



ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E EFEITO INTERATIVO *in vitro* DE EXTRATOS E FASES PARTICIONADAS DE *Piper montealegreanum* YUNCKER FRENTE A MICRO-ORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS

Wilma Raianny Vieira da Rocha (1); Harley da Silva Alves (2); Luanne Eugênia Nunes (3);
Raïssa Mayer Ramalho Catão (4)

(1) Laboratório de Análises Cínicas - Universidade Estadual da Paraíba - UEPB; Campina Grande-PB, Brasil.

Email: wilmaraianny@gmail.com

(2) Laboratório de Fitoquímica - Universidade Estadual da Paraíba - UEPB; Campina Grande-PB, Brasil.

Email: harley.alves@hotmail.com

(3) Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Email: luanne_87@hotmail.com

(4) Laboratório de Atividade Antimicrobiana - Universidade Estadual da Paraíba - UEPB; Campina Grande-PB,

Brasil. Email: raissacatao@uol.com.br

RESUMO

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos dentre eles a síntese de novas moléculas e modificação molecular de substâncias naturais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto (EEB), a fase clorofórmica (CHCl_3) e a fase acetato de etila (ACOEt) de *Piper montealegreanum* Yuncker, determinar a concentração inibitória mínima – CIM dos produtos ativos e a interação dos produtos testados com os seguintes antimicrobianos: ampicilina 10mcg (AMP), gentamicina 10mcg (GEN), ciprofloxacino 5mcg (CIP), cloranfenicol 30mcg (CLO), sulfametoxazol 25mcg (SUT), tetraciclina 30mcg (TET) e eritromicina 5 mcg (ERI). A avaliação da atividade antibacteriana e as interações foram realizadas pelo método de disco difusão. Para a interação foram adicionados 20 μL da solução de cada produto ao disco do antimicrobiano, os solventes utilizados no preparo dos produtos também foram testados durante a avaliação da atividade antimicrobiana bem como nas interações. Foram testadas duas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Foi possível verificar que tanto o extrato etanólico bruto (EEB) como as fases clorofórmica (CHCl_3) e acetato de etila (ACOEt) não apresentaram atividade frente as cepas ensaiadas, fato evidenciado pela ausência de halos de inibição de crescimento, após incubação a 37 °C por 24 horas, impossibilitando portanto, a determinação da CIM. Em relação às interações realizadas com os antimicrobianos, observou-se, *in vitro*, modificação do comportamento da droga evidenciando possível antagonismo frente a *P.aeruginosa*, enquanto que frente a *E. coli* verificou-se possível sinergismo na maioria das interações. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que os produtos de *P. montealegreanum* testados isoladamente não apresentaram atividade antibacteriana frente às cepas ensaiadas. No entanto, foram capazes modificar o efeito dos antimicrobianos quando testados associados a estes. Os resultados destas interações devem ser melhor investigadas, em estudos futuros, visando à identificação e a determinação da concentração das substâncias ativas, em cada parte da planta, podendo assim evidenciar quais substâncias são capazes de promover efeitos interativos com os antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: Piperaceae. Interação. Antimicrobianos. *Pseudomonas aeruginosa*. *Escherichia coli*.



INTRODUÇÃO

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos dentre eles a síntese de novas moléculas e modificação molecular de substâncias naturais.

O tratamento de doenças infecciosas vem se tornando um problema que cresce significativamente, tendo em vista a disseminação da resistência bacteriana, causando incertezas quando se trata de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, surgindo a necessidade de se buscar novos compostos com atividade antimicrobiana que possam servir como alternativa terapêutica no combate a esses micro-organismos. De acordo com Gonçalves et al. (2011), é importante para encontrar formas de inibir ou combater esses patógenos, que constantemente apresentam resistência a antibióticos usuais. De modo que o uso de medicação combinada ou associada é frequente, no entanto, as interações medicamentosas podem causar diferentes.

A interação medicamentosa caracteriza-se como um evento onde os efeitos de um fármaco podem ser alterados pela presença de outro fármaco, alimento ou substâncias diversas, dentre elas as plantas medicinais (KAWANO et al., 2006).

As interações podem causar modificações na farmacocinética e/ou farmacodinâmica dos fármacos e podem ser classificadas em farmacocinéticas, farmacodinâmicas, farmacêuticas ou de efeito. De modo que devido ao seu alto poder de interação, nenhum fitoterápico ou produto natural deve ser administrado concomitantemente com outros medicamentos sem orientação médica/farmacêutica (CORDEIRO et al., 2005)1, 20).

Dentre as atividades farmacológicas e biológicas atribuídas ao gênero *Piper* destacam-se as espécies de *Piper regnellii* com atividade antileishmania e antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras (PESSINI et al., 2003; NAKAMURA et al., 2006), *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* com atividade tripanocida (REGASINI, 2009), *Piper aduncum* com atividade sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* (MAGALHÃES, 2010), *Piper hostmannianum* com a potente atividade antiplasmodial de seus flavonóides (PORTET et al., 2007), além da *Piper hispidinervum* com atividade inseticida de frente a lagarta *Spodoptera frugiperda* (LIMA et al., 2009).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto (EEB), a fase clorofórmica (CHCl_3) e a fase acetato de etila (ACOEt) de *Piper montelegreanum* Yuncker frente a cepas ATCC de bactérias Gram negativas, determinar a



concentração inibitória mínima – CIM dos produtos ativos e verificar a interação dos produtos testados com alguns antimicrobianos e esclarecer os mecanismos dessas interações.

METODOLOGIA

Material vegetal

As folhas de *Piper montealegreanum* Yuncker foram coletadas no *campus* de pesquisas do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém-PA e identificadas pela professora Dra. Elsie Guimarães do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e uma exsicata foi depositada no herbário do Museu Emílio Goeldi, localizado em Belém-PA, sob n° MSP-010. Foram preparados a partir das folhas de *P. montealegreanum*, o extrato etanólico bruto (EEB) e frações particionadas a partir do deste, que foram as frações clorofórmica (CHCl_3) e acetato de etila (ACOEt), que foram rotaevaporadas para recuperação do solvente e utilizadas nos testes de determinação de atividade antibacteriana.

A concentração utilizada de cada produto foi igual ao rendimento total obtido do EEB e das frações, que foi de 348 mg.mL^{-1} para o EEB, 95 mg.mL^{-1} para a CHCl_3 e 411 mg.mL^{-1} para ACOEt.

Determinação da atividade antibacteriana, concentração inibitória mínima (CIM) e interações com antimicrobianos

Para este estudo foram utilizadas cepas Gram negativas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* ATCC (25922) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2010). Após o enriquecimento em Caldo BHI, uma alíquota de cada crescimento foi semeada através da técnica de esgotamento por estrias em Ágar Muller Hinton incubando a 37°C por 24h. Após esse período de incubação, algumas colônias foram diluídas em solução salina estéril 0,85% até atingirem a turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, valor equivalente a $1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$ originando uma suspensão bacteriana padrão (CLSI, 2010).

Inicialmente foi realizada uma triagem da atividade antibacteriana do EEB e suas fases frente às cepas escolhidas para o estudo. O semeio, na superfície do meio de cultura (Agar Mueller-Hinton) foi realizado utilizando-se *swabs* estéreis, que foram mergulhados na suspensão bacteriana previamente padronizada. Em seguida foram adicionados discos de



papel de filtro estéreis (CEFAR[®]) de 6 mm de diâmetro, previamente impregnados com 20 µL de cada produto a ser testado, sendo distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar (CLSI, 2010), garantindo que haja espaço para formação de possíveis halos de inibição.

Para determinação da concentração inibitória mínima foram utilizados os produtos nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 %, tomando-se como base a concentração inicial dos produtos preparados para análise.

Como controles negativos foram testados todos os solventes utilizados na preparação dos extratos e fases, utilizando-se a mesma metodologia empregada para os produtos em avaliação. Após o semeio e distribuição dos discos, as placas foram incubadas a 37°C/24 h, para a formação de halos de inibição de crescimento, os quais foram medidos com auxílio de um halômetro (BAUER; KIRBY; TURCK, 1966; CLSI, 2010), considerando-se como ativo o produto que apresentou halo com diâmetro igual ou superior a 8 mm (Parekh, Chanda, 2007; Catão et al., 2007).

Para verificar se o EEB e as frações CHCl₃ e ACOEt eram capazes de provocar alguma interação com antimicrobianos foram realizados antibiogramas por disco-difusão em meio sólido de acordo com as recomendações do CLSI (2010).

Foram realizados simultaneamente três antibiogramas para cada cepa ensaiada. No primeiro foram adicionados 20 µL das soluções do EEB (348 mg.mL⁻¹) a fração CHCl₃ (95 mg.mL⁻¹) e a fração ACOEt (411 mg.mL⁻¹) nos discos dos antimicrobianos. No segundo antibiograma foram adicionados 20µL de cada diluente utilizado no preparo das soluções que foram álcool absoluto, clorofórmio e acetato de etila e por fim, o terceiro antibiograma, foi realizado de forma convencional (CLSI, 2010), ou seja, os antimicrobianos foram testados isoladamente. Este último antibiograma qual foi utilizado para avaliar comparativamente se a adição dos produtos acarretaria alguma alteração no diâmetro dos halos de inibição de crescimento bacteriano.

Os antimicrobianos utilizados foram: Ampicilina 10 mcg (AMP), gentamicina 10mcg (GEN), ciprofloxacino 5 mcg (CIP), cloranfenicol 30 mcg (CLO), sulfametoxazol 25 mcg (SUT) e tetraciclina 30 mcg (TET) para *E. coli* e gentamicina 10mcg (GEN), ciprofloxacino 5 mcg (CIP) para *P. aeruginosa*.

Considerou-se efeito interativo sinérgico, quando o diâmetro do halo de inibição formado pela combinação do produto teste e o antimicrobiano, apresentou aumento ≥ 2 mm quando comparado com o halo de inibição formado pela ação do antibiótico testado isoladamente. Quando da formação de halo de inibição decorrente da ação combinada



apresentou diâmetro inferior àquele desenvolvido pela ação isolada do antibiótico considerou-se efeito antagônico (OLIVEIRA et al., 2006).

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível verificar que tanto o extrato etanólico bruto (EEB) bem como as fases clorofórmica (CHCl_3) e acetato de etila (ACOEt) mostraram-se inativos frente as cepas ensaiadas evidenciado pela ausência de halos de inibição de crescimento bacteriano após incubação a 37°C por 24 horas, o que impossibilitou a determinação da CIM dos produtos uma vez que os mesmos não se demonstraram ativos. O fato desses produtos não terem apresentado atividade antimicrobiana por disco-difusão diante dos micro-organismos testados não determina, categoricamente, a sua inatividade, visto que os testes de atividade antimicrobiana devem ser realizados por pelo menos duas metodologias distintas (CATÃO, 2007).

Segundo Pool-Zobel et al.(1993), as bactérias Gram negativas apresentam uma membrana mais externa, que pode impedir a entrada de numerosas moléculas de antibióticos, também apresentam o espaço periplasmático que contem enzimas, capazes de quebrar moléculas estranhas introduzidas no meio. Estes fatos, associados à presença da membrana dual presente nas bactérias Gram negativas, que forma um envelope complexo, podem justificar a menor sensibilidade dessa classe de bactérias frente aos antimicrobianos assim como aos extratos vegetais (HOLLEY et al., 2005).

A tabela 1 apresenta os resultados das interações, *in vitro*, realizadas com os produtos obtidos a partir da *Piper montealegreanum* Yuncker com seis antimicrobianos. Observou-se que a maioria das associações/interações foram capazes de modificar o efeito das drogas frente às cepas testadas e que a mesma associação (antimicrobiano e produto vegetal) foi capaz de provocar efeitos distintos em função da espécie microbiana testada. Este fato ficou bem caracterizado na associação dos produtos vegetais com o ciprofloxacino, que apresentou um possível efeito interativo sinérgico frente a *E. coli* e antagônico frente a *P.aeruginosa*, respectivamente pelo aumento e diminuição dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento microbiano.

Evidenciou-se uma possível interação antagônica com destaque para a gentamicina que quando associada ao EEB e à fração ACOEt que apresentou incapacidade de inibir o crescimento bacteriano. Ou seja, o diâmetro do halo de inibição que inicialmente era de aproximadamente 20 mm, passou a zero, para ambas as espécies bacterianas testadas. Em relação à associação GEN + CHCl_3 , também foi evidenciada interação antagônica.



É relevante ressaltar que o uso concomitante extratos vegetais com antimicrobianos merece um olhar atento e cuidadoso pela possibilidade de ocorrer interferências entre eles, reduzindo a potência da atividade antimicrobiana, em relação a sua potência quando utilizados isoladamente (ELLER et al., 2015).

Tabela 1. Avaliação do efeito interativo de produtos obtidos de *Piper montealegreanum* Yuncker e antimicrobianos frente a cepas ATCC

Antimicrobianos e Interações	Micro-organismos testados	
	Diâmetros dos halos de inibição (mm) / Desvio padrão	
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
AMP isolado (10mcg)	17±1,00	NT
AMP+EEB	20,33±0,58	NT
AMP+CHCl ₃	20,67±1,15	NT
AMP+ACOEt	21±1,00	NT
GEN isolado (10mcg)	19,67± 1,15	20±1,00
GEN+EEB	0	0
GEN+CHCl ₃	8,67±1,15	9,67± 0,58
GEN+ACOEt	0	0
CIP isolado (5mcg)	30,33±0,58	27,67±0,58
CIP+EEB	33,33±1,15	14,33±0,58
CIP+CHCl ₃	35,33±1,15	17,33±0,58
CIP+ACOEt	30,67±1,15	9,67±0,58
CLO isolado (30mcg)	21,33±0,58	NT
CLO+EEB	28,33±0,58	NT
CLO+CHCl ₃	28,33±0,58	NT
CLO+ACOEt	23,67± 0,58	NT
SUT isolado (25mcg)	24,67±0,58	NT
SUT+EEB	26,67±0,58	NT
SUT+CHCl ₃	28,33±1,15	NT
SUT+ACOEt	26,67±0,58	NT
TET isolado (30mcg)	20,33±0,58	NT
TET+EEB	25,67±0,58	NT
TET+CHCl ₃	22,67±1,15	NT
TET+ACOEt	25±1,00	NT

Legenda: NT (Não testado para a cepa); AMP (ampicilina); GEN (gentamicina); CIP (ciprofloxacino); CLO (cloranfenicol); SUT (sulfametoxazol); TET (tetraciclina); EEB (extrato etanólico bruto); CHCl₃ (fração clorofórmica); ACOEt (fração acetato)

Diante da cepa de *E. coli* verificou-se possível sinergismo para as interações do EEB e das frações com ampicilina, ciprofloxacino, cloranfenicol, sulfametoxazol e tetraciclina, evidenciado pelo aumento do diâmetro dos halos de inibição de crescimento em comparação ao antibiograma isolado.

3 CONCLUSÃO

Através dos resultados é possível concluir que os produtos testados obtidos a partir da *P. montealegreanum* não apresentaram atividade antibacteriana frente às cepas ensaiadas. No entanto, o EEB assim como as fases particionadas foram capazes de modificar o efeito dos



antimicrobianos causado diferentes efeitos, quando testados associados a estes. É importante ressaltar a necessidade de estudos complementares onde sejam realizadas em cada parte da planta, o isolamento, a identificação e quantificação da concentração das substâncias ativas, capazes de promover efeitos interativos com os antimicrobianos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

CATÃO, R.M.R et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Anal Clin.**, v.42, n.1, p.9-14, 2010.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA, 2010.

CORDEIRO, C.H.G. et al. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, n.3, p.272-278, 2005.

ELLER, S.C.W. S. et al. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2015;36(1):131-136.

GONÇALVES, D.M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.13, n.2, p.197-202, 2011.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiol.**, v.22, n.4, p.273-292, 2005.

KAWANO, D.F., et al. Acidentes com os medicamentos: como minimizá-los? **Rev. Bras Ciênc Farmac.** 2006; 42 (4): 487-95

LIMA, R.K., et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta amazônica**, v. 39, n. 2, 2009.

MAGALHÃES, C. F. **Efeito de extratos e frações de *Piper aduncum* sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis***. 2010, 52f (Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas) Programa de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares – SP.

NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.



OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

PESSINI, G. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev Bras Farmacogn**, v. 13, p. 21-24, 2003.

POOL- ZOBEL, B. L. et al. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the S. typhimurium mutagenicity assay. **Nutrition and Cancer**, v. 20, 1993.

PORTET, B. et al. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from Piper hostmannianum var. berbicense. **Phytochemistry**, v. 68, n. 1312, 2007.

REGASINI, L.O. et al. Atividade tripanocida de Piper arboreum e Piper tuberculatum (Piperaceae). **Rev Bras Farmacog**; v. 19, p. 199-203, 2009.

