UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE - PGDRA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DA *Piper obliquum* Ruiz & Pavon

HÉLIDA SOLEANE MENDONÇA FERREIRA NOBRE

Porto Velho
2017

HÉLIDA SOLEANE MENDONÇA FERREIRA NOBRE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DA *Piper obliquum* Ruiz & Pavon

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, da Universidade Federal de Rondônia – UNIR.

Área: Química de Produtos Naturais

Orientadora: Profª Drª Mariangela Soares de Azevedo

Coorientadora: Profª Drª Najla Benevides Matos

Porto Velho
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

N754a Nobre, Hélida Soleane Mendonça Ferreira.

Atividade antimicrobiana de extratos e óleo essencial da Piper obliquum Ruiz & Pavon / Hélida Soleane Mendonça Ferreira Nobre. -- Porto Velho, RO, 2017.

70 f. : il.

Orientador(a): Prof. PhD Mariangela Soares de Azevedo

Coorientador(a): Prof.ª Dra. Najla Benevides Matos.

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Piper obliquum. 2.Atividade antimicrobiana. 3. ESEC-Cuniã. I. Azevedo, Mariangela Soares de. II. Título.

CDU 504:579.2

Bibliotecário(a) Ozelina do Carmo de Carvalho CRB 11/486

HÉLIDA SOLEANE MENDONÇA FERREIRA NOBRE

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E ÓLEO ESSENCIAL DA *Piper obliquum* Ruiz & Pavon

Comissão Examinadora

Dra. Mariangela Soares de Azevedo
Orientadora
Fundação Universidade Federal de Rondônia

Dra. Najla Benevides Matos
Coorientadora
Fundação Oswaldo Cruz/Rondônia

Dr. Wanderley Rodrigues Bastos
Membro Titular
Fundação Universidade Federal de Rondônia

Dra. Frances Tatiane Tavares Trindade
Membro Titular
Fundação Universidade Federal de Rondônia

Porto Velho, 17 de novembro de 2017.

Dedicatória

Ao meu amado e querido esposo e ao meu amado e querido filho, por estarem sempre ao meu lado me incentivando e apoiando em todas as lutas e demais momentos. A eles dedico esta conquista com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por toda oportunidade que tem me concedido e por toda misericórdia que tem sido dispensada a mim.

Ao meu esposo por toda confiança, amor, carinho, paciência, incentivo e palavras de incentivo que tem me direcionado em todos os momentos.

Ao meu filho que, apesar de ainda ser criança e não ter entendimento total dos acontecimentos a sua volta, tem sido a fonte de toda a minha vontade de vencer.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por terem acreditado desde o início de meus estudos que tudo daria certo, mesmo com tudo indicando o contrário. Vocês me ensinaram o valor da persistência!

À minha orientadora, Profª Drª Mariangela Soares de Azevedo, por tanta confiança, dedicação e conhecimentos transmitidos. Sempre ensinando com carinho, mesmo nos momentos mais difíceis da pesquisa. Sua inteligência e otimismo são contagiantes!

Às minhas colegas de laboratório, Gisele, Márcia, Mayara e Márcia Bay. Agradeço a vocês pelo companheirismo e pela ajuda durante os trabalhos no LABFITO.

À Profª Drª Najla Benevides Matos e à sua equipe do Laboratório de Microbiologia do CEPEM, por disponibilizar equipamentos, materiais e protocolos laboratoriais, em especial ao Técnico Rosimar Pires Esquerdo, pela disposição em repassar as técnicas dos testes microbiológicos.

À doutoranda Natália Faria Romão pela confecção dos gráficos e análises estatísticas dos resultados microbiológicos.

Ao Prof. Dr. Ângelo Gilberto Manzatto, à Ms Adeilza Felipe Sampaio e à Ms Jussara Rojas e Silva Aizzo, pelas coletas da *Piper obliquum* na ESEC Cuniã.

À minha amiga e colega de trabalho do IFRO, Jamile Mariano Macedo, pela revisão do Projeto de Pesquisa submetido à seleção do Mestrado em Desenvolvimento Regional.

Agradeço a todos com muito carinho!

Porque, onde estiver o teu tesouro, aí também estará o teu coração.

(Mt 6.21)

RESUMO

A *Piper obliquum* (Piperaceae) é conhecida como Anis do Oriente devido ao seu aroma marcante. A espécie tem seu uso disseminado na medicina tradicional na Guiana e Equador, aplicada como analgésico e antiartrítico. No Brasil, a espécie pode ser encontrada na ESEC-Cuniã, Porto Velho, Rondônia. Estudos relacionados a esta espécie são ainda incipientes e com a presente pesquisa pretendeu-se comprovar a atividade antimicrobiana da planta com o teste de difusão em ágar para o óleo essencial, extrato etanólico, frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e acetona, frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Candida sp*. O óleo essencial foi testado nas concentrações de 50, 25 e 10 $mg \cdot mL^{-1}$, demonstrando atividade antimicrobiana nas duas primeiras concentrações frente à *S. aureus* com halos de 17 e 9 mm e frente à MRSA com a formação de halo de 11 mm na concentração de 50 $mg \cdot mL^{-1}$. Para o extrato etanólico, fração hexano e fração acetato de etila, houve a formação de halos de inibição de 12 mm, 7 mm e 11 mm, respectivamente, frente à *S. aureus*. Para a MRSA houve a formação de halos de 10 mm na presença do extrato etanólico e 12 mm para a fração acetato de etila. Com os dados obtidos seguiu-se para o teste de microdiluição em meio líquido para a observação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e cálculo do IC_{50} para o extrato etanólico e frações, resultando em CIM que variaram de 0,125 e 2,0 $mg \cdot mL^{-1}$ frente à *S. aureus* e CIM de 0,062 e 0,5 $mg \cdot mL^{1}$ frente à MRSA. Os valores de IC_{50} demonstraram ação relevante da fração acetato de etila, corroborando com os resultados de viabilidade celular para a mesma fração. Os resultados obtidos sugerem atividade antimicrobiana da *P. obliquum*, indicando um caminho promissor em estudos futuros na área fitoquímica para a elucidação e o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras-chave: *Piper obliquum;* atividade antimicrobiana; ESEC-Cuniã.

ABSTRACT

Piper obliquum (Piperaceae) is known as Anise of the East due to of its striking scent. The species has its widespread use in traditional medicine in Guyana and Ecuador, applied as analgesic and antiarthritic. In Brazil, the species can be found in ESEC-Cuniã, in Porto Velho, Rondônia. The studies related to this species are still incipient and the present research was aimed at proving the antimicrobial activity of the plant with the agar diffusion test for essential oil, ethanolic extract, hexane, chloroform, ethyl acetate and acetone fractions against the *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* methicillin resistant (SAMR), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida* sp. microorganism. The essential oil was tested in the 50, 25 and 10 $mg.mL^{-1}$ concentrations, demonstrating antimicrobial activity in the first two concentrations against *S. aureus* with 17 and 9 mm halos and against MRSA was observed the halo formation of 11 mm in the 50 $mg.mL^{-1}$ concentration. For the ethanolic extract, hexane and ethyl acetate fractions, were formed the inhibition halos of 12 mm, 7 mm and 11 mm, respectively, against *S. aureus*. For MRSA, 10 mm halos were formed in the presence of the ethanolic extract and 12 mm for the ethyl acetate fraction. Based on the result, the microdilution test was carried out in a liquid medium for the observation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and IC_{50} calculation for the ethanolic extract and fractions, resulting in MICs ranging from 0.125 to 2.0 $mg.mL^{-1}$ against *S. aureus* and MIC of 0.062 and $mg{\cdot}mL^{-1}$ against MRSA. The IC 50 values showed significant action of the ethyl acetate fraction, corroborating with the results of cell viability for the same fraction. The results obtained suggest the antimicrobial activity of *P. obliquum*, indicating a promising path in future studies in the phytochemical area for the elucidation and development of new drugs.

Keywords: *Piper obliquum;* antimicrobial activity; ESEC-Cuniã.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pág

Figura 1: Folhas de *Piper obliquum* coletadas na ESEC-Cuniã..... 18
Figura 2: Substâncias isoladas da *P. obliquum*..... 19
Figura 3: *Klebsiella pneumoniae* vista ao microscópio eletrônico e cultivo em placa de Petri 21
Figura 4: *Escherichia coli* vista ao microscópio eletrônico e cultivo em placa de Petri 22
Figura 5: *Pseudomonas aeruginosa* vista ao microscópio eletrônico e cultivo em placa de Petri 24
Figura 6: *Staphylococcus aureus* visto ao microscópio e manifestação de infecção gerada pelo microrganismo 25
Figura 7: Mapa da Estação Ecológica do Cuniã, localizada no município de Porto Velho – RO 29
Figura 8: Coluna filtrante de sílica-gel do extrato etanólico da *P. obliquum* 30
Figura 9: Esquema do desenvolvimento da pesquisa 31
Figura 10: Representação da placa de microdiluição em meio líquido para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 36
Figura 11: Teste de difusão em ágar para o óleo essencial da *P. obliquum* nas concentrações de 10, 25 e 50 $mg \cdot mL^{-1}$ 38
Figura 12: Médias dos diâmetros dos halos de inibição do teste de difusão em ágar com o óleo essencial da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica 40
Figura 13: Componentes majoritários do óleo essencial de *P. obliquum*..... 42
Figura 14: Teste de difusão em disco para a *P. obliquum* frente a espécies bacterianas e fúngica 44
Figura 15: Médias dos diâmetros dos halos de inibição do teste de difusão em ágar com o extrato etanólico e frações da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica 47
Figura 16: Teste de microdiluição em meio líquido para EEPO, FHex e FEtOAc da *P. obliquum* frente à bactéria *S. aureus* em 48 horas 49

Figura 17: Teste de microdiluição em meio líquido para EEPO e FEtOAc da *P. obliquum* frente à bactéria MRSA em 48 horas..... 50
Figura 18: Redução da resazurina a resofurina em células vivas 51
Figura 19: Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do EEPO, FHex, FEtOAc e controle positivo frente à *S. aureus* 54
Figura 20: Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do EEPO, FEtOAc e controle positivo frente à MRSA 55

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 1: Espécies microbianas utilizadas no teste de difusão em ágar 32

Tabela 2: Média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para o óleo essencial da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica 39

Tabela 3: Média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para o extrato etanólico e frações da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica..... 46

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o teste de microdiluição em meio líquido em diferentes concentrações para o EEPO, FHex e FEtOAc da *P. obliquum* frente a *S. aureus* e MRSA 50

Tabela 5: Valores de IC50 do EEPO, FHex, FEtOAc e controle positivo da *P. obliquum* frente à S. aureus e MRSA..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ágar MH – Ágar Mueller-Hinton

ATCC – *American TypeCulture Collection*

C- - Controle negativo

C+ - Controle positivo

Caldo LB – Caldo Luria Bertani

CEPEM – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards* Institute

DAEC - *Escherichia coli* aderência difusa

DEC – *Escherichia coli* diarreiogênica

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

IC_{50}–*Inhibitory Concentration 50%*

EEPO – Extrato etanólico da *Piper obliquum*

EHEC/STEC - *Escherichia coli* produtoras de toxinas Shiga ou produtoras de toxinas Vero

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ESEC-Cuniã – Estação Ecológica do Cuniã

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

FAcet – Fração acetona

$FCHCl_3$ – Fração clorofórmio

FEtOAc- Fração acetato de etila

FHex – Fração hexano

ITU – Infecção do Trato Urinário

LABFITO – Laboratório de Fitoquímica

MNE/SEPEC - *Escherichia coli* associada à meningite/sepse

MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

OE – Óleo Essencial

LISTA DE APÊNDICES

Pág

Apêndice 1: - Gráficos dose-resposta da ação do EEPO (extrato etanólico), FHex (fração hexano), FEtOAc (fração acetato de etila) e Controle positivo (Cloranfenicol), frente à *S. aureus* após 48 horas de incubação 69

Apêndice 2: Gráficos dose-resposta da ação do EEPO (extrato etanólico) e FEtOAc (fração acetato de etila) e Controle positivo (Cloranfenicol), frente à *S. aureus* após 48 horas de incubação 70

SUMÁRIO

Pág

INTRODUÇÃO 15
1 REFERENCIAL TEÓRICO 17
1.1 O gênero *Piper* e a espécie *Piper obliquum*..... 17
1.2 Microrganismos e suas características 20
1.2.1 *Candida sp*. 20
1.2.2 *Klebsiella pneumoniae* 20
1.2.3 *Escherichia coli* 22
1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*..... 23
1.2.5 *Staphylococcus aureus* 25
2 OBJETIVOS 27
2.1 Geral 27
2.2 Específicos 27
3 MATERIAIS E MÉTODOS 28
3.1 Área de coleta (Adaptado de Aizzo, 2013) 28
3.2 Obtenção do óleo essencial, extrato etanólico e frações..... 29
3.3 Testes antimicrobianos 32
3.3.1 Testes de difusão em ágar para o extrato etanólico, frações e óleo essencial 32
3.3.1.1 Preparação dos antibiogramas..... 33
3.3.1.2 Preparação do extrato etanólico, frações, óleo essencial, controles e inóculos 33
3.3.1.3 Aplicação do inóculo e das amostras no antibiograma 34
3.3.2 Teste de microdiluição em meio líquido 34
3.3.2.1 Preparo do extrato etanólico, frações, controles, corante indicador e inóculos 34
3.3.2.2 Preparação das placas de microdiluição 35
3.3.3 Leitura espectrofotométrica 36
3.3.4 Cálculo da viabilidade celular 37
4 RESULTADOSE DISCUSSÃO..... 38
4.1 Testes antimicrobianos 38
4.1.1 Determinação da atividade antimicrobiana através do teste de difusão

em ágar para o óleo essencial da *P. obliquum* 38
4.1.2 Determinação da atividade antimicrobiana através do teste de difusão em ágar para o extrato etanólico e frações da *P. obliquum* 44
4.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e viabilidade celular e IC_{50} para o extrato etanólico e frações da *P. obliquum*..... 49
CONSIDERAÇÕES FINAIS 57
REFERÊNCIAS 58
APÊNDICES..... 69

INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida humana desde seus primórdios. O homem primitivo dependia fundamentalmente da natureza para manter-se vivo, utilizando as plantas para tratar doenças, além de usá-las como alimento, vestuário, habitação, defesa contra predadores e apresentações culturais (ALMEIDA, 2011; SCHENKEL et al, 2010).

A descoberta do potencial curativo das plantas pelos povos primitivos, bem como pelos indígenas, foi fundamental para o desenvolvimento de pesquisas em produtos naturais, pois o aprendizado desses diferentes grupos étnicos contribuiu para o entendimento da relação entre o potencial curativo das plantas e as estruturas químicas responsáveis por estas ações (VIEGAS JÚNIOR et al, 2006).

Certamente, sem o auxílio desses conhecimentos passados por gerações, as pesquisas a respeito das atividades biológicas dos vegetais não teriam atingido o patamar de desenvolvimento que se observamos dias atuais (VIEGAS JÚNIOR et al, 2006).

Com o intuito de potencializar a eficácia desses vegetais como medicamentos, inúmeras equipes de pesquisa vêm estudando suas propriedades ao longo dos anos, com a finalidade de gerar produtos fitoterápicos ou fitofármacos.

São vários os estudos que deram origem a medicamentos a partir de fontes naturais, como os medicamentos contra câncer, bactérias, fungos, parasitas, vírus (CRAGG e NEWMAN, 2007), antitussígenos, analgésicos, antipiréticos, antiinflamatórios, antirreumáticos, espasmolíticos, broncodilatadores; ou foram responsáveis por grandes avanços na produção de fármacos sintéticos como os anti-histamínicos, antipsicóticos, antidepressivos e ansiolíticos (VIEGAS JÚNIOR et al, 2006).

Ainda assim, com o progressivo avanço das pesquisas nessa área, acredita-se que apenas 15% das espécies de plantas superiores tenham sido estudadas sob a ótica sistêmica, química e farmacológica (SIMÕES et al, 2010)

Contudo, as investigações do potencial medicinal das plantas ainda são insuficientes, mediante o grande número de vegetais que possuem substâncias responsáveis por propriedades bioativas.

Em estudos bibliográficos preliminares a respeito do gênero *Piper*, observou-se o potencial de bioatividade de suas espécies nas mais variadas áreas de

pesquisa. Especificamente sobre a espécie *Piper obliquum*, que possui trabalho publicado voltado para a realização de estudos sobre sua atividade antimicrobiana, corroborando com o presente trabalho, onde se avaliou a atividade antimicrobiana frente a espécies de microrganismos (bactéria e fungo) para extrato, frações e óleo essencial.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 O gênero *Piper* e a espécie *Piper obliquum*

O gênero Piper pertence à família botânica Piperaceae que é considerada um “fóssil vegetal” por ser uma das mais primitivas entre as Angiospermas (TAYLOR e HICKEL, 1992). É constituída por cerca de 14 gêneros, distribuída em regiões tropicais e subtropicais, composta por 1400 espécies (BARROSO, 1978). No Brasil podem ser encontrados cinco gêneros nativos: *Ottonia, Peperomia*, *Pothomorphe, Sarcorhachis e Piper* (SOUZA e LORENZI, 2005).

Com referência a sua classificação botânica, segundo Cronquist (1981), tem-se:

- Reino – Plantae;
- Divisão – Magnoliophyta;
- Classe – Magnoliopsida;
- Ordem – Piperales;
- Família – Piperacea

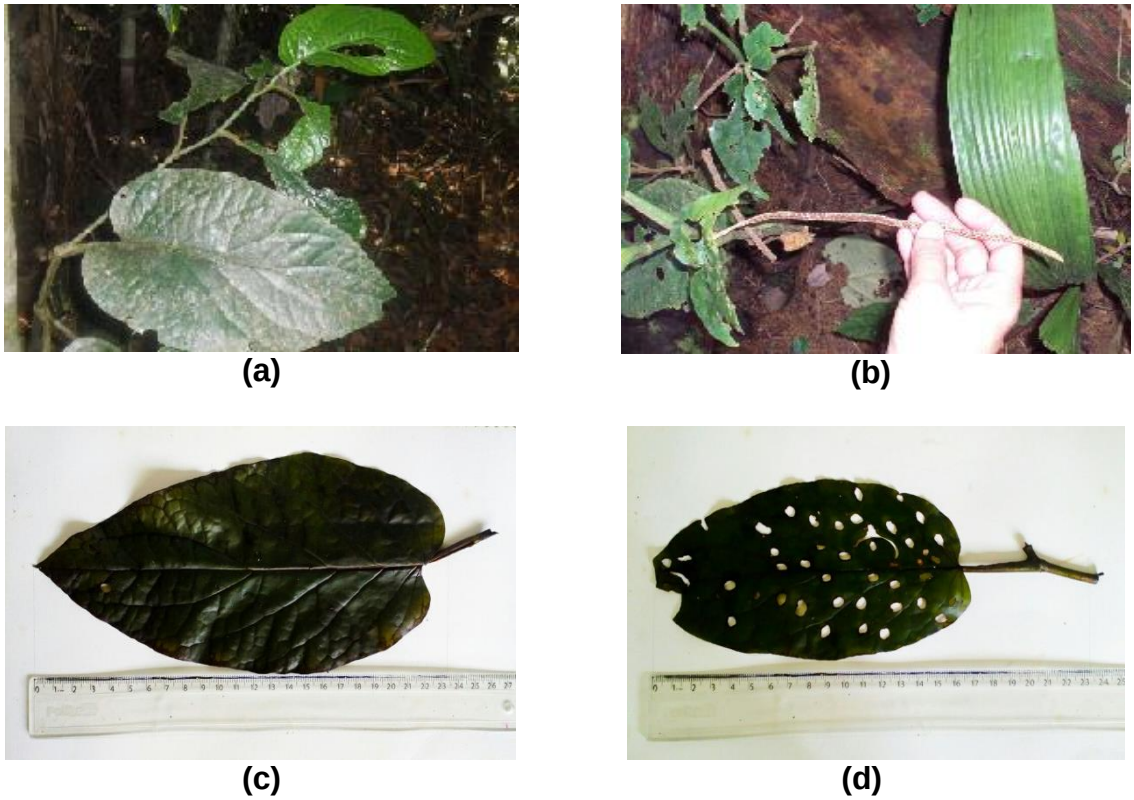
No Brasil são encontradas cerca de 350 espécies do gênero *Piper*, podendo se apresentar sob a forma de ervas, lianas, arbustos ou árvores, folhas assimétricas e espigas opostas às folhas (JARAMILLO e MANOS, 2001; SOUZA e LORENZI, 2005). São muito utilizadas na medicina tradicional para tratar de dores, reumatismo, artrite, micoses, infecções urinárias, insônia, afecções da pele e cabelos, entre outras (BASTOS et al, 1999; BLUMENTHAL e SING, 1997; SILVA et al, 2002).

Diante de seu uso e atividades biológicas comprovadas, o estudo do gênero tem sido promissor desde 1819, quando seu primeiro composto foi isolado da *P. nigrum*, a piperina, um alcalóide de ação pungente (PARMAR et al, 1997).

O interesse pelo potencial fitoterápico do gênero evoluiu demasiadamente e pode ser explicado pela presença de metabólitos secundários de interesse farmacológico, que são presença marcante no gênero (MARQUES, 2009). Alguns deles com atividade anti-inflamatória, anti-tumorais (GUPTA et al, 2010), antifúngica (BEZERRA et al, 2008), ansiolítica (SOMMERWERK et al, 2014) e antidepressiva (WHITEHEAD, et al 2013).

A espécie *P. obliquum*, por sua vez, é caracterizada por arbustos nodosos simples ou ramificados, com altura de até cinco metros, caule glabro e suas folhas têm formato elíptico-ovaladas (Figura 1), presente de sete a nove nervuras de cada lado. Suas espigas chegam a 50 cm de comprimento, com flores organizadas anularmente em subespiral (YUNCKER, 1972).

Figura 1 – Folhas de *Piper obliquum* coletadas na ESEC-Cuniã



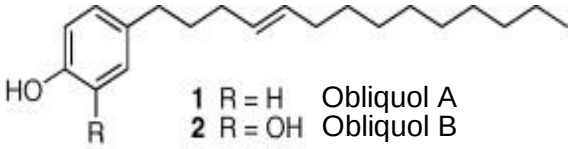
(a) e **(b)** Folha e espiga da *P. obliquum* colhida na ESEC-Cuniã em Porto Velho-RO (Fotos: Jussara Rojas); **(c)** e **(d)** Folhas intacta e predada (Fotos: Hélida Soleane).

Conhecida como Anis do Oriente, tem seu uso disseminado na Guiana e Equador como analgésico e antiartrítico (DEFILIPPIS et al, 2004).Os estudos a respeito da espécie ainda são poucos. Em levantamento prévio, foram observadas poucas publicações: sendo uma voltada para o isolamento de seus metabólitos secundários e outras duas para a elucidação dos compostos de seu óleo essencial, das quais duas tiveram atividades biológicas testadas.

Em sua pesquisa, Valdivia et al (2008), isolou compostos inéditos a partir das inflorescências e das folhas da *P. obliquum* colhida no Valle Del Sacta, em

Cochabamba, Bolívia, os alquenil-fenóis, denominados obliquol A e obliquol B (Fig. 2), demonstrando atividade anti-inflamatória e antimicrobiana semelhante à ampicilina. Guerrini et al (2009) elucidou os compostos constituintes do óleo essencial da espécie colhida no Equador, sem comprovação de atividade biológica. Os estudos de Mundina et al (1998), com a espécie colhida no Parque Nacional de Altos de Campana no Panamá, também elucidaram a composição do óleo essencial, não realizando testes biológicos.

Figura 2: Substâncias isoladas da *P. obliquum*



Fonte: VALDÍVIA et al (2008).

A *P. obliquum,* colhida na ESEC-Cuniã, localizada em Porto Velho, Rondônia, estudada por MARTÃO (2013), em trabalho ainda não publicado, apresentou atividade antioxidante expressiva para o extrato etanólico e todas as frações analisadas, exceto para a fração clorofórmica, apresentando resultados semelhantes ao EC_{50} da *Ginkgo biloba*. AIZZO (2013) observou a composição do óleo essencial, com a finalidade de identificar a variação da classe de substâncias produzidas ao longo do ciclo sazonal, demonstrando que o ciclo climático interfere na produção destes.

Até o presente momento não se tem conhecimento a respeito de trabalhos publicados com a espécie coletada em Rondônia. Contudo, faz-se necessário seu estudo químico e comprovação de atividades farmacológicas, a fim de auxiliar em pesquisas subsequentes (AIZZO, 2013).

1.2 Microrganismos e suas características

1.2.1 *Candida spp.*

O gênero *Candida,* família Saccharomycetidae, é constituído por cerca de 200 espécies diferentes de leveduras (SCHULZE e SONNENBORN, 2009), faz parte da microbiota natural humana, sendo encontrada com frequência em mucosas e na pele e qualquer desequilíbrio na imunidade do indivíduo pode torná-lo patogênico, sendo as infecções geniturinárias as mais frequentes (KOEHLER et al, 20016).

Várias espécies de *Candida* aparecem como importantes patógenos oportunistas, sendo a *Candida albicans* a de maior prevalência em isolados clínicos, porém, outras espécies também possuem importância médica como a *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (FOOGLADDA et al, 2002; KOEHLER et al, 20016).

Frequentemente, as infecções geradas por fungos, são difíceis de tratar devido à aquisição de resistência aos antifúngicos por parte de seus agentes etiológicos, acometendo pacientes expostos a fatores de risco (ARAÚJO et al, 2004). Entretanto, infecções em indivíduos saudáveis também têm sido documentadas, manifestando-se em diferentes regiões anatômicas, a exemplo das mulheres que adquirem a candidíase vaginal (DIGNANI et al, 2003).

Da mesma forma, o gênero também é responsável por infecções sistêmicas em pacientes portadores de doenças degenerativas ou neoplásicas, como resultado de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo, podendo comprometer inúmeras vísceras (DIGNANI et al, 2003).

1.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

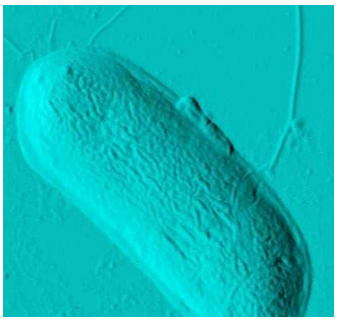
A *Klebsiella pneumoniae*, pertence à família Enterobacteriaceae que, por sua vez, é composta por cerca de 30 gêneros e 130 espécies de bacilos gram-negativos (FARMER et al, 1985). *Serratia, Hafnia, Enterobacter e Klebsiella* são os principais gêneros desta família (ROOLINS e JOSEPH, 2000).

O gênero *Klebsiella* está amplamente distribuído na natureza (água, solo, alimentos, resíduos orgânicos) e, no homem, coloniza a pele (IBÁNEZ et al, 2010). Suas espécies são conhecidas como bactérias entéricas, pois seu habitat principal é o trato intestinal inferior de alguns vertebrados e invertebrados. Através de seu

seqüenciamento genético identificou-se as espécies *K.terrigena, K. oxytoca, K. mobilis, K. planticola* e, *K. pneumoniae* (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

A espécie *Klebsiella pneumoniae* é uma gram-negativa e se apresenta na forma de bastonetes aeróbios facultativos, imóveis, com formação de colônias grandes, não esporulados, com diâmetros que variam entre 0,3 e 1 µm (MARTINEZ et al, 2004) (Fig. 3).

Figura 3 – *Klebsiella pneumoniae* vista ao microscópio eletrônico e cultivo em placa de Petri



(a)

(b)

(a) Eletromicrografia de *K. Pneumoniae* (Fonte: ATC, Gallery); **(b)** Isolado de *K. pneumoniae* em ágar MacConkey (Fonte: SANTOS, 2007).

A *K. pneumoniae* é um patógeno oportunista, podendo ser transportado por seus hospedeiros de forma assintomática na pele, nariz, intestino e garganta, mesmo em indivíduos saudáveis. Em pacientes hospitalizados pode causar pneumonia, infecções do trato urinário e feridas no tecido mole; e inúmeras infecções graves adquiridas pela comunidade, incluindo abscessos hepáticos piogênicos, endoftalmite, pneumonia e meningite. São particularmente um problema entre idosos, recém-nascidos e pessoas imunocomprometidas (SHON, BAJWA e RUSSO, 2013).

A espécie é uma das responsáveis por infecções em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), demonstrando resistência a diversos medicamentos (MENEZES et al, 2007; MOURA et al, 2007). É um patógeno responsável por surtos de infecções hospitalares e sua resistência progressiva aos antibióticos tem sido preocupante desde a década de 80, quando se identificou a *K. pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), gerando resistência a todas as

cefalosporinas (BLACK, BONTEN e WEINSTEIN, 2004) e muitas outras classes de fármacos, incluindo os carbapenêmicos, conhecidos por sua capacidade de penetrar nas bactérias e por sua estabilidade diante da ESBL (STURENBURG e MACK, 2003).

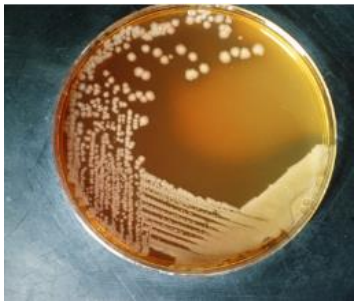
1.2.3 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia*, semelhantemente ao gênero *Klebsiella*, está inserido na família Enterobacteriaceae, composto por seis espécies: *Escherichia albertii, E. blattae, E. fergusonii, E. hermannii, E. vulneris*e e *E. coli* (SOUSA e PEIXE, 2000).

É uma gram-negativa, em forma de bastonetes (extremidades arredondadas), mede cerca de 1,1 e 1,5 mm de diâmetro e 2 a 6 mm de comprimento, aeróbia facultativa, não esporulada, pode ser imóvel ou móvel contendo múltiplos flagelos peritriquiais (distribuídos por toda a célula) (FERREIRA E SOUSA, 2000) (Fig.4).

Figura 4: *Escherichia coli* vista ao microscópio eletrônico e cultivo em placa de Petri.

(a)



(b)

(a) *E. coli* em uma folha de alface (estômatos); **(b)** Colônias de *E. coli* cultivadas em ágar sangue dezoito horas após a incubação (Fonte: Gettyimages).

Sua distinção em relação aos demais microrganismos se dá pela capacidade em gerar enfermidades por conta de sua informação genética relacionada à produção de toxinas, destruição de tecidos, interferência no metabolismo da célula, capacidade de adesão e invasão de células hospedeiras (FAO, 2017).

A *Escherichia coli* integra a flora intestinal humana poucas horas após o nascimento e é considerada um microrganismo comensal inofensivo da flora normal, existindo cepas que podem ser patogênicas e gerar doenças como a diarreia (CAMPOS e TRABULSI, 2002).

Os quadros diarréicos provocados pelo microrganismo podem se apresentar de inúmeras maneiras, desde uma diarreia aguda aquosa até um quadro mais grave com sangramentos intestinais, acompanhados de febre e vômito. A manifestação de sintomas diversificados é devido à presença de mecanismos de patogenicidade em suas cepas, sendo possível classificar as estirpes de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) em seis grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica, conhecida também como produtoras de toxina Vero ou toxina semelhante à Shiga (EHEC/STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e aderência difusa (DAEC), porém, esta última não está claramente definida (ANGELES, 2002).

Além dos patótipos de *E. coli* de origem intestinal, relacionados diretamente com as contaminações alimentares, o microrganismo é responsável por infecções extra-intestinais (ExPEC), como a *E. coli* uropatogênica (UPEC), associadas às infecções do trato urinário (ITUs) e *E. coli* relacionada a meningite/sepse (MNEC/SEPEC) (RUSSO e JOHSON, 2000).

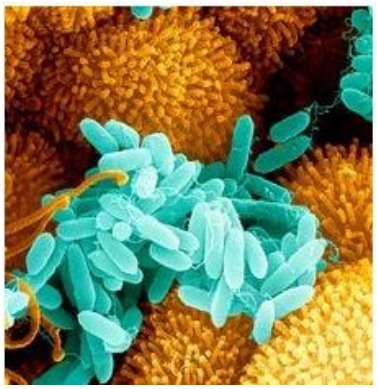
As ITUs figuram como uma das infecções mais comuns do ser humano (VALIQUETTE, 2001), sendo a *E. coli* o microrganismo invasor mais frequente (SATO et al, 2005).

A *E. coli* associada a MNEC é a principal causa de meningite por gram-negativa em neonatos. A MNEC age deslocando-se do sangue para o sistema nervoso central resultando na inflamação das meninges (KAPER, NATARO e MOBLEY 2004). Em uma estimativa de 70 mil internações anuais, pelo menos um terço já chega com septicemia ou vai adquiri-la dentro do ambiente hospitalar (ANANIAS, 2006).

1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa*, uma gram-negativa, pertencente à família Pseudomonadaceae, constitui-se em uma bactéria em forma de bastonete (PALLERONI et al, 1973), isoladas ou aos pares, são movidas por flagelos polares (TRABULSI et al, 1999), habitam em ambientes variados como solo, pântanos, costa marinha e tecidos animais (HARDALO e EDBERG, 1997) (Fig. 5).

Figura 5: *Pseudomonas aeruginosa* vista ao microscópio eletrônico e cultivo em placa de Petri



(a)

(b)

(a) *P. aeruginosa* vista ao microscópio eletrônico de varredura colorido em epitélio nasal humano (Fonte: Juergen Berger/Science Photo Library); **(b)** Colônias de *P. aeruginosa* mostrando a cor verde característica (Fonte: Gloria Delisle/Microbe Biblioteca).

Mutluoglu e Uzun (2011) referem-se ao microrganismo como possuidor de um cheiro adocicado e uma das gram-negativas mais prevalentes isoladas de feridas diabéticas dos pés.

Esta espécie faz parte da microbiota normal do homem, sendo encontrada na garganta, pele e fezes sem causar-lhe danos, porém, por serem oportunistas, podem provocar doenças em indivíduos imunocomprometidos (MURRAY, KOBAYASHI e THOMPSON, 2000) oferecendo risco de infecção a pacientes vítimas de queimaduras, além de ser responsável por infecções do trato urinário e pulmões (BODEY et al, 1983).

A *P. aeruginosa* pode causar infecções nosocomiais graves, com elevada mortalidade (PELLEGRINO et al, 2002). É uma espécie frequentemente envolvida em infecções hospitalares, e se posiciona entre as principais causadoras destas infecções, perdendo somente para *S. aureus* e *S. coagulase negativo* (SADER et al, 2001).

Para Tortora et al (2002), algumas cepas de *P. aeruginosa*, através de mutações e seleção natural, devido ao uso em excesso de antibióticos, tornaram-se capazes de produzir betalactamases potentes, gerando grande preocupação quanto aos pacientes hospitalizados.

A espécie é responsável por doenças crônicas das vias aéreas, sendo uma das principais causas de morbidade em pessoas com fibrose cística ou doença

pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (ALBUQUERQUE et al, 2016). Além disso, a espécie é a principal causadora de pneumonia em pacientes hospitalizados submetidos à ventilação mecânica (RELLO et al, 2009).

1.2.5 *Staphylococcus aureus*

Conjuntamente às infecções comunitárias e hospitalares dos microrganismos gram-negativos, inserem-se neste contexto as infecções provocadas pelas gram-positivas, como a bactéria *Staphylococcus aureus*, que é uma bactéria esférica do grupo dos *coccus* (SANTOS et al, 2007).

Pertencente à família Micrococcae, o gênero *Staphylococcus* geralmente faz parte da microbiota da pele normal do homem. A espécie desperta muito interesse na área da saúde por estar presente com frequência em diversas infecções, podendo apresentar-se de forma sistêmica ou localizada, desde uma simples infecção como um furúnculo, espinhas e impetigo, até mais graves, como endocardite, pneumonia, meningite, síndrome da pele escaldada (necrose epidérmica tóxica), síndrome do choque tóxico, septicemia, entre outras (Fig. 6) (CASSETTARI et al, 2005; SANTOS et al, 2007).

Figura 6: *Staphylococcus aureus* visto ao microscópio e manifestação de infecção gerada pelo microrganismo

(a) **(b)**

(a) Imagem em microscópio eletrônico de colônias de bactérias *Staphylococcus aureus* (Fonte: Martin Oeggerli/NationalGeographic); **(b)** Manifestações cutâneas da síndrome da pele escaldada (esquerda) e impetigo (direita) (Fonte: SANTOS et al, 2007).

A contaminação por *S. aureus* pode ocorrer através da alimentação, como em queijos (LOWY, 1998; ALMEIDA FILHO e NADER FILHO, 2000), leite (ARCURI et al, 2006; BRITO et al, 1999) e até produtos de confeitaria (PERESI et al, 2004).

Além de causar intoxicações alimentares, a espécie é agente causadora de osteomielite, endocardite e pneumonia (BOUCHER et al, 2010). Além de produzir diversas toxinas é também um exemplo consolidado de microrganismo multirresistente em ambiente hospitalar (BOUCHER e COREY, 2008). Em UTIs e berçários é comum o isolamento em pacientes colonizados. Pacientes imunocomprometidos que fazem diálise, portadores de HIV, diabéticos e queimados, sofrem riscos de infecção pelo microrganismo, uma vez que pode gerar diversos processos infecciosos (CARVALHO et al, 2005).

S. aureus expressa diversos fatores de virulência, incluindo proteínas de superfícies que se ligam de forma covalente aos peptideoglicanos, criando uma adesão à parede da bactéria a matriz extracelular, a superfícies de biomateriais e células hospedeiras (FOSTER et al, 2014) e, da mesma forma que tantas outras bactérias, tem a capacidade de desenvolver resistências a diversos antibióticos, incluindo as beta-lactamas e glicopeptídeos (REHM e TICE, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana da *Piper obliquum* Ruiz &Pavon frente a microrganismos geradores de patogenias em seres humanos.

2.2 Específicos

- Obter o extrato etanólico (EEPO) e as frações dos talos e folhas da espécie em estudo;
- Submeter o EEPO, frações e óleo essencial a testes de difusão em ágar para as espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebisiela pneumoniae*;
- *S*ubmeter o EEPO, frações e óleo essencial a testes de difusão em ágar para a espécie fúngica: *Candida sp.*;
- Efetuar testes de microdiluição em placa para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e IC_{50} (*Inhibitory Concentration 50%)* para as amostras com atividade antimicrobiana comprovada em teste de difusão em ágar, realizados previamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de coleta (Adaptado de Aizzo, 2013)

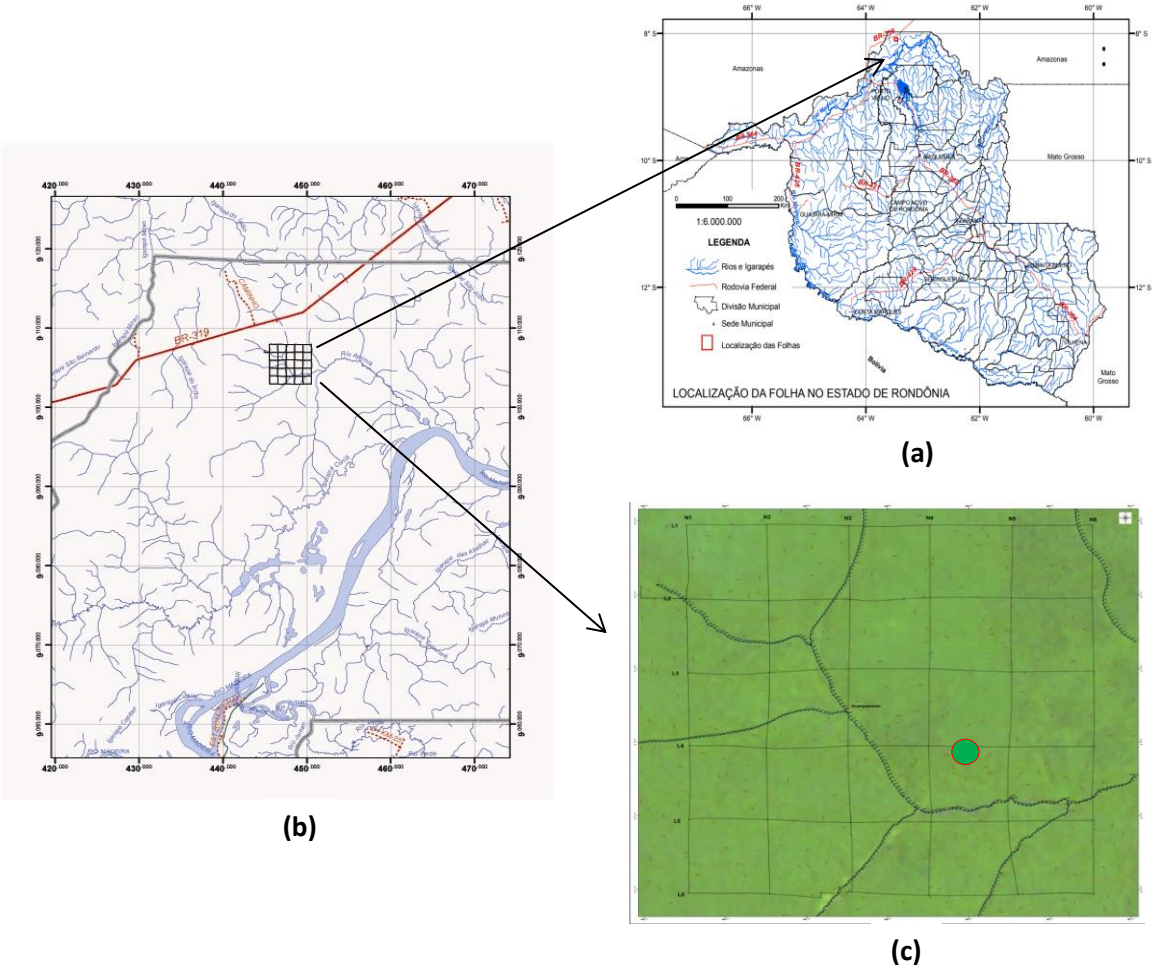
A *Piper obliquum* Ruiz & Pavon foi coletada na área de estudo que faz parte da Estação Ecológica do Cuniã (ESEC Cuniã), cuja unidade de conservação foi criada pelo Decreto Federal de 27 de setembro de 2011. Localizada no município de Porto Velho, abrange uma área de 125.849,23 hectares, dividida em duas áreas adjuntas, a Resex Cuniã: áreas I e II. O acesso pode ser realizado por via fluvial ou por terra firme (PPBIO, 2012).

A área do presente estudo está localizada ao lado oeste da unidade com acesso pela BR 319, a 120 km da capital rondoniense, sentido Porto Velho (RO) – Humaitá (AM). Os espécimes coletados estão localizados na linha LO4 3550, com as seguintes coordenadas geográficas: S08º05’49,435“W063º27’44,696”, representado pelo círculo em vermelho na figura 7.

Para a coleta dos espécimes foi anotado o número e metragem do piquete onde se encontrava a população. O material botânico para a obtenção do extrato, frações e óleo essencial foi coletado e acondicionado em saco plástico preto, e transportados posteriormente em uma caixa de isopor com gelo seco até o Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal de Rondônia (LABFITO - UNIR).

O material testemunho foi obtido por Aizzo, J.R.S. 133, em 2012 e depositado no Herbário Rondoniense (RON) sob o nº RON 4696. A exsicata foi herborizada segundo a metodologia de Martins-da-Silva (2002). Foi enviada uma duplicata do espécime para o herbário (RB) do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, a fim de proceder à identificação botânica pela especialista da família Piperaceae, Dra. Elsie Franklin Guimarães.

Figura 7: Mapa da Estação Ecológica do Cuniã, localizada no município de Porto Velho – RO.



Localização da Estação Ecológica do Cuniã: **(a)** Mapa de Rondônia, com destaque para o município de Porto Velho; **(b)** Área de estudo do PPBio (Programa de Pesquisa em Biodiversidade); **(c)**Ponto de amostragem da coleta da planta (círculo em vermelho) (Fonte: http://ppbio.inpa.gov.br/sitios/cunia)

3.2 Obtenção do óleo essencial, extrato etanólico e frações.

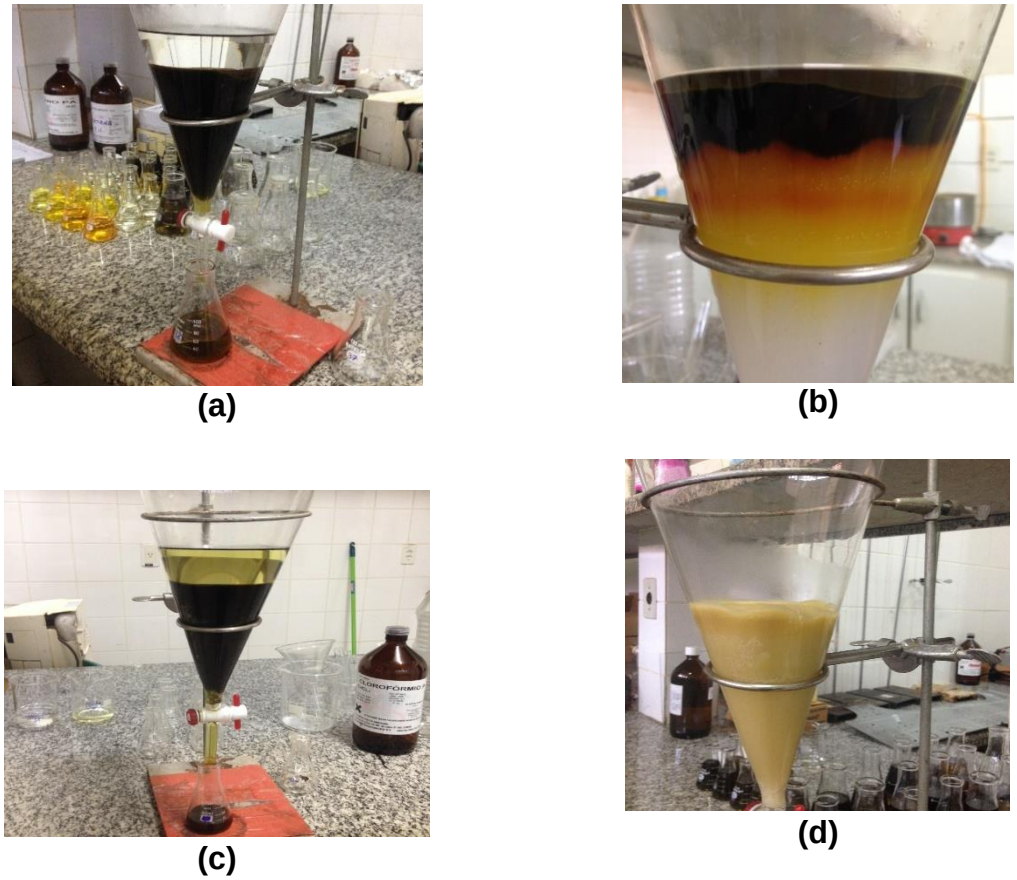
Foi realizada a extração do óleo essencial, por hidrodestilação em extrator de Clevenger e o óleo essencial obtido foi conservado em congelador para evitar a perda de material por volatilização e envolto em papel alumínio, evitando seu contato com a luz.

O extrato etanólico da *P. obliquum* (EEPO) foi preparado com as folhas e talos (1,78 kg). O material vegetal foi submetido à secagem em estufa a 40 ^{o}C e posteriormente colocado em contato com etanol (EtOH) 95% PA por 7 dias, com

agitação ocasional. Após filtração deste material, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (marca Fisaton). Este procedimento foi repetido por mais uma vez resultando em 56,61g de extrato etanólico. Uma parte do extrato foi reservada para a realização dos testes antimicrobianos e 20,00 g deste foi submetido à coluna cromatográfica em Sílica gel 60, 230-400 mesh (marca Vetec) para obtenção das frações em ordem crescente de polaridade: Hexano (FHex), clorofórmio ($FCHCl_3$), acetato de etila (FEtOAC) e acetona (FAcet) (Fig. 8). Após obtenção do extrato e frações, o solvente de cada um deles foi evaporado e os produtos foram reservados para posterior realização dos testes antimicrobianos.

Ressalta-se que as folhas e talos da *P. obliquum,* utilizadas na atual pesquisa, foram coletadas em agosto de 2012, quando foi preparado o extrato etanólico e extraído o óleo essencial, ficando armazenados sob refrigeração constante até o momento de sua utilização.

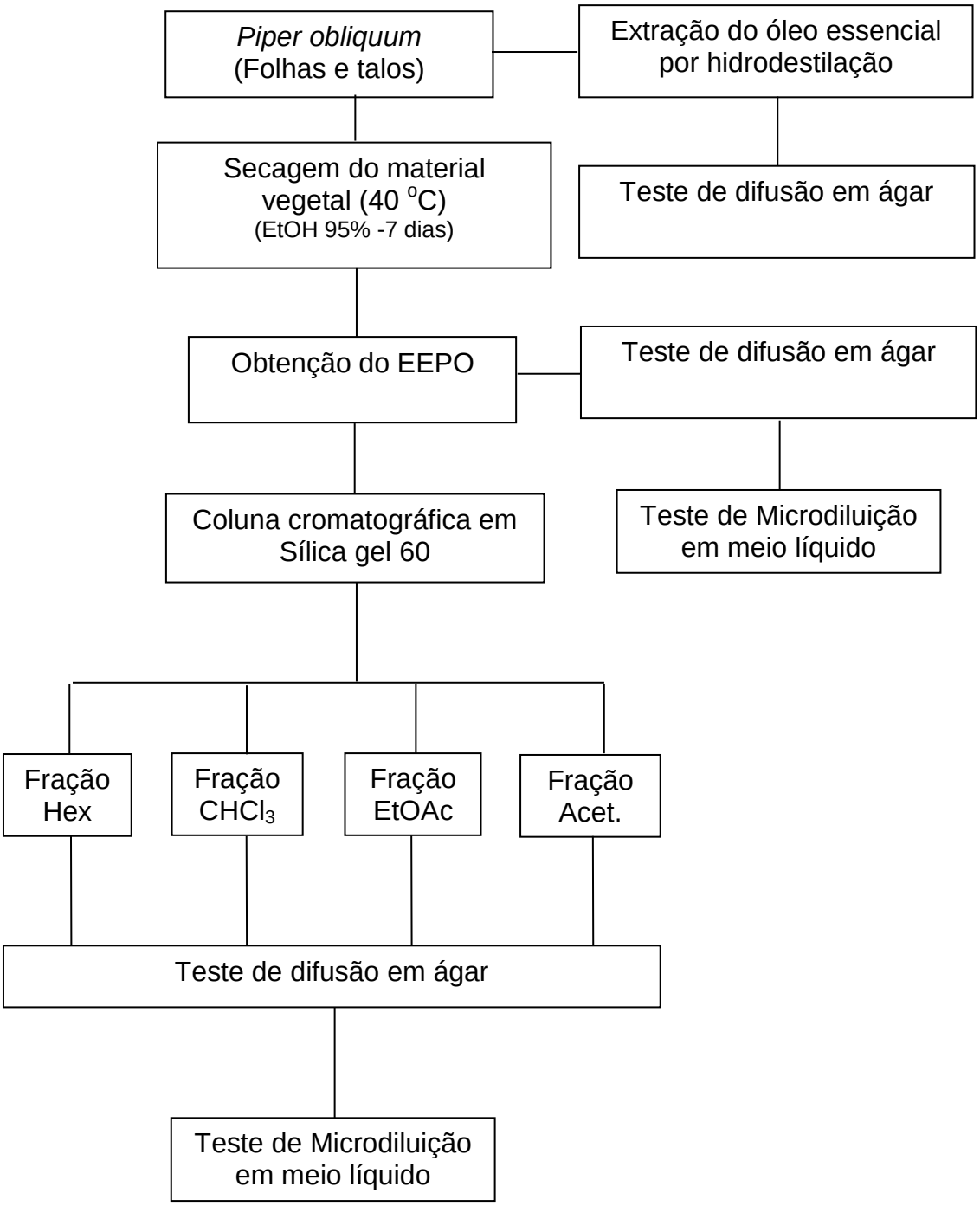
Figura 8: Coluna filtrante de sílica gel do extrato etanólico da *P. obliquum*



(a) Coluna filtrante no início da cromatografia; **(b)** Eluição com hexano; **(c)** Eluição com acetato de etila; **(d)** Final da cromatografia após todas as eluições (Fotos: Hélida Soleane).

A figura 9 demonstra o esquema de obtenção do EEPO (extrato etanólico da *Piper obliquum*) e das frações (FHex, $FCHCl_3$, FEtOAc e FAcet) e realização dos testes antimicrobianos.

Figura 9: Esquema do desenvolvimento da pesquisa



3.3 Testes antimicrobianos

Os testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do CEPEM (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical), seguindo os POPs - Procedimento Operacional Padrão para Antibiograma com Produtos Naturais e o Procedimento Operacional Padrão para Ensaios de Microdiluição em Meio de Cultura Líquido com produtos Naturais sobre Bactérias. Ambos os POPs seguem os protocolos do CLSI (2008) com modificações sugeridas por Cursino et al (2011) e Pieri et al (2010).

3.3.1 Testes de difusão em ágar para o extrato etanólico, frações e óleo essencial.

Para o teste de difusão em ágar foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883). Incluiu-se no teste a espécie fúngica *Candida sp*. (ATCC 14053) (Tabela 1).

Tabela 1 - Espécies microbianas utilizadas no teste de difusão em ágar

<table>
<tr><th>Amostras da
P. obliquum</th><th>Bactérias
gram-positivas</th><th>Bactérias
gram-negativas</th><th>Fungo</th></tr>
<tr><td>EEPO</td><td rowspan="3">*S. aureus*
(ATCC 29213)

S. aureus
resistente à
meticilina (MRSA)</td><td rowspan="3">*P. aeruginosa*
(ATCC 27853)

E. coli
(ATCC 25922)

K. pneumoniae
(ATCC 13883)</td><td rowspan="3">*Candida sp.*</td></tr>
<tr><td>FHex
$FCHCl_3$
FEtOAc
FAcet</td></tr>
<tr><td>Óleo essencial</td></tr>
</table>

3.3.1.1 Preparação dos antibiogramas

Os antibiogramas, realizados em placas de Petri de 90 mm para os testes de difusão em ágar, em duplicata, foram confeccionados em camada dupla: a camada inferior com 10 mL de caldo ágar Mueller-Hinton (MH), acrescida de 15mL de caldo Luria-Bertani (LB). Após o preparo, as placas de Petri foram deixadas em estufa bacteriológica (marca FANEM LTDA) a 37 °C por 5 min para sua total secagem. Os poços, na quantidade de cinco em cada placa, foram feitos com ponteiras estéreis de 200 µL com distâncias equivalentes entre si.

3.3.1.2 Preparação do extrato etanólico, frações, óleo essencial, controles e inóculos.

- Extrato etanólico e frações

O EEPO da *P. obliquum* e as frações tiveram solubilizações testadas previamente. Observando-se que todas eram solúveis em etanol PA, foram pesadas e diluídas para uma concentração de 10 $mg.mL^{-1}$.

- Óleo essencial

O óleo essencial (OE) foi pesado e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para a obtenção das concentrações de 10, 25 e 50 $mg.mL^{-1}$.

- Controles

Como controle positivo (C+) utilizou-se o antibiótico Cloranfenicol, diluído em água para injeção à concentração de 10 $mg.mL^{-1}$ e, como controle negativo (C-) etanol para o extrato etanólico e frações e DMSO para o óleo essencial.

- Inóculos

O crescimento bacteriano foi realizado em tubos de ensaio com meio LB e incubados “overnight” a 37°C em agitação constante para a obtenção de uma turvação comparada ao padrão 0,5 de MacFarland (aproximadamente $1,5x10^8$ UFC/mL). Antes de ser inoculado na placa foi diluído para se chegar a uma concentração de aproximadamente $5x10^6$ $UFC.mL^{-1}$.

3.3.1.3 Aplicação do inóculo e das amostras no antibiograma

Com um swab estéril, o inóculo foi aplicado na placa em toda a superfície do ágar em quatro direções, com um giro de 60° cada vez, assegurando uma distribuição uniforme. Para finalizar, o swab foi passado nas bordas da placa, deixadas entreabertas por 15 min à temperatura ambiente para que o inóculo fosse absorvido pelo meio.

Com o auxílio de um micropipetador, as soluções contendo as amostras (EEPO, frações e óleo essencial) e os controles, foram aplicadas em seus respectivos poços na quantidade de 40 µL cada. Após a aplicação das soluções dos produtos naturais, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica (marca FANEM) a 37°C por 24 horas. Os halos formados foram medidos com halômetro e as placas fotografadas para arquivamento.

3.3.2 Teste de microdiluição em meio líquido

O teste de microdiluição em meio líquido foi realizado em duplicata com três repetições com intervalos de sete dias entre elas e somente para as amostras que tiveram atividade antimicrobiana comprovada no teste de difusão em ágar, ressaltando ainda que o óleo essencial não teve sua atividade submetida a este teste.

3.3.2.1 Preparo do extrato etanólico, frações, controles, corante indicador e inóculos.

- Extrato etanólico e frações

As amostras de produtos naturais foram diluídas em etanol para se chegar a uma concentração inicial de 2 $mg.mL^{-1}$ em placa, foram “vortequizadas” e filtradas em filtro microbiológico com poros de 0,22µm.

- Controles

Para o controle positivo usou-se o Cloranfenicol diluído em álcool para uma concentração inicial de 2 $mg.mL^{-1}$ em placa, filtrado em filtro microbiológico com poros de 0,22µm. Como controle de esterilidade da placa usou-se o caldo LB. Para o controle de viabilidade celular, utilizou-se inóculo em caldo LB.

- Inóculo

O inóculo ajustado à escala 0,5 de MacFarland foi diluído antes de ser inserido na placa de 96 poços para se chegar a uma concentração de aproximadamente $5x10^6$ UFC/mL em cada orifício.

- Corante indicador de crescimento

Como corante indicador de crescimento bacteriano, usou-se a resazurina, sendo preparado em água destilada à concentração de 0,01%, filtrado em filtro microbiológico com poros de 0,22µm.

3.3.2.2 Preparação das placas de microdiluição

O teste de microdiluição em meio líquido foi realizado em placa de 96 poços, inicialmente foram inseridos 100 µL de caldo LB em todos eles. Nos orifícios da coluna 1 foram acrescidos 60 µL do meio e 40 µL da amostra, em duplicata (linhas A e B). Ainda na coluna 1, linhas C e D, foi repetido o mesmo procedimento para outra amostra; sendo o procedimento repetido para todas as demais amostras da planta, incluindo o controle positivo (Cloranfenicol).

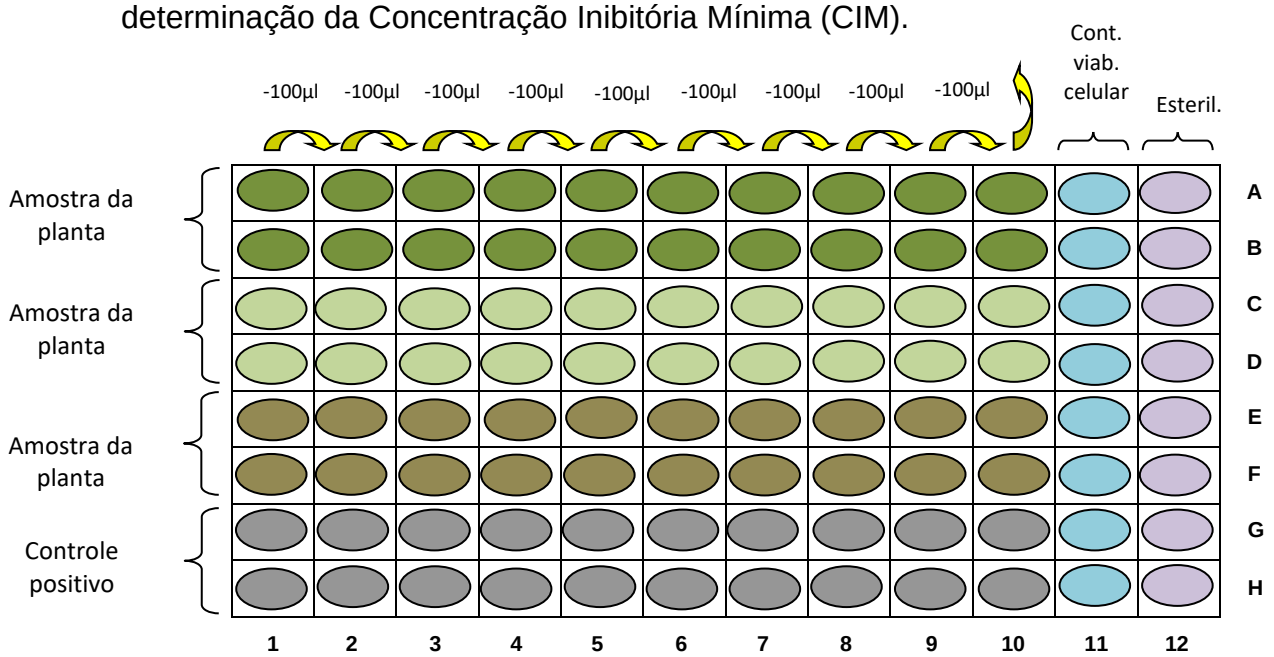
O conteúdo dos orifícios da coluna 1 (amostras e controle) foi homogeneizado com uma micropipeta e 100 µL retirados e passados para os orifícios da coluna 2, sendo novamente homogeneizado. O procedimento seguiu-se até a coluna 10 e, ao final, os 100 µL desta última coluna foram retirados e descartados. Completaram-se os orifícios da coluna 1 a 10 (amostras e controle) com 60 µL de meio LB.

Na coluna 11 (linhas A-H), a de controle de viabilidade celular, foi acrescido mais 60 µL de meio LB. Na coluna 12 (linhas A-H), controle negativo, ou de esterilidade, foi acrescido 80 µL de meio LB. Nas colunas de 1 a 11 (linhas A-H) foram aplicados 20 µL de inóculo.

Ao final de todo o procedimento, 20 µL do corante resazurina foi aplicado nos 96 orifícios e a placa incubada em estufa bacteriológica (marca Fanem) à temperatura de 37°C, sendo retiradas para leitura de densidade óptica (DO) em 48 horas.

Foram confeccionadas placas de controle dos extrativos vegetais e do controle negativo (solvente) em placas separadas (Fig.10).

Figura 10: Representação da placa de microdiluição em meio líquido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



Legenda: Placa de microdiluição - as linhas A e B (extrato ou fração da *P. obliquum*)-verde escuro, C e D (extrato ou fração da *P. obliquum*)-verde claro, E e F (extrato ou fração da *P. obliquum*)-marrom, G e H (Cloranfenicol)-roxo; todas as amostras estão nas concentrações seriadas: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015, 0,008, 0,004 $mg.mL^{-1}$. Coluna 11 (linhas A-H)-azul claro, controle de viabilidade celular (meio com bactérias) realizado para observar o desenvolvimento microbiano e o surgimento da cor rosa, indicando a viabilidade celular do microrganismo. A coluna 12 (linhas A-H)-lilás caracteriza a esterilidade do meio nutritivo, contendo apenas o meio LB.

A observação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de forma visual, sendo definida como a menor concentração na qual não houve mudança de coloração do violeta para rosa.

3.3.3 Leitura espectrofotométrica

As placas foram submetidas à leitura de absorbância em 630 nm, em espectrofotômetro de microplacas (marca Thermo Plate). Os valores obtidos foram analisados para a confecção dos gráficos e cálculos para se observar a atividade antimicrobiana das amostras da *P. obliquum*, de acordo com ROZATTO (2012). Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa computacional GraphPad Prism.

3.3.4 Cálculo da viabilidade celular

A equação descrita abaixo foi utilizada para se observar a viabilidade de cada microrganismo sob a ação de cada amostra da planta (extrato e frações) para cada concentração aplicada a eles.

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1- (A_c/A_0)] \times 100$$

Para a fórmula, temos que,

A_c = média das absorbâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância, sem a adição do inóculo (somente extrativos vegetais).
A_0 = média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (ROZATTO, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

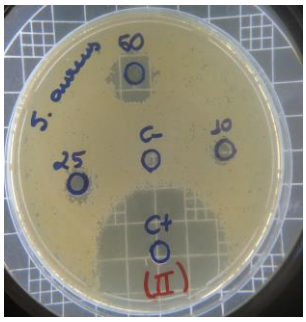
4.1 Testes antimicrobianos

4.1.1 Determinação da atividade antimicrobiana através do teste de difusão em ágar para o óleo essencial da *P. obliquum*

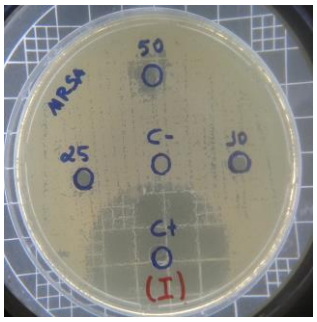
Para a avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) da *P. obliquum*, foi realizado o teste de difusão em ágar em concentrações de 10, 25 e 50 $mg \cdot mL^{-1}$, diluídas em DMSO.

Analisando a figura 11 e tabela 2, onde estão plotados os resultados obtidos no teste de difusão em ágar, observa-se que o mesmo sugere atividade antimicrobiana com a formação de halos de inibição de 17 e 9 mm nas concentrações de 50 e 25 $mgl \cdot mL^{-1}$, respectivamente, frente à *S. aureus*; e 11 mm na concentração de 50 $mg \cdot mL^{-1}$, frente à MRSA. No controle positivo houve a formação de halos de inibição que variaram de 20 a 43 mm, demonstrando a sensibilidade das bactérias ao Cloranfenicol. Não houve formação de halo de inibição para o controle negativo, revelando a inocuidade deste. O óleo essencial da *P. obliquum* não demonstrou atividade frente às espécies *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ou *Candida sp* (Fig. 12).

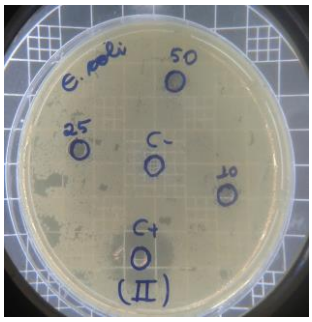
Figura 11 – Teste de difusão em ágar para o óleo essencial da *P. obliquum* nas concentrações de 10, 25 e 50 $mg \cdot mL^{-1}$.



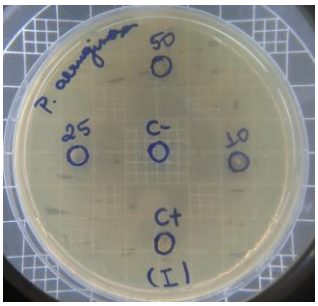
(a)



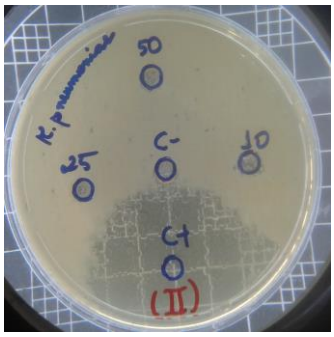
(b)



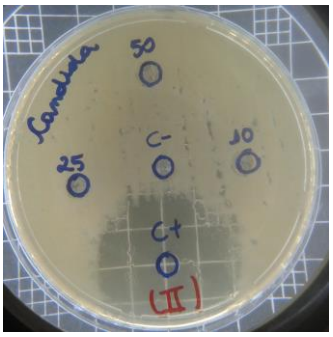
(c)



(d)



(e)



(f)

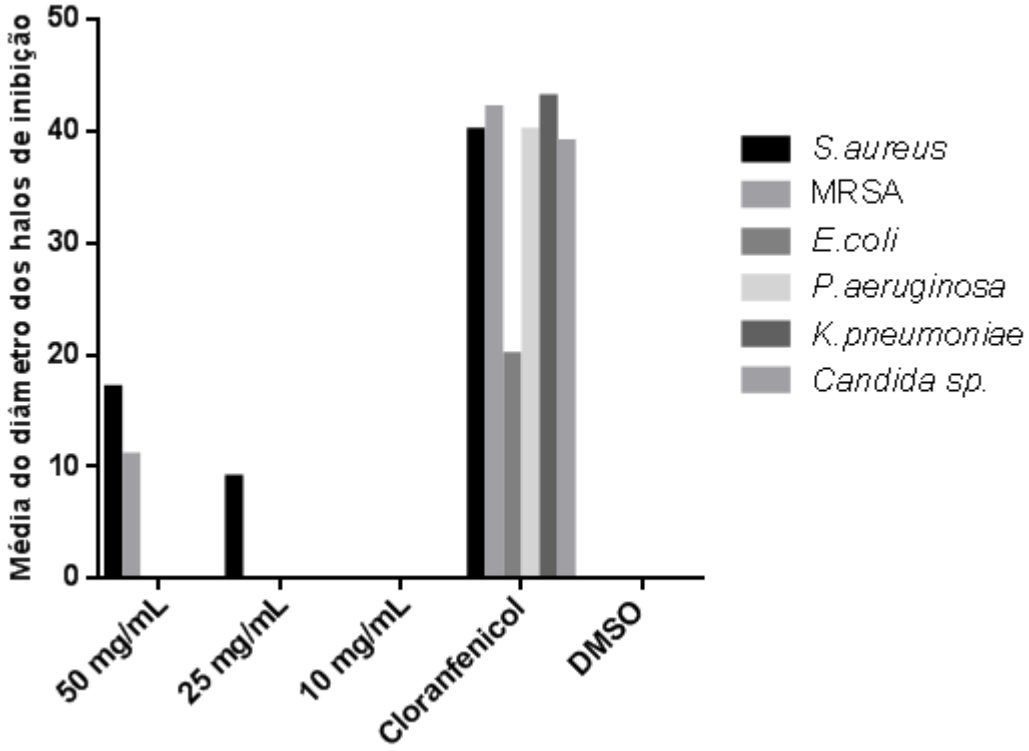
(a) *S. aureus*; **(b)** MRSA; **(c)** *E. coli*; **(d)** *P. aeruginosa*; **(e)** *K. pneumoniae;* **(f)** *Candida sp*. (Fotos: Hélida Soleane).
Legenda: 10, 25 e 50 (concentrações de 10, 25 e 50 mg·mL^{-1} de óleo essencial em DMSO); C+=controle positivo (Cloranfenicol na concentração de 10 mg·mL^{-1}); C- = controle negativo (DMSO).

Tabela 2 - Média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para o óleo essencial da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica

	Média do diâmetro dos halos de inibição em mm[a]					
	Microrganismos					
Concentrações do óleo essencial (mg·mL^{-1})	S.a.	MRSA	E.c.	P.a.	K.p.	C.sp.
50	17±1,4	11±1,4	*	*	*	*
25	9±1,4	*	*	*	*	*
10	*	*	*	*	*	*
Controles	*	*	*	*	*	*
C+	40±2,8	42±2,8	20±0,0	40±0,0	43±1,4	39±1,4
C -	*	*	*	*	*	*

[a]= incluindo os 4 mm do poço
Legenda: S.a.=*S. aureus*; MRSA= *S. aureus* resistente à meticilina; E.c=*E.coli*; P.a.=*P. aeruginosa*; K.p.=*K. pneumoniae*; C.sp.=*Candida sp*.; *=ausência de halos; C+=controle positivo (Cloranfenicol); C-=controle negativo (DMSO).

Figura 12– Médias dos diâmetros dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para o óleo essencial da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica.



Os óleos essenciais são um conjunto de elementos voláteis contidos em inúmeros órgãos vegetais e constituem um importante grupo de matéria prima para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia; e nas plantas estão relacionados à sobrevivência da espécie com papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al, 2000). As estruturas de conteúdos oleíferos podem estar localizadas em várias partes da planta e nas Piperaceas, em especial, ocorre em estruturas secretoras especializadas, tais como em células parenquimáticas diferenciadas (PESSINI et al, 2003).

Essas misturas são responsáveis por diversas ações farmacológicas tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoárica (REBELO et al, 2012), antioxidante, antielmíntica (GAÍNZA et al, 2017), inseticida (SOUTO et al, 2012; MAMOOD et al, 2017), entre outras. Segundo Bhavanani e Ballow (1992), apresentam atividades biológicas que podem ser divididas, de uma forma geral, em atividade antifúngica (65%) e antibacteriana (35%).

O óleo essencial de diversas espécies do gênero *Piper* tem demonstrado atividades antimicrobianas sobre os mais variados tipos de microrganismos. Oyedeji et al (2005), pesquisando a bioatividade de *P. guineense* frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, observaram o combate à *E.coli* e *P. eruginosa*, com a formação de halos de 12 mm para ambos no teste de difusão em disco.

Ferreira (2006) avaliou o potencial do óleo essencial de *P. renitens* que apresentou a formação de halos de inibição com média de 12 mm frente à *S. aureus.* Abreu et al (2015) observaram a formação de halos de 8, 9, 11 e 15 mm também para *S. aureus* e diâmetros de 10 e 13 mm frente à *E. coli*, e 7, 8, 9 e 13 mm frente à *C. albicans*, em diferentes concentrações do óleo essencial da *P. aduncum*.

O perfil de sensibilidade da *S aureus* e MRSA, sob a ação do óleo essencial na concentração de 50 $mg \cdot mL^{-1}$, pode ser classificado como moderadamente sensível (halos entre 10 e 20 mm) de acordo com a escala definida pelo POP (procedimento operacional) para Antibiograma com Produtos Naturais, utilizado como protocolo para os testes; na concentração de 25 $mg \cdot mL^{-1}$, a MRSA pode ser considerada de baixa sensibilidade (halos menores que 10 mm).

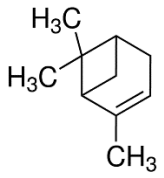
A composição do óleo essencial é diversificada, variando entre as espécies ou podendo até mesmo variar entre a mesma espécie dependendo das condições bióticas e abióticas às quais a planta está exposta. Na mistura, os compostos mais comuns são hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres, ésteres, lactonas, cumarinas, furanos, ácidos orgânicos, óxidos, peróxidos, compostos com enxofre, entre outros (SIMÕES e SPITZER, 2010).

Ao analisar a variabilidade sazonal do óleo essencial da *P. obliquum* coletada na Estação Ecológica Cuniã, no mês de agosto de 2012, Aizzo (2013) concluiu que a espécie havia passado por estresse devido às variações de temperatura e/ou regime hídrico, teorizando que o óleo coletado neste período foi sintetizado por dupla origem biossintética, uma vez que formou, além dos terpenos, um fenilpropanóide (metil-eugenol). Neste período, dentre as 40 substâncias identificadas no óleo essencial, as maiores concentrações aconteceram no mês de agosto para os terpenos α-pineno, canfeno, β-pineno e limoneno (Fig. 13), cujas concentrações variaram em todos os períodos das coletas.

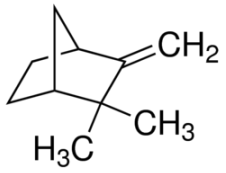
Na pesquisa de Guerrine et al (2009), o safrol foi componente majoritário da *P. obliquum* e o seu óleo essencial demonstrou atividade frente à *S. aureus* (MIC

>4,79 µg.mL^{-1}), *K. oxytoca* (MIC > 4,79 µg.mL^{-1}), *P. aeruginosa* (MIC 4,79 µg.mL^{-1}), *E. coli* (MIC > 4,79 µg.mL^{-1}).

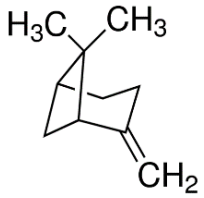
Figura 13: Componentes majoritários do óleo essencial de *P. obliquum*.



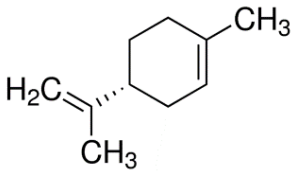
α-pineno



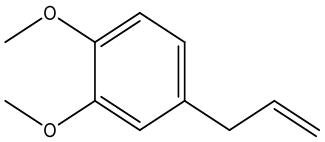
Canfeno



β-pineno

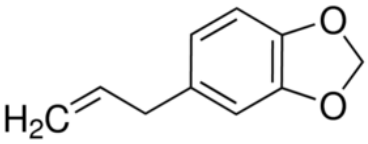


Limoneno



Metil-eugenol

Fonte: AIZZO (2013)



Safrol

Fonte: COSTA et al (1999)

A ação antimicrobiana do óleo essencial da *P. obliquum* poderia ser justificada por sua constituição química, uma vez que seus compostos majoritários podem ser considerados agentes com potencial atividade biológica. Leite et al (2007), avaliando o potencial inibitório de α e β-pineno, comprovou a ação de ambos frente à *S. aureus, S. epidermidis, S. pyogenes*e *S. pneumoniae.* O óleo essencial

de *P. guineense*, tendo o β-pineno como substância majoritária e α-pineno como a quarta substância mais abundante, também teve sua atividade comprovada (OYEDEJI, 2005) sobre as espécies *E. coli* e *P. aeruginosa*, como citado anteriormente.

O limoneno demonstrou eficácia antimicrobiana contra *S. uberis*, sugerindo a possibilidade de seu uso *in vivo* (MONTIRONI, CARIDDI e REINOSO, 2016). Entretanto, Burt (2004) observa que os componentes majoritários de determinados óleos essenciais, quando misturados não apresentam atividade antimicrobiana, porém, quando o óleo essencial é submetido aos mesmos testes, estes demonstram atividades promissoras, o que leva a concluir que pode haver uma forte relação entre os componentes majoritários e que os componentes minoritários também participam da ação antimicrobiana podendo até ser cruciais para a atividade biológica.

No presente trabalho, há evidências da atividade frente a alguns microrganismos, entretanto, não se pode concluir se a ação é advinda de um componente majoritário ou pelo conjunto de sua composição.

Os testes antimicrobianos geralmente são realizados seguindo-se padrões da CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, que é desenvolvido para avaliar a suscetibilidade de antibióticos aos microrganismos. Porém, ao se tratar de testes com produtos naturais derivados de plantas, a situação é bem diferente (NASCIMENTO, 2007). Com os antibióticos têm-se substâncias com ações já conhecidas, mas nos produtos naturais existe uma gama de substâncias agindo sobre o microrganismo e, muitas vezes, não se tem conhecimento de quais substâncias são as responsáveis por essa ação antimicrobiana da planta até sua identificação.

A forma de avaliar a suscetibilidade de um microrganismo ao produto natural é comparar os resultados obtidos com os controles positivos. Contudo, usar como padrão algo tão diferente da amostra testada, deixa as análises mais difíceis de serem realizadas. Para minimizar esses problemas, tornou-se comum o uso do óleo essencial diluído em detergentes, solventes ou emulsificadores, na tentativa de dispersá-lo de forma mais eficiente nos meios de cultura, sejam sólidos ou líquidos (NASCIMENTO et al, 2007; BRUNI et al, 2004).

Para o teste de difusão em poço, optou-se em diluir o óleo essencial da *P. obliquum* em DMSO por alguns motivos, dentre eles: quantidade pequena de óleo,

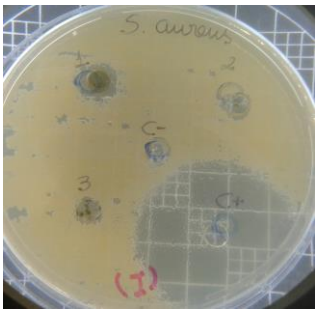
necessitando aumentar seu volume, produzindo quantidade maior de solução a fim de observar sua ação sobre os microrganismos; facilidade de dispersão da solução no meio sólido; incluindo ainda nesse aspecto, o fato de não ter sido observada suscetibilidade dos microrganismos à ação do DMSO em trabalhos anteriores, e que o DMSO é amplamente utilizado para diluição de medicamentos hidro e lipossolúveis (JACOB e TORRE, 2009).

A diluição do óleo essencial com a finalidade de melhorar sua dispersão sobre o meio nutritivo no teste de difusão em ágar, pode ser observado no trabalho de Santos et al (2012) que diluiu o óleo da *Piper malacophyllum* em solução aquosa de DMSO a 20% (v/v) no intuito de facilitar a diluição do mesmo em placas de microdiluição seriada. Oyedeji et al (2005) utilizou solução do óleo essencial de *P. guineense* em 10% de DMSO para a realização do teste de difusão em disco e Santos et al (2009) diluiu o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* a 5% em DMSO.

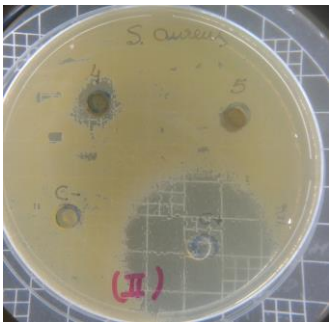
4.1.2 Determinação da atividade antimicrobiana através do teste de difusão em ágar para o extrato etanólico e frações da *P. obliquum*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos componentes fixos da *P. obliquum*, testou-se seu extrato etanólico (EEPO), frações hexano (FHex), clorofórmio ($FCHCl_3$), acetato de etila (FEtOAc) e acetona (FAcet), todas na concentração de 10 $mg \cdot mL^{-1}$, frente a cinco espécies bacterianas e uma fúngica, cujos resultados podem ser observados nas figura 14 e tabela 3.

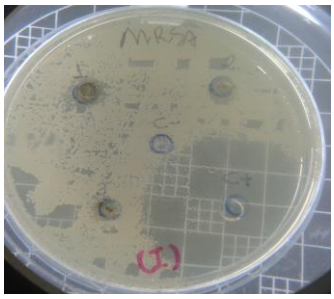
Figura 14 – Teste de difusão em ágar para a *P. obliquum* frente a espécies bacterianas e fúngica



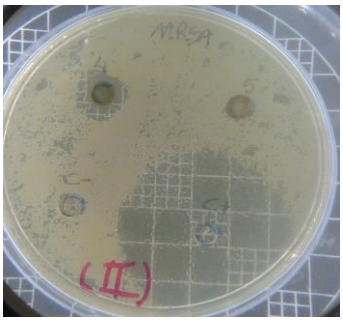
(a-1)



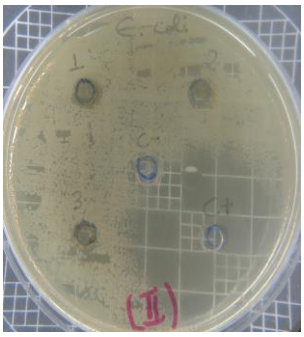
(a-2)



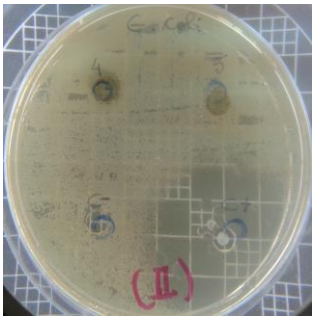
(b-1)



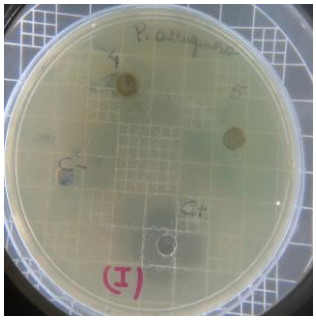
(b-2)



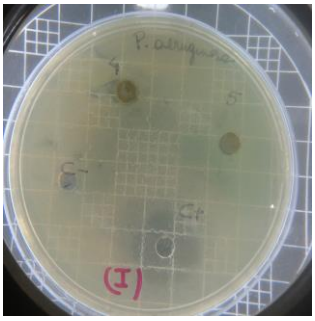
(c-1)



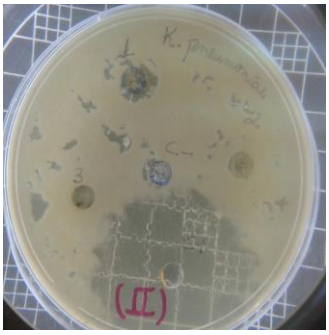
(c-2)



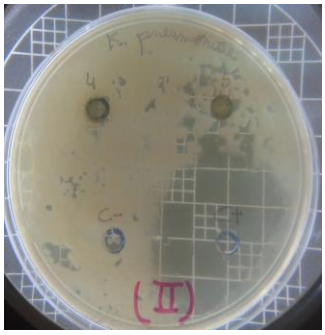
(d-1)



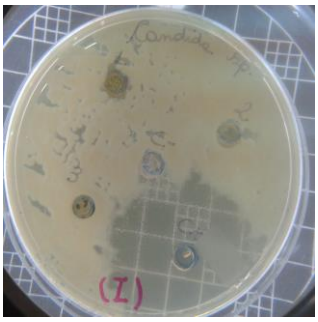
(d-2)



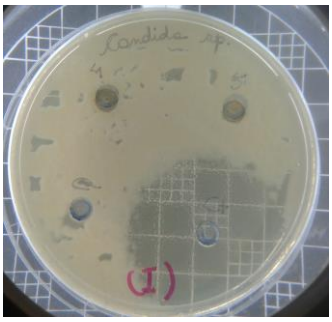
(e-1)



(e-2)



(f-1)



(f-2)

Legenda: **(a-1 e a-2)** *S. aureus*; **(b-1 e b-2)** MRSA; **(c-1 e c-2)** *E. coli*; **(d-1 e d-2)** *P. aeruginosa*; **(e-1 e e-2)** *K. pneumoniae;* **(f-1 e f-2)** *Candida sp*.; 1=EEPO; 2=FHex; 3=$FCHCl_3$; 4=FEtOAc; 5=FAcet; (+)=controle positivo (Cloranfenicol); (-) = controle negativo (EtOH);
Nota: O extrato etanólico, frações e controle positivo encontram-se na concentração de 10 $mg.mL^{-1}$ (Fotos: Hélida Soleane)

Tabela 3 - Média aritmética e desvio padrão dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para o extrato etanólico e frações da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica

	Média do diâmetro dos halos de inibição em mm[a]					
	Microrganismos					
Concentração 10 $mg.mL^{-1}$	S.a.	MRSA	E.c.	P.a.	K.p.	C.sp.
EEPO	12 ± 0,0	10 ± 0,0	*	*	*	*
FHex	7 ± 1,4	*	*	*	*	*
$FCHCl_3$	*	*	*	*	*	*
FEtOAc	11 ± 1,4	12 ± 0,0	*	*	*	*
FAcet.	*	*	*	*	*	*
C+	40	46	40	25	45	47
C -	*	*	*	*	*	*

[a]= incluindo os 4 mm do poço
Legenda: EEPO; FHex; $CHCl_3$; FEtOAc; FAcet; S.a.=*S. aureus*; MRSA= *S. aureus* resistente à meticilina; E.c.=*E. coli*; P.a.=*P. aeruginosa*; K.p.=*K pneumoniae*; C.sp.=*Candida sp*.; * = ausência de halos; C+=controle positivo (Cloranfenicol); C - = controle negativo (etanol).

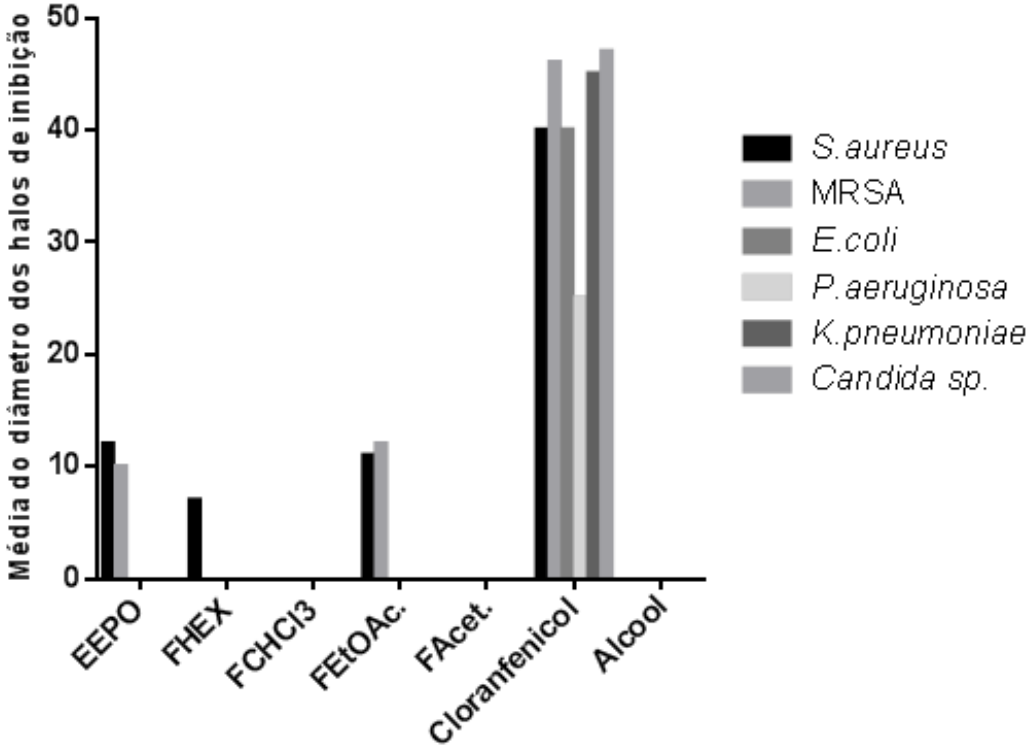
A FHex formou halos de 7 mm para *S. aureus*, demonstrando baixa sensibilidade do microrganismo na presença desta fração. A FEtOAc teve atividade frente a *S. aureus* e MRSA, com halos de 11 e 12 mm, respectivamente, sendo consideradas moderadamente sensíveis para esta fração.

Como pode ser observado na tabela 3, o EEPO demonstrou atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. aureus* e MRSA, com a formação de halos de

inibição de 12 e 10 mm, respectivamente. O perfil de sensibilidade destas bactérias, sob a ação do EEPO, pode ser classificado como moderadamente sensível (halos entre 10 e 20 mm) de acordo com a escala definida pelo POP (procedimento operacional) para Antibiograma com Produtos Naturais, utilizado como protocolo para os testes.

Os controles positivos formaram halos com valores entre 25 a 47 mm para todas as cepas e para o controle negativo não foi observada formação de halos em torno do poço, indicando que este não está interferindo nos resultados das atividades antimicrobianas das amostras testadas (Fig. 15).

Figura 15 – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do teste de difusão em ágar para o extrato etanólico e frações da *P. obliquum* sobre espécies bacterianas e fúngica.



Observa-se que os tamanhos dos halos de inibição da *P. obliquum* ora diferem, ora se aproximam dos encontrados em algumas plantas do mesmo gênero submetidas aos mesmos testes.

Astuti (2014) testou a atividade do extrato etanólico das folhas de *P. crocatum*, que apresentou halos de inibição nas placas de difusão em ágar de 14 e 16 mm, nas concentrações 0,5 e 0,24 $mg.mL^{-1}$, respectivamente, frente a *S. aureus.* Na fração EtOAc, Valle Jr. (2016), estudando o extrato etanólico da *Piper betle,* na concentração de 2,5 $mg.mL^{-1}$, obteve halos de 38 mm frente à MRSA, e 17 mm em placas com *P. aeruginosa* e a fração metanólica apresentou halos de 34 e 15 mm, respectivamente, frente aos mesmos microrganismos. O extrato etanólico da *P. arboreum* possui atividade frente à *S. aureus* com halos de 15 mm, mas não apresenta atividade frente a *E. coli*, segundo Nascimento et al (2015). Em testes realizados por Zarai et al (2013), a *P. nigrum* apresentou atividade frente a *S. aureus* (12,5 mm), *K. pneumoniae* (7,5 mm) e *E. coli* (8,3 mm) quando tratados com seu extrato etanólico; porém, não apresentou atividade frente à *K. pneumoniae* quando testados com as frações EtOAc e $CHCl_3$, apresentando atividades antimicrobianas para as demais bactérias testadas para as frações EtOAc, $CHCl_3$ e MeOH. Wiart et al (2004) observaram as mesmas atividades biológicas para a *P. porphyrophyllum* frente à *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* para o extrato EtOH e da fração hexano apenas para *S. aureus*.

Alguns fatores podem interferir nos resultados obtidos, tais como: tempo esperado para leitura das placas: algumas misturas levam mais tempo do que outras para agir sobre o microrganismo; temperatura utilizada; taxa de oxigênio; meio de cultura utilizado, pois alguns são mais polares que outros, impedindo a dispersão adequada das amostras sobre o meio; concentração das amostras testadas: algumas necessitam ser aplicadas em maiores concentrações; comportamento do solvente utilizado para diluir as amostras, pois, semelhantemente ao que acontece aos meios de cultura, o solvente pode não apresentar polaridade totalmente compatível com estes (HAMMER et al, 1999).

Fatores externos podem influenciar na produção dos metabólitos secundários, responsáveis pela bioatividade das plantas, como sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação UV, nutrientes disponíveis, poluição atmosférica, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, idade da planta (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Os resultados antimicrobianos de algumas espécies vegetais, incluindo a *P. obliquum* são devido à presença de substâncias bioativas que podem agir combatendo os microrganismos. A *P. obliquum*, estudada por Valdívia et al (2008),

colhida em Cochabamba, Bolívia, demonstrou atividade antimicrobiana para quatro de um total de cinco substâncias isoladas na espécie, obliquol A, obliquol B, 4-cromanona, 2'-hidroxi-3,4,4',6'-tetrametoxichalcona e ácido 3-farnesil-4-hidroxibenzóico, frente às espécies *E. coli e S. epidermis*.

Obliquol A e B são substâncias do grupo dos alquenilfenóis. Compostos deste grupo de metabólitos secundários foram relatados em *P. dilatatum* (SANTOS et al, 2009); outros quatro novos alquilfenóis foram isolados de *P. gibbilimbum* e apresentaram atividade antimicrobiana frente à *S. epidermidis* e *Bacillus cereus* (RALI et al, 2007).

4.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), viabilidade celular e IC_{50} para o extrato etanólico e frações da *P. obliquum*.

Para a realização do teste de microdiluição em meio líquido utilizou-se o EEPO, FHex e FEtOAC da *Piper obliquum* por terem demonstrado atividade no teste de difusão em ágar frente à *S. aureus* e MRSA.

Os resultados das CIM das atividades antimicrobianas sugerem que o extrato etanólico e frações testadas da *P. obliquum* apresentaram capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos.

A atividade antimicrobiana da *P. obliquum* foi obtida e demonstrada nas figuras 16 e 17 e tabela 4, onde estão inseridas as fotos do teste de microdiluição em meio líquido e plotados os valores de suas concentrações inibitórias mínimas.

Figura 16: Teste de microdiluição em meio líquido para o EEPO, FHex e FEtOAc da *P. obliquum* frente à bactéria *S. aureus* em 48 horas.

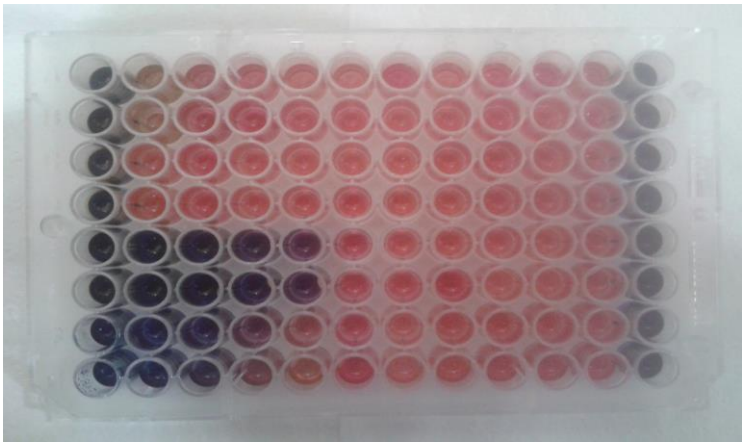


Figura 17: Teste de microdiluição em meio líquido para o EEPO e FEtOAc da *P. obliquum* frente à bactéria MRSA em 48 horas.

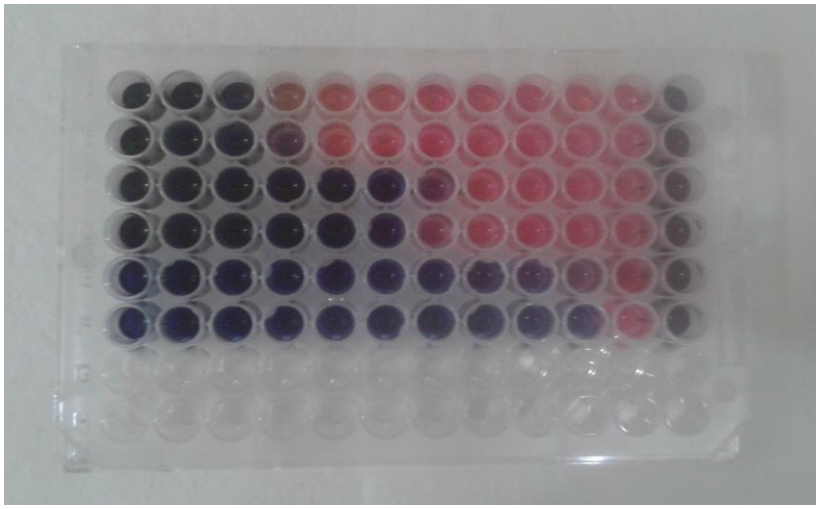


Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o teste de microdiluição em meio líquido em diferentes concentrações para o EEPO, FHex e FEtOAc da *P. obliquum* frente a *S. aureus* e MRSA.

	CIM ($mg.mL^{-1}$)	
	Microrganismos	
Amostras	S.a.	MRSA
EEPO	2,0	0,5
FHex	2,0	*
FEtOAc	0,125	0,062
C+	0,25	0,004

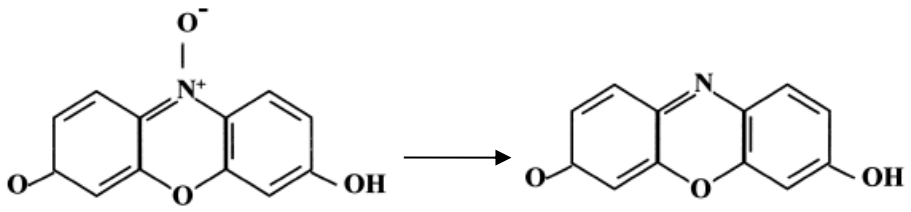
Legenda: S.a.=*Staphylococcus aureus*; MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; * = amostra não utilizada; C+=controle positivo (Cloranfenicol).

O teste de microdiluição em meio líquido é considerado uma metodologia adequada para a observação e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Ostrosky (2008) relata que o método da microdiluição para determinação da CIM, desenvolvido por Eloff (1998), é muito utilizado devido às suas características positivas, como economia de reagentes, reprodutibilidade e confiabilidade.

A CIM, na placa de microdiluição em meio líquido, pode ser visualizada através da conversão do corante resazurina, de cor violeta, em resofurina, de cor rosa, na presença de reações metabólicas microbianas, indicando o crescimento

destes microorganismos através de uma reação de oxirredução (Fig. 18). A resazurina é reduzida por vários compostos da cadeia respiratória da célula, transformando-se em resofurina (ARAUJO, 2011; NAKAYAMA et al, 1997).

Figura 18: Redução de resazurina a resofurina em células vivas



Resazurina (violeta) **Resofurina (rosa)**

Fonte: O'BRIEN et al (2000)

O EEPO, FHex e FEtOAc demonstraram atividade frente à bactéria *S. aureus* com CIM de 2,0, 2,0 e 0,125 $mg.mL^{-1}$, respectivamente, onde não houve a conversão do corante resazurina em resofurina, indicando ausência de metabolismo por parte do microrganismo até às concentrações descritas.

Ao comparar as CIM das amostras com o controle positivo que foi de 0,25 $mg.mL^{-1}$, observa-se que o EEPO e FHex tiveram concentração de inibição das bactérias acima do controle, demonstrando ser menos eficientes, já a FEtOAc apresentou CIM 50% abaixo do controle positivo, o que sugere que sua atividade de combate ao microrganismo foi superior a este.

Para o teste frente à MRSA utilizou-se o EEPO e a FEtOAc e os mesmos demonstraram valores de 0,5 e 0,062 e, ao compará-las à CIM do controle positivo (0,004 $mg.mL^{-1}$) observam-se atividades antimicrobianas menos eficientes para estas amostras da *P. obliquum*.

O POP utilizado para a microdiluição em meio líquido não propõe uma classificação da atividade antimicrobiana das amostras testadas, permitindo, assim, a adoção de parâmetros oferecidos por outros autores, como o de Rios e Recio (2005), por exemplo, que descrevem que os extratos que apresentam CIM inferiores a 0,1 $mg.mL^{-1}$ são considerados promissores. Duarte et al (2005) propõe que os

extratos que apresentarem CIM ≤ 0,5 $mg.mL^{-1}$ possuem atividade antimicrobiana forte; CIM com os valores entre 0,51-1,0 $mg.mL^{-1}$, atividade moderada e CIM ≥ 1,0, atividade fraca. Para Aligiannis et al (2001), são considerados extratos com forte atividade antimicrobiana aqueles que apresentam CIM de até 0,5 $mg.mL^{-1}$, atividade moderada com CIM entre 0,6 e 1,5 $mg.mL^{-1}$ e de atividade fraca aqueles que apresentam CIM acima de 1,6 $mg.mL^{-1}$.

Aplicando as referidas classificações ao resultado obtido para EEPO, pode-se verificar que o extrato apresentou atividade fraca frente à *S. aureus* (2 $mg.mL^{-1}$) e MRSA (0,5 $mg.mL^{-1}$), e a mesma avaliação pode ser aplicada para FHex (2 $mg.mL^{1}$). Na classificação de Duarte et al (2005) e Aligiannis et al (2001), a FEtOAc pode ser considerada como portadora de atividade antimicrobiana potente frente a *S. aureus* (0,125 $mg.mL^{-1}$) e MRSA (0,062 $mg.mL^{-1}$).

Ao comparar as concentrações inibitórias mínimas para o extrato etanólico, fração hexano e acetato de etila da *Piper obliquum*, frente à *S. aureus*, com as CIM obtidas em outras pesquisas para o gênero *Piper*, percebe-se diferenças nos resultados. Figueira et al (2016), ao estudar o extrato bruto etanólico de *P.regnelli*, *P. aduncum* e *P. marginatum*, observaram CIM>2, 1, 8 e 0,2 $mg.mL^{-1}$, respectivamente, frente à *S. aureus,* que são valores aproximados ao da *P. obliquum* em relação ao EEPO e FHex.

O extrato etanólico da *P. arboreum* com CIM de 0,25 $mg.mL^{-1}$ (NASCIMENTO et al, 2015), *P. porphyrophyllum* com CIM 0,0625 $mg.mL^{-1}$ (AHMAD et al, 2014) e *P. hispidum* com CIM de 0,0625 $mg.mL^{-1}$ (COSTA et al 2016), demonstram que concentrações menores foram suficientes para o combate ao microrganismo quando comparados à *P. obliquum*. O extrato etanólico, metanólico e éter de petróleo da *P. nigrum* demonstraram CIM de 12,5 $mg.mL^{-1}$ frente à *S. aureus* em Akthar et al (2014).

Para Fennel (2004), estas variações em relação à CIM das plantas são atribuídas a vários fatores, como por exemplo, o uso da técnica aplicada, a época de coleta da planta, a concentração dos extratos testados e o modo de preparo das amostras, acrescenta-se, ainda, o fato de serem plantas do mesmo gênero, mas espécies diferentes, tornando, possivelmente, sua composição química mais diversificada. Ainda, segundo autor, diante destas variáveis, conclui-se que não existe método padronizado para os resultados das atividades antimicrobianas quando se trata de produtos naturais.

Para observar a viabilidade do microrganismo, produziu-se uma coluna com inóculo e meio nutritivo (caldo LB), o qual permaneceu rosa em todos os orifícios, indicando presença das reações metabólicas da *S. aureus*. Para testar a esterilidade da placa de microdiluição usou-se a última coluna (coluna 12) preenchida somente com meio nutritivo (caldo LB) que, permanecendo violeta, demonstrou a esterilidade do meio nutritivo utilizado no teste.

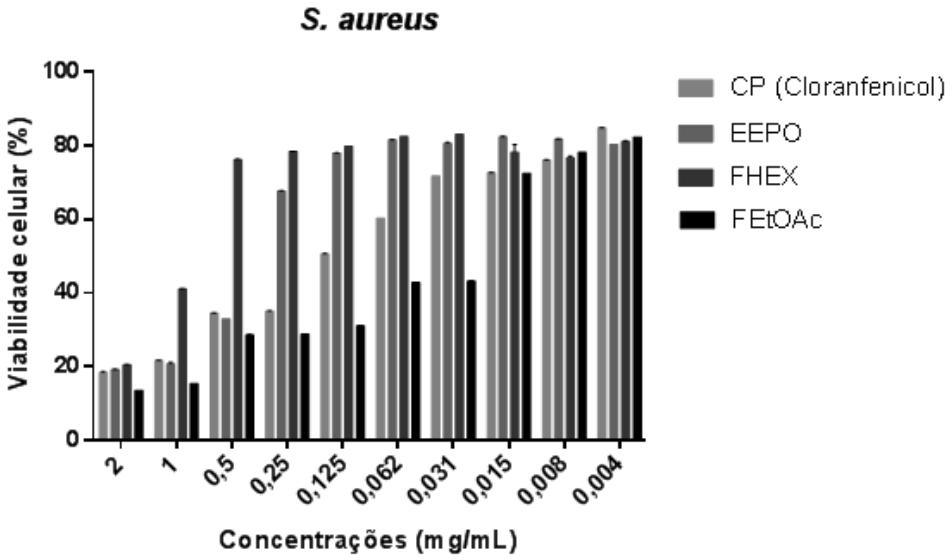
Como controle positivo na microdiluição, em meio líquido, utilizou-se o Cloranfenicol. Este antibiótico age inibindo a síntese protéica nas bactérias e também possui amplo espectro de atividade antimicrobiano, incluindo microrganismos gram-positivos e gram-negativos. Seu uso clínico é reservado a infecções nas quais seus benefícios necessitam ser superiores à sua toxicidade hematológica incomum (pancitopenia) e o cuidado na administração do medicamento em recém-nascidos é imprescindível, podendo resultar na “síndrome do bebê cinzento”, com mortalidade de até 40%. Seu uso pode ser incluído no tratamento às infecções geradas por *Haemophilus influenze*, meningite, conjuntivite bacteriana (uso tópico), febre tifóide, entre outros (RANG et al, 2007).

Para o experimento o controle positivo, de viabilidade celular, de esterilidade do meio nutritivo e do solvente, com e sem o inóculo, foram aceitáveis.

Através da leitura de densidade óptica em espectrofotômetro calculou-se a viabilidade celular. Analisando os dados da figura 19 observa-se o aumento da viabilidade celular, indicando o desenvolvimento do microrganismo à medida que as concentrações das amostras da *P. obliquum* e do controle positivo diminuem.

A viabilidade celular do microrganismo frente à ação do EEPO se mantêm semelhante à da ação do controle positivo até a concentração de 0,5 $mg.mL^{-1}$, porém, a partir da concentração de 0,25 $mg.mL^{-1}$,a viabilidade celular foi superior a 50%, havendo perda da atividade antimicrobiana para esta amostra. A FHex manteve a viabilidade celular abaixo de 50% até a concentração de 1 $mg.mL^{-1}$, mantendo a viabilidade acima de 50%a partir de 0,5 $mg.mL^{-1}$. Em comparação com as demais amostras, a FEtOAc demonstrou maior controle sobre o desenvolvimento bacteriano, mantendo valores bem próximos nos intervalos das concentrações 2-1$mg.mL^{-1}$ (13,52-15,38% de viabilidade celular), 0,5-0,125 $mg.mL^{-1}$ (28,66-31,04%) e 0,062-0,031$mg.mL^{-1}$(43,22-42,77%), perdendo totalmente sua atividade a partir da concentração de 0,015 $mg.mL^{-1}$, quando a viabilidade celular ultrapassa 70% de desenvolvimento bacteriano.

Figura 19: Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do EEPO, FHex, FEtOAc e controle positivo frente à *S. aureus*.



Legenda: CP=controle positivo (Cloranfenicol); EEPO=extrato etanólico, FHex=fração hexano, FEtOAc=fração acetato de etila.

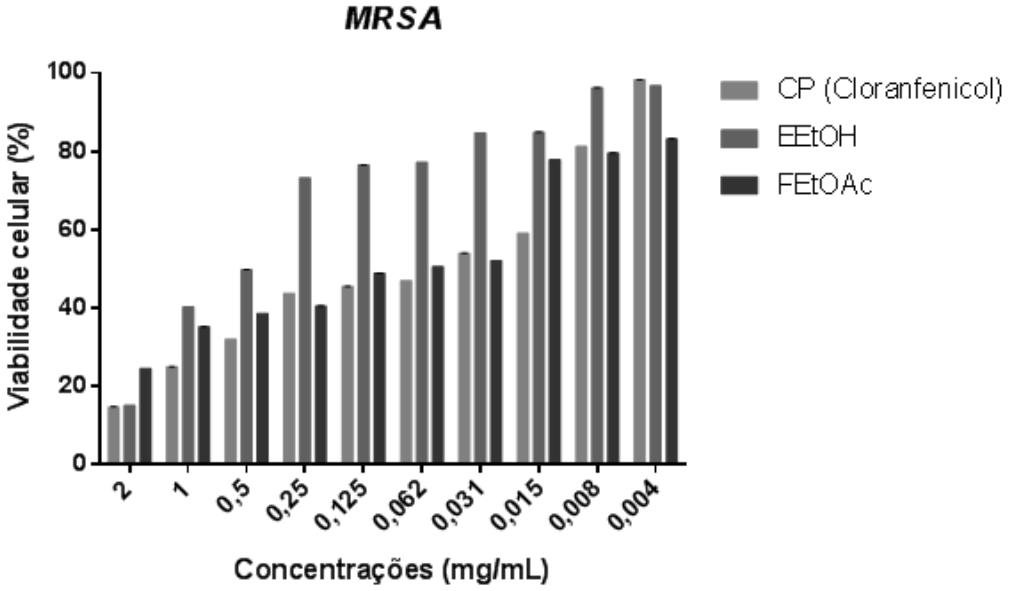
A observação da figura 20 demonstra o aumento da viabilidade celular da MRSA, indicando o desenvolvimento do microrganismo à medida que as concentrações das amostras da *P. obliquum* e do controle positivo diminuem, em semelhança à viabilidade de *S. aureus*.

A viabilidade celular sob a ação do EEPO permaneceu abaixo de 50% até a concentração de 0,5 $mg.mL^{-1}$, a partir de 0,25 $mg.mL^{-1}$ a viabilidade superou os 70% em todas as demais concentrações. A FEtOAc manteve a viabilidade celular abaixo de 50% até a concentração de 0,125 $mg.mL^{-1}$.

Semelhantemente à ação frente à *S. aureus*, a FEtOAc demonstrou maior eficiência no combate à MRSA e manteve valores próximos de viabilidade e abaixo de 50% nos intervalos 1 - 0,25 $mg.mL^{-1}$.

Quanto ao controle positivo, este manteve sua ação evidente com 50% de viabilidade de MRSA até a concentração de 0,062 $mg.mL^{-1}$, demonstrando maior eficiência em relação às amostras da *P. obliquum*, porém, a FEtOAc acompanha sua atividade até a concentração de 0,031 $mg.mL^{-1}$.

Figura 20: Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do EEPO, FEtOAc e controle positivo frente à MRSA.



Legenda: CP=controle positivo (Cloranfenicol); EEPO=extrato etanólico, FEtOAc=fração acetato de etila

O valor de IC_{50}, que define a concentração de amostra da planta necessária para reduzir em 50% o desenvolvimento celular indica que, quanto menor o valor de IC_{50}, maior a atividade do material testado (NEGRI et al, 2009). Para se observar os valores de IC_{50} nas diferentes amostras foi utilizada a equação da reta, substituindo-se o y por 50 para se obter a concentração no eixo x, que corresponde à concentração da amostra capaz de reduzir o desenvolvimento celular em cinquenta por cento.

Após a obtenção dos valores de IC_{50} para as amostras testadas da *P. obliquum*, com valor de 1,75 $mg.mL^{-1}$ para EEPO, de 1,205 $mg.mL^{-1}$ para FHex e de 0,579 $mg.mL^{-1}$ para FEtOAc, frente à *S. aureus*, observou-se que a FEtOAc necessitará de 0,579 $mg.mL^{-1}$ para inibir a atividade bacteriana pela metade, enquanto que para o EEPO e FHex esses valores necessitaram ser maiores para que aconteça a mesma redução. Os valores de IC_{50} obtidos frente à MRSA foram de 3,164 $mg.mL^{-1}$ para EEPO e 0,222 $mg.mL^{-1}$ para FEtOAc, demonstrando novamente uma maior atividade antimicrobiana para a FEtOAc (Tab. 5).

Tabela 5 – Valores de IC_{50}[a] do EEPO, FHex, FEtOAc e controle positivo da *P. obliquum* frente à *S. aureus* e MRSA.

	S. aureus		MRSA	
Amostras	IC_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$)	Intervalo de confiança (95%)	IC_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$)	Intervalo de confiança (95%)
EEPO	1,775	0,921 – 2,252	3,164	1,123 – 5,264
FHex	1,205	0,974 – 1,490	*	*
FEtOAc	0,579	0,3752 – 0,672	0,222	0,199 – 0,249
C+	0,116	0,084 – 0,130	1,023	0,768 – 1,663

[a] = Quantidade de amostra necessária para redução de 50% de desenvolvimento celular.
Legenda: S.a.=*Staphylococcus aureus*; MRSA= *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; C+=controle positivo (Cloranfenicol); * = amostra não utilizada

Os três resultados, CIM, viabilidade celular e IC_{50}, corroboram entre si. Nos três testes, a FEtOAC demonstrou melhores resultados para a atividade antimicrobiana frente aos dois microrganismos testados e o EEPO menor eficiência. A explicação para isso pode estar no fato de que os extratos estão mais concentrados em relação à quantidade de metabólitos, e as frações, que foram submetidas a uma maior purificação, possuem menor concentração em relação a esses metabólitos. Isso permite que as frações ajam de forma mais eficiente já que as substâncias com atividades biológicas sofrem menor impedimento das demais substâncias.

Todavia a investigação fitoquímica da *P. obliquum* é importante para o isolamento da(s) substância(s) responsável(éis) pelas atividades antimicrobianas sugeridas pelos testes realizados neste trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para o óleo essencial, extrato etanólico e frações da *Piper obliquum* sugerem que a planta, coletada na ESEC Cuniã, pode ser uma candidata em potencial para novas pesquisas e desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos a partir dos compostos fixos da espécie.

O óleo essencial das folhas da *P. obliquum* demonstrou atividade antimicrobiana frente á *S. aureus* e MRSA no teste de difusão em ágar, mas não foi testado para microdiluição em meio líquido, necessitando ainda, ter sua CIM e IC_{50} determinados como as demais amostras testadas.

Entre todas as amostras da planta, em ambos os testes antimicrobianos, a fração acetato de etila (FEtOAc) foi a que demonstrou melhor atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* e MRSA, gerando uma CIM e IC_{50} de menores valores entre as demais, sugerindo uma seu potencial como fração a ser escolhida para estudos futuros.

Diante do exposto faz-se necessário um aprofundamento no estudo da espécie no que diz respeito a sua composição química e mecanismo de ação dessas substâncias frente aos microrganismos sensíveis a elas para posteriores pesquisas em relação a sua atividade biológica.

REFERÊNCIAS

ABREU, O. A.; SÁNCHEZ, I.; PINO, J.; BARRETO, G. Antimicrobialactivityof*Piperaduncum*subspossanumessentialoil. **International Journal of Pytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 205-208, 2015.

AHMAD, F.; EMRIZAL; SIRAT, H. M.; JAMALUDIN, F.; MUSTAPHA, N. M.; ALI, M.; ARBAIN, D.; ENENIN-ABOUL, H. Y.; Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Piper porphyrophyllum* (Fam. Piperaceae).**Arabian Journal of Chemistry**, n. 6, p. 1031-1033, 2014.

AIZZO, J. R. e S.**Variabilidade Química do Óleo Essencial da *Piper obliquum* Ruiz &Pav. da Estação Ecológica Cuniã, Porto Velho-RO**. 69f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho/RO.

AKTHAR, M. S.; BIRHANU, G.; DEMISSE, S.Antimicrobial activity of *Piper nigrum* L. and *Cassia didymobotyra* L. leaf extract on selected food borne pathogens.**Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 2, p. 911-919, 2014.

ALBUQUERQUE,C. F. G. de; SILVA, A. R.; BURTH, P.; ROCCOC, P. R. M.; FARIA, M. V. C.; NETO, H. C. C. F., Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lungdisease. **InternationalJournal Medical Microbiology**, v. 55, p. 1641-1644, 2016.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanumspecies.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 40, p. 4168-4170, 2001.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". **RevistadeSaúde Pública**, v. 34, p. 578-80, 2000.

ALMEIDA, M. Z. de.**Plantas Medicinais**.3 ed. Salvador, EDUFBA, 2011. Disponível em: <http://books.scielo.org>. Acesso em: 12 dez. 2016.

ANANIAS, M. **Métodos biológicos e moleculares no estudo dos fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas por hemocultura de pacientes com septicemia**. 53f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2006.

ANGELES, G. R. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Pública de México**, v. 44, n.5, 2002.

ARAUJO, I. S. **Atividade Antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no Estado de Pará**. 103f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS/BA,2011.

ARAÚJO, J. C. L. V., LIMA, E. O., CEBALLOS, B. S. O, FREIRE, K. R. L., SOUZA, E. L., SANTOS FILHO, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre

microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v.33, p. 55-64, 2004.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZ, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas.**Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 58, v.3, p. 440-446, 2006.

ASM – American Society for Microbiology, Microbe Library.Disponívelem: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2007/07/pseudomonas-aer.html. Acessoem: 10 jul 2017.

ASTUTI, P. A.; WHAYONO; NABABAN, O. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *Piper crocatum*Ruiz&Pav.**Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 592-596, 2014.

ATC - Advanced Technologies Center, Gallery. Disponível em:<http://www.nanoscopy.net/en/gallery.shtm>. Acesso em: 18 mai 2017.

BARROSO, G. M.**Sistemática de Angiospermas do Brasil**. São Paulo, EPU/USP. 1978.

BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M. L. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylumnaranjillo*.**PlantaMédica,** v. 65, p. 541-544. 1999.

BHAVANANI, S.M; BALLOW, C.H.New agents for Gram-positive bacteria.**Current Opinion Microbiology**, v. 13, p. 528-534, 1992.

BERGER, J. Science Photo Library. Disponível em: <https://www.sciencephoto.com/media/11601/view> Acesso em: 02 mar 2017.

BEZERRA, D. P.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; VASCONCELLOS M. C. de; SILVA, A. C. R. de; MORAES, M. O. de; SILVEIRA, E. R.Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum,* in yeast and mammalian V79 cells. **Science Direct,** v. 652, p.164-174, 2008.

BLACK, S. R.; BONTEN, M. J. M.; WEINSTEIN, R. A. Enterobacteriaceae. In: Mayhall, C. G., **Hospital Epidemiology and Infection Control**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

BLUMENTHAL, M.; SING, Y. N. Pharmacology of kava and its constituints.**HerbalGramAmerican Botanical Council**, v. 39, p. 50-56, 1997.

BODEY, G. P.; BOLIVAR, R.; FAINSTEIN, V.; JADEJA, L. Infectionscausedby*Pseudomonas aeruginosa*. **Revista InfectiousDiseases**, v. 2, n. 5, p. 279-313, 1983.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O.; Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários

das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.2, p. 129-135, 1999.

BOUCHER, H.; MILLER, L. G.; RAZONABLE, R. R. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.**Clinical Infectious Disease**, v. 2, n. 51, p. 183-197, 2010.

BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.**Clinical Infectious Diseases**, v. 5, n. 46, p. 344-349, 2008.

BRUNI, R; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M., ROMAGNOLI, C., SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocoteaquixos*(Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**,v. 3, n. 85, p. 415-421, 2004.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food and Microbiology**, n. 94, p. 223-253, 2004.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*.In.: TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**.3 ed, São Paulo, Atheneu, p.215-228, 2002.

CARVALHO, C.; BEREZIN, E. N.; PISTELLI, I. P.; MÍMICA, L.; CARDOSO, R. R. A.Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 9, n. l, p. 70-6, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS (CLSI), **Performance Standards for Antimicrobial discs and dilution susceptibility tests for bacteria isolated for animals**, 3ª ed., Pensilvania: CLSI, documento M31-A3, 99p, 2008.

COSTA, G. M.; ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHOS, B., P. Antimicrobial effects of *Piper hispidum* extract, fractions and chalcones against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **Journal de MycologieMédicale**, v. 26, p. 217-226, 2016.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. Química Nova, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial nadescoberta de fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtosnaturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 1. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007.

CURSINO, L. M. C.; SANTOS, I.; MARIÚBA, L. A. M.; JEFFREYS, M. F.; LIMA, N. M.; OLIVEIRA, J. L.; ORLANDI, P. P.; NUNEZ, C. V. Antibacterialativityof*Minquartiaguianensis*extractsandphytochemicalevaluation**.** **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, n. 6, p. 505-510, 2011.

CRONQUIST, H.An Integrated System of Classification of Flowering Plants, New York, Columbia University Press, EUA, 1981.

DEFILIPPIS, R.A., MAINA, S.L.; CREPIN, J. Medicinal Plants of Guianas (Guyana, Surinam, French Guianas).**National Museum of History**, Washington, 2004.

DIGNANI, M. C., SOLOMKIN, J. S., ANAISSIE, E. Candida. In: Anaissie, E., McGINNIS, M. R., PFALLER, M. A. Medical Mycology. 1ª ed., Churchill Livingstone, Filadélfia, 2003.

DUARTE, M.C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. DELARMELINA, C. Anti Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA. Prevención de La *E. coli*en alimentos. Disponível em: <http://www.fao.org/alc/ file/media/pubs/2011/prevecoli.pdf> Acesso: 03 out. 2017.

FARMER, J. J.; DAVIS, B. R.; HICKMAN-BRENNER, F. W.; McWHORTER, A.; HUNTLEY-CARTER, G. P.; ASBURY, M. A.; RIDDLE, C.; WATHEN-GRADY, H. G.; ELIAS, C.Biochemical identification of new species and biotypes ofEnterobacteriaceae isolatedfrom clinical specimens. **JournalofClinicalMicrobiology**, v. 21, p. 46–76, 1985.

FENNEL, C. W.; LINDSEY, K. L.; Mc GAW, L. J.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I; ELGORASHI, E. E. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **JournalofEthnopharmacology**; v, 94, p. 205-217, 2004.

FERREIRA, W.F.C; SOUSA, J.C.F. **Microbiologia**.Lisboa, v. 2. Lidel, 2000.

FERREIRA, H, S, M., **Estudo Fitoquímico e Avaliação Antimicrobiana da *Piper renitens* (Miq.) Yunck**. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho/RO, 2006.

FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; SILVA, C. A. L.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de *Piper spp* cultivadas na coleção de germoplasmas do CPQBA-Unicamp. In.:**XXIVSimpósio de PlantasMedicinais do Brasil**, 2016.

FOOGLADDA, S., HAOUHARN, P., SAKULMAIWATANA, P., CHAIPRASERT, A. Comparative evalution of Candi Select test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. **Mycoses**. v. 45, p. 75-78, 2002.

FOSTER, T.J.; GEOGHEGAN, J. A.; GANESH, V. K.; HOOK, M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, p. 49-62, 2014.

GAÍNZA, Y.A.; FANATTO, R.R.; CHAVES, F.C.M.; BIZZO, H.R.; ESTEVES, S.N.; CHAGAS, A.C.; *Piper aduncum* against *Haemonchuscontortus* isolates: Cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **RevistaBrasileira de ParasitologiaVeterinária**, v. 25, p. 383–393, 2017.

GETTYIMAGES. Disponível em: http://www.gettyimages.com/photos>. Acesso em: 20 mai 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADO, M. E.; BRUNI, R. Bioactivitiesof*Piperaduncum*L. and*Piper obliquum* Ruiz &Pavon (Piperaceae) essentialoilsfromEasternEcuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 39-48, 2009.

GUPTA, P. Beta-sitosterol among other secondary metabolites of *Piper galeatum*shows inhibition of TNFa-induced cell adhesion molecule expression on human endothelial cells.**Biochimie**, v. 92, 2010.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and others plants extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1999.

HARDALO, C.; EDBERG, S. C. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. **CriticalReviews in Microbiology**, v. 23, p. 47-75, 1997.

IBÁÑEZ,C. L.; VERDÚ, E. V.; RIVERO, A.; CISNEROS, J. T. Infecciones por bacilos gram-negativos no fermentadores (I): *Klebsiellapneumoniae*, *Acinetobacter sp*., *Serratiamarcescens* y otros. **Medicine**, v. 10, n. 52, p. 3475-3481, 2010.

JACOB, S.W.; TORRE, J.C. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage.**Pharmacological Reports**, v.61, p.225-235, 2009.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n 4, p. 706-716. 2001.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. **2**, p. 123–140. 2004.

KOEHLER, A., DALLEMOLE, D. R., RIÇA, L. B., CORBELLINI, V. A., RIEGER, A. Identificação de três espécies de Candida por PCR em tempo real. **Revista Jovens Pesquisadores**. v. 6, n. 1, p. 58-73, 2016.

LEITE, A. M.; LIMA, E. de O.; SOUZA, E. L. de; DINIZ, M. de F. F. M.; TRAJANO, V. N.; MEDEIROS, I. A. de. Inhibitory effect of *β*-pinene,*α*-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteriaBrazilian. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1, 2007.

LOWY, F. D. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520-532, 1998.

MAMOOD, S.N.H.; HIDAYATULFATHI, O.; BUDININ, S.B.; AHMAD, R, G. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. **BulletinofEntomologicalResearch**, v. 107, 49–57, 2017.

MARQUES, J. V. **Atividade biológica de amidas e análogos de espécies de Piper e estudos biossintéticos**. Tese (Doutorado em Química Orgânica). 375f. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo/SP, 2009.

MARTÃO, V. M.**Atividade antioxidante in vitro de plantas medicinais da Amazônia Ocidental**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). 99 folhas. Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho/RO, 2013.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTINEZ, R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **InternationalJournalof Medical Microbiology**, v. 7, p. 261-268, 2004

MARTINS-DA-SILVA, R.C.V. **Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos. EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL**. Belém-Pará, 2002.

MENEZES, E. A.;SÁ, K. M.; CUNHA, F. A.; ÂNGELO, M. R. F.; OLIVEIRA, I. R. N.; SLAVIANO, M. N. C. Freqüência e percentual de suscetibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, 2007.

MONTIRONI, I. D.; CARIDDI, L. N.: REINOSO, E. B. Evaluationof theantimicrobialefficacyof*Minthostachysverticillata*essentialloilandlimoneneagainst*Streptococcusuberis*strainsisolatedfrombovinemastitis. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 48, n. 3, p. 210-216, 2016.

MOURA, M. E. B.; CAMPELO, S. M. A.; BRITO, F. C. P. de; BATISTA, O. M. A.; ARAÚJO, T. M. E. de; OLIVEIRA, A. D. da S.Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 4, p. 416-421, 2007.

MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; GUPTA, M. P.; ADZET, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. LeafessentialoilsofthreePanamanian*Piper*species. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, 1998.

MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, S. G.; THOMPSON, J. J. H. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.79-95, 2000.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**,Elsevior, 7 ed., Rio de Janeiro, 2014.

MUTUOGLU, M.; UZUN, G. *Pseudomonas* infection in a postoperative foot wound.**Canadian Medical AssociationJournal**, v. 183, n. 8, 2011.

NAKAYAMA, G. H.; MAUREEN, C. C.; MICHAEL, P. N.; ZAHRA, P. Assessment of the Alamar Blue assay for celular growth and viability in vitro.**Journal of Immunological Methods**, v. 26, n. 204, p. 205-208, 1997.

NASCIMENTO, P. F. C;NASCIMENTO,A. C.;RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NASCIMENTO, S. A., ARAÚJO, E. A., SILVA, J. M. da, RAMOS, C. S. Chemicalstudy and antimicrobialactivitiesof*Piperarboreum* (PIPERACEAE), **JournalofChileanChemicalSociety**, v. 60, n. 1, 2015.

NEGRI, M. L. S., POSSAMAI, J. C., NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa –*Maytenusilicifolia* Mart. exReiss., secas em diferentes temperaturas,**BrazilianJournalofPharmacognosy**, v. 19, p. 553-556, 2009.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. InvestigationoftheAlamar Blue (resazurin) fluorescentdye for theassessmentof mammalian cell cytotoxicity.**EuropeanJournalofBiochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OEGGERLI, M. NationalGeographic. Disponível em: https://news.nationalgeographic.com/2016/07/antibiotics-nose-bacteria-mrsa-staphylococcus-health/. Acesso em: 10 ago 2017.

OSTROSKY,E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.;FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **RevistaBrasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OYEDEJI, O. A.; ADENIYI, B. A.; AJAVI, O.;KONIG, W. A. Essential oil composition of *Piper guineense*and its antimicrobial activity,anotherchemotype from Nigeria.**Phytotherapy Research**, v. 19, p. 362-364, 2005.

PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. M.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of Genus *Piper.* **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.

PELLEGRINO, F.L.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. M. da G. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonasaeruginosa* clone in differenthospitals in Rio de Janeiro.**BrazilianJournalofClinicalMicrobiology**, v. 40, p. 2420-2424, 2002.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z.C. de; TEIXEIRA, I. S. de C.; LIMA, S. I. de; CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, 232-237, 2004.

PESSINI, G. L.; ALBIERO, A. L. M.; MOURÃO, K. S. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G. Análise Farmacognóstica de *Piper regnellii*(Miq.) C. DC. var.pallescens(C. DC.) Yunck: Aspectos Botânicos e Enfoque Físico-quimico Preliminar. **Latin American JournalPharmacy**, v. 22, n. 3, p. 209-216, 2003.

PIERI, F. A.; JOSÉ, R. M.; GALVÃO, N. N.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclavedcopaibaoilon*Listeriamonocytogenes*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, 1797-1801, 2010.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella*spp.as nosocomial pathogens: epidemiolgy, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. **ClinicalMicrobiologyReview**, v. 11, p. 589-603, 1998.

POP, Procedimento Operacional Padrão para Antibiograma com Produtos Naturais, **Fundação Oswaldo Cruz,InstitutoLêonidas e Maria Deane**, 2012.

POP, Procedimento Operacional Padrão para Ensaios de Microdiluição em meio de cultura líquidos com produtos naturais sobre bactérias, **Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Lêonidas e Maria Deane**, 2012.

PPBio - PROGRAMA DE PESQUISA EM BIODIVERSIDADE. Disponível em: <http://ppbio.inpa.gov.br/sitios/cunia>. Acesso em: 31 Jul. 2016.

RALI, T.; WOSSA, S. W.; KEACH, D. N.; WATERMAN, P. G. Volatile chemical constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimbum* C. DC (Piperceae) from Papua New Guinea. **Molecules**, v. 12, p. 389-394, 2007.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLORWER, R. J.; HEMDERSON, O.**Farmacologia**. Rio de Janeiro, Elsevier, 6. ed., 2007.

RELLO, J.; VEESENMEYER, J. L.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. **CriticalCare Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1777–1786, 2009.

REHM, S. J.; TICE, A. *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin resistant *S. aureus*. **ClinicalInfectiousDiseases**, v. 51, n. 176–182, 2010.

RIOS, J.L.; RECIO, M. Medicinal plants and antimicrobial plants.**Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 80-84, 2005.

REBELO,R. A. SANTOS, T. G.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; GASPER, A. L. de; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

ROOLINS, D. M.; JOSEPH, S. W. Enterobacteriaceae, 2000. Disponível em: <http//: medic.med.utm.tmc.edu>. Acesso em: 15 ago. 2005.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobianain vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaeabrachypoda***. 101f. Dissertação(Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara/SP, 2012.

RUSSO, T. A.; JOHSON, J.R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinalpathogenicisolatesof*Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-214, 2001.

SANTOS, L. A. dos; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C. de; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES. C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E.; D'OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogoncitratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade econsorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p.436-441, 2009.

SANTOS, D. F. **Características microbiológicas de *Klebsiellapneumoniae*isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial**. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde). Universidade Católica de Goiás, Goiânia/GO. 2007.

SANTOS, R. A.; YOSHIDA, N. C.; RAMOS, C. S.; AMORIM, A. M. A.; KATO, M. J.; BATISTA, R. Alquilfenóis nas folhas de *Piper dilatatum* (Piperaceae). In.:**33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

SANTOS, T. G.;REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; GASPER, A. L. de; CRUZ, A. B.; SCHMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malcophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n.3, p. 477-481, 2012.

SATO, A.F.; SVIDZINSKI, A.E.; CONSOLARO, M.E.L.; BOER, C.G. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 41, p. 397-404, 2005.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G..PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O., et al,**Famacognosia: da planta ao medicamento**.UFSC,6.ed.,Florianópolis/SC, 2010.

SCHULZE, J. e SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. German Medical Journal International. v. 106, p. 837–842, 2009.

SHON, A. S; BAJWA, R. P.; RUSSO, T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, p.1-12, 2013.

SILVA, R. V.; NAVICKIENE, H. M. D.; KATO, M. J.; BOLZNI, V. da S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum*and*Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETRVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta aomedicamento.** 5. ed. Florianópolis/SC, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis/SC, 2010.

SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M, C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SOMMERWERK, S.; KEM, S.; HELLER, L.; CSUK, R. First total synthesisofpiperodione and analogs. **Tetrahedron Letters**, v. 55, 2014.

SOUSA, J. C. F. e PEIXE, L. V. Antibióticos Antibacterianos. In: Ferreira, W. F. C., J. C. F. Sousa, e N. Lima. **Microbiologia**. LIDEL – Edições Técnicas, Lda, 2010.

SOUTO, R.N.P.; HARADA, A.Y.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsissaevissima*(Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 510–517, 2012.

SOUZA, V.C.; H. LORENZI. **“Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II”**. InstitutoPlantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, 2005.

STURENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrumbetalactamases: implications for theclinicalmicrobiologylaboratory, therapy, and infectioncontrol. **JournalofInfection**, v. 47, n. 4, p. 273-95, 2003.

TAYLOR, D. W.; HYCKEL, L. J., Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of Angiosperms.**Plant Systematic and Evolution**, v. 180, p. 137-156, 1992.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 6 ed., 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. Atheneu, São Paulo, 1999.

VALDIVIA, C., MARQUEZ, N., ERIKSSON, J. VILASECA, A., MUÑOZ, E., STERNER, O. Bioactive alkenylphenols from *Piper obliquum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 4120-4126, 2008.

VALIQUETTE, L. Urinary tract infections in women.**Canadian Journal of Urology,** v. 8, p. 6-12, 2001.

VALLE Jr. D. L. V.. CABRERA, E. C.; PUZON, J. J. M.; RIVERA, W. L. Antimicrobial activities of methanol, ethanol and supercritical CO_2 extracts of Philippine *Piper betle* L. on clinical isolates of Gram Positive and Gram Negative bacteria with transferable multiple drug resistance. **PlosOne**, v. 7, 2016. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0146349&type=printable>. Acesso em: 18 mai 2017.

VIEGAS JÚNIOR, C., BOLZANI, V. da S., BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAVARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*.**Food Science and Technology**, v. 50, p. 634-641, 2013.

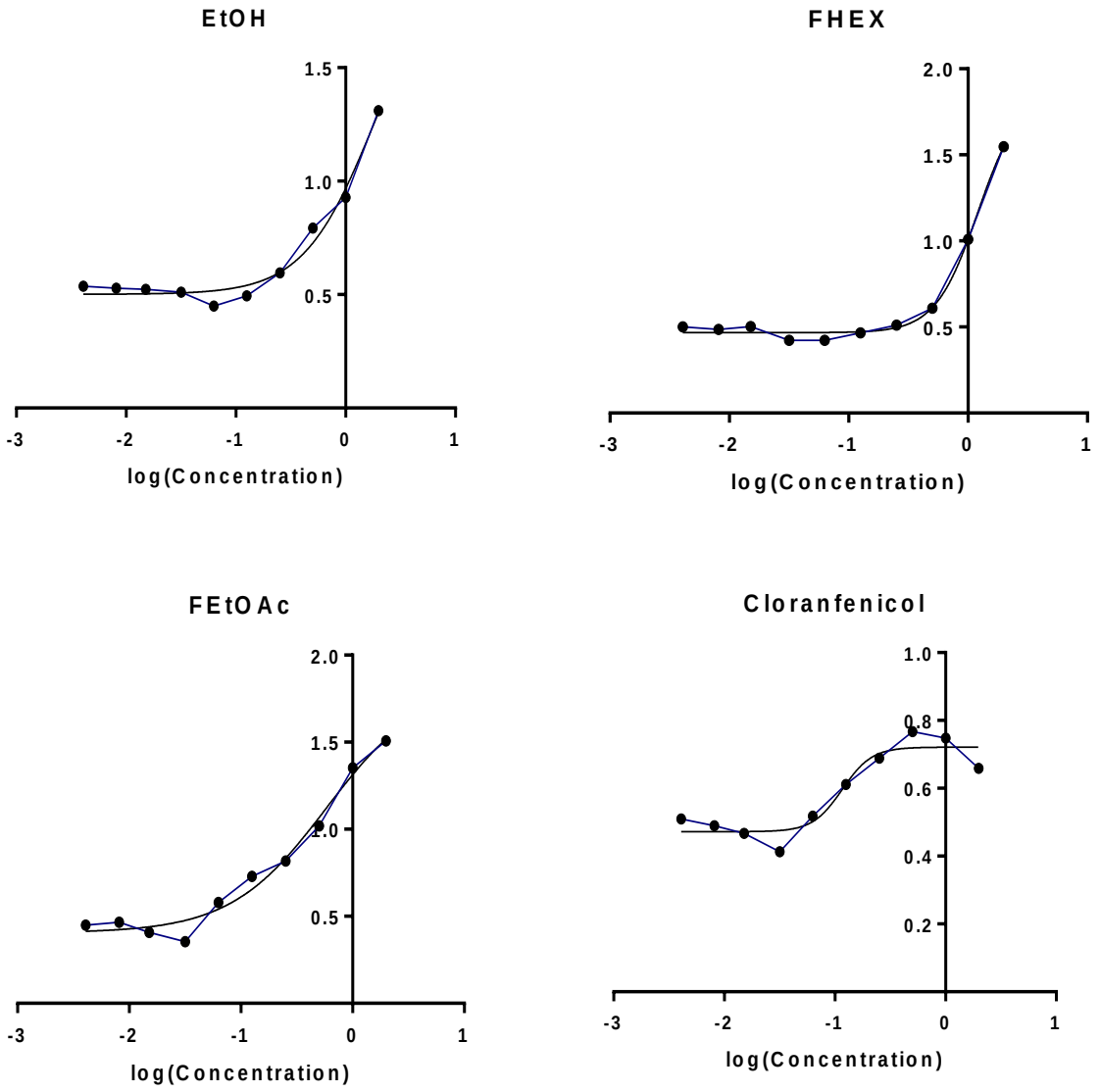
YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil I: Piper Group I, II, III, IV. **Hoehnea**,v. 2, p. 19-366, 1972.

WIART, C.; HANNAH, S. A.; YASSIM, M.; HAMIMAH, H.; SULAIMAN, M.; Antimicrobial activity and tiger’s betel (*Piper porphyrophyllum* N. E. Br., Piperaceae). **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 783-784, 2004.

WHITEHEAD, S. R.; JEFFREY, C. S.; LEONARD, M. D.; DODSON, C. D.; DYER, L. A.; BOWERS, M. D. Patterns of secondary metabolite allocation to fruits and seeds in *Piper reticulatum*. **JournalofChemicalEcology**, v. 39, 2013.

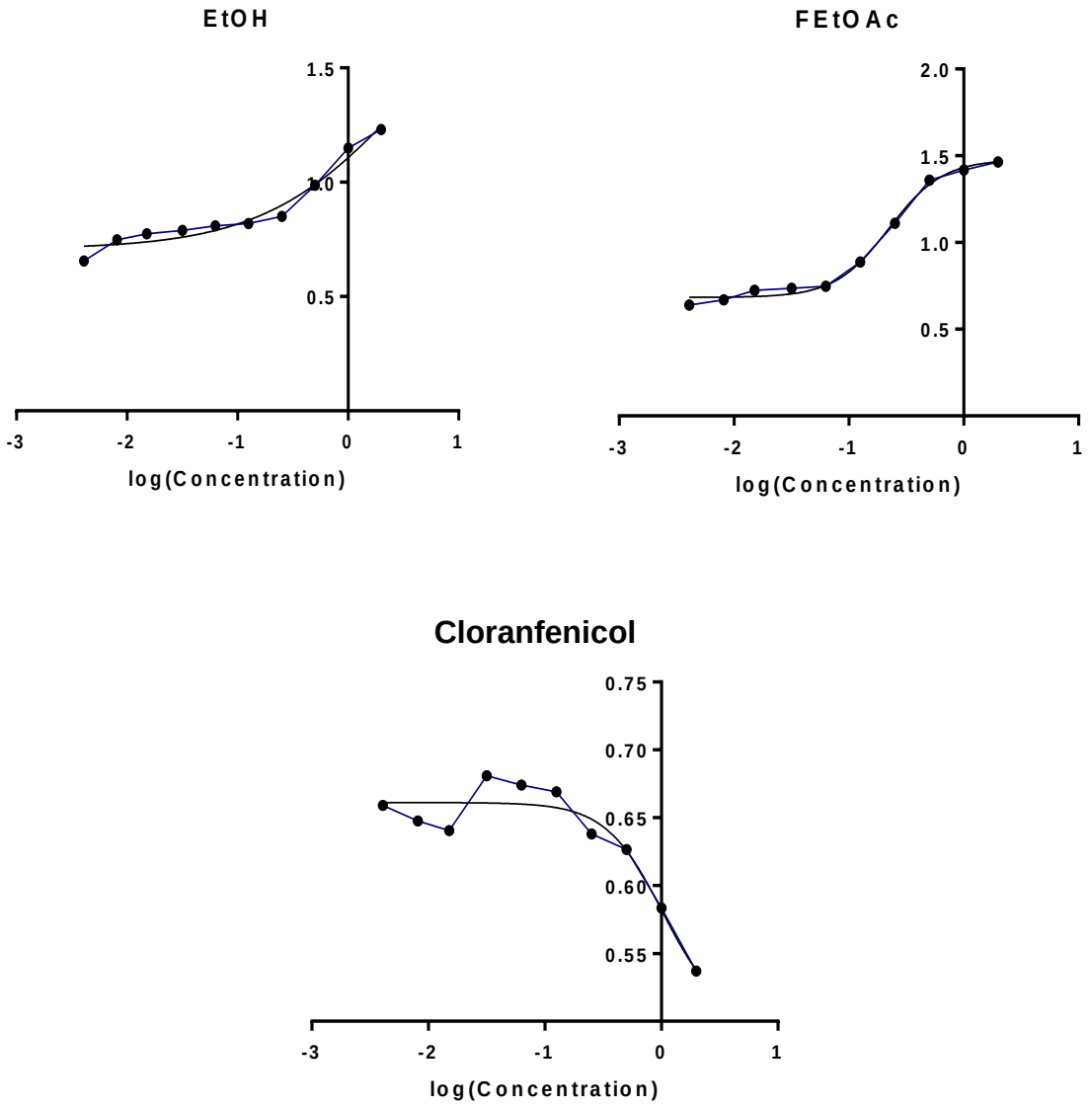
APÊNDICES

Apêndice 1 - Gráficos dose-resposta da ação do EEPO (extrato etanólico), FHex (fração hexano), FEtOAc (fração acetato de etila) e Controle positivo (Cloranfenicol), frente à *S. aureus* após 48 horas de incubação.



Eixo das abscissas: Log das concentrações de 2, 1, 0,5, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015, 0,008 e 0,004 $mg.mL^{-1}$ do EEPO, FHex, FEtOAc e Controle positivo; Eixo das ordenadas: Densidade ótica obtida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm.

Apêndice 2 - Gráficos dose-resposta da ação do EEPO (extrato etanólico), FEtOAc (fração acetato de etila) e Controle positivo (Cloranfenicol), frente à MRSA após 48 horas de incubação.



Eixo das abscissas: Log das concentrações de 2, 1, 0,5, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015, 0,008 e 0,004 $mg.mL^{-1}$do EEPO, FEtOAc e Controle positivo; Eixo das ordenadas: Densidade ótica obtida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm.