

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL DA *P. obliquum* RUIZ E PAVON – ESEC CUNIÃ, PORTO VELHO, RONDÔNIA.

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY EVALUATION OF EXTRACTS, FRACTIONS AND A ESSENTIAL OIL OF *Piper obliquum* RUIZ E PAVON – ESEC CUNIÃ, PORTO VELHO, RONDÔNIA.

Hélida Soleane Mendonça Ferreira Nobre<sup>1</sup>, Mariangela Soares de Azevedo<sup>2</sup>, Najla Benevides Matos<sup>3</sup>, Ângelo Gilberto Manzatto<sup>2</sup>, Natalia Faria Romão<sup>4</sup>, Jussara Rojas e Silva Aizzo<sup>5</sup>, Adeilza Felipe Sampaio<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia - IFRO

<sup>2</sup>Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

<sup>3</sup>Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia

<sup>4</sup>Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná - CEULJI/ULBRA

<sup>5</sup>Secretaria de Estado do Desenvolvimento Ambiental (SEDAM)

<sup>6</sup>BIONORTE

Autor correspondente: [helida.ferreira@ifro.edu.br](mailto:helida.ferreira@ifro.edu.br)

#### RESUMO

A *Piper obliquum* tem seu uso disseminado como analgésico e antiartrítico na medicina tradicional da Guiana e Equador. No Brasil, a espécie não tem seu uso disseminado, contudo pode ser encontrada na Estação Ecológica de Cuniã (ESEC-Cuniã), no município de Porto Velho, Rondônia. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico e frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e acetona) provenientes da planta, frente às espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e a espécie fúngica, *Candida sp.* Para a observação preliminar da atividade antimicrobiana utilizou-se o teste de difusão em ágar e, posteriormente, teste de microdiluição em meio líquido, a fim de obter a concentração inibitória mínima (CIM) e avaliar a viabilidade celular. As CIMs do extrato etanólico e frações variaram entre 0,125 e 2,0 mg·mL<sup>-1</sup> frente à *S. aureus* e de 0,062 e 0,5 mg·mL<sup>-1</sup> frente à MRSA. Os valores de viabilidade celular foram relevantes para a fração acetato de etila, corroborando com os resultados das CIMs para a mesma fração. Quanto ao óleo essencial, este demonstrou atividade frente a *S. aureus* e MRSA, no teste de difusão em ágar, com halos de inibição 17,0 e 11,0 mm, respectivamente.

**Palavras-chave:** ESEC-Cuniã. *Staphylococcus aureus*. MRSA.

#### ABSTRACT

*Piper obliquum* has its widespread use as analgesic and antiarthritic in traditional medicine in Guyana and Ecuador. In Brazil, the species does not have its widespread use, however it can be found in the Cuniã Ecological Station (ESEC-Cuniã), in the municipality of Porto Velho, Rondônia. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil, ethanol extract and fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate and acetone) from the plant, against bacterial species *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and the fungal species, *Candida sp.* For the preliminary observation of the antimicrobial activity, the diffusion test was used in agar and subsequently, the microdilution test in liquid medium, in order to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) and evaluate cellular viability. The MICs of the ethanol extract and fractions ranged from 0.125 to 2.0 mg mL<sup>-1</sup> against *S. aureus* and 0.062 and 0.5 mg mL<sup>-1</sup> against MRSA. The cell viability values were relevant for the ethyl acetate fraction, corroborating with the results of MICs for the same fraction. In relation to essential oil, it showed activity against *S. aureus* and MRSA, in the agar diffusion test, with inhibition halo 17.0 and 11.0 mm, respectively.

**Keywords:** ESEC-Cuniã. *Staphylococcus aureus*. MRSA.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil são encontradas cerca de 170 espécies do gênero *Piper*, de um total de 700 distribuídas em regiões tropicais [1], podendo se apresentar sob a forma de ervas, lianas, arbustos ou árvores, com folhas assimétricas e espigas opostas às folhas [2,3]. As espécies deste gênero são muito utilizadas na medicina tradicional para tratar de dores, reumatismo, artrite, micoses, infecções urinárias, insônia, afecções da pele, entre outras [4,5,6].

O interesse pelo potencial fitoterápico do gênero *Piper* evoluiu demasiadamente a partir do século XIX [7] e pode ser explicado pela presença de metabólitos secundários de interesse farmacológico, que são presença marcante no gênero [8]. Alguns deles com comprovadas atividades antiinflamatória [9], antitumoral [10], antifúngica [11], ansiolítica [12] e antidepressiva [13].

Inserir-se nesse contexto, a espécie *Piper obliquum*, conhecida como Anis do Oriente, por seu aroma marcante, que tem seu uso disseminado na Guiana e Equador como analgésico e antiartrítico [14].

Os estudos a respeito da espécie ainda são incipientes, até o presente momento, isolou-se o obliquol A e B das inflorescências e das folhas da *P. obliquum*, colhida no Valle Del Sacta, em Cochabamba, Bolívia, que demonstraram atividade anti-inflamatória e antimicrobiana [15]. Guerrini et al [16] elucidou os compostos constituintes do óleo essencial da espécie no Equador, bem como com a espécie coletada no Parque Nacional de Altos de Campana no Panamá [17]. Martão [18] observou expressiva atividade antioxidante das folhas e galhos de *P. obliquum* coletada em Rondônia, na ESEC-Cuniã e Aizzo [19] realizou um estudo sazonal do óleo essencial da *P. obliquum*, encontrando divergências quanto a sua composição química.

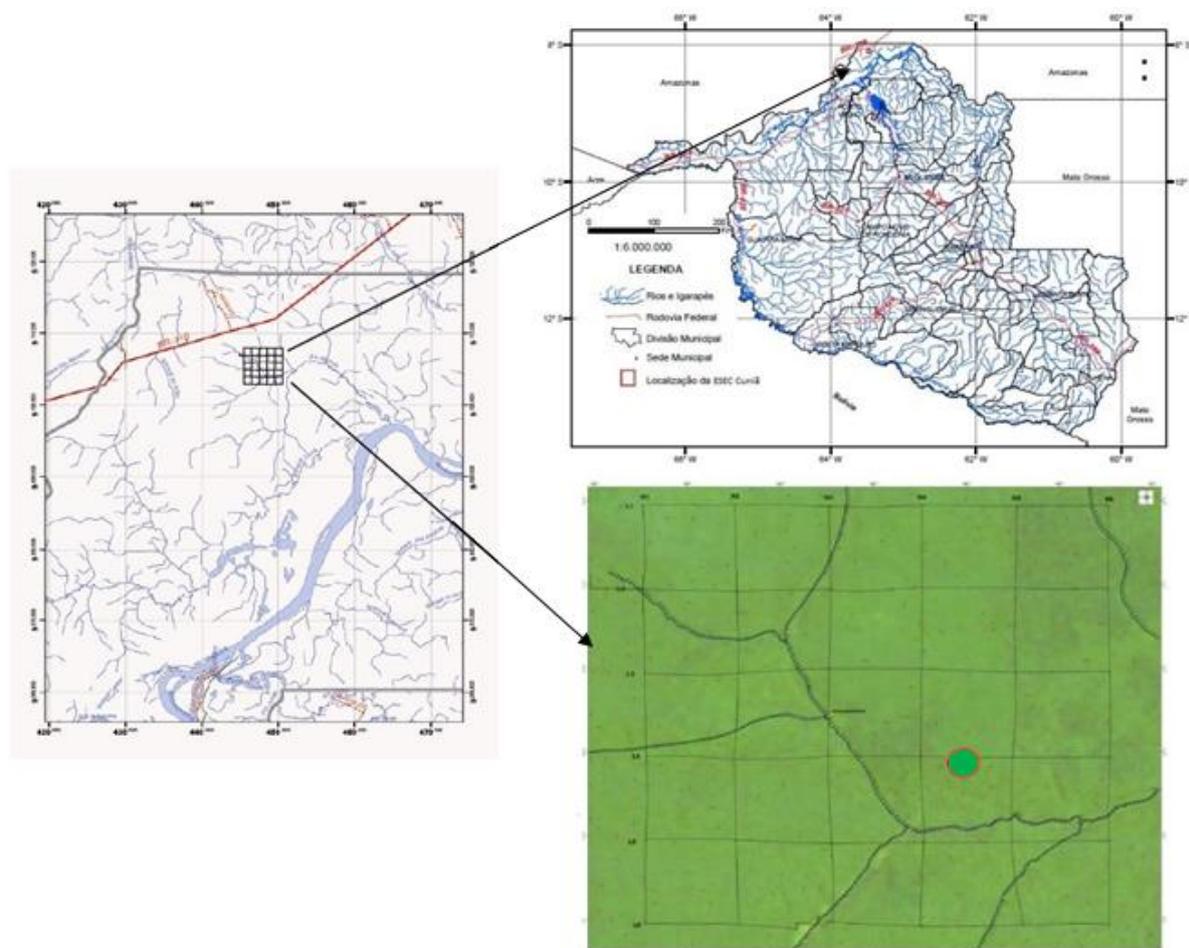
O fato da divergência dos constituintes químicos encontrados por Aizzo, em relação aos trabalhos citados [19], pode estar relacionado aos fatores externos, tais como sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação UV, nutrientes disponíveis, poluição atmosférica, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, idade da planta, que influenciam na produção dos metabólitos secundários, responsáveis pela bioatividade das plantas [20].

Neste trabalho, realizou-se o estudo da atividade antimicrobiana do óleo essencial, do extrato e frações da *Piper obliquum*, coletada na ESEC-Cuniã, com o intuito de avaliar seu potencial frente a microrganismos geradores de patologias em seres humanos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 MATERIAL VEGETAL, PREPARAÇÃO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ÓLEO ESSENCIAL

As folhas e galhos da *Piper obliquum* foram coletadas no período da manhã, no mês de agosto, na área de estudo que faz parte da ESEC-Cuniã, localizada no município de Porto Velho - Rondônia, Brasil [21] (Figura 1). O material testemunho foi obtido por Aizzo [19] n° 133 e foi depositado no Herbário Rondoniense (RON), sob o n° RON 4696, sendo identificada pelo Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.



**Figura 1:** Mapa da Estação Ecológica de Cuniã, localizada no município de Porto Velho – RO, área de estudo do PPBio (Programa de Pesquisa em Biodiversidade).

O extrato etanólico da *P. obliquum* (EEPO) foi preparado com as folhas e galhos (1,78 kg), os quais foram submetidos à secagem em estufa a 40 °C e colocados em contato com etanol

(95% v/v) por sete dias, com agitação ocasional. O material foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo (marca Fisaton), resultando em 56,61g de extrato etanólico.

Parte do extrato (28,0 g) foi submetido à coluna cromatográfica em Sílica gel 60, 230-400 mesh (marca Vetec) para obtenção das frações, sendo eluída em ordem crescente de polaridade: hexano (FHEX),  $\text{CHCl}_3$  (FCHCl<sub>3</sub>), EtOAc (FEtOAc) e acetona (FACet). O solvente de cada um foi evaporado em evaporador rotativo (marca Fisaton) e os produtos foram reservados para posterior realização dos testes antimicrobianos, bem como o restante do extrato etanólico (28,61 g).

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em extrator de Clevenger, utilizando a metodologia de Aizzo [19] e, o volume obtido, foi conservado em congelador para evitar volatilização dos componentes e envolto em papel alumínio, diminuindo sua exposição à luz.

## 2.2 TESTES ANTIMICROBIANOS

Os testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical), seguindo os POPs (Procedimentos Operacionais Padrão) [22, 23], seguindo os protocolos do CLSI (Clinical and Laboratory Standards) [24] com modificações sugeridas por Cursino e Pieri [25] e [26].

## 2.3 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR COM POÇO

Para o teste de difusão em ágar com poço foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883). Incluiu-se no teste a espécie fúngica *Candida sp.* (ATCC 14053).

O teste de difusão em ágar com poço, em triplicata, para o extrato etanólico, frações e óleo essencial das folhas de *P. obliquum*, foi realizado com a finalidade de verificar a sensibilidade dos microrganismos a estas amostras, conforme descrições dos POPs. O crescimento bacteriano foi realizado em meio LB (meio nutritivo Luria Bertani) e incubados “overnight” a 37°C em agitação constante para a obtenção de uma turvação comparada ao padrão 0,5 na escala de MacFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Antes de ser inoculado na placa foi diluído para se chegar a uma concentração de aproximadamente  $5 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>, sendo semeadas em seguida, com o auxílio de um swab, na superfície das placas de

Petri, contendo camada dupla, sendo a inferior de 10 mL de caldo ágar Mueller Hinton, acrescida de 15mL de caldo LB.

O extrato e frações foram diluídos em etanol (95%v/v) para uma concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup>, sendo também o etanol seu controle negativo.

O óleo essencial foi diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) para se chegar a concentrações de 10, 25 e 50 mg·mL<sup>-1</sup>.

Como controle positivo, utilizou-se Cloranfenicol diluído em água para injeção na concentração de 10 mg·mL<sup>-1</sup>. Com um micropipetador, as soluções contendo as amostras (extrato, frações e óleo essencial) e os controles foram aplicadas em seus respectivos poços na quantidade de 40 µL cada.

Após a aplicação das soluções dos produtos naturais, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica (marca FANEM) a 37°C por 24 horas. Os halos formados foram medidos com halômetro [25, 26].

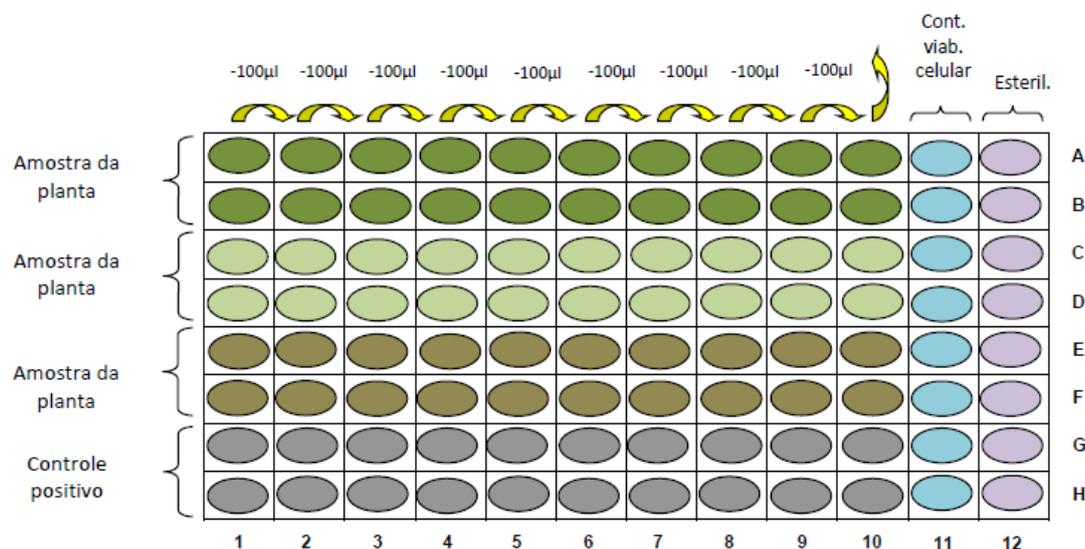
#### 2.4 MICRODILUIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO PARA OBTENÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O teste de microdiluição em meio líquido foi realizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), sendo utilizadas as amostras que apresentaram halos de inibição no teste de difusão em ágar. O teste foi realizado em duplicata com três repetições, no intervalo de sete dias entre cada repetição. Ressalta-se que o óleo essencial não foi submetido a este teste devido ao fato de haver quantidade insuficiente.

O presente teste foi realizado em microplaca de 96 poços, onde 100 µL de caldo LB foram inseridos em todos os poços. Nos poços da coluna 1 foram acrescidos 60 µL do meio e 40 µL das amostras da *P. obliquum*, em duplicata (linhas A e B). Ainda na coluna 1, linhas C e D, foi repetido o mesmo procedimento para outra amostra; sendo o procedimento repetido para todas as demais amostras da planta, incluindo o controle positivo (Cloranfenicol) (Figura 2).

Em seguida, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço da coluna 1 foi transferido para os poços da coluna 2 e homogeneizado, o mesmo volume foi transferido para a coluna 3, repetindo-se este procedimento até a coluna 10, e desprezando-se após homogeneização os 100 µL em excesso da diluição. Com este procedimento foi possível obter, ao final, as concentrações em ordem decrescente de: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015,

0,008, 0,004 mg.mL<sup>-1</sup>. Completaram-se os orifícios da coluna 1 a 10 (amostras e controle) com 60 µL de meio LB.



**Legenda:** Placa de microdiluição - as linhas A e B (extrato ou fração da *P. obliquum*)-verde escuro, C e D (extrato ou fração da *P. obliquum*)-verde claro, E e F (extrato ou fração da *P. obliquum*)-marrom, G e H (Cloranfenicol)-roxo; todas as amostras estão nas concentrações seriadas: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015, 0,008, 0,004 mg.mL<sup>-1</sup>. Coluna 11 (linhas A-H)-azul claro, controle de viabilidade celular (meio com bactérias) realizado para observar o desenvolvimento microbiano e o surgimento da cor rosa, indicando a viabilidade celular do microrganismo. A coluna 12 (linhas A-H)-lilás caracteriza a esterilidade do meio nutritivo, contendo apenas o meio LB.

**Figura 2:** Representação da placa de microdiluição em meio líquido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Na coluna 11 (linhas A-H), a de controle de viabilidade celular, foi acrescido mais 60 µL de meio LB. Na coluna 12 (linhas A-H), controle negativo, ou de esterilidade, foi acrescido 80 µL de meio LB. Nas colunas de 1 a 11 (linhas A-H) foram aplicados 20 µL de inóculo.

Ao final de todo o procedimento, 20 µL do corante resazurina foi aplicado nos 96 poços e a placa incubada em estufa bacteriológica (marca Fanem) à temperatura de 37 °C, sendo retiradas para observação da CIM em 48 horas.

No momento da leitura, observa-se que a presença de coloração rosa nos poços foi interpretada como proliferação bacteriana, enquanto que a persistência da cor violeta foi considerada como ação inibitória das amostras da planta.

Foram confeccionadas placas separadas de controle dos extrativos vegetais e do controle negativo (solvente). A observação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de forma visual, sendo definida como a menor concentração na qual não houve mudança de coloração do violeta para rosa.

As placas foram submetidas à leitura de absorbância em 630 nm, em espectrofotômetro de microplacas (marca Thermo Plate). Os valores obtidos foram analisados para observar a viabilidade celular das amostras da *P. obliquum*, de acordo com metodologia de Rozzato [27].

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa computacional GraphPad Prism 6.0 para a confecção dos gráficos estatísticos.

## 2.5 CÁLCULO DA VIABILIDADE CELULAR

A equação, descrita abaixo, foi utilizada para se observar a viabilidade de cada microrganismo sob a ação de cada amostra da planta (extrato e frações) para cada concentração aplicada a eles.

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1 - (A_c/A_0)] \times 100$$

Onde,

$A_c$  = média das absorbâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância, sem a adição do inóculo (somente extrativos vegetais).

$A_0$  = média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) [27].

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o teste de difusão em ágar para o óleo essencial, extrato e frações da *P. obliquum* foram importantes para definir a atividade preliminar dos produtos provenientes da planta. Com os dados obtidos foi possível direcionar a avaliação para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a viabilidade celular destes produtos naturais.

No teste de difusão em ágar para o óleo essencial observou-se a formação de halos de inibição de 17 e 9 mm nas concentrações de 50 e 25 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente, frente à *S.*

*aureuse* 11 mm na concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>, frente à MRSA. No controle positivo houve a formação de halos de inibição que variaram de 20 a 43 mm, demonstrando a sensibilidade das bactérias ao Cloranfenicol. Não houve formação de halo de inibição para o controle negativo, revelando a inocuidade deste. O óleo essencial da *P. obliquum* não demonstrou atividade frente às espécies *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ou *Candida sp.* (Tabela 1).

Na tabela 1, o EEPO demonstrou atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus* e MRSA, com a formação de halos de inibição de 12 e 10 mm, respectivamente.

Tabela 1. Média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para o óleo essencial, extrato etanólico e frações da *P. obliquum* espécies bacterianas e fúngica.

Amostra	Concentração (mg/mL <sup>-1</sup> )	S.a	M RSA	E .c.	P .a.	K .p.	C .sp.
Óleo essencial	50	17 ±1,4	11 ±1,4	-	-	-	-
	25	9 ±1,4	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
EEP O	10	12 ±0,0	10 ±0,0	-	-	-	-
FHE X		7 ±1,4	-	-	-	-	-
FCH Cl <sub>3</sub>		-	-	-	-	-	-
FEt OAc		11 ±1,4	12 ±0,0	-	-	-	-
FAc et.		-	-	-	-	-	-
C+	+	+	+	+	+	+	+
C-	-	-	-	-	-	-	-

**Legenda:** *S. a.* = *Staphylococcus aureus*; MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; *E. c.* = *Escherichia coli*; *P. a.* = *Pseudomonas aeruginosa*; *K. p.* = *Klebsiella pneumoniae*; *C. sp.* = *Candida sp.*; EEPO = extrato etanólico; FHEX=fração hexano; FCHCl<sub>3</sub>=fração CHCl<sub>3</sub>; FEtOAc=fração EtOAc; FAcet.=fração acetona; C + = controle positivo (Cloranfenicol); C - = controle negativo, DMSO para o óleo essencial e etanol para o extrato e frações; (-) Ausência de halos de inibição microbiana; (+) Presença de halos de inibição microbiana.

A FHEX formou halos de 7 mm para *S. aureus*, demonstrando baixa sensibilidade do microrganismo na presença desta fração. A FEtOAc teve atividade frente a *S. aureus* e MRSA, com halos de 11 e 12 mm, respectivamente, sendo consideradas moderadamente sensíveis para esta fração.

Ao analisar a variabilidade sazonal do óleo essencial da *P. obliquum* coletada na Estação Ecológica Cuniã, no mês de agosto de 2012, Aizzo [19] concluiu que a espécie havia passado por estresse devido às variações de temperatura e/ou regime hídrico, teorizando que o óleo coletado neste período foi sintetizado por dupla origem biossintética, uma vez que formou, além dos terpenos, um fenilpropanóide (metil-eugenol).

Ainda segundo Aizzo [19], neste período, dentre as 40 substâncias identificadas no óleo essencial, as maiores concentrações aconteceram no mês de agosto para os terpenos  $\alpha$ -pineno (37,7%),  $\beta$ -pineno (15,7%), canfeno (22,6%) e limoneno (2,3%), cujas concentrações variaram em todos os períodos das coletas.

A ação antimicrobiana do óleo essencial da *P. obliquum* poderia ser justificada por sua constituição química, uma vez que seus compostos majoritários podem ser considerados agentes com potencial atividade biológica, como exemplo, tem-se o trabalho de Leite et al [28] que, avaliando o potencial inibitório de  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, comprovou a ação de ambos frente à *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenese*, *S. pneumoniae*. O óleo essencial de *P. guineense*, tendo o  $\beta$ -pineno como substância majoritária e  $\alpha$ -pineno como a quarta substância mais abundante, também teve sua atividade comprovada sobre as espécies *E. coli* e *P. aeruginosa* nas pesquisas de Oyedeji [29]. O limoneno demonstrou eficácia antimicrobiana contra *S. uberis*, sugerindo a possibilidade de seu uso *in vivo* [30].

O perfil de sensibilidade destas bactérias, sob a ação do EEPO, pode ser classificado como moderadamente sensível (halos entre 10 e 20 mm) de acordo com a escala definida pelo POP (Procedimentos Operacionais Padrão para Antibiograma com Produtos Naturais) [22], utilizado como protocolo para os testes. Os controles positivos formaram halos com valores entre 25 a 47 mm para todas as cepas e para o controle negativo não foi observada formação de halos em torno do poço, indicando que este não está interferindo nos resultados das atividades antimicrobianas das amostras testadas.

Astuti et al [31] testou a atividade do extrato etanólico das folhas de *P. crocatum*, que apresentou halos de inibição nas placas de difusão em ágar de 14 e 16 mm, nas concentrações 0,5 e 0,24 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, frente a *S. aureus*.

Valle-Júnior et al [32], estudando o extrato etanólico da *Piper betle*, na concentração de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, obteve halos de 38 mm frente à MRSA, e 17 mm em placas com *P. aeruginosa*, e a fração metanólica apresentou halos de 34 e 15 mm, respectivamente, frente aos mesmos microrganismos.

O extrato etanólico da *P. arboreum* possui atividade frente à *S. aureus* com halos de 15 mm, mas não apresenta atividade frente a *E. coli*[33]. Em testes realizados por Zarai et al [34], a *P. nigrum* apresentou atividade frente a *S. aureus* (12,5 mm), *K. pneumoniae* (7,5 mm) e *E. coli* (8,3 mm) quando tratados com o extrato etanólico, porém não demonstrou atividade frente à *K. pneumoniae* quando testados com as frações EtOAc e CHCl<sub>3</sub>. A mesma planta demonstrou atividade antimicrobiana para as demais bactérias testadas, onde as frações EtOAc, CHCl<sub>3</sub> e MeOH frente à *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. colie* para o extrato EtOH e fração hexano apenas para *S. aureus*.

### 3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E VIABILIDADE CELULAR PARA O EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÕES DA *P. obliquum*.

Para a realização do teste de microdiluição em meio líquido utilizou-se o EEPO, FHEX e FEtOAc da *Piper obliquum* por terem demonstrado atividade no teste de difusão em ágar frente à *S. aureus* e MRSA.

Os resultados das CIMs das atividades antimicrobianas sugerem que o extrato etanólico e frações testadas da *P. obliquum* apresentaram capacidade de inibir o crescimento de microrganismos até determinadas concentrações (Tabela 2).

**Tabela 2** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o teste de microdiluição em meio líquido em diferentes concentrações para o EEPO, FHEX e FEtOAc da *P. obliquum* frente a *S. aureus* e MRSA.

Amostras	CIM (mg.mL <sup>-1</sup> )	
	S.a.	MRSA
EEPO	2,0	0,5
FHEX	2,0	*
FEtOAc	0,125	0,062
C+	0,25	0,004

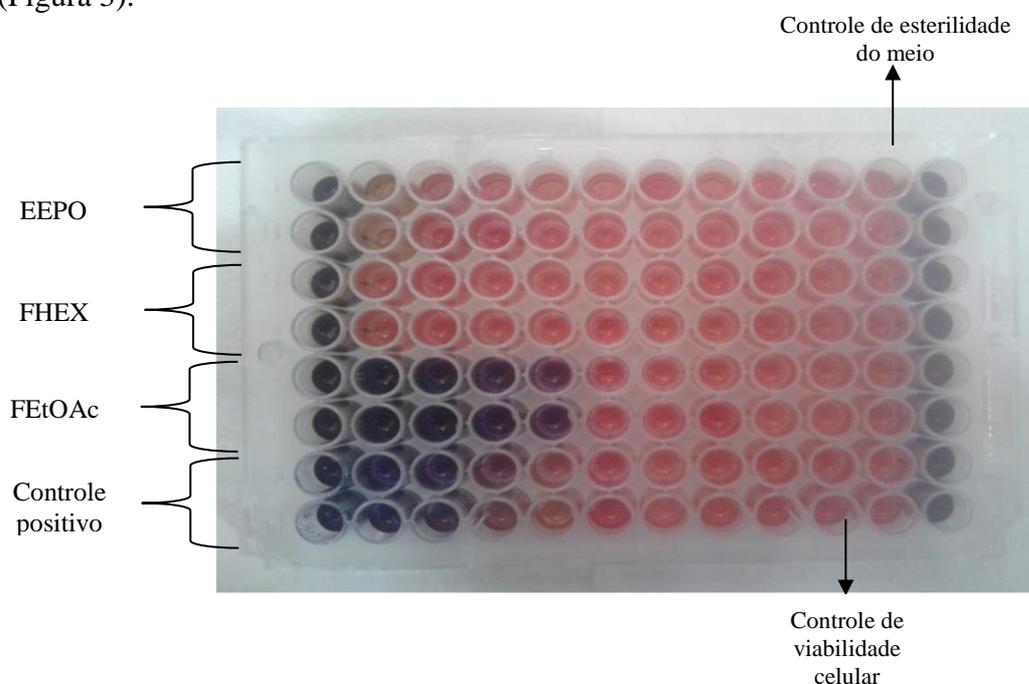
**Legenda:** S.a.=*Staphylococcus aureus*; MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente à metilina; \* = amostra não utilizada; C+=controle positivo (Cloranfenicol).

O teste de microdiluição em meio líquido é considerado uma metodologia adequada para a observação e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Ostrosky et al [35] relata que o método da microdiluição para determinação da CIM, desenvolvido por Eloff [36],

é muito utilizado devido às suas características, tais como, economia de reagentes, reprodutibilidade e confiabilidade.

A CIM, na placa de microdiluição em meio líquido, pode ser visualizada através da conversão do corante resazurina, de cor violeta, em resofurina, de cor rosa, na presença de reações metabólicas microbianas, indicando o crescimento destes microrganismos através de uma reação de oxirredução. A resazurina é reduzida por vários compostos da cadeia respiratória da célula, transformando-se em resofurina[37,38].

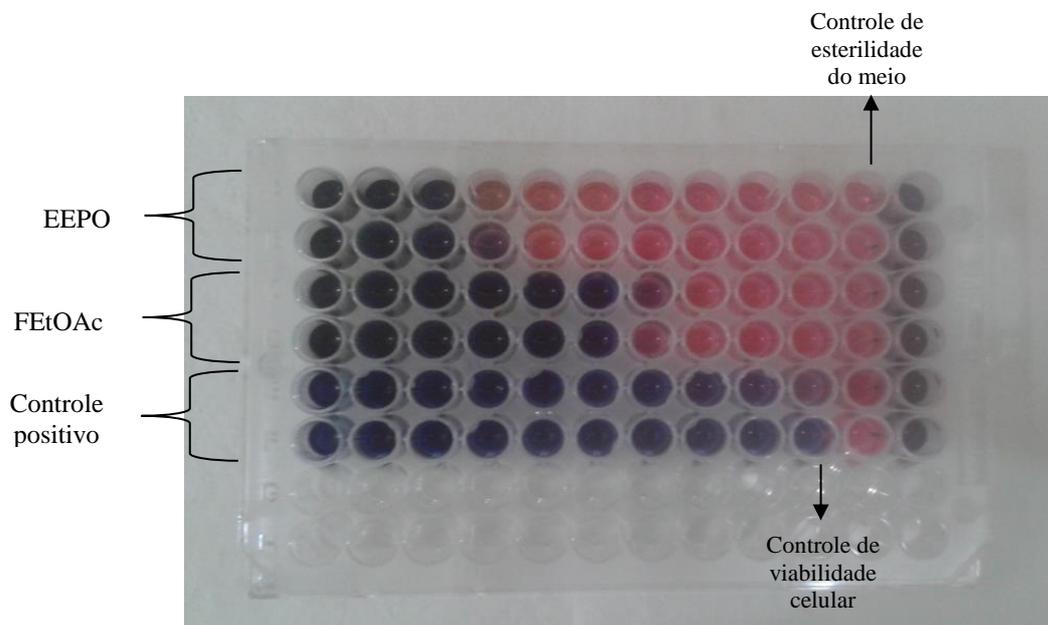
O EEPO, FHEX e FEtOAc demonstraram atividade frente à bactéria *S. aureus* com CIM de 2,0, 2,0 e 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, onde não houve a conversão do corante resazurina em resofurina, indicando ausência de metabolismo por parte do microrganismo (Figura 3).



**Figura 3:** Teste de microdiluição em meio líquido para o EEPO, FHex e FEtOAc da *P. obliquum* frente à bactéria *S. aureus* em 48 horas.

Ao comparar as CIMs destas amostras com o controle positivo (0,25 mg.mL<sup>-1</sup>), observa-se que o EEPO e FHEX tiveram concentração de inibição das bactérias acima do controle, demonstrando ser menos eficientes, já a FEtOAc apresentou CIM 50% abaixo do controle positivo, o que sugere que sua atividade de combate ao microrganismo foi superior a este.

Para o teste frente à MRSA utilizou-se o EEPO e a FEtOAc e os mesmos demonstraram valores de 0,5 e 0,062 mg.mL<sup>-1</sup> e, ao compará-las à CIM do controle positivo (0,004 mg.mL<sup>-1</sup>) observam-se atividades antimicrobianas menos eficientes para estas amostras (Figura 4).



**Figura 4:** Teste de microdiluição em meio líquido para o EEPO e FEtOAc da *P. obliquum* frente à bactéria MRSA em 48 horas.

O POP (Procedimento Operacional Padrão para Ensaio de Microdiluição em Meio de Cultura Líquido com Produtos Naturais sobre Bactérias) [23] utilizado para a microdiluição em meio líquido não propõe uma classificação da atividade antimicrobiana das amostras testadas, permitindo, assim, a adoção de parâmetros oferecidos por outros autores, como o de Rios e Recio [39], por exemplo, que descrevem que os extratos que apresentam CIM inferiores a 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> são considerados promissores.

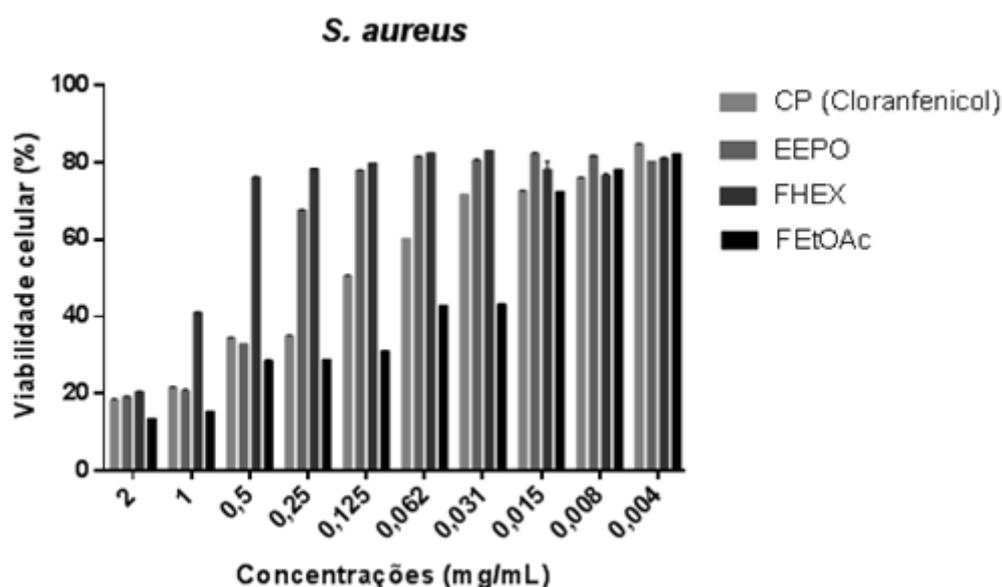
Duarte et al [40] propõe que os extratos que apresentarem CIM  $\leq 0,5$  mg.mL<sup>-1</sup> possuem atividade antimicrobiana forte; CIM com os valores entre 0,51-1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, atividade moderada e CIM  $\geq 1,0$ , atividade fraca. Para Aligiannis et al [41], são considerados extratos com forte atividade antimicrobiana aqueles que apresentam CIM de até 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, atividade moderada com CIM entre 0,6 e 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> e de atividade fraca aqueles que apresentam CIM acima de 1,6 mg.mL<sup>-1</sup>.

Aplicando as referidas classificações ao resultado obtido para EEPO e FHEX, pode-se verificar que estes apresentaram atividade fraca frente à *S. aureus* (2 mg.mL<sup>-1</sup> para ambas). A mesma avaliação pode ser aplicada ao EEPO frente à MRSA (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) concluindo que esta apresentou-se como uma fração forte na presença deste microrganismo. Ainda diante desta

classificação, a FEtOAc pode ser considerada como portadora de atividade antimicrobiana potente frente a *S. aureus* ( $0,125 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e MRSA ( $0,062 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Para Fennel et al [42], estas variações em relação à CIM das plantas são atribuídas a vários fatores, como a escolha da técnica aplicada, a época de coleta da planta, a concentração dos extratos testados e o modo de preparo das amostras. Ainda, segundo o autor, diante destas variáveis, conclui-se que não existe método padronizado para os resultados das atividades antimicrobianas quando se trata de produtos naturais.

Analisando a figura 5 observa-se o aumento da viabilidade celular, indicando o desenvolvimento do microrganismo à medida que as concentrações das amostras da *P. obliquum* e do controle positivo diminuem.



**Figura 5:** Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do EEPO, FHEX, FEtOAc e controle positivo frente à *S. aureus*.

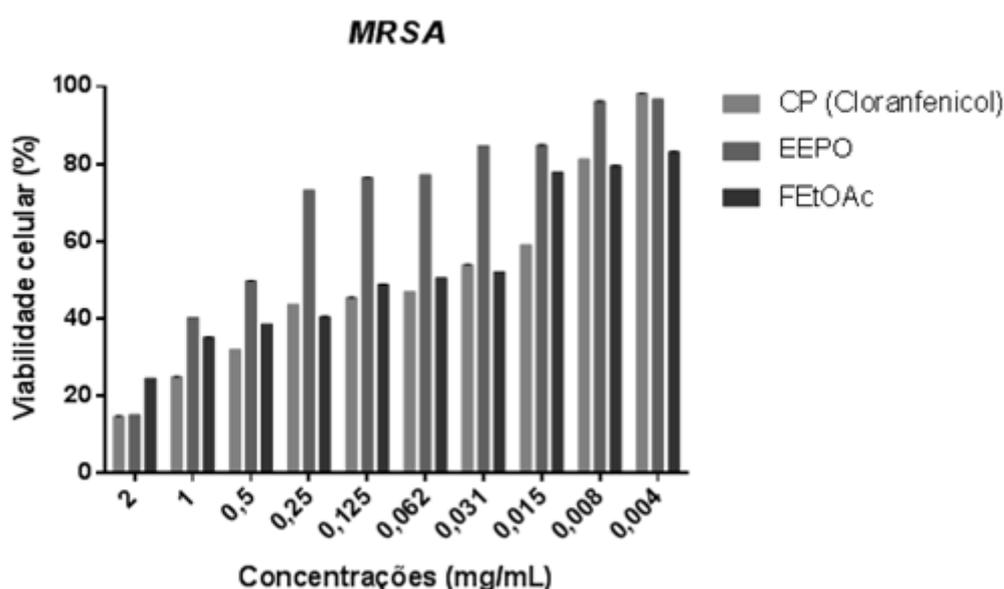
A viabilidade celular do microrganismo frente ao EEPO se mantém semelhante à ação do controle positivo até a concentração de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , porém a partir de  $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ , a viabilidade celular foi superior a 50%, havendo perda da atividade antimicrobiana para esta amostra.

A FHEX manteve a viabilidade abaixo de 50% até a concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ , mantendo a viabilidade acima de 50% a partir de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Em comparação com as demais amostras, a FEtOAc demonstrou maior controle sobre o desenvolvimento bacteriano, mantendo valores bem próximos entre si nos intervalos das concentrações  $2\text{-}1 \text{ mg.mL}^{-1}$  (13,52-15,38% de viabilidade celular),  $0,5\text{-}0,125 \text{ mg.mL}^{-1}$  (28,66-

31,04%) e 0,062-0,031 mg.mL<sup>-1</sup> (43,22-42,77%), perdendo totalmente sua atividade a partir da concentração de 0,015 mg.mL<sup>-1</sup>, quando a viabilidade celular ultrapassa 70% de desenvolvimento bacteriano.

A figura 6 demonstra o aumento da viabilidade celular da MRSA, indicando o desenvolvimento do microrganismo à medida que as concentrações das amostras da *P. obliquum* e do controle positivo diminuem, em semelhança à viabilidade de *S. aureus*.



**Figura 6:** Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do EEPO, FEtOAc e controle positivo frente à MRSA.

A viabilidade celular, sob a ação do EEPO, permaneceu abaixo de 50% até a concentração de 0,5mg.mL<sup>-1</sup>, a partir de 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>a viabilidade superou os 70% em todas as demais concentrações. A FEtOAc manteve a viabilidade celular abaixo de 50% até a concentração de 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>.

Semelhantemente aos resultados do *S. aureus*, a FEtOAc demonstrou maior eficiência no combate à MRSA, mantendo valores de viabilidade próximos entre si e abaixo de 50%, nos intervalos 1 - 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>.

Quanto ao controle positivo, este manteve sua ação evidente com 50% de viabilidade de MRSA até a concentração de 0,062 mg.mL<sup>-1</sup>, demonstrando maior eficiência em relação às amostras da *P. obliquum*, porém a FEtOAc acompanha sua atividade até a concentração de 0,031 mg.mL<sup>-1</sup>.

De forma geral, os resultados obtidos após análise da viabilidade celular indica que, para as amostras da *P. obliquum* com atividades, a medida que as concentrações diminuem, seu

potencial antimicrobiano também diminui. Esse fato pode ser explicado pelo sinergismo dos compostos bioativos e/ou pela influência da metodologia empregada [43].

Vale ressaltar também a importância da continuidade das pesquisas voltadas para atividade antimicrobiana da *P. obliquum*, no intuito de perfazer um perfil de atividade biológica da planta.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial das folhas da *P. obliquum* demonstrou atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* e MRSA, para o teste de difusão em ágar, porém não foi testado para microdiluição em meio líquido, necessitando ainda, ter sua CIM e viabilidade celular determinadas como as demais amostras.

Entre todas as amostras da planta, em ambos os testes antimicrobianos, difusão em disco e microdiluição em meio líquido, a fração acetato de etila (FetOAc) foi a que demonstrou melhor atividade antimicrobiana frente à *S. aureuse* MRSA, gerando uma CIM de menores valores entre as demais, o que sugere um potencial como fração a ser escolhida para estudos futuros.

Diante do exposto faz-se necessário um aprofundamento no estudo da espécie no que diz respeito a sua composição química e mecanismo de ação dessas substâncias frente aos microrganismos sensíveis a elas, para posteriores pesquisas em relação a sua atividade biológica.

Os resultados obtidos para o óleo essencial, extrato etanólico e frações da *Piper obliquum* sugerem que planta, obtida na ESEC Cuniã, pode ser uma candidata em potencial para novas pesquisas e desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos a partir dos compostos fixos da espécie.

**AGRADECIMENTOS:** CAPES, CEPEM-RO, LABFITO, PGDRA-UNIR, IFRO.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] YUNCKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil I: Piper Group I, II, III, IV.** Hoenea: Instituto de Botânica; 1972.

[2] JARAMILLO, M.A; MANOS, P. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus Piper (Piperaceae). **Am. J. Bot.** v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

- [3] SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.
- [4] BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Med**, v. 65, n. 6, p. 541-544, 1999.
- [5] BLUMENTHAL, M.; SING, Y.N. Pharmacology of kava and its constituents. **Herbal Gram American Botanical Council**, v. 39, p. 50-56, 1997.
- [6] SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, M.J.; BOLZNI, V.S.; MÉDA, C.I.; YOUNG, M.C.M., et al. Antifungal amides from *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521-527, 2002.
- [7] PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; BISHT, K.S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A., et al. Phytochemistry of Genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- [8] MARQUES, J.V. **Atividade biológica de amidas e análogos de espécies de *Piper* e estudos biossintéticos** (Tese). Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de São Paulo (São Paulo), 2009.
- [9] UDDIN, M.F.; UDDIN, S.A.; HOSSAIN, M.D.; MANCHUR, M.A. Antioxidant, cytotoxic and phytochemical properties of the ethanol extract of *Piper betle* leaf. **IJPSR**, v. 6, n. 10, p. 4252-4258, 2015.
- [10] GUPTA, P.; BALWANI, S.; KUMAR, S.; AGGARWAL, N.; ROSSI, M.; PAUMIER, S., et al. Beta-sitosterol among other secondary metabolites of *Piper galeatum* shows inhibition of TNF $\alpha$ -induced cell adhesion molecule expression on human endothelial cells. **Biochimie**, v. 92, n. 9, p. 1213-1221, 2010.
- [11] BEZERRA, D.P.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; VASCONCELLOS, M.C.; SILVA, A.C.R.; MORAES, M.O.; et al. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkalamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Science Direct.**, v. 652, n. 2, p. 164-174, 2008.
- [12] SOMMERWERK, S.; KEM, S.; HELLER, L.; CSUK, R. First total synthesis of piperodione and analogs. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 45, p. 6243-6244, 2014.
- [13] WHITEHEAD, S.R.; JEFFREY, C.S.; LEONARD, M.D.; DODSON, C.D.; DYER, L.A.; BOWERS, M.D. Patterns of secondary metabolite allocation to fruits and seeds in *Piper reticulatum*. **J. Chem. Ecol.**, v. 39, n. 11-12, p. 1373-1384, 2013.
- [14] DEFILIPPIS, R.A.; MAINA, S.L.; CREPIN, J. **Medicinal plants of Guianas (Guyana, Surinam, French Guianas)**. 1 st ed. Washington: National Museum of History, 2004.
- [15] VALDIVIA, C.; MARQUEZ, N.; ERIKSSON, J.; VILASECA, A.; MUÑOZ, E.; STERNER, O. Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 2, p. 4120-4126, 2008.

- [16] GUERRINI A, SACCHETTI G, ROSSI D, PAGANETTO G, MUZZOLI M, ANDREOTTI E, TOGNOLINI M, MALDONADO ME, BRUNI R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environ. Toxicol.Pharmacol.*, v. 27, n. 1, p. 39-48, 2009.
- [17] MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; GUPTA, M.P.; ADZET, T.; CASANOVA, J; CAÑIGUERAL, S. Leaf essential oils of three Panamanian *Piper* species. *Phytochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1277-1282, 1998.
- [18] MARTÃO, V.M. **Atividade antioxidante in vitro de plantas medicinais da Amazônia Ocidental** (Dissertação). Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Universidade Federal de Rondônia (Porto Velho), 2013.
- [19] AIZZO, J.R.S. **Variabilidade química do óleo essencial da *Piper obliquum* Ruiz & Pavon da Estação Ecológica Cuniã, Porto Velho-RO** (Dissertação) Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Universidade Federal de Rondônia (Porto Velho), 2013.
- [20] GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- [21] **Programa de Pesquisa em Biodiversidade - PPBio. Porto Velho: Estação Ecológica Lago do Cuniã (BR)**. Disponível em: <http://ppbio.inpa.gov.br/sitios/cunia>, [acesso em 31 de Jul 2016].
- [22] **Procedimento Operacional Padrão para Antibiograma com Produtos Naturais (POP)**, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Lêonidas e Maria Deane, 2012.
- [23] **Procedimento Operacional Padrão para Ensaios de Microdiluição em meio de cultura líquidos com produtos naturais sobre bactérias (POP)**, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Lêonidas e Maria Deane, 2012.
- (24) **Clinical and Laboratory Standards.M31-A3 (CLSI)**. Performance Standards for Antimicrobial discs and dilution susceptibility tests for bacteria isolated for animals, 3 st ed. Pensilvania, 2008.
- [25] CURSINO, L.M.C.; SANTOS, I.; MARIÚBA, L.A.M.; JEFFREYS, M.F.; LIMA, N.M.; OLIVEIRA, J.L., et al. Antibacterial activity of *Minuartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. *EJFA*, v. 23, n. 6, p. 505-510, 2011.
- [26] PIERI, F.A.; JOSÉ, R.M.; GALVÃO, N.N.; NERO, L.A.; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. *Ciênc. Rural.*, v. 40, n. 8, p. 1797-1801, 2010.
- [27] ROZATTO, M.R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. (Dissertação) Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Araraquara), 2012.

- [28] LEITE, A.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; DINIZ, M.F.F.M.; TRAJANO, V.N.; MEDEIROS, I.A. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.
- [29] OYEDEJI, O.A.; ADENIYI, B.A.; AJAVI, O.; KONIG, W.A. Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. **Phytotherapy Research.**, v. 19, n. 4, p. 362-364, 2005.
- [30] MONTIRONI, I.D.; CARIDDI, L.N.; REINOSO, E.B. Evaluation of the antimicrobial efficacy of *Minthostachys verticillata* essential oil and limonene against *Streptococcus uberis* strains isolated from bovine mastitis. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 210-216, 2006.
- [31] ASTUTI, P.A.; WAYONO; NABABAN, O.A. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *Piper crocatum* Ruiz & Pavon. **Asian Pac J. Trop. Biomed.**, v. 4, n. 2, p. 592-596, 2014.
- [32] VALLE-JUNIOR, D.L.V.; CABRERA, E.C.; PUZON, J.J.M., RIVERA, W.L. Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of Philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of Gram Positive and Gram Negative bacteria with transferable multiple drug resistance. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2016.
- [33] NASCIMENTO, S.A.; ARAÚJO, E.A.; SILVA, J.M.; RAMOS, C.S. Chemical study and antimicrobial activities of *Piper arboreum* (PIPERACEAE). **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 60, n. 1, p. 2837-2839, 2015.
- [34] ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; SALEM, N.B.; GARGOURI, Y.; SAVARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **Food Sci. Technol.**, v. 50, n. 2, p. 634-641, 2013.
- [35] OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- [36] ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med.**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.
- [37] ARAUJO, I.S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará.** (Dissertação) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana (Feira de Santana), 2011.
- [38] NAKAYAMA, G.H.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **J. Immunol. Methods.**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.
- [39] RIOS, J.L., RECIO, M. Medicinal plants and antimicrobial plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

[40] DUARTE, MC.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C. Anti *Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

[41] ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum species*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

[42] FENNEL, C.W.; LINDSEY, K.L.; McGAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; et al. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, n. 2-3, p. 205-217, 2004.

[43] PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.