficaz e barata. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* (OEPg) 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 germacrene B como componente principal. O OEPg apresentou MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* e *E. coli*. A combinação do OEPg 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 gaudichaudianum* não apresentou atividade inibitória contra as cepas testadas, entretanto interfere na ação de antibióticos, que em alguns casos é potencializado pela ação da luz de LED azul. Os resultados obtidos tornam-se importantes na contribuição para desenvolvimento de novas metodologias na terapia antimicrobiana.

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

1. Introdução

Os produtos florestais não madeireiros (PFNM) são utilizados na alimentação, produção de medicamentos, cosméticos, construção de moradias, entre outros, sendo fundamentais para a subsistência de muitas comunidades. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), cerca de 80% da população de países em desenvolvimento usam os PFNM para suprir algumas de suas necessidades vitais (MACHADO, 2008). *Piper gaudichaudianum* Kunth é conhecida popularmente como pariparoba ou jaborandi, as atividades biológicas descritas

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

incluem efeito fungicida, inseticida, anti-inflamatória, larvicida e analgésica (GUIMARÃES; VALENTE, 2001).

Combinações antimicrobianas são empregadas para prevenir o surgimento de cepas resistentes ou aumentar a atividade, nos casos de infecções mistas ou reduzir a toxicidade de uma substância sem comprometendo a ação antimicrobiana. As interações entre diferentes drogas podem ser sinérgicas, antagonista ou indiferente (SMITH et al., 2007).

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 gaudichaudianum* 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 396411. A extração do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* (OEPg) 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

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

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 μ L da suspensão 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

A destilação do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* apresentou rendimento de 0,56%. Foram identificados 22 componentes, representando 87,04% da composição, destes 3,96% são monoterpenos hidrocarbonados, 67,26% sesquiterpenos não oxigenados e 15,82% sesquiterpenos oxigenados, tendo como principal constituinte germacrene B (21,53%). Schindler; Heinzmann (2017) analisando o efeito da sazonalidade sobre a composição química dos óleos essenciais de *P. gaudichaudianum* identificaram como principal composto o fenilpropanoide dillapiole (69,2%).

O óleo essencial de *Piper P. gaudichaudianum* apresentou MIC ≥ 1024 μ g/mL contra *S. aureus* e *E. coli* padrão e resistente. Puhl et al. (2011), encontraram boa atividade do extrato bruto de *P. gaudichaudianum* contra *S. aureus*. Entre os constituintes voláteis, os fenólicos (timol, carvacrol, eugenol) e monoterpenos oxigenados (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol) são relatados por possuir não somente forte atividade antimicrobiana, mas também amplo espectro de ação (APETREI et al., 2012). A baixa atividade antimicrobiana encontrada no presente estudo pode ser devido à baixa quantidade ou ausência destes constituintes no óleo essencial analisado.

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 (Figura 1).

A combinação do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* com os antibióticos amicacina e gentamicina sob efeito da luz azul (Figura 1) provocou diminuição da CIM contra todas as cepas utilizadas neste estudo.

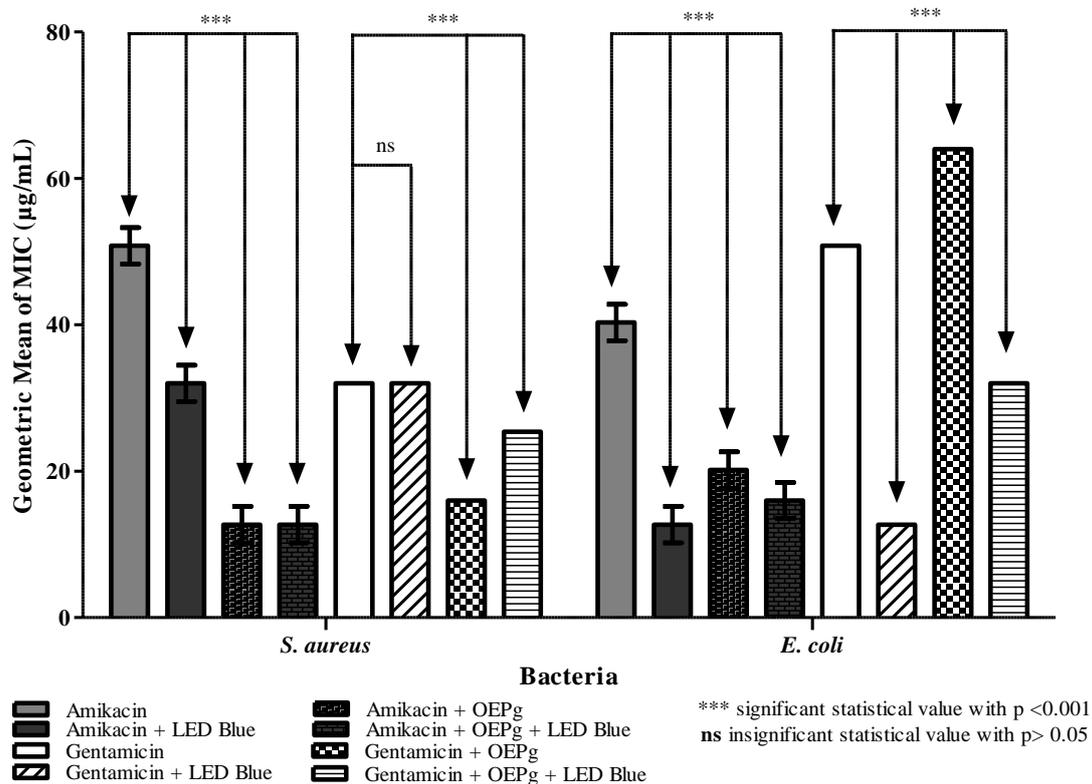


Figura 1: Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* (OEPg) em associação com antimicrobianos e LED azul contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

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 gaudichaudianum* 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

APETREI, C. L. et al. Composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of a full grown tree of *Pinus cembra* L. from the Calimani mountains (Romania) *Journal of Serbian Chemistry Society*, v. 77, p. 1-15, 2011.

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.

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

GUIMARÃES, E. F; VALENTE, M. C. Piperáceas – Piper. *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí, Santa Catarina. 2001, 104p.

LAWRENCE, G. H. M. *Taxonomia das Plantas Vasculares*, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa 1951, 296p.

MACHADO, F. S. *Manejo de produtos florestais não madeireiros: um manual com sugestões para o manejo participativo em comunidades da Amazônia*. Rio Branco: PESACRE; CIFOR, 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.

SCHINDLER, B.; HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: Seasonal Characterization of the Essential Oil Chemical Composition of Leaves and Reproductive Organs. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 2017.

SMITH, E. C. J. et al. The phenolic diterpene totarol inhibits multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 4480-4483, 2007.

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