ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Piper amalago*

Bruno Diniz Batista (PIBIC/CNPq)[1], Vanilda Mroginski de Souza[2], Vanessa Lima Torres[3], Rosi Zanoni da Silva[3], Luis Antonio Esmerino[4] (Orientador), e-mail: esmerino@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Cursos Medicina[1] e Farmácia[2]/Departamentos Farmácia[3] e Análises Clínicas[4].

Área do conhecimento 4.03.00.00-5 Farmácia e subárea do conhecimento 2.12.00.00-9 Microbiologia.

Palavras-chave: *Piper amalago*, farmacognosia, atividade antimicrobiana.

Resumo

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como um importante recurso no atendimento básico de saúde. Dentre as plantas medicinais com potencial para atividade antimicrobiana no Brasil destaca-se a *Piper amalago*. Assim, foi avaliado o seu extrato, frações e o óleo essencial de folhas de *P. amalago.* Através das técnicas de disco difusão, concentração inibitória mínima (CIM) e biofilme. Resultados mostraram halos de inibição na triagem para *S. aureus* ATCC 25923 com o extrato bruto, óleo essencial e a fração diclorometano. Atividade antimicrobiana significante com o extrato bruto 250µg/mL frente *S. aureus* ATCC 2923 e 500 µg/mL frente *Candida albicans* (*p<0,05). Com o óleo essencial concentração inibitória mínima de 1000µg/ml para *S. aureus* ATCC 25923, 250µg/ml para *S. aureus* ATCC 6538 e 2000µg/ml para *Candida albicans* ATCC 10231. Atividade antibiofilme 2000µg/ml para *Enterococcus faecalis* 25212 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados evidenciaram a potencialidade antimicrobiana dos extratos e óleo essencial de *Piper amalago* L. e estudos complementares poderão resultar em novas substâncias antimicrobianas.

Introdução

Os extratos vegetais são uma alternativa terapêutica para o tratamento de microrganismos multirresistentes, pois apresentam muitas vantagens: menor efeito colateral, melhor tolerância do paciente, mais econômico, melhor aceitação devido à longa história de uso na medicina popular e ser renovável por estar disponível na natureza. Devido a sua atividade metabólica secundária os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas que são utilizadas como mecanismo de defesa contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros (GINDRI et al., 2011). A espécie *Piper amalago* L., conhecida popularmente como Jaborandi, é distribuída desde o México até o Brasil, sendo utilizada como analgésica. Em estudos prévios foram evidenciados a presença de amidas, que são responsáveis pela atividade anti-inflamatória e antimicrobiana (CARRARA, 2012). Dentre as plantas medicinais com possível atividade antimicrobiana existentes no Brasil destacam-se a *Piper amalago* L. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o seu potencial antimicrobiano.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212),

Escherichia coli (ATCC 25922) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). A carga microbiana foi equivalente ao padrão 05, da escala de MacFarland (1,0 – 2,0 x 10^8 UFC/mL). Esta carga foi utilizada nos testes de disco difusão e biofilme. Para CIM foi diluída 1:10 e utilizada 10µl nos testes em placa. Testou-se o extrato bruto, óleo essencial, fração hexânica, fração acetato de etila, fração diclorometano e fração etanólica. Inicialmente foram preparadas solução mãe dos extratos na concentração de 40,0 mg em 200 µL de dimetilsulfoxido (DMSO). A partir dessa solução os extratos (incluindo o óleo essencial) foram testados nas concentrações de 2000 – 62,5 µg/mL

Para a pesquisa da atividade antimicrobiana de *Piper amalago* foram utilizadas as técnicas de disco difusão para triagem (WINN et al, 2000), concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica da microdiluição em placa (NCCLS/CLSI, 2004) e inibição do biofilme pela técnica da placa corada com cristal violeta 0,5% (STEPANOVIC *et al.* (2000).

Na atividade antimicrobiana por disco difusão os discos inertes foram impregnados com 2000, 1000 e 500 µg dos extratos. A atividade antimicrobiana pela CIM em placa foi realizada com o extrato bruto e o óleo essencial nas concentrações 2000 – 62,5 µg/mL em triplicata. Utilizou-se o caldo Muller-Hinton para bactérias e Caldo Muller-Hinton com 2% de glicose para leveduras. Os testes foram realizados em triplicata e cada teste teve um branco equivalente. A redução ou inibição do biofilme foi realizada com o óleo essencial na concentração de 2000 µg/mL, com oito repetições.

Na análise dos dados para os testes de disco difusão os halos de inibição foram determinados em milímetros. Para avaliação da concentração inibitória mínima e a inibição do biofilme a densidade óptica (DO) foi lida, pós agitação, no leitor de placa SynergyH1 com software Gen5.2 em 630 nm e biofilme em 570 nm. No cálculo foi feita a média das leituras descontando a média do branco correspondente. As DO foram comparadas por análise estatística (ANOVA e pós teste Bonferroni (*$p<0.05$), utilizando o programa GraphPad Prism6. Para o cálculo do percentual de inibição (CIM e biofilme) a DO obtida com o crescimento do microrganismo teste foi equivalente a 100%. O crescimento e/ou inibição dos microrganismos frente as concentrações de *Piper amalago* foram proporcionalmente calculadas, sendo CIM^{90} quando inibe ≥90% e CIM^{50} ≥50 e <90%.

Resultados e Discussão

A triagem por disco difusão com o extrato bruto mostrou para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 halos de 17, 12 e 7 mm, nas concentrações de 2000, 1000 e 500µg, respectivamente; para o óleo essencial halos de 10 mm e 7 mm em 2000 e 1000µg, respectivamente. Dentre as frações observou-se halo de 6mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nas frações hexânica e diclorometano em 2000µg. A fração etanólica 2000 µg apresentou um halo de inibição de 7mm para *Escherichia coli* ATCC 25922.

Pela técnica da CIM a análise estatística mostrou para o extrato bruto de *Piper amalago* atividade antimicrobiana significante (*$p>0,05$) nas concentrações de 2000 a 250 µg/mL frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, houve uma inibição de 30 a 18% do crescimento (Figura 1). Para *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o extrato bruto não apresentou atividade antimicrobiana (não significante $p>0,05$). Para *Candida albicans* ATCC 10231 houve uma inibição do crescimento de 38 a 30% nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL que foram estatisticamente significantes em relação ao crescimento dos microrganismos

controle (*p<0,05). A CIM não foi observada para nenhum dos microrganismos testados nas diferentes concentrações do extrato bruto.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial avaliado pela técnica da CIM mostrou que na comparação com o grupo controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, um coco Gram-positivo, a atividade antimicrobiana do óleo essencial foi estatisticamente significante até a concentração de 62,5 µg/mL. A CIM^{90} foi observada na concentração de 1000 µg/mL e CIM^{50} na concentração de 500 µg/mL(Figura 1). Para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, um coco Gram-positivo produtor de betalactamase e resistente a penicilina; a atividade antimicrobiana foi estatisticamente significante até a concentração de 62,5 µg/mL. A CIM^{90} foi observada na concentração de 1000 µg/mL e CIM^{50} na concentração de 62,5 µg/mL Para *Escherichia coli* ATCC 25922, um bacilo Gram-negativo, foi estatisticamente significante até a concentração de 62,5µg/mL com redução do crescimento entre 55 e 17%. A CIM^{50} foi na concentração de 1000 µg/mL. Para *Candida albicans* ATCC 10231 utilizou-se o caldo Muller-Hinton com glicose 2%. A redução do crescimento foi estatisticamente significante até a concentração de 500 µg/mL e nas concentrações entre 250 - 62,5 µg/mL não houve redução significativa do crescimento (p>0,05). A CIM^{90} foi observada na concentração de 2000 µg/Ml que reduziu 99% do crescimento e a CIM^{50} em 1000 µg/mL. que inibiu 65% do crescimento. A fração diclorometano para *Staphylococcus aureus* apresentou CIM na concentração de 2000µg/mL (Figura 1).

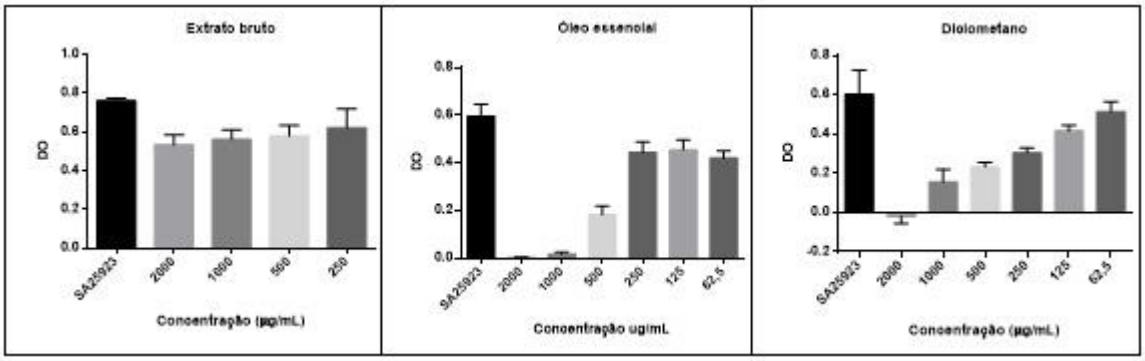


Figura 1 – Atividade antimicrobiana *de Piper amalago* frente *S. aureus* ATCC 25923

O biofilme foi avaliado pela capacidade dos microrganismos se aderirem às cavidades da microplaca O óleo essencial de *Piper amalago* na concentração de 2000 µg/ml inibiu a formação do biofilme produzido por *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, foi estatisticamente significante (*p<0,05), com redução de 26 e 29%, respectivamente. Para o *Staphylococcus aureus* não foi observada redução significante (p>0,05).

Os valores de CIM encontradas para os microrganismos pesquisados foram significativos do ponto de vista farmacocientífico. As limitações do estudo residem do tempo disponível para sua realização que foi de 1 ano, o que impossibilita a realização de experimentos mais extensos e comparativos. Além disso, na literatura há poucas referências a respeito da análise do potencial antimicrobiano específico de *Piper amalago L.*. Portanto, a relevância do presente estudo reside na sua originalidade e no potencial antimicrobiano encontrado para o óleo essencial de *Piper amalago* contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* 25922 e *Candida albicans* 10231.

Quando comparado o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Piper amalago L*. aos das plantas congêneres é possível notar um padrão comum de atividade antimicrobiana positiva (MGBEAHURUIKE, E. et al 2017). Entre as cepas bacterianas, o óleo demonstrou maior potencial antimicrobiano para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em relação aos demais microrganismos. Ao contrário do estudo de MORANDIM-GIANNETTI, Andreia de Araujo et al. 2010 o óleo essencial de *Piper amalago* mostrou eficiente ação antifúngica contra *C. albicans*, o que provavelmente se deve ao fato de que o presente estudo utilizou DMSO como solvente ao contrário do outro estudo e permitiu assim a ação do princípio ativo do óleo sobre a levedura.

Conclusões

Os resultados da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper amalago* mostraram o potencial antimicrobiano contra as cepas dos microrganismos testados. Estudos complementares poderão futuramente auxiliar o desenvolvimento de novos fármacos e agentes saneantes que consigam combater microrganismos multirresistentes. A importância da farmacognosia neste contexto é então a de agregar ao conhecimento científico a sabedoria popular com base no estudo metodológico rigoroso. Assim, valorizando a medicina popular, incentivando novas pesquisas auxiliando o desenvolvimento fármaco-científico e a soberania nacional no que tange a produção independente de fármacos e afins.

Agradecimentos

O presente trabalho foi possível graças ao Prof. Dr. Luis Antonio Esmerino, UEPG, CNPq, PIBIC.

Referências

BOCELLI, M.D. Estudo da atividade de chalconas no controle de biofilmes bacterianos. Tese. Universidade de São Paulo. 2016. http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-17112016-141016/. Acesso em 31/05/2017.

CARRARA, V.S.; CUNHA-JÚNIOR, E.F.; TORRES-SANTOS, E.C *et al*. Analisys of supercritical carbono dioxide and compressed propane extracts from *Piper amalago* L. with antileishmanial activity. Molecules, v. 17, p.15-33, 2012. 12

MGBEAHURUIKE, E. E.; YRJONEN, T.; VUORELA, H. *et al*. Bioactive Compounds from Medicinal Plants: Focus on Piper Species. South African J. Bot. 2017, 112, 54–69.

MORANDIM-GIANNETTI, Andreia de Araujo et al. Composition and antifungal activity against Candida albicans, Candida parapsilosis, Candida krusei and Cryptococcus neoformans of essential oils from leaves of Piper and Peperomia species. **Journal of Medicinal Plants Research**, p. 1810-1814, 2010.

NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, document M7-A6, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods. v. 40, p.175–79, 2000.).

WINN, W.; ALLEN, S.; JANDA, W. et al. Diagnóstico Microbiológico.Texto e Atlas Colorido. 6a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.