

AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DA PIPERINA CONTRA AS CEPAS DE *CANDIDA*

Maria das Neves da Silva Neta¹
Fernanda Silva Soares²
Francinara da Silva Alves³
Laísa Vilar Cordeiro⁴
Helivaldo Diógenes da Silva Souza⁵

RESUMO

Nos últimos anos, houve um aumento gradual de doenças infecciosas causadas por microrganismos, levando a taxas consideráveis de morbidade e mortalidade, principalmente devido à baixa efetividade dos medicamentos disponíveis e ao aumento e desenvolvimento de cepas resistentes. Na busca por novos medicamentos que possuem menor toxicidade para o tratamento das infecções causadas pelos fungos, a piperina o principal constituinte da *Piper nigrum* se torna um composto altamente pesquisado por apresentar uma gama de atividade biológica como leishmanicida, antitumoral, amebicida e dentre outros. A piperina foi extraída da pimenta do reino através da metodologia do soxhelt usando etanol como solvente nesse processo. O composto foi caracterizado pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho e RMN 1H. O alcaloide natural foi avaliado em atividade antifúngica que apresentou uma inibição de 66,66% contras as cepas de *Candida* com uma CIM variando entre 512-1024 µg/mL.

Palavras-chave: Piperina, *Candida*, CIM.

INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, as infecções fúngicas sistêmicas tornaram-se uma preocupação para os especialistas da saúde devido ao aumento de hospedeiros imunocomprometidos. A mortalidade, a morbidade e as despesas no tratamento contra as infecções causadas pelos fungos aumentaram devido ao surgimento de cepas resistentes para todas as categorias de fármacos antifúngicas (GUERRA et al., 2018). Entre os fungos responsáveis pelas doenças, destacam-se aqueles referentes ao gênero *Candida*, que são patógenos oportunistas regularmente coletados das regiões mucosas de pessoas normais, podendo causar danos superficiais até infecções espalhadas denominadas candidíases

¹ Mestranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, neves_neta@hotmail.com;

² Graduanda pelo Curso de Química Industrial pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, fernandaqi@hotmail.com;

³ Mestranda em Química pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, francinaraufpb@gmail.com;

⁴ Doutoranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB, laisavilar@email.com;

⁵ Pós Doutorando: Doutor, Departamento de Química - UFPB, helivaldog3@email.com.

(ÁLVARES et al, 2007, p. 319-327). A *Candida albicans* é uma das origens mais comuns nas infecções da corrente sanguínea e a principal espécie responsável pela maioria dos casos de candidíase (NOBILE e JOHNSON, 2015, p. 71-92). No entanto, espécies como *C. tropicalis* e *C. krusei*, já foram relatadas como patógenos de incidência emergente (FERNANDES; SILVA; HENRIQUES, 2015, p. 165-169).

O fármaco anfotericina B usado no tratamento das doenças causadas pelos fungos é bastante tóxico e possui efeitos colaterais graves. Na busca por novos medicamentos que possuem menor toxicidade para o tratamento das infecções causadas pelos fungos, os produtos naturais são uma fonte de moléculas biologicamente ativas. E dentro desses produtos naturais, temos a *Piper nigrum* (popularmente conhecida como pimenta do reino) usada principalmente como tempero e usada bastante nas culturas chinesas e indianas para diversos fins que possui metabolitos secundários que vem motivando estudos científicos.

A piperina, um alcaloide de ocorrência natural é um dos principais constituintes químicos da *Piper nigrum* (KARPAKAVALLI, SINI, ARTHI, 2012, p. 1-5). O composto possui vasta gama de atividades biológicas, dentre elas antitumoral, amebicida, Alzheimer e dentre outras (SANTOS et al, 2018, p. 2594; GHOSHAL, PRASAD, LAKSHMI, 1996, p. 167-170; CHONPATHOMPIKUNLERT, WATTANATHORN, MUCHIMAPURA, 2010, p. 798-802). A piperina tem sido usada como molécula precursora de novas moléculas com propriedades biológicas.

Portanto, levando-se em consideração o potencial da piperina na construção para o desenvolvimento de candidatos a fármacos, o alcaloide foi extraído da pimenta do reino para avaliar o seu potencial de atividade antifúngica contra fungos de *Candida*.

METODOLOGIA

Local de Desenvolvimento do Estudo

A piperina foi extraída no Laboratório de Pesquisa em Bioenergia e Síntese Orgânica (LPBS) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Campus I (João Pessoa) – PB, onde o mesmo é provido de toda aparelhagem necessária para o procedimento de extração. A caracterização da piperina foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da Universidade Federal da Paraíba, Campus I – PB e ensaios laboratoriais referentes à atividade antifúngica frente às cepas de *Candida* foram realizados no Laboratório

de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Campus I – PB. O espectro na região de Infravermelho (IV) foi obtido no espectrômetro FTIR modelo IRPrestige-21, do fabricante Shimadzu, com acessório de reflectância total atenuada (do inglês, ATR) acoplado, com as seguintes condições de análise: Região $4000-600\text{ cm}^{-1}$; Resolução: 4 cm^{-1} ; N° acumulações: 20; Modo: transmitância. O espectro de RMN ^1H foi obtido no aparelho da Marca Bruker, operando a 400 MHz utilizando o clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi usado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em unidades de parte por milhão (ppm). As multiplicidades das bandas em RMN ^1H foram indicadas segundo as convenções: s – singlete, d – dubleto, dd – duplo dupleto, ddd – duplo duplo dupleto e m – multiplete. A purificação do composto foi realizada pela técnica de recristalização em etanol e confirmada a partir da determinação da faixa de fusão obtido em placa de aquecimento da marca MQAPF-301 (Microquímica).

Isolamento da Piperina

A metodologia usada para o isolamento da piperina (Figura 1) foi baseada por IKAN (1991, p 240). Numa aparelhagem de Soxhlet foram colocados 10 g de pimenta-do-reino e 150 mL de etanol a 95%. O sistema foi mantido em refluxo por aproximadamente 2 horas. Após concentrar o extrato em evaporador rotatório, foi então adicionado ao mesmo 10 mL de uma solução alcoólica de KOH 10% e depois filtrou o material precipitado. Foi adicionada à solução alcoólica uma pequena quantidade de água, suficiente para que o meio se tornasse turvo. Após um período de 72 horas em repouso, formou-se um precipitado amarelo que foi filtrado sob pressão reduzida. O sólido obtido foi lavado com uma pequena quantidade de água gelada, seguido de éter etílico gelado, seco e recristalizado com etanol. Rendimento de 3,2%. Ponto de fusão de $126-128\text{ }^\circ\text{C}$ (Lit: $125-127\text{ }^\circ\text{C}$). IV (ATR, cm^{-1}): 2939 (C – HAr); 1631 (C = O); 1581-1442 (C = CAr.); 1249 (C – O – C); 930 (C – HAr). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.40 (ddd, $J = 14.7, 8.9, 1.2\text{ Hz}$, 1H, H-3), 6.95 (d, $J = 1.6\text{ Hz}$, 1H, H-7), 6.86 (dd, $J = 8.1, 1.7\text{ Hz}$, 1H, H-11), 6.74 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 1H, H-10), 6.71 (m, 2H, H-4 e H-5), 6.41 (d, $J = 14.6\text{ Hz}$, 1H, H-2), 5.94 (s, 2H, H-12), 3.59 – 3.53 (m, 4H, H-13 e H-17), 1.68 – 1.60 (m, 2H, H-15), 1.59 – 1.52 (m, 4H, H-14 e H-16).

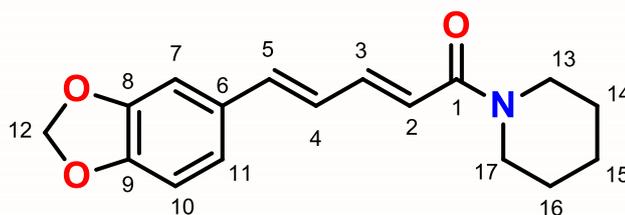


Figura 1: Estrutura química da Piperina

Avaliação Antifúngica

Foi avaliada a atividade antifúngica da piperina. A substância foi pesada e devidamente solubilizada em dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5% e tween 80 a 2%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL (PEREIRA, 2015, p. 229).

Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para manutenção das cepas fúngicas foi Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltd, USA, France). Para os ensaios de atividade antimicrobiana, foi usado meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (INLAB, São Paulo, Brasil). Ambos os meios foram preparados conforme as recomendações dos respectivos fabricantes.

Microrganismos

Foram utilizados os isolados clínicos *Candida albicans* ATCC-76645, *Candida albicans* LM-111, *Candida albicans* LM-122, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida tropicalis* LM-04 e *Candida tropicalis* LM-06. Os microrganismos pertencem à MICOTECA do Laboratório de Pesquisa de Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em ASD à temperatura de 4°C. Para utilização nos ensaios, as leveduras foram repicadas em ASD com incubação a 35±2°C durante 24-48h.

Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas recentes dos microrganismos em meio ASD foram suspensas em solução fisiológica estéril a 0,9% e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2015).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos recomendados (CLSI, 2015). A determinação da CIM das substâncias sobre cepas fúngicas foi realizada através da técnica de microdiluição em meio líquido em placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100µL de caldo RPMI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da substância foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 16µg/mL. Por fim, foram adicionados 10µL das suspensões das cepas fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles para comprovação de viabilidade das cepas (RPMI + leveduras) e esterilidade do meio de cultura (RPMI). Também foi feito o controle negativo com anfotericina B (32 µg/mL) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção da piperina foi a partir dos frutos secos da pimenta do reino (*Piper nigrum*), usando a metodologia desenvolvida por Ikan (1991, p. 240) usando um aparelho de soxhlet e o solvente usado nesse procedimento é o etanol a 95%. Depois da extração no aparelho de soxhlet e seguindo o tratamento descrito na literatura, a piperina foi obtida em forma de cristais. O composto foi caracterizado usando técnicas de espectroscópicas de infravermelho e RMN de ^1H . No espectro de infravermelho (Figura 2) observa-se a absorção de estiramento da carbonila de amida conjugada em 1631 cm^{-1} . Estiramentos assimétrico e

simétrico de C-O-C referente ao grupo metilenodioxi em 1250 cm^{-1} e 1031 cm^{-1} , respectivamente. As bandas de absorções de estiramentos de C-H sp^2 do anel aromático variaram de $3076\text{--}300\text{ cm}^{-1}$. Absorções de estiramentos de estiramentos de C=C de anéis aromáticos variaram entre de $1613\text{--}1491\text{ cm}^{-1}$. As bandas de absorções de estiramentos de C-H sp^3 do anel piperidina variaram de $2996\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$.

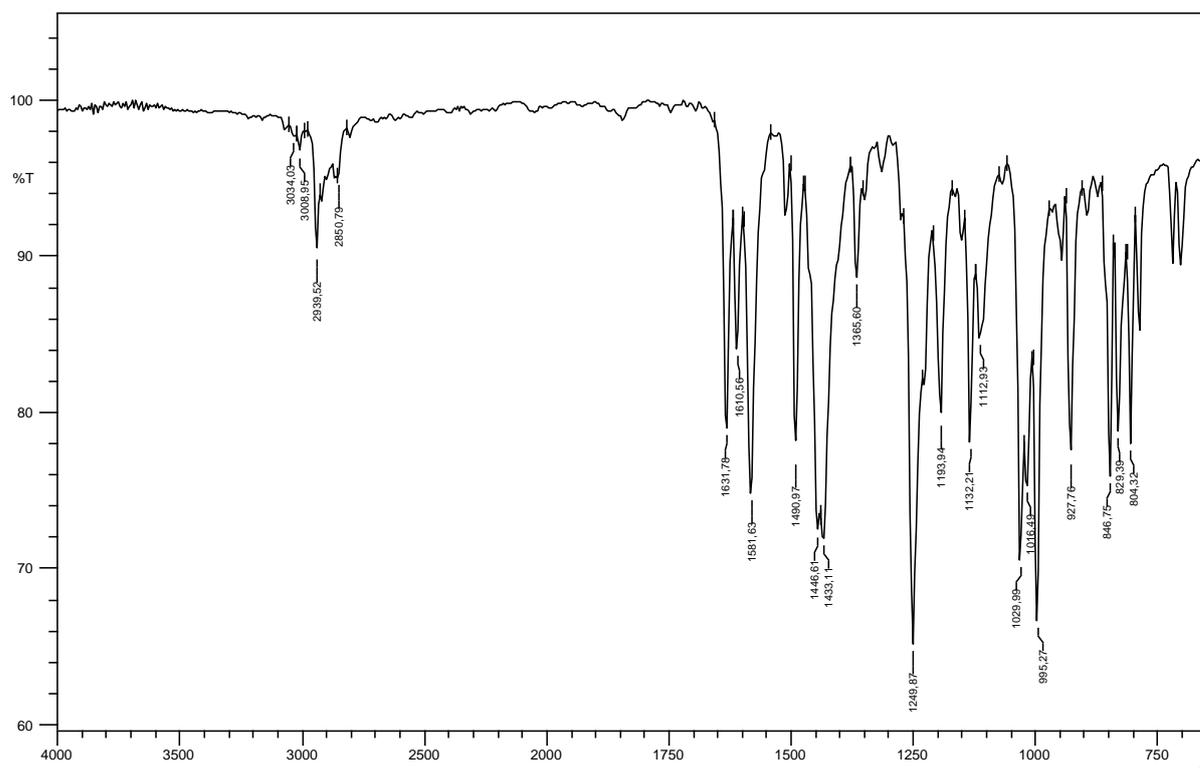


Figura 2: Espectro de Infravermelho da Piperina

No espectro de RMN ^1H do composto (Figura 3) podemos observar um singleto para dois hidrogênios em δ 5.94 ppm característico do grupo metilenodioxi. Na região de alifáticos observamos três grupos de sinais característicos do anel piperidina: um na faixa de δ 3.59 – 3.53 ppm para quatro hidrogênios referentes a H-13 e H-17; um na faixa de δ 1.68 – 1.60 ppm para dois hidrogênios para o H-15 e outro na faixa de δ 1.59 – 1.52 para quatro hidrogênios referentes a H-14 e H-16. Os sinais da faixa de δ 7.40–6.41 ppm são referentes ao hidrogênios do anel aromático e dos hidrogênios do sistema insaturados.

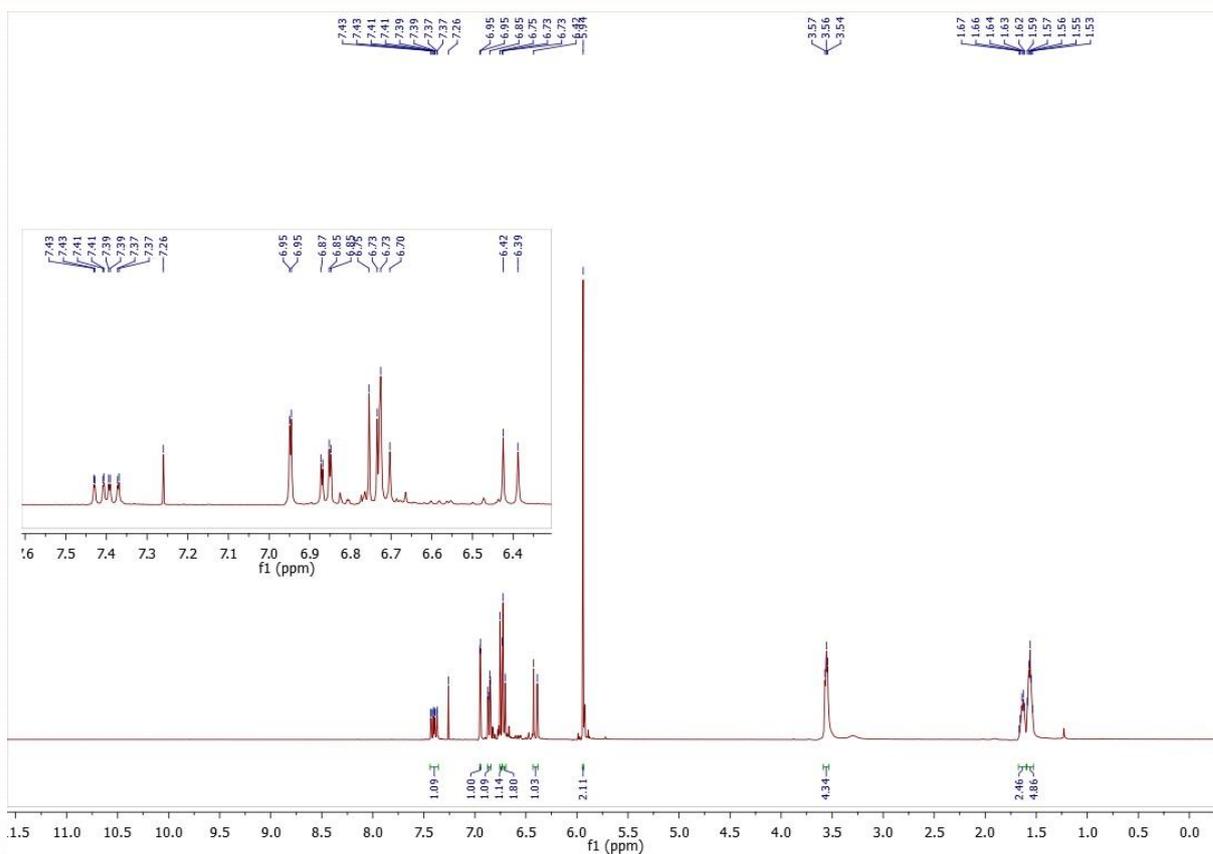


Figura 3: Espectro de RMN ^1H da piperina

A piperina depois de ser caracterizado e comparado com a literatura foi submetido à avaliação antifúngica frente às cepas de *Candida*. A avaliação dos resultados obtidos foi feita conforme análise realizada por Peixoto et al. (2016, p. 1812) que classificou o potencial antifúngico com base nos resultados da CIM, considerando como forte poder antifúngico os produtos com CIM até 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, moderado poder antifúngico aqueles com CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e de fraco poder antifúngico os produtos com CIM acima de 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 1).

O composto demonstrou atividade de inibição em quatro das seis cepas de *Candida*. A piperina inibiu as cepas de *C. albicans* ATCC-76645, *C. albicans* LM-111, e *C. tropicalis* ATCC 13803 numa concentração mínima de mínima (CIM) de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Já a *C. albicans* LM-122 foi inibida com uma CIM de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De acordo com Peixoto et al. (2016, p. 1812), o alcaloide natural possui um moderado poder antifúngico.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) da Piperina.

Cepas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		Controles	
	Piperina	Anfotericina B	Viabilidade	Caldo
<i>C. albicans</i> ATCC-76645	1024	-	+	-
<i>C. albicans</i> LM-111	1024	-	+	-
<i>C. albicans</i> LM-122	512	-	+	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1024	-	+	-
<i>C. tropicalis</i> LM-04	+			
<i>C. tropicalis</i> LM-06	+			

(-) Inibição do crescimento fúngico (+) Crescimento fúngico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piperina foi extraída e obtendo um rendimento de 3,2% a partir da pimenta do reino. O composto foi caracterizado com as técnicas de espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C e o resultado corrobora com o da literatura (IKAN, 1991, p. 240). O ensaio antifúngico relevou que o alcaloide apresentou uma inibição de 66,66% contra as cepas de *Candida* numa concentração inibitória mínima de 512-1024 $\mu\text{g/mL}$.

REFERÊNCIAS

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 319-327, 2007.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 3, p. 798-802, 2010.

FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; *Candida tropicalis* biofilm's matrix— involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, p.165–699, 2015.

GHOSHAL, S.; PRASAD, B. N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of Piper longum fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 3, p. 167-170, 1996.

GUERRA, F. Q. S.; ARAÚJO, R. S. A.; SOUZA, J. P.; SILVA, V. A.; PEREIRA, F. O.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PEREIRA, J. A.; LIMA, E. O.: A new coumarin derivative, 4-acetatecoumarin, with antifungal activity and association study against *Aspergillus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 49, 407–413, 2018.

IKAN, R. **Natural Products: A Laboratory Guide**. 2nd Ed. San Diego: Academic Press, p. 360, 1991.

KARPAKAVALLI, M.; SINI, K. R.; ARTHI, I.; Microwave assisted extraction and estimation of piperine, andrographolide using HPLC techniques. **Pharmacie Globale**, v. 5, p. 1-5, 2012.

Nobile C. J.; Johnson, A. D.; *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.

PEIXOTO, I. N.; SOUZA, H. D. S.; LIRA, B. F.; SILVA, D. F.; LIMA, E. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthesis and Antifungal Activity Against *Candida* Strains of Mesoionic System Derived From 1, 3-Thyazolium-5-thiolate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1807-1813, 2016.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical biology**, v. 53, n. 2, p. 228-234, 2015.

SANTOS, J.; BRITO, M.; FERREIRA, R.; MOURA, A. P.; SOUSA, T.; BATISTA, T.; MANGUEIRA, V.; LEITE, F.; CRUZ, R.; VIERIA, G.; LIRA, B.; ATHAYDE-FILHO, P.; SOUZA, H.; COSTA, N.; VERAS, R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAGALHÃES, H.

(83) 3322.3222

contato@conapesc.com.br

www.conapesc.com.br

SOBRAL, M. Th1-Biased Immunomodulation and In Vivo Antitumor Effect of a Novel Piperine Analogue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, p. 2594, 2018.