



AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA EM BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS E GRAM-NEGATIVAS DE EXTRATOS DE PARIPAROBA

*Caroline Ortega Terra Lemos*¹, *Renata Menoci Gonçalves*², *Vera Lucia Dias Siqueira*³,
*Lucio Cardozo Filho*⁴, *Vladimir Ferreira Cabral*⁵

RESUMO: As plantas representaram durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. A *Piper regnellii* var. *pallescens* é uma planta medicinal ocorrente no Brasil, popularmente conhecida como Pariparoba e utilizada para tratar ulcerações e irritação da pele. Neste contexto avaliou-se a capacidade antibacteriana dos extratos das folhas e dos caules dessa espécie, obtidos por extração a alta pressão. A Pariparoba foi seca, triturada e classificada para se obter um material com 0,3 mm de espessura. A obtenção dos extratos supercríticos (ESC) usando CO₂ pressurizado como solvente ocorreu em três combinações dos parâmetros temperatura e pressão: 40 °C e 109,2 bar; 60 °C e 244,1 bar; e 40°C e 250 bar. A concentração inibitória mínima (CIM) de todos os extratos foi determinada para *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os extratos supercríticos de Pariparoba foram eficientes para inibir o crescimento de *S. aureus*. Todos os extratos apresentaram uma baixa atividade contra *Escherichia coli* (CIM ≥ 500µg/mL). A diminuição da pressão e, conseqüentemente, a redução da densidade do fluido supercrítico diminuiu a CIM para a bactéria gram-positiva. Este comportamento indica que maior poder solvente é necessário pra a obtenção de compostos com potencial antimicrobiano. Os baixos valores de CIM apresentados indicam a extração supercrítica como um excelente método para obtenção de extratos de *Piper regnellii* com atividade antiestafilocócica.

PALAVRAS- CHAVE: Técnicas de extração, *Piper regnellii*, atividade antibacteriana.

1 INTRODUÇÃO

Apesar de representarem, por muito tempo, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a ser a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (DUARTE *et al*, 2007).

O uso de extratos de plantas também é possível para se obter princípios ativos quimicamente definidos, e para isso, a atividade farmacológica deve estar definida, assim como os compostos responsáveis por essa atividade. Em alguns casos, o efeito terapêutico pode resultar da ação de vários princípios ativos (HOSTETTMANN *et al*, 2003).

¹ Acadêmica do curso de mestrado em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. carolaterra@hotmail.com

² Acadêmica do curso de mestrado em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. menoci@hotmail.com

³ Professora mestre da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. vldsiqueira@uem.br

⁴ Co-orientador professor doutor da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. cardozo@deq.uem.br

⁵ Orientador professor doutor da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Maringá – Paraná. vladimir@deq.uem.br

Inúmeras espécies vegetais têm sido usadas como fontes de compostos bioativos. Em alguns casos, a atividade da espécie é explicada não só pela presença de compostos específicos, mas também pela existência de sinergismo entre os compostos.

Estudos revelaram que extratos obtidos por extração supercrítica mantêm ou excedem a bioatividade dos extratos obtidos por técnicas convencionais. A razão para isso é a especificidade dos processos supercríticos que promovem uma extração seletiva, resultando num extrato rico em compostos desejáveis e livre de solventes orgânicos (PEREIRA e MEIRELES, 2010).

A extração com fluido supercrítico é uma operação unitária, onde são utilizados solventes acima de seus pontos críticos para extraírem componentes solúveis de uma mistura (PAVIANI *et al*, 2010). Esta operação, embora ainda não tenha uma larga aplicação industrial, tem despertado grande interesse de pesquisa devido as suas vantagens na qualidade dos produtos extraídos quando comparados com aqueles extraídos por técnica tradicionais.

Substâncias obtidas de diferentes espécies de *Piper* têm incitado interesse, dos pesquisadores, devido às atividades biológicas. Benevides *et al* (1999) isolaram diferentes neolignananas presentes no extrato em acetato de etila das raízes de *Piper regnellii*, dentre as quais o conocarpano, eupomatenóide-3, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6.

A *Piper regnellii* var. *pallescens* é conhecida popularmente como pariparoba, caapeba e capeba. Na medicina popular, suas raízes são utilizadas no tratamento das obstruções do fígado e do baço, para cicatrização de feridas, redução de inchaços e irritações na pele (KOROISHI *et al*, 2008).

A *Piper regnellii* var. *pallescens* apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos leveduriformes). Recentemente, Luize *et al*. (2005) demonstraram que extratos brutos de folhas de *P. regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* apresentam atividade antileishmania e antitripanossoma.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de extratos supercríticos de *Piper regnellii* obtidos sob variação dos parâmetros pressão e temperatura.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Pré-tratamento da planta

As folhas e os caules de *Piper regnellii* foram coletados de espécimes do “Horto Didático de Plantas Medicinais Prof^a Irenice Silva” no campus da Universidade Estadual de Maringá em Setembro de 2010.

O material botânico foi seco em estufa de ar circulante a temperatura de 40 °C. Após 72 horas de secagem separaram-se as folhas dos caules para a moagem em moinho de facas. Peneiras do tipo Tyler foram utilizadas para a classificação das amostras, segundo sua granulometria. As folhas e caules selecionados tinham tamanho médio de 0,3 mm.

Obtenção dos extratos

Os experimentos supercríticos foram realizados em uma unidade de escala laboratorial, que consiste basicamente de um cilindro de CO₂, dois banhos termostatizados, uma bomba seringa (ISCO, Modelo 500D) e um extrator com volume interno de aproximadamente 170 mL (diâmetro do leito é de 2,85 cm e altura do leito é 26,1 cm).

Os principais parâmetros que influenciam no rendimento de óleos obtidos via extração supercrítica são: pressão, temperatura e vazão de solvente, além do tamanho

médio das partículas. Sendo assim, utilizaram-se 3 combinações destes parâmetros para as extrações, apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de extração utilizados na extração supercrítica.

Corrida	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade (g/cm ³)	Vazão (mL/min)
1	109,2	40	0,68125	3
2	244,1	60	0,78112	3
3	250,0	40	0,88022	3

Realizaram-se, separadamente, extrações com 20 g das folhas e 30 g dos caules em tempo de 280 e 260 minutos, respectivamente.

Microrganismos usados e condições de crescimento

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram testadas as cepas ATCC (American Type Culture Collection, Bethesda, MD, USA) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os antibióticos empregados para o controle de qualidade do teste foram Ciprofloxacino e Vancomicina (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

As cepas ATCC em 3^a geração (3^o repique) foram inoculadas em caldo Tryptcaseína Soja (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) e mantidas a 37 °C por 6 horas. Depois de semeadas em placas de petri contendo esse mesmo caldo as bactérias foram mantidas por 16 a 20 horas em estufa a 37 °C.

A concentração inibitória mínima (CIM) de todos os extratos vegetais e dos antibióticos de referência (Ciprofloxacino para *E. coli* e Vancomicina para *S. aureus*) foi determinada através da técnica de micro diluição em caldo Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) cátions ajustados (CAMHB), conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009). Para a determinação da CIM utilizou-se microplacas de 96 poços (Inlab, São Paulo, SP, Brasil).

A CIM foi definida como a menor concentração dos extratos e antibióticos padrões em que os microorganismos testados não demonstram crescimento visível.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi considerado que se o extrato bruto apresentou CIM ≤ 100 µg/mL a atividade antibacteriana era forte; se a CIM era de 100 à 500 µg/mL a atividade era moderada; para CIM entre 500 e 1000 µg/mL a atividade era fraca e para CIM > 1000 µg/mL o extrato era inativo contra a bactéria testada.

Tabela 2. Resultados dos CIMs dos testes in vitro em bactérias gram-negativa e gram-positiva utilizando os extratos obtidos.

Extratos	CIM (µg/mL)			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Folhas	Caules	Folhas	Caules
ESC (P=109,2 bar/40 °C)	7,81	7,81	>500	>500
ESC (P=244,1 bar/60 °C)	3,90	3,90	>500	>500
ESC (P=250,0 bar/40 °C)	3,90	3,90	>500	>500
Droga padrão	1,17		0,13	

Diferentes resultados foram obtidos para os extratos testados contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, de acordo com a tabela 2. Se compararmos as atividades apresentadas pelos extratos brutos supercríticos e pelos compostos eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6 isolados por PESSINI *et al* (2003), que apresentaram, contra a mesma bactéria, CIMs de 1,56 e 3,12 µg/mL, respectivamente, observamos que os valores são muito próximos. Isso pode ser explicado através da sinergia que ocorre entre os compostos, sugerindo que um composto pode potencializar a ação do outro. Possíveis sinergismos nos fazem entender as tentativas fracassadas de isolar um único composto ativo de plantas medicinais.

Já contra a bactéria gram-negativa testada nenhum extrato se mostrou ativo. Isso se deve a membrana externa desse tipo de bactéria, que representa um obstáculo à penetração de inúmeras moléculas antibióticas. Além disso, o espaço periplásmico contém enzimas que são capazes de destruir moléculas estranhas.

Os baixos valores de CIM apresentados indicam a ESC como o melhor método para obtenção de extratos de *Piper regnellii* com forte poder inibidor, de acordo com a classificação apresentada previamente (forte inibidor MIC ≤ 100 µg/mL). A redução da densidade do fluido supercrítico aumentou o valor da CIM contra o *S. aureus*. Este comportamento indica que maior poder solvente é necessário para a obtenção de compostos com potencial antimicrobiano.

4 CONCLUSÃO

A análise antimicrobiana dos extratos de pariparoba demonstrou que os extratos supercríticos são eficientes contra o crescimento de bactérias gram-positivas, apresentando potencial para serem avaliados futuramente como possíveis fitoterápicos de uso humano e animal. Porém ainda faz-se necessário testes de citotoxicidade para avaliar o grau de toxidez destes extratos, com relação a outras células.

REFERÊNCIAS

BENEVIDES P. J. C.; SARTORELLI P.; KATO M. J. Phenilpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, 52, p. 339-343, 1999.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, M07-A8 - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 8th ed., Wayne, Pennsylvania, 65 pp, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drugs discovery and development. **Journal of Natural Products**, 60, 52, 1997.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, 111, p. 197-201, 2007.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores** – Série de textos da escola de verão em química, São carlos: EDUFSCAR, vol. 6, 152 p, 2003.

KOROISHI A. M.; FOSS S. R.; CORTEZ D. A. G.; NAKAMURA T. U; NAKAMURA C. V.; FILHO B. P. D. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **J. Ethno-Pharmacology**, 117, p. 270-277, 2008.

LUIZE P. S.; TIUMAN T. S.; MORELLO L. G.; MAZA P. K.; UEDA N. T.; DIAS B. P.; CORTEZ D. A. G.; MELLO J. C. P.; NAKAMURA C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Ci Farma**, 41, p. 85-94, 2005.

PAVIANI, L.C.; DARIVA, C.; MARCUCCI, M. C.; CABRAL, F.A. Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of propolis, **Journal of Food Process Engineering** 33, p. 15-27, 2010.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food Bioprocess Technology**. 3, p. 340-372, 2010.

PESSINI G. L.; HOLETZ F. B.; SANCHES N. R.; CORTEZ D. A. G.; DIAS B. P.; NAKAMURA C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev Bras Farmacogn**, 13, 1, p. 21-24, 2003.