

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Piper arboreum* AUBL.

Ana Vlândia Ferreira de Freitas¹, Ana Cristina Albuquerque da Silva², Jefferson de Salles Diodato³, Henrique Douglas Melo Coutinho⁴

Resumo: O uso de plantas medicinais é datado desde a antiguidade. Em virtude da grande dificuldade encontrada no tratamento de infecções provocadas por bactérias multirresistentes, é notória a necessidade de novas substâncias antimicrobianas que sejam eficazes no combate a microrganismos. *Piper arboreum* é conhecida popularmente como pau-da-angola, apresenta atividade antifúngica, antibacteriana. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Piper arboreum* (OEPar). 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. A composição química foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, onde foi identificado β -copaen-4- α -ol como componente principal. O OEPar apresentou MIC de 128 $\mu\text{g} / \text{mL}$ contra *S. aureus* multirresistente e $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$ contra *E. coli*. A combinação do OEPar com antibióticos apresentou efeito sinérgico com norfloxacin e gentamicina contra *S. aureuse*, contra *E. coli* com o antibiótico gentamicina. O presente estudo demonstrou que o óleo essencial obtido de *Piper arboreum* possui ação antibacteriana e, interfere na ação de antibióticos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, essas pesquisas se tornam importante na contribuição para desenvolvimento de futuras metodologias no combate a infecções por bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: *Piper arboreum*. Atividade antibacteriana. Produtos naturais.

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 conhecida popularmente como pau-de-angola, jaborandi, pimenta do mato, é um arbusto glabro de altura entre 2 a 4 metros, de ocorrência da América Central até o Sul do Brasil. É utilizada como anti-reumática, sudorífera, afrodisíaca e emoliente (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006).

1 Universidade Regional do Cariri, email: vladya.freitas@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

2. Objetivo

Este trabalho objetivou avaliar a atividade antibacteriana e o efeito modulador do óleo essencial de *Piper arboreum* Aubl.

3. Metodologia

O material vegetal foi coletado no Vale do Ribeira na Reserva Biológica BOM JESUS. A excisada 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). 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 norfloxacin, eritromicina 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 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 com o volume da concentração sub-inibitória e 150 µL da suspensão bacteriana (correspondente a 10% da solução). Para o controle foram preparados tubos *eppendorf* 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 e incubadas a 35 ± 2 ° 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 β -copaen-4- α -ol 31,38% e muurola-4,10(14)-dien-1- β -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 = 128 μ g/mL contra *Staphylococcus aureus* resistente e ≥ 1024 μ g/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).

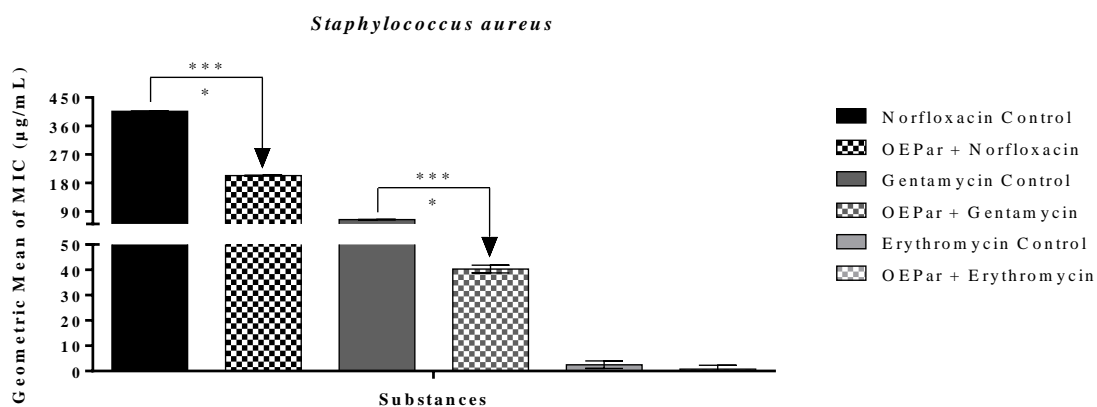


Figura 1: Óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* (OEPAr) em associação com antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*.

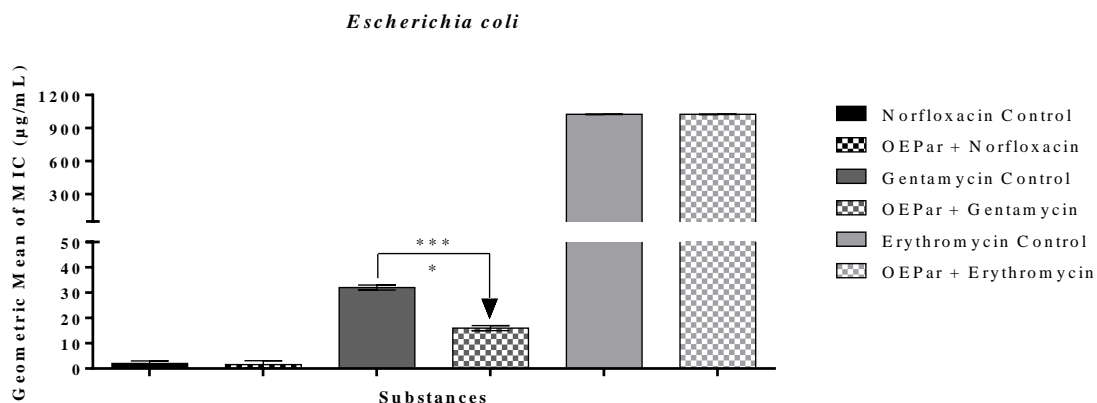


Figura 2: Óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* (OEPAr) em associação com antimicrobianos contra *Escherichia coli*.

Na avaliação do efeito modulador, a combinação do óleo essencial de *P. arboreum* (Figura 1) com os antibióticos norfloxacin e gentamicina provocou diminuição da CIM contra *S. aureus*, indicando sinergismo na associação

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

destes tratamentos, enquanto que para *E. coli* foi observado sinergismo apenas na associação com gentamicina, para norfloxacin não foi observado efeito significativo (Figura 2). As bombas de efluxo presentes na membrana plasmática de *E. coli* (VAN BAMBEKE et al., 2003) podem está relacionadas com o resultado indiferente encontrado na combinação com norfloxacin.

O sinergismo entre o óleo essencial de *P. arboreum* e os antibióticos norfloxacin e gentamicina contra *S. aureus* pode ser atribuído às alterações na permeabilidade da parede e membrana celular do microrganismo, que pode facilitar a passagem de drogas que atuam no interior da célula, como os aminoglicosídeos e norfloxacin (COUTINHO et al., 2008).

Eritromicina não apresentou nenhum resultado significativo frente às cepas utilizadas, essa indiferença pode ser atribuída aos mecanismos de resistência que estas cepas podem ter desenvolvido para este antibiótico, como as bombas de efluxo presentes em *E. coli* (MCMURRY et al., 1980).

5. Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o óleo essencial de *Piper arboreum* possui atividade contra *S. aureus* e atua na modulação de antibióticos. Esses achados se tornam importantes na busca por novas terapias eficazes para infecções desencadeadas por bactérias multirresistentes.

6. Referências

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 Bazilian Chemical Society, v.16, n.6, p.1378-1381, 2005.

MCMURRY, L. et al. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, v. 77: p.3974–3977, 1980.

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.

XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018
Universidade Regional do Cariri

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

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.

VAN BAMBEKE, F. et al. Antibiotic ef flux pumps in prokaryotic cells: occurrence, im-pact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother*, v. 51,p.1055–1065, 2003.