



# Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries

Vicente C. O. Costa,<sup>1</sup> Josean F. Tavares,\*<sup>1</sup> Maria F. Agra,<sup>1</sup> Vivyanne S. Falcão-Silva,<sup>2</sup> Roselaine Facanali,<sup>3</sup> Maria Aparecida R. Vieira,<sup>3</sup> Márcia Ortiz M. Marques,<sup>3</sup> José P. Siqueira-Júnior,<sup>2</sup> Marcelo Sobral da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, CP 5009, 58051-970 João Pessoa-PB, Brasil,

<sup>2</sup>Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa-PB, Brasil,

<sup>3</sup>Centro de P & D de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agronômico de Campinas, CP 28, 13001-970 Campinas-SP, Brasil

**RESUMO:** O óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* foi obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e a sua composição química foi analisada através de CG-EM. Com essa técnica, foi possível identificar 22 constituintes em uma mistura complexa de monoterpenos (54,5%) e sesquiterpenos (45,5%). O principal componente encontrado nas folhas foi o biciclogermacreno (22,47%). O óleo essencial foi avaliado numa linhagem de *Staphylococcus aureus* portadora de bomba de efluxo responsável pela resistência norfloxacino. Embora o óleo essencial não tenha apresentado atividade antibacteriana relevante *in vitro*, ele apresentou atividade moduladora da resistência, ou seja, em combinação com o norfloxacino observou-se uma redução de 4x na concentração inibitória mínima do antibiótico, indicando inibição de bomba de efluxo.

**Unitermos:** *Rollinia leptopetala*, óleo essencial, CG-EM, *Staphylococcus aureus*, modulação da resistência a drogas, Inibição de bomba de efluxo.

**ABSTRACT:** “Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from the leaves of *Rollinia leptopetala* R. E. Fries”. The essential oil from the leaves of *Rollinia leptopetala* was obtained by hydrodistillation in Clevenger’s apparatus and its chemical composition was analyzed by GC-MS. With this technique could be identified 22 constituents in a complex mixture of monoterpenes (54.5%) and sesquiterpenes (45.5%). The main component found in the leaves was the bicyclogermacrene (22.47%). The essential oil was assayed against a strain of *Staphylococcus aureus* possessing efflux mechanism of resistance to norfloxacin. Although the essential oil did not display relevant antibacterial activity *in vitro*, it modulated the activity of the norfloxacin, i.e. in combination with the antibiotic it was observed a fourfold reduction in the minimum inhibitory concentration for norfloxacin, indicating inhibition of efflux pump.

**Keyword:** *Rollinia leptopetala*, essential oil, GC-MS, *Staphylococcus aureus*, modulation of drug resistance, efflux pump inhibitor.

## INTRODUÇÃO

A família Annonaceae é constituída por cerca de 120 gêneros e aproximadamente 2300 espécies. No Brasil são registrados 29 gêneros, compreendendo cerca de 260 espécies (Barroso, 1978). Para a Paraíba um levantamento das Annonaceae no Herbário JPB, registrou 7 gêneros e 12 espécies (Pontes et al., 2004). Essa família é caracterizada pela presença de terpenóides (principalmente diterpenos), alcalóides (um grande número de derivados do núcleo isoquinolínico), além de óleos essenciais cuja composição química é

predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (Leboeuf et al., 1982). O gênero *Rollinia* é constituído por 65 espécies, que ocorrem principalmente na América do Sul e com poucas espécies no México, Caribe e América Central (Leboeuf et al., 1982). Existem relativamente poucos relatos de investigações fitoquímicas sobre este gênero comparado com outros, por exemplo, *Annona* (Kuo et al., 2001; Paulo et al., 1992) e *Duguetia* (Fechine et al., 2002; Sousa et al., 2004). Apesar de vários trabalhos relatando o isolamento de acetogeninas no gênero *Rollinia*, existem apenas dois reportando a caracterização de constituintes voláteis (Pino, 2000;

\* E-mail: josean@ltp.ufpb.br, Tel. +55-83-32167177

Jurgens et al., 2000), o que torna esse estudo de alta relevância. *Rollinia leptopetala* R.E. Fries é uma árvore ou arbusto, endêmica do Brasil com nome popular de “pinha brava” e utilizada pela medicina popular como digestivo (Agra et al., 2007). Trabalhos prévios, realizados por nossa equipe, relataram a presença de alcalóides tetrahidroprotoberberínicos nessa espécie (Sette et al., 2000a,b). Nosso grupo vem trabalhando com constituintes voláteis de espécies de Annonaceae, dentre elas, *Xylopi langsdorffiana* (Tavares et al., 2007), *Fusaea longifolia* (Tavares et al., 2005) e *Guatteria* (Lima et al., 2003; Lima et al., 2004;).

Bombas de efluxo são proteínas integrantes da membrana plasmática bacteriana e que tem sido responsabilizadas por diversos casos de resistência a drogas, as quais são expelidas para fora da célula (Pidcock, 2006). Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo revertem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) que

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala*.

Composto	Área %	IR <sup>a</sup>
$\alpha$ -tujeno	3,80	924
$\alpha$ -pineno	1,80	931
sabineno	0,53	968
mirreno	3,51	985
$\delta$ -3-careno	0,57	1007
limoneno	3,74	1023
(Z)- $\beta$ -ocimeno	0,70	1031
(E)- $\beta$ -ocimeno	2,60	1041
isoterpinoleno	0,69	1082
cis-4-tujanol	17,37	1093
$\alpha$ -terpineol	8,42	1181
geraniol	1,79	1246
$\beta$ -elemeno	0,52	1384
trans-cariofileno	6,63	1410
aromadendreno	0,68	1430
$\alpha$ -humuleno	0,78	1444
germacreno D	7,72	1471
biciclogermacreno	22,47	1487
$\delta$ -cadineno	0,83	1513
germacreno B	1,30	1545
espatulenol	0,77	1564
guaial	4,61	1585

<sup>a</sup>(Índice de Retenção = Índice de Kovats); Componentes identificados baseados no IR e CG-EM e listados de acordo com a ordem de eluição na coluna DB-5 (30 m).

alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (Gibbons, 2004). No presente trabalho reportamos a composição química do óleo essencial de *R. leptopetala* (OERL) e avaliamos efeito modulador da resistência a drogas usando uma linhagem de *Staphylococcus aureus* portadora de bomba de efluxo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

O material vegetal (folhas) foi coletado em Serra Branca, região Semi-árida da Paraíba, Brasil, em março de 2005. Uma exsicata está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) na Universidade Federal da Paraíba sob identificação Agra 3567.

### Extração do óleo essencial

As folhas frescas de *R. leptopetala* (1600 g) foram submetidas a hidrodestilação durante 4 h, em aparelho do tipo Clevenger a temperatura de 40 °C, obtendo-se 640 mg de óleo essencial. Para análise, o óleo essencial foi diluído da seguinte forma: 2  $\mu$ L de amostra em 1 mL de acetato de etila.

### Análise do óleo essencial

A análise em CG foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu GC17-A, usando coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25  $\mu$ M de espessura do filme). Foi utilizado Hélio como gás carreador, a um fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi programada de 60° a 240° a 3 °C/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 °C e 230 °C, respectivamente.

A análise por Cromatografia a Gás - Espectrometria de Massas (CG-EM) foi realizada em um sistema Shimadzu QP-5000-Quadrupole MS, operando com energia de ionização de 70 eV. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25  $\mu$ M de espessura do filme); Hélio como gás carreador, fluxo de 1 mL/min com split. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 °C e 230 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 60 °C a 240 °C a 3 °C/min. A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (Adams, R. P. Identification of essential oil components by chromatography / mass spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, 1995). Os índices de retenção das substâncias foram obtidos pela co-injeção do óleo essencial com uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C<sub>9</sub>-C<sub>24</sub>), aplicando-se a equação de Van den Dool & Kratz, 1963.

## Ensaio bacteriológico

A linhagem de *S. aureus* utilizada foi a SA-1199B que superexpressa o gene *norA* codificador da proteína NorA de efluxo do norfloxacino e outras drogas (Kaatz et al., 1993; Kaatz & Seo, 1995). A solução estoque do norfloxacino (Sigma-Aldrich) foi preparada em água após solubilização com NaOH 0,1 M (CLSI/NCCLS document M100-S15). A solução estoque do óleo essencial foi preparada em Tween-80 (Sigma-Aldrich). A concentração inibitória mínima (CIM) do norfloxacino e do OERL foi determinada pelo método da diluição em meio de cultura solidificado (agar infusão de coração, Difco) com concentrações variando de 0,25 a 128 µg/mL e 0,03125 a 2%, respectivamente. A CIM foi definida como a menor concentração que inibia completamente o crescimento bacteriano. Para a avaliação do OERL como modulador da resistência, a CIM do norfloxacino foi determinada na presença do óleo numa concentração subinibitória.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial das folhas foi obtido por hidrodestilação com rendimento de 0,04 % em relação ao peso de material fresco utilizado. Pela análise em CG-EM foi possível identificar 22 componentes, correspondendo a 91,83 % do total do óleo em uma mistura complexa de monoterpenos (54,5 %) e sesquiterpenos (45,5 %). Bicyclogermacreno (22,47 %), *cis*-4-tujanol (17,37 %),  $\alpha$ -terpineol (8,42 %), germacreno D (7,72 %), *trans*-cariofileno (6,63 %) e guaiol (4,61%) foram os constituintes majoritários. Essa composição química é compatível com dados da literatura para constituintes voláteis de espécies de *Rollinia* (Pino, 2000; Jurgens et al., 2000) bem como, de outras espécies de Annonaceae cuja composição dos componentes voláteis é caracteristicamente de monoterpenos e sesquiterpenos (Tavares et al., 2007). A Tabela 1 mostra os componentes do óleo essencial, bem como suas porcentagens e Índice de Kovats.

Na ausência do OERL no meio de cultura, a CIM do norfloxacino observada foi 64 µg/mL. Embora o OERL não tenha apresentado atividade antibacteriana relevante (CIM = 0,5%), quando foi incorporado ao meio de cultura na concentração 0,0625% ( $\frac{1}{8}$  CIM), a CIM do norfloxacino observada foi 16 µg/mL (redução de 4X), indicando inibição da bomba de efluxo.

É provocativa e lícita a idéia de que os componentes principais do OERL, bicyclogermacreno e *cis*-4-tujanol, sejam os responsáveis pela observada atividade moduladora da resistência. Experimentos estão planejados para avaliar tal idéia.

Alguns poucos trabalhos relatam o efeito potencializador de óleos essenciais quando em combinação com drogas antimicrobianas clássicas (Filoche et al., 2005; Shahverdi et al., 2007; Rosato et

al., 2007; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007), mas digno de nota mesmo é o fato de termos encontrado na literatura apenas um artigo avaliando óleo essencial (*Ligustica porteri* L, Apiaceae) como modulador de resistência a drogas por inibição de bomba de efluxo (Cégiéla-Carlioz et al., 2005), sendo bom aqui mencionar que o OERL apresentou melhor atividade moduladora.

Destarte, os resultados aqui apresentados mostram a relevância da avaliação de óleos essenciais de espécies vegetais nativas como inibidores putativos de bomba de efluxo, ou seja, potenciais adjuvantes de antibióticos.

## AGRADECIMENTOS

Dr. Simon Gibbons (Universidade de Londres) pela valiosa e gentil cooperação, as agências de fomento: CNPq, CAPES, FAPESQ-PB, RENORBIO e IMSEAR e a Raimundo Nonato da Silva Filho pelo apoio técnico.

## REFERÊNCIAS

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Barroso GM 1978. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo.
- Cégiéla-Carlioz P, Bessière J, David B, Mariotte A, Gibbons S, Dijoux-Franca M 2005. Modulation of multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour Frag J*. 20: 671-675.
- Fechine IM, Navarro VR, Cunha EVL, Silva MS, Maia JGS, Barbosa-Filho JM 2002. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. *Biochem Syst Ecol* 30: 267-269.
- Filoche SK, Soma K, Sissons CH 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol* 20: 221-225.
- Gibbons S 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat Prod Reps* 21: 263-277.
- Jurgens A, Webber AC, Gottsberger G 2000. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. *Phytochemistry* 55: 551-558.
- Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1086-1094.
- Kaatz GW, Seo SM 1995. Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2650-2655.
- Kuo RY, Chang FR, Chen CY, Teng CM, Yen HF, Wu YC 2001. Antiplatelet activity of *N*-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry* 57: 421-425.
- Lebouef M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukerjee B, Mukherjee R 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21: 2783-2813.
- Lima MA, Fechine IM, Silva MS, Maia JGS, Cunha EVL, Barbosa-Filho JM 2003. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria juruensis*. *Biochem Syst*

- Ecol* 31: 423-425.
- Lima MA, Barbosa-Filho JM, Maia JGS, Silva MS, Cunha EVL 2004. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria poeppigiana*. *Biochem Syst Ecol* 32: 347-349.
- Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima, IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn* 16: 77-82.
- Oliveira RAG, Lima EO, Souza EL, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Silva-Filho RN 2007. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. *Rev Bras Farmacogn* 17: 186-190.
- Paulo MQ, Barbosa-Filho JM, Lima EO, Maia RF, Barbosa RCSBC, Kaplan MAC 1992. Antimicrobial activity of benzyloisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. *J Ethnopharmacol* 36: 39-41.
- Piddock LJV 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacterial. *Clin Microbiol Rev* 19: 382-402.
- Pino JA 2000. Volatile components of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. *J Essent Oil Res* 12: 97-98.
- Pontes AF, Barbosa MRV, Maas PJM 2004. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. *Acta Bot Bras* 18: 281-293.
- Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Milillo MA 2007. Antibacterial effect of some essential oil administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 14: 727-732.
- Sette IMF, Da-Cunha EVL, Barbosa-Filho JM, Agra MF, Da-Silva MS 2000a. The first tetrahydroprotoberberine alkaloid from the genus *Rollinia*. *Biochem Syst Ecol* 28: 393-394.
- Sette IMF, Cunha EVL, Barbosa-Filho JM, Silva MS 2000b. Tetrahydroprotoberberine and aporphine alkaloids from *Rollinia leptopetala*. *Pharm Biol* 38: 318-320.
- Shahverdi AR, Abdolpour F, Monsef-Esfahani HR, Farsan H 2007. A TLC bioautographic assay for the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound. *J Chromatogr B* 850: 528-530.
- Sousa OV, Soares-Júnior DT, Del-Vechio G, Mattosinhos RG, Gattas CR, Kaplan MAC 2004. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. *Rev Bras Farmacogn* 14 (Supl): 11-14.
- Tavares JF, Barbosa-Filho JM, Da-Silva MS, Maia JGS, Da-Cunha EVL 2005. Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). *Rev Bras Farmacogn* 15: 115-118.
- Tavares JF, Silva MVB, Queiroga KF, Martins RM, Silva TMS, Camara CA, Agra MF, Barbosa-Filho JM, Da-Silva MS 2007. Composition and molluscicidal properties of essential oils from leaves of *Xylopia langsdorffiana* A. St. Hil et Tul. (Annonaceae). *J Essent Oil Res* 19: 282-284.