

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS DO DILAPIOL

Tatiana Cavalcante MARIALVA<sup>1</sup>; Ana Cristina da Silva PINTO<sup>2</sup>; Ana Lúcia Basílio CARNEIRO<sup>3</sup>; Wanderli Pedro TADEI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPCS/INPA; <sup>3</sup>Co-orientadora PARASITOLOGIA/UFAM; <sup>4</sup>Co-orientador CPCS/INPA

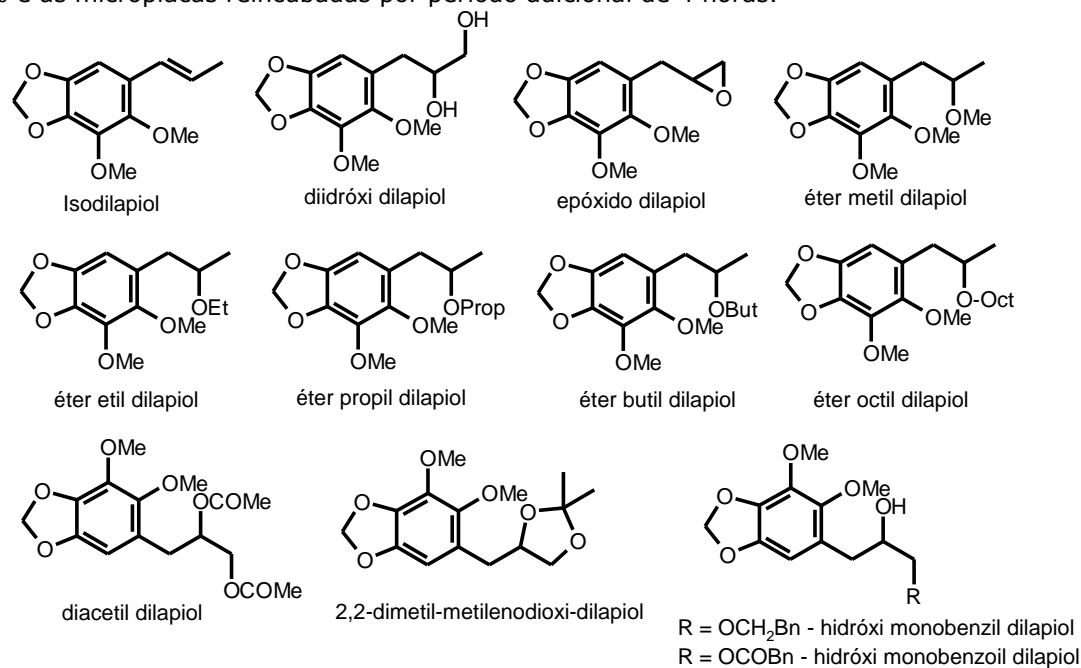
### 1. Introdução

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente, na floresta Amazônica, a maior do Planeta e fonte inestimável de matérias-primas (Souza *et al.* 2004). Muitas das espécies vegetais presentes na região amazônica possuem aplicações agrônomicas e principalmente farmacológicas, o que possibilita a descoberta de novas moléculas bioativas e agentes fitoterápicos. Grande parte dos fármacos desenvolvidos atualmente é extraída de plantas ou de seus derivados ativos. Apesar da sua importância para o desenvolvimento de novos medicamentos, o potencial farmacológico amazônico tem sido pouco explorado. O gênero *Piper* (Piperaceae) é muito utilizado na medicina popular e possui espécies com atividade inseticida e antimicrobiana. *P. aduncum* L., conhecido popularmente como "pimenta-de-macaco" é constituído essencialmente por hidrocarbonetos do tipo monoterpenos (piperitona, 1,8-cineol), sesquiterpenos ( $\alpha$ -cariofileno, bicilogermacreno) e fenilpropanóides (dilapiol, miristicina, apiol) (Pinto 2008). Pesquisas mostraram baixa toxicidade do óleo essencial de *P. aduncum* ( $DL_{50}=2.400 \pm 191,7$  mg/kg) (Sousa *et al.* 2008). Após diversos estudos comprovou-se que o dilapiol, componente majoritário do óleo das folhas de *P. aduncum* é o responsável pelas atividades fungicida, larvicida, inseticida e moluscicida. É grande o número de microrganismos resistentes aos antibióticos e antifúngicos existentes no mercado, o que ocasiona preocupação quanto ao controle de diversas doenças infecciosas. Dentre os patógenos mais comuns em infecções nosocomiais estão *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida spp.* O gênero *Candida* possui aproximadamente 200 espécies descritas, mas apenas 10% são patogênicas e, portanto, de grande interesse médico, são elas: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Develoux e Bretagne 2005; Eggimann *et al.* 2003). Visando obter um formulado com ação antimicrobiana e repelente, o presente trabalho teve por objetivo avaliar substâncias semi-sintéticas derivadas do dilapiol, isolado de *Piper aduncum*, frente a microrganismos de interesse médico.

### 2. Material e Métodos

A partir da substância dilapiol isolada das partes aéreas da *P. aduncum* por destilação por arraste de vapor, foram preparados os derivados semi-sintéticos a partir de reações de epoxidação, oximercuriação, isomerização, carbonilação dentre outras, de acordo com metodologia descrita em Pinto (2008). Doze substâncias semi-sintéticas foram submetidas à avaliação da atividade antimicrobiana sendo elas: isodilapiol, diidróxi dilapiol, epóxido dilapiol, éter metil dilapiol, éter etil dilapiol, éter propil dilapiol, éter butil dilapiol, éter octil dilapiol, diacetil dilapiol, 2,2-dimetil-metilenodioxi dilapiol, hidróxi monobenzoil dilapiol e hidróxi monobenzil dilapiol, Figura 1. Para avaliar a atividade antimicrobiana foram utilizados microrganismos da American Type Culture Collection (ATCC), Coleção do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA) e Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM), Fiocruz. As cepas selecionadas para os testes foram: *E. coli* (CBAM 001), *S. aureus* (CBAM 324), *Streptococcus mutans* (CBAM 241), *Enterococcus faecalis* (CBAM 284), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073), *C. parapsilosis* (DPUA 113), *C. glabrata* (DPUA 1171), *C. tropicalis* (DPUA 114) e *C. albicans* (DPUA 1340; ATCC 10231). Utilizou-se como meio de cultura ágar Sabouraud para *Candida spp.* e ágar Mueller Hinton para bactérias. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelos métodos de difusão em ágar (Carneiro *et al.* 2008) e microdiluição em caldo. O delineamento utilizado no teste de difusão em ágar foi o inteiramente casualizado com 16 tratamentos e três repetições, sendo cada tratamento correspondente a uma das substâncias testadas. De cada cultura, foi preparada uma suspensão para obter turvação equivalente a escala 1 de MacFarland. No teste de difusão utilizou-se 25 mL do meio de cultura em placas de Petri (90 x 15 mm). O inóculo (100  $\mu$ L) foi

semeado com auxílio de *swab*. Após preparação de cinco orifícios no ágar, uma alíquota da substância ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e dos controles negativo (DMSO) e positivos (ampicilina, clorafenicol, amoxicilina e itraconazol) foram dispensados na cavidade. A leitura dos halos de inibição foi realizada após 18, 24 e 48 horas de incubação. Posteriormente foi realizado outro experimento com as substâncias que apresentaram resultados positivos com o objetivo de avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) utilizando os métodos de difusão em meio sólido e microdiluição. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado disposto em esquema fatorial ( $9 \times 2$ ), tendo como fatores as substâncias (isodilapiol, epóxido, éter metil, éter etil, éter propil, éter butil, 2,2-dimetil-metilenodioxo, hidróxi monobenzoil e monobenzil) e o método de difusão (meio sólido) e microdiluição utilizando-se viabilizador celular (Rezarsurina®). Assim, para o teste em meio sólido, formulou-se 35 mL de ágar homogeneizados com 200  $\mu\text{L}$  da suspensão do microrganismo em placa de Petri (140 X 15 mm). Em cada placa foram preparados 30 orifícios de 4 mm de diâmetro. Nesses orifícios inoculou-se, em triplicata, 15  $\mu\text{L}$  de uma série de 10 diluições das substâncias preparadas a partir de uma solução-estoque ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Após incubação, mediram-se os halos de inibição em milímetros. A CIM foi determinada considerando-se a menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo. Para o método de microdiluição foi utilizado placa de 96 poços, soluções-estoque das substâncias ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Após a adição de meio de cultivo (100  $\mu\text{L}$ ), soluções das substâncias (100  $\mu\text{L}$ ) e suspensões microbianas (100  $\mu\text{L}$ ), as placas foram seladas e incubadas a temperatura controlada (25 °C) de acordo com a cepa testada, por um período de 24 e 48 horas. Após incubação foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de Rezarsurina® 0,01% e as microplacas reincubadas por período adicional de 4 horas.



**Figura 1** - Estrutura química dos derivados semi-sintéticos do dilapiol.

### 3. Resultados e discussão

Após a triagem preliminar pelo método de difusão em ágar, observou-se que algumas substâncias apresentam resultados significativos para as cepas de *S. aureus*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Tabela 1). Das doze substâncias semi-sintéticas avaliadas, nove obtiveram halos de inibição frente a *C. parapsilosis*. É importante considerar que o tamanho da zona de inibição depende da origem do microrganismo, da solubilidade e da difusão da substância em meio sólido aquoso e, portanto, pode não expressar a real eficácia da substância frente ao microrganismo.

**Tabela 1** - Média do diâmetro dos halos de inibição em mm das substâncias avaliadas pelo método de difusão em ágar. Concentração de trabalho 5 mg/mL.

Composto	Ec	Sa	Sm	Ef	Ss	Cp	Cg	Ct	Ca
Isodilapiol	-	-	-	-	-	6	8	-	-
Diidróxi	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epóxido	-	-	-	-	-	14	-	-	-
Éter metil	-	-	-	-	-	6	-	-	-
Éter etil	-	8	-	-	-	15	-	-	-
Éter propil	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Éter butil	-	10	-	-	-	10	-	-	-
Éter octil	-	8	-	-	-	n.t	n.t	n.t	n.t
Diacetil	6	-	-	-	-	8	-	-	-
2,2-dimetil metilenodioxí	-	-	-	-	-	8	-	-	-
Hidróxi monobenzoil	-	-	-	-	-	8	-	-	-
Hidróxi monobenzil	-	-	-	-	-	6	-	-	-
Ampicilina	20	50	10	22	30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Amoxicilina	21	60	-	20	25	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Cloranfenicol	20	20	33	20	28	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
Itraconazol	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	19	20	20	20

Ec: *E. coli*; Sa: *S.aureus*; Sm: *S.mutans*; Ef: *E.faecalis*; Ss: *S.salivarius*; Cp: *C.parapsilosis*; Cg: *C.glabrata*; Ct: *C.tropicalis*; Ca: *C.albicans*; - = resultado negativo; n.t. = não testado.

A maioria das substâncias testadas apresentou CIM acima de 100 µg/mL. A menor CIM foi exibida frente a *C. parapsilosis* ( $\leq 4$  µg/mL, Tabela 2). A maior parte dos antibacterianos (Andrews 2001) e antifúngicos (NCCLS 2002) disponíveis no mercado apresenta CIM abaixo de 100 µg/mL. O agente antifúngico Fluconazol, por exemplo, apresenta faixa de CIM entre 2,0 e 8,0 µg/mL frente a *C. parapsilosis* ATCC® 22019 (NCCLS 2002). Entretanto, os dados para Fluconazol e Itraconazol baseiam-se em experiência com infecções de mucosa (NCCLS 2002), enquanto algumas das cepas utilizadas nesse trabalho são isolados regionais de *Tinha cruris* (*C. parapsilosis*) e de castanha do Brasil (*C. glabrata*).

A substância diacetil dilapiol apresentou valor de CIM igual a 625 µg/mL frente a *E. coli*. As substâncias éter etil e éter butil dilapiol obtiveram valores de CIM equivalente a 625 µg/mL frente a cepa de *S.aureus* e 312,5 frente a *C.tropicalis*. A substância 2,2-dimetilmetilenodioxí dilapiol apresentou inibição parcial (*trailing*) contra as cepas de *C.parapsilosis* e *C.glabrata*. O fenômeno *trailing* representa um crescimento reduzido, mas persistente, acima da CIM para alguns derivados azólicos, em geral o crescimento não está presente em 24 h, aparecendo após a primeira leitura. As causas do *trailing* não estão bem definidas, todavia, o tamanho de inóculo, tempo de incubação, concentração de glicose, tampão e pH do meio de cultura e características inerentes ao inóculo podem estar envolvidos (Neufeld *et al.* 2009). Os isolados com esse tipo de comportamento devem ser classificados como "sensíveis" ao invés de "resistentes" (NCCLS 2002).

Outros estudos são necessários para definir o real potencial das novas substâncias. Além disso, é interessante associar essas substâncias a outros antimicrobianos, os quais podem exercer um efeito sinérgico como demonstrado em outros trabalhos (Rosato *et al.* 2008).

**Tabela 2** - Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM, µg/mL) de nove substâncias semi-sintéticas do dilapiol pelo método de microdiluição e em meio sólido.

Compostos	Ec		Sa		Cp		Cg	Ct	Ca
	sólido	micro.	sólido	micro.	sólido	micro.	micro.	micro.	micro.
Isodilapiol	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	156	156	n.t.	312,5
Epóxido	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	156	156	n.t.	625
Éter metil	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	312,5	312,5	n.t.	625
Éter etil	n.t	n.t	>1000	625	≤4	312,5	312,5	312,5	625
Éter propil	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	312,5	312,5	n.t.	625
Éter butil	n.t	n.t	>1000	625	n.t	312,5	312,5	312,5	625
Diacetil	>1000	625	n.t	n.t	n.t	312,5	312,5	n.t.	625
2,2-dimetil metilenodioxi	n.t	n.t	n.t	n.t	n.t	312,5/ 19,5*	312,5/ 19,5*	n.t.	625
Hidróxi Monobenzoil	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	312,5	312,5	n.t.	312,5

Ec: *E. coli*; Sa: *S.aureus*; Cp: *C.parapsilosis*; Cg: *C.glabrata*; Ct: *C.tropicalis*; Ca: *C.albicans* (ATCC 10231). n.t. = não testado; (\*) inibição parcial (*trailing*).

#### 4. Conclusão

Nas condições avaliadas o microrganismo mais sensível foi *C. parapsilosis* isolado de *Tinha cruris*, na qual a substância éter etil dilapiol foi ativa em 4 µg/mL. *C. parapsilosis* é uma espécie patogênica de grande interesse médico. Portanto, os resultados apresentados suportam a necessidade de uma avaliação mais detalhada com outras metodologias, pois não há técnica padronizada para novas substâncias. Assim, observou-se que os derivados do dilapiol têm atividade antimicrobiana e podem, portanto, contribuir na descoberta de novos agentes antimicrobianos.

#### 5. Referências

- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 5-16.
- Carneiro, A.L.B.; Teixeira, M.F.S.; Oliveira, V.M.A.; Fernandes, O.C.C.; Cauper, G.S.B.; Pohlit, A.M. 2008. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(1): 31-38.
- Develoux, M.; Bretagne, S. 2005. Candidiasis and yeast infections. *EMC - Maladies Infectieuses*. 2: 119-139.
- Eggimann, P., Garbino, J.; Pitet, D. 2003. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet infectious Diseases*. 3: 685-702.
- NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA. 177 pp.
- Neufeld P.M.; Santos, L.H.; Ribeiro, M.D.; Silva, F.M.; Rocha, A.C.M.; Silva M.; Lazéra, M.S. 2009. Prevalência e Susceptibilidade in vitro a Itraconazol e Anfotericina B de Isolados Clínicos de *Candida*. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 41(2): 119-125.
- Pinto, A.C.S. 2008. *Desenvolvimento de substâncias semi-sintéticas e bioativas do 4-nerolidilcatecol e dilapiol*. Tese de Doutorado, Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 298 pp.

Rosato, A.; Vitali, C.; Gallo, D.; Balenzano, L.; Mallamaci, R. 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B, *Phytomedicine*, 15: 635-638.

Sousa, P.J.C.; Barros, C.A.L.; Rocha, J.C.S.; Lira, D.S.; Monteiro, G.M.; Maia, J.G.S. 2008. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L.. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(2): 217-221.

Souza, A.Q.L.; Souza, A.D.L.; Astolfi Filho, S.; Pinheiro, M.L.B.; Sarquis, M.I.M.; Pereira J.O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica*. 34(2): 185-195.