



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA21



IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Piper marginatum* OBTIDOS EM MEIO ÁCIDO,  
BÁSICO E NEUTRO.

LÍBNA LARISSA MONTEIRO CLAUDINO

RECIFE, 2019.

LÍBNA LARISSA MONTEIRO CLAUDINO

IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Piper marginatum* OBTIDOS EM MEIO ÁCIDO,  
BÁSICO E NEUTRO.

Monografia apresentada como pré-requisito de conclusão do Curso de Licenciatura Plena em Química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tendo como orientador o Professor Doutor Clécio Souza Ramos

RECIFE, 2019.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C615i Claudino, Líbna Larissa Monteiro  
IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS  
DE *Piper marginatum* OBTIDOS EM MEIO ÁCIDO, BÁSICO E NEUTRO. / Líbna Larissa Monteiro Claudino. -  
2019.  
49 f.

Orientador: Clecio Souza Ramos.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Licenciatura em Química, Recife, 2019.

1. *Piper marginatum*. 2. Óleo essencial. 3. atividade antimicrobiana. 4. atividade antifúngica. 5. atividade  
antibacteriana. I. Ramos, Clecio Souza, orient. II. Título

---

CDD 540

LÍBNA LARISSA MONTEIRO CLAUDINO

IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Piper marginatum* OBTIDOS EM MEIO ÁCIDO,  
BÁSICO E NEUTRO.

Monografia apresentada como pré-requisito de conclusão do Curso de  
Licenciatura Plena em Química, da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco.

APROVADO EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr Clécio Souza Ramos – UFRPE orientador

---

Prof. Dr Cláudio Augusto Gomes da Camara- UFRPE Primeiro Examinador

---

Prof. Dr. Marcílio Martins de Moraes – UFRPE Segundo Examinador

RECIFE, 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pela vida, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada, a minha Mãe Salete, ao meu Pai Alexandre e a minha irmã Yasmmin por serem minha base. Ao Professor Clécio pela paciência, orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta monografia. Aos meus colegas de laboratório, em especial Giselle e Marcílio, aos quais me ajudaram a executar com êxito cada etapa do meu trabalho. Agradeço também aos meus colegas de turma, Carol, Arthur, Camila, Raphaela, André, Maria, Danylo e Natanael pela amizade, pelo apoio aos momentos difíceis que tornaram meus dias mais prazerosos dentro da universidade. A minha melhor amiga Laura, agradeço pela sua amizade e compreensão durante todos os anos do curso, que mesmo longe não permitiu nossa amizade diminuir. A Igor, meu melhor amigo e a pessoa com quem amo partilhar a vida, obrigada pelo carinho, paciência e por me trazer paz na correria desses últimos semestres.

**“Um livro, uma caneta, uma criança e um professor podem mudar o mundo”**

**(Malala Yousafzai)**

## RESUMO

O aumento da resistência dos microrganismos patogênicos aos antimicrobianos convencionais tem sido enfrentado como um problema de saúde pública em nível mundial. O uso generalizado de antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por patógenos favorece a resistência microbiana, tornando ineficaz a ação desses medicamentos. A busca por novos compostos vegetais se torna uma alternativa inovadora como uma excelente fonte de novas moléculas bioativas. O presente trabalho tem por objetivo determinar a composição química, assim como, avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais das folhas de *Piper marginatum* em meio básico, ácido e neutro. A coleta do material vegetal foi feita na reserva dois irmãos situada na cidade do Recife no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os óleos essenciais extraídos das folhas da *Piper marginatum* foram obtidos pela técnica da hidrodestilação, utilizando o aparelho do tipo Clevenger e a identificação de seus constituintes químicos foram determinados por CG-EM. Para obtenção do óleo em meio ácido foi preparado uma solução ácida de ácido sulfúrico: ácido nítrico na proporção molar (1:1), bem como para obtenção em meio básico, foi preparado uma solução básica de hidróxido de potássio a uma concentração de 5 Mol.L<sup>-1</sup>. Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de CMI (Concentração Mínima Inibitória). Os resultados mostraram que o óleo obtido em meio ácido apresentou melhor atividade frente a bactéria gram-negativa *Escherichia Coli* com CMI de 78,1 µg/ml e aos fungos *Candida Albicans* e *Candida Utilis* com CMI de 312 µg/ml e 78,1 µg/ml, respectivamente. As atividades dos óleos em meio básico e neutro foram consideradas de moderadas a fracas para todos os microrganismos testados, e apresentaram CMI que variou entre 625 µg/ml e 2500 µg/ml para ambos os óleos. Sobre a identificação dos constituintes, os compostos majoritários encontrados nos óleos obtidos em meio básico e neutro foram o Macrocarpeno, e Z-Asarona, respectivamente. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento químico e biológico da *P. Marginatum*, que é amplamente divulgada na população como uma excelente planta para fins terapêuticos.

**Palavras Chave:** *Piper marginatum*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, antifúngica, antibacteriana

## ABSTRACT

The increasing resistance of pathogenic microorganisms to conventional antimicrobials has been faced as a worldwide public health problem. The generalized use of antimicrobials in the treatment of infections caused by pathogens indulges microbial resistance, rendering them ineffective. The search for new plant compounds becomes an innovative alternative as an excellent source of new bioactive molecules. This work aims to define the chemical composition, as well as to evaluate the antimicrobial activity of essential oils of *Piper marginatum* leaves in basic, acid and neutral environments. The collection of plant material was made in the reserve dois irmãos located in the city of Recife on the campus of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). The essential oils extracted from *Piper marginatum* leaves were obtained by hydrodistillation technique, using Clevenger type apparatus and the identification of their chemical constituents were determined by GC-MS. To obtain the oil in acidic environments an acidic solution of sulfuric acid: nitric acid in the molar ratio (1: 1) was prepared, as well as to obtain in basic environments a basic solution of potassium hydroxide was prepared at a concentration of 5 Mol.L<sup>-1</sup>. Antimicrobial activity was evaluated using the MIC method (Minimum Inhibitory Concentration). The results showed that the oil obtained in acid environments had a better activity against gram-negative *E. coli* bacteria with a MIC of 78.1 µg/ml and the fungi *C. Albicans* and *C. Utilis* with a MIC of 312 µg/ml and 78.1 µg/ml respectively. The activities of oils in basic and neutral environments were considered moderate to weak for all microorganisms tested, and showed MIC ranging from 625 µg/ml to 2500 µg/ml for both oils. Regarding the identification of the constituents, the major compounds found in the oils obtained in the basic and neutral environments were Macrocarpene, and Z Asarone, respectively. These results contribute to the chemical and biological knowledge of *P. Marginatum*, which is widely publicized as an excellent plant for therapeutic purposes.

**Keywords:** *Piper marginatum*, essential oil, antimicrobial, antifungal, antibacterial.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química da morina.....	14
<b>Figura 2</b> – Estrutura química da quinina.....	14
<b>Figura 3</b> – Estrutura química da salicina, ácido salicílico e ácido acetil salicílico, respectivamente.....	15
<b>Figura 4</b> - Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i> .....	20
<b>Figura 5</b> –Inflorescências e nodos da <i>Piper marginatum</i> .....	21
<b>Figura 6</b> – Folhas da <i>Piper marginatum</i> .....	22
<b>Figura 7:</b> (a) Imagem em microscópio eletrônico de colônias de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> ; (b) Manifestações cutâneas da síndrome da pele escaldada (esquerda) e impetigo (direita).....	25
<b>Figura 8</b> - (a) imagem em microscópio eletrônico da <i>E. Coli</i> ;(b) Colônias de <i>E. coli</i> cultivadas em ágar sangue dezoito horas após a incubação.....	26
<b>Figura 9</b> - (a) imagem de microscópio da <i>B. subtilis</i> ; (b) colônia de <i>B. subtilis</i> cultivado em ágar.....	27
<b>Figura 10</b> – Padronização das multiplicas.....	32
<b>Figura 11</b> – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Piper marginatum</i> obtidos em meio ácido.....	35
<b>Figura 12</b> – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Piper marginatum</i> obtidos em meio neutro.....	36
<b>Figura 13</b> – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Piper marginatum</i> obtidos em meio básico.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Bactérias utilizadas na atividade antimicrobiana.....	31
<b>Tabela 2</b> – Fungos utilizados na atividade antimicrobiana.....	31
<b>Tabela 3</b> – Rendimentos das extrações dos óleos essenciais.....	34
<b>Tabela 4</b> - Compostos identificados no óleo essencial das folhas da <i>P. marginatum</i> extraído em meio ácido.....	34
<b>Tabela 5</b> - Compostos identificados no óleo essencial das folhas da <i>P. marginatum</i> extraído em meio neutro.....	35
<b>Tabela 6</b> - compostos identificados no óleo essencial das folhas da <i>P. marginatum</i> extraído em meio básico.....	36
<b>Tabela 7:</b> Concentração Mínima Inibitória –CMI das amostras dos óleos essenciais obtidos em meio ácido, básico e neutro.....	39

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 OBJETIVOS .....	18
1.1.1 <b>Objetivo geral</b> .....	<b>18</b>
1.1.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>19</b>
2.1 FAMÍLIA PIPERACEAE .....	19
2.2 GÊNERO <i>PIPER</i> .....	20
2.3 <i>PIPER MARGINATUM</i> .....	21
2.3.1 <b>Descrição botânica</b> .....	<b>21</b>
2.3.2 <b>Distribuição</b> .....	<b>22</b>
2.4 USOS .....	22
2.5 ÓLEO ESSENCIAL .....	23
2.6 OBTENÇÃO DO ÓLEO.....	23
2.7 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	25
2.8 MICROORGANISMOS E SUAS CARACTERÍSTICAS .....	25
2.8.1 <b><i>Staphylococcus Aureus</i></b> .....	<b>25</b>
2.8.2 <b><i>Escherichia Coli</i></b> .....	<b>26</b>
2.8.3 <b><i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>27</b>
2.8.4 <b><i>Candida Albicans e Candida Utilis</i></b> .....	<b>27</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	28
3.2 EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	29
3.3 OBTENÇÃO DOS OLÉOS ESSENCIAIS.....	29
3.3.1 <b>Obtenção do óleo essencial da <i>P. marginatum</i> em meio ácido</b> .....	<b>29</b>
3.3.2 <b>Obtenção do óleo essencial da <i>P. marginatum</i> em meio básico</b> .....	<b>30</b>
3.3.3 <b>Obtenção do óleo essencial da <i>P. marginatum</i> em meio neutro</b> .....	<b>30</b>
3.4 ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM) .....	30
3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	30
3.5.1 <b>Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>31</b>
3.5.2 <b>Determinação da concentração mínima inibitória – CMI</b> .....	<b>31</b>

3.5.3	Leitura da microplaca.....	33
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
4.1	RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE <i>P. marginatum</i> EM MEIO ÁCIDO, BÁSICO E NEUTRO .....	34
4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS .....	34
4.3	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA – CMI .....	37
5.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>40</b>
6.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, desde os primórdios são utilizados pela humanidade. A busca incessante do homem pelo alívio e pela cura através de substâncias advindas da natureza foi uma das primeiras formas do uso de produtos naturais. (VIEGAS, BOLZANI, BARREIRO, 2006)

A principal contribuição para o desenvolvimento da terapêutica moderna foi a utilização de plantas medicinais que se deu, a priori, pelos egípcios, indianos e chineses, há mais de 8.000 anos, sendo posteriormente praticado em outras regiões do mundo (BARBERATO FILHO, 2006).

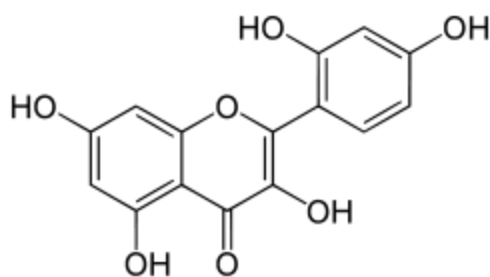
Há registro do uso de algumas plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*) há milhares de anos antes de Cristo. Contudo, somente no século XIX que se iniciou a procura pelos princípios ativos de plantas medicinais, considerados os primeiros medicamentos com as características que se conhece atualmente (CALIXTO e SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

É válido destacar que a história do Brasil está profundamente ligada ao comércio de produtos naturais. Como possuidor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, sua biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial por ser uma fonte de novos fármacos, o que permite uma diversidade para o estudo de produtos naturais. A área de química de produtos naturais é uma das mais antigas no Brasil e uma das que mais formam pesquisadores entre áreas de química (PINTO et al, 2002).

Quando os primeiros médicos portugueses que chegaram no Brasil, se viram diante da escassez na colônia de remédios empregados na Europa, foram obrigados a fazer uso dos produtos naturais com base no conhecimento etnobotânico dos indígenas. Os viajantes sempre se abasteciam desses remédios antes de excursionarem por regiões pouco conhecidas ou desconhecidas. (PINTO et al., 2002).

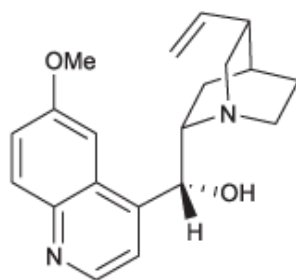
Além dos remédios naturais usados na terapêutica médica, não se pode deixar de mencionar o corante extraído da árvore do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*), o principal produto de exportação da colônia durante mais de dois séculos que também era muito utilizado para tingimento de roupas e como tinta de escrever (VIEGAS, BOLZANI, BARREIRO 2006; PINTO et al., 2002).

Neste sentido, além do pau-brasil, que foi extraído de forma predatória do território brasileiro até quase sua extinção, muitos outros produtos despertaram interesse por parte dos europeus que aportaram na terra recém-descoberta. A morina (Figura 1) obtida de *Chlorophora tinctoria*, foi outro corante natural exportado para a Europa, permanecendo em destaque no comércio até o desenvolvimento da química das anilinas na Alemanha e, até hoje, é utilizada como indicador de açúcares em cromatografia em camada delgada (CCD). (VIEGAS, BOLZANI, BARREIROS, 2006).



**Figura 1** – Estrutura química da morina.

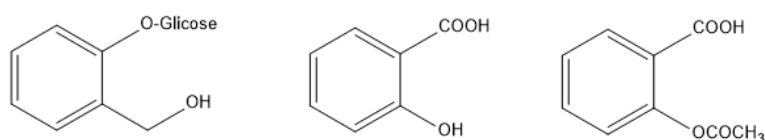
O isolamento de produtos naturais em forma pura se deu no século XIX, e foi um passo decisivo para a criação da indústria farmacêutica. Durante a primeira fase, os produtos naturais se constituíram na principal fonte de insumos para a preparação de medicamentos. A quinina, por exemplo, (Figura 2), foi isolada da casca de quina (*Cinchona Officinalis*) por P. J. Polletier e J. Caventou, em 1820. (COSTA, 2009).



**Figura 2** – Estrutura química da quinina.

O avanço da ciência e da tecnologia trouxeram profundas mudanças sociais e comerciais, culminando com a Revolução Industrial, ocorrida no século XIX. Talvez, o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos a partir do salgueiro branco (*Salix alba*), dentre eles pode-se destacar a salicina (Figura 3) e o ácido salicílico (figura 3). (VIEGAS, BOLZANI, BARREIRO, 2006)

Em 1897, Felix Hofmann pesquisando a cura para a artrite que afligia seu pai, que era sensível aos efeitos colaterais do salicilato de sódio, descobriu o ácido acetil-salicílico (figura 3), menos ácido que o ácido salicílico, mas mantendo a propriedade analgésica desejada. No mesmo ano, a Bayer lança o primeiro fármaco sintético, o ácido acetil salicílico, (aspirina), inspirado na salicina, um glicosídeo natural isolado de *Salix alba*. (COSTA, 2009)



**Figura 3** – Estrutura química da salicina, ácido salicílico e ácido acetil salicílico, respectivamente.

Os avanços da química, da farmacologia e da biologia molecular proporcionou um grande passo para o desenvolvimento da química medicinal. Com isto, os produtos sintéticos foram ganhando destaque dentro do arsenal terapêutico. Além disso, com a chegada da química combinatória no início dos anos 90 e a introdução de novas tecnologias, a química medicinal se tornou mais ampla em sua concepção. Ou seja, essa metodologia de combinação permite utilizar a síntese automatizada e miniaturizada e a farmacologia de forma interativa, reduzindo o tempo de pesquisa, uma vez que produz substâncias análogas com diferentes grupos farmacofóricos ou conformações, ao qual, o objetivo é acelerar a descoberta de potenciais candidatos a fármacos. (AMARAL et al., 2003 apoud GORDON e KERWIN 1998; FENNIRI, 2000; BROCCINI, 2001).

O estudo de produtos naturais como fonte de novas substâncias terapêuticas teve o ápice na indústria farmacêutica ocidental no período 1970-1980, isto

influenciou fortemente a cena farmacêutica. Das 877 novas moléculas de novas substâncias químicas introduzidas entre os anos de 1981 e 2002, cerca de 49% eram produtos naturais, análogos semi-sintéticos de produtos naturais ou farmacofórricos de produtos naturais (KOHEN e CARTER, 2005; NEWMAN e CRAGG, 2003)

Contudo, apesar de todo avanço tecnológico que foi observado durante esse período para a pesquisa de novas substâncias químicas, a quantidade de novos fármacos lançados no mercado não ocorreu de forma proporcional. A química de combinação não conseguiu atingir seu objetivo em fornecer uma significativa pluralidade química. Nesse contexto, os produtos naturais começam a recuperar espaço e importância dentro das indústrias farmacêuticas, vindo a atuar como uma nova fonte de moléculas bioativas. (YUNES e CECHINEL, 2001).

Inúmeras publicações recentes reafirmam a importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos. Dentro desse contexto, se ressaltam os óleos essenciais advindos das plantas, como os óleos de alecrim, hortelã e camomila que possuem atividades terapêuticas. Também pode-se destacar os óleos das espécies *Piper marginatum*, que deu origem ao seguinte trabalho de pesquisa.

Cabe salientar que no âmbito farmacêutico há uma grande disponibilidade de antimicrobianos que é acompanhado de uma publicidade pouco criteriosa, isto tem acentuado ainda mais o uso abusivo desses medicamentos. Dados da organização mundial da saúde (OMS), afirmam que 25% das mortes no mundo são causadas por doenças infecciosas, e 45% em países subdesenvolvidos.

Há provas, cada vez mais concretas, de que o mau uso de antimicrobianos é o principal responsável pela resistência microbiana. Esta resistência é uma adaptação do microrganismo ao seu meio ambiente e resulta em uma redução ou eliminação da eficácia do agente antimicrobiano para curar ou prevenir a infecção causada por este microrganismo. O aumento da resistência é um fenômeno biológico e natural que acontece com a inserção de agentes antimicrobianos. O uso desmedido e irracional tem piorado tal problema. (ANVISA, 2017; WANNMACHER, 2004)

Os antibióticos são a segunda classe de medicamentos mais utilizada em hospitais e responsável por 20 a 50% das despesas hospitalares com medicamentos (ANVISA, 2017), desta forma o controle e a prevenção da disseminação da



resistência microbiana aos antimicrobianos pelos serviços de saúde é indispensável nos dias de hoje.

Devido ao grande aumento de patologias associadas a microrganismos, no caso dos fungos e bactérias, se torna imprescindível e uma questão de saúde pública a descoberta de novos compostos antimicrobianos. Nesse sentido, os produtos naturais se tornam uma alternativa inovadora como uma excelente fonte de novas moléculas bioativas. (COSTA-LOFUTO et al., 2010).

A situação é de alerta mundial, o que torna a proposição da pesquisa extremamente relevante. A proposta e a inovação do trabalho se baseiam em torno da seguinte questão: É possível otimizar o potencial antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum* a partir da mudança do perfil químico de óleo durante processo de obtenção em diferentes pH's?

## 1.1 OBJETIVOS

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antimicrobiana e determinar a identificação química de óleos essenciais das folhas de *Piper marginatum* em meio ácido, básico e neutro.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Obter por hidrodestilação os óleos essenciais das folhas de e *Piper marginatum* em meio ácido, básico e neutro;
- Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *Piper marginatum* através da análise por CG-EM;
- Avaliar as possíveis mudanças na atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Piper marginatum*.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 FAMÍLIA PIPERACEAE

As plantas medicinais são um recurso terapêutico de suma importância e que merece uma grande relevância para a saúde humana, principalmente em países em desenvolvimento. Muitas plantas são usadas na medicina como matéria prima para fabricação de fitoterápicos e a extração de compostos farmacológicos ativos. Além disso, tem importância ornamental, alimentícia e industrial. É utilizada na fabricação de fármacos, temperos, corantes, cosméticos, bebidas medicinais, inseticidas, etc. (FREITAS, 1999; RUSCHEL, 2004)

A Piperaceae é uma das famílias mais antigas dentre as angiospermas. No Brasil, está representada pelos gêneros *Ottonia Spreng.*, *Peperomia Ruiz & Pav.*, *Piper L.*, *Pothomorphe Miq.* e *Sarcorhachis Trel.*, totalizando 450 espécies. A *Piper* e a *Peperomia* são os maiores gêneros, respectivamente com 265 e 166 espécies. O nordeste brasileiro tem a ocorrência de quatro gêneros: *Ottonia Spreng.*, *Peperomia Ruiz & Pav.*, *Piper L.* e *Pothomorphe Miq.*, não tendo sido relatado o gênero *Sarcorhachis Trel.*, exclusivo das Regiões Sudeste e Sul do Brasil. (CRONQUIST, 1981; GUIMARÃES e GIORDANO, 2004).

A classificação botânica, segundo Cronquist (1981), tem-se:

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

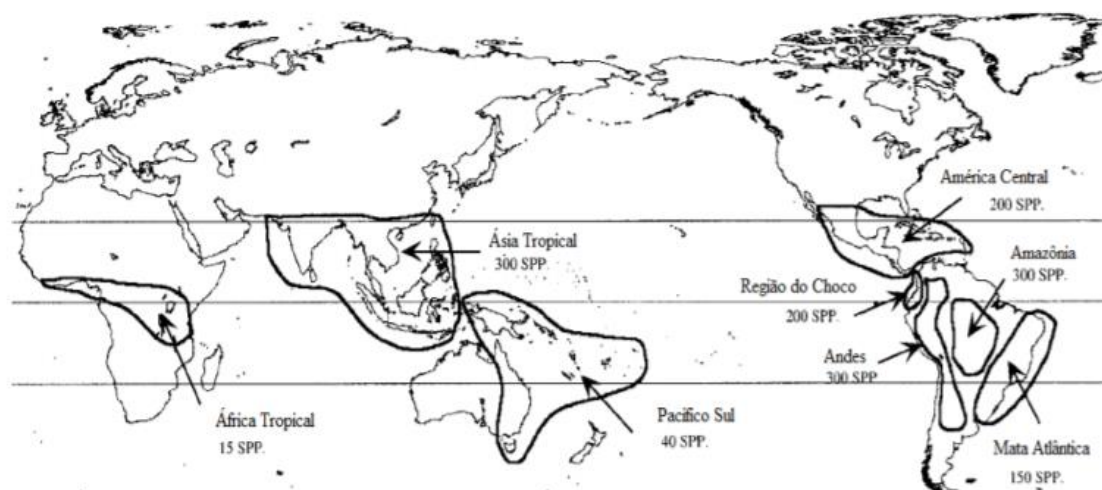
As plantas da família Piperaceae são geralmente caracterizadas por árvores delgadas, comumente finas. Suas folhas variam de 2 mm até 70 cm de

comprimento, possuindo formas variadas. Nas espécies de *Piper*, comumente encontra-se inflorescências associadas a folhas. Atualmente a família *Piperaceae* desperta interesse de pesquisadores, uma vez que apresentam metabólitos com diversas atividades biológicas, principalmente, as espécies pertencentes ao gênero *Piper*. Ela é considerada uma importante família de plantas medicinais e grande promissora na produção de novos medicamentos (TEBBS, 1993; SOUZA, 2019).

A maioria das espécies de *Piperaceae* apresentam metabólitos secundários como fenilpropanóides, lignanas e neolignanas, pironas, amidas alifáticas e aromáticas, alcalóides, policetídeos, derivados de ácidos benzóicos e cromenos (SILVA, 2006). Os metabólitos secundários não são associados com crescimento e desenvolvimento da planta, geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, e possuem atividades biológicas diversas, (BERG e LUBERT, 2008; TAIZ e ZEIGER, 2003).

## 2.2 GÊNERO PIPER

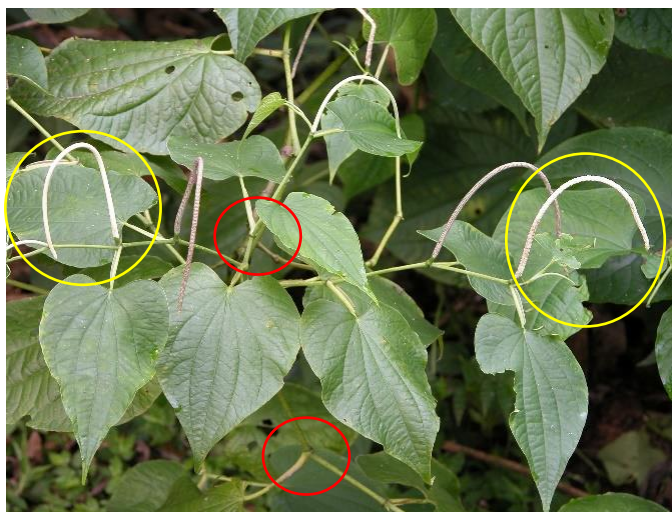
Dentre os gêneros que compreendem a família *Piperaceae*, o gênero *Piper* é um dos mais importantes, sendo conhecido por apresentar um valor econômico e medicinal. No Brasil, o gênero *Piper* é representado por aproximadamente 266 espécies (REIGADA, 2009; GUIMARÃES e GIORDANO, 2004).



**Figura 4** - Distribuição geográfica do gênero *piper*. Fonte: (MARQUES, 2009)

Morfologicamente, as espécies de *Piper* são relativamente uniformes, com folhas simples e com alternâncias, apresentam caules divididos por nodos salientes, onde os galhos quebram com mais facilidade (DYER e PALMER, 2004). Como

característica de sua família, suas inflorescências apresentam espigas ou infrutescências, como pode ser observado na *P. marginatum* (figura 5).



**Figura 5** – Inflorescências e nodos da *Piper marginatum*. Fonte: Pinterest

■ Inflorescências;

■ Nodos.

O gênero é encontrado nas formas de arbustos, ervas, alpinistas, ou arvoretas comuns no sub-bosque de florestas tropicais. Muitas das espécies que fazem parte deste gênero se destacam pelo uso medicinal e pela importância econômica, devido a produção de óleos essenciais utilizados em indústrias de condimentos, farmacêuticas e inseticidas (JARAMILLO et al., 2008).

As espécies do gênero *Piper* possuem uma variedade de metabólitos secundários, que é o principal responsável pelo aumento do interesse medicinal do gênero. (CABRAL, 2017; DYER E PALMER, 2004). Alguns dos metabólitos secundários nesse gênero são representados por compostos fenólicos prenilados, (WADT, GHAUS, KAGEYAMA, 2004).

## 2.3 *Piper marginatum*

### 2.3.1 *Descrição botânica*

As espécies da *Piper marginatum* possuem arbustos com até 5,0 m de altura. Suas folhas apresentam lâminas ovaladas com tamanho de dez a vinte centímetros

de largura e de sete a quinze centímetros de comprimento, pecíolo de dois a seis centímetros, base cordada, ápice agudo ou acuminado, membranácea, glabra em ambas as faces, com exceção da presença da densa ciliação na margem. (GUIMARÃES E GIORDANO, 2004).



**Figura 6** – Folhas da *Piper marginatum* (fonte: flickr)

### **2.3.2 Distribuição**

A *Piper marginatum* é uma planta amazônica e pode ser encontrada na América central, Antilhas e América do Sul. No Brasil, ocorre nos estados do Amazonas, Pará, Ceará, Paraíba e Pernambuco (GUIMARÃES E GIORDANO, 2004)

### **2.4 USOS**

A espécie *P. marginatum* tem sido amplamente reconhecida por seus fins medicinais em várias culturas indígenas. Na Amazônia esta espécie é conhecida como caapeba-cheirosa, nhandi, nhandú, pimenta-do-mato, pimenta-dos-índios e pimenta-betel, sendo usada sob a forma de chá, considerada antiespasmódica para afecções do fígado e baço. Estudos fitoquímicos previamente realizados em raízes, caules, folhas e frutos da *Piper marginatum* descrevem a ocorrência de propiofenonas, amidas fravanóides, alcalóides e aristolactmas, além da composição química do óleo essencial das folhas (REIGADA, 2009 apud RAMOS et al). Um

exemplo disto é que a *P. marginatum* é a única espécie do gênero que contém anetol, estragol, éter metil isoeugenol, os fenilalcanóides 3-farnesil-4-hidroxibenzóico e 3-farnesil-4-metoxibenzóico e os glicosídeos marginatosídeo e vitexina (BRU e GUZMAN, 2016; PARMAR et al., 1997).

## 2.5 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais podem ser descritos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e que possui baixo peso molecular. Esses óleos são originados dos metabólitos secundários das plantas e são geralmente odoríferos e líquidos, possuindo uma composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides (EMBRAPA, 2009; GONÇALVES, et al., 2003; SILVA et al., 2003)

Os óleos essenciais são obtidos geralmente de vegetais, por meio do arraste a vapor d'água, hidrodestilação, podendo também ser obtidos por métodos como enfleurage, extração por CO<sub>2</sub> supercrítico e também por solventes orgânicos apalores (EMBRAPA, 2009). Os óleos essenciais apresentam diversas atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Essas propriedades são de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas (JACOB, *et al*, 2016).

Muitos trabalhos com óleos essenciais têm indicado seu potencial no controle de bactérias e fungos (DEMUNER et al., 2011). “[...] A inibição do desenvolvimento de fungos pode ser atribuída tanto a sua ação direta, que inibe o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto a indução de resistência a diversos patógenos.” (VELOSO, 2012). Para as bactérias, em alguns casos, pode ser pela ação oxidante dos constituintes dos óleos que tem por consequência danificação da membrana celular (MOTANARI et al., 2012).

## 2.6 OBTENÇÃO DO ÓLEO

Os óleos essenciais podem ser extraídos a partir de diversos métodos, dentre esses, se pode destacar a destilação a vapor, sendo o processo mais utilizado a nível mundial, e através dele é possível obter óleo das mais diversas espécies vegetais, seja folhas, raízes, ramos, sementes e etc. O processo consiste em

submeter o material vegetal a ação do vapor d'água que extrai o óleo pelo arraste de vapor. Outro método é a prensagem a frio, mais utilizada para extração de óleos essenciais de frutos cítricos. A prensa, a partir do esmagamento, faz com que o suco do óleo essencial seja expelido simultaneamente pelo fruto. A enfleurage é uma técnica para extração de óleos essenciais de matérias primas mais delicadas, como em caso de extração de óleos essenciais de flores. Outro método que é válido destacar é o supercrítico, muito utilizado na indústria por apresentar vantagens comparadas com outros métodos, como ser uma tecnologia limpa, atóxica e não residual que mantém total integridade das matérias primas, originando produtos de qualidade. E por fim, a hidrodestilação, processo mais utilizado em escala laboratorial, ao qual foi utilizada nesse estudo. Nele, a matéria prima é completamente mergulhada na água, aquecida a uma temperatura inferior a 100 °C, para evitar a perda de compostos sensíveis a altas temperaturas. Os compostos voláteis são levados a vapor, condensados e separados (AZAMBUJA, 2012).

O óleo essencial da *P. marginatum* apresenta algumas propriedades importantes, e uma que vale a pena salientar é a atividade antimicrobiana. Foi comprovada sua atividade fungicida no controle de doenças de plantas para vários fitopatógenos, como *Phytophthora palmivora*, *P. capsici*, *Moniliophthora perniciosa* (SILVA e BASTOS, 2007). Este óleo essencial é polimórfico, variando intraespecificamente, e é marcado pela presença de sesquiterpenos e fenilpropanóides (ANDRADE et al. 2009). Seus principais metabólitos secundários são terpenóides e fenilalcanóides (ANDRADE et al, 2008)

Andrade, et al., (2008), relatou sete quimiotipos em seu estudo com 22 amostras de *P. marginatum*. A composição do óleo essencial da folha, caule e inflorescência de uma espécie de *P. marginatum* coletada no Recife, PE, mostrou que o principal componente era *Z*-asarona (30,4%) no óleo essencial da folha, *E*-asarona (32,6%) no óleo essencial do caule e patchoulol (23,4%) no óleo essencial da inflorescência. Na Costa Rica, uma espécie de *P. marginatum* era rica em anetol (45,9%) e anisaldeído (22,0%), já na *P. marginatum* coletada em Cuba mostrou altas quantidades de isosafrol (37,3%) e notossiranol (22,7%) (AUTRAN, et al., 2009; VOGLER et al., 2006; SANCHEZ et al, 2011). Esses estudos sugerem que existem mais de sete quimiotipos no óleo essencial de *P. marginatum*. Ou seja, esses estudos mostram uma grande variabilidade na composição química da espécie da *Piper marginatum* em diferentes regiões.



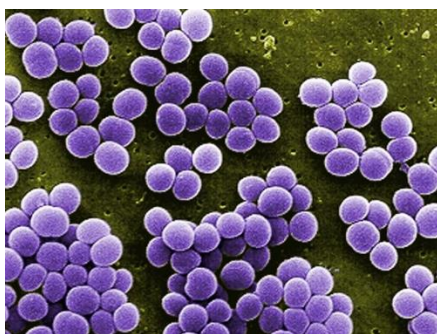
## 2.7 ATIVIDADE BIOLÓGICA

A *Piper marginatum* é um vegetal rico em óleo essencial que apresenta diversas atividades biológicas incluindo inseticidas, larvicida, antimicrobiana e antitumoral (MARQUES, 2009).

## 2.8 MICROORGANISMOS E SUAS CARACTERÍSTICAS

### 2.8.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* são cocos gram e catalises-positivo que possuem aproximadamente 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Este gênero pertence à família Micrococcae, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. O gênero geralmente faz parte da microbiota da pele normal do homem. *S. aureus* é a que apresenta maior interesse médico, pois esta pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras. Esta espécie possui uma enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007; NOBRE, 2017).



(a)

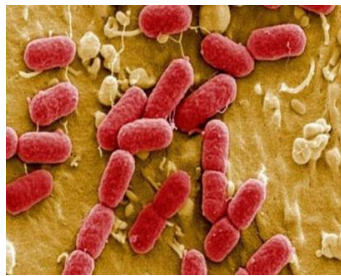


(b)

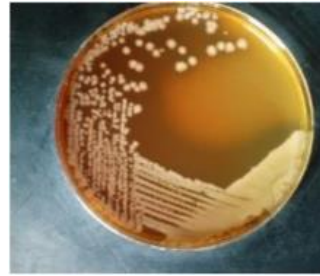
**Figura 7** - (a) Imagem em microscópio eletrônico de colônias de bactérias *Staphylococcus aureus* (Fonte: food safety brazil); (b) Manifestações cutâneas da síndrome da pele escaldada (esquerda) e impetigo (direita) (Fonte: SANTOS et al, 2007).

### 2.8.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria que pertence à família Enterobacteriaceae, ao qual se encontra em abundância na natureza, tendo como principal habitat o trato intestinal humano e animal (SOUZA, et al., 2016). O gênero *Escherichia* é composto por seis espécies: *Escherichia albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulnerise* e *E. coli* (NOBRE, 2017). *E. coli* é uma bactéria Gram negativa, fermentativa, anaeróbias facultativa, cultivada facilmente em meios de cultura de rotina. Esta possui a forma de bastonetes (extremidades arredondadas), mede cerca de 1,1 e 1,5 mm de diâmetro e 2 a 6 mm de comprimento.



(a)



(b)

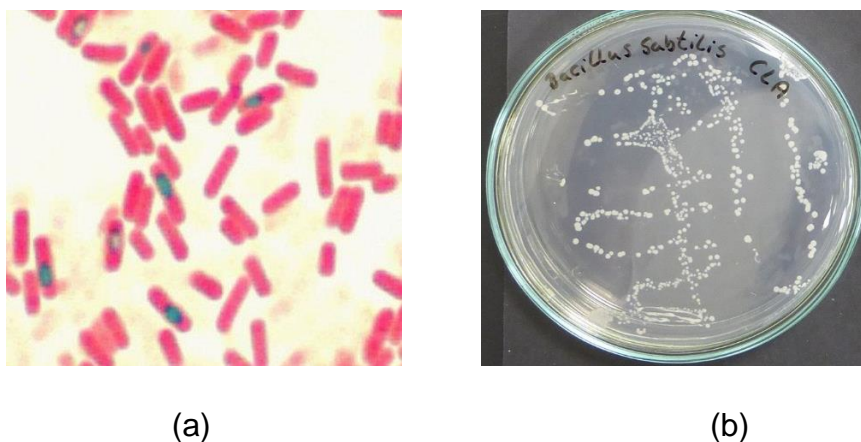
**Figura 8** - (a) imagem em microscópico eletrônico da *E. Coli*; (fonte: exame abril) ;(b) Colônias de *E. coli* cultivadas em ágar sangue dezoito horas após a incubação (Fonte: Gettyimages).

*E. coli* atinge a flora intestinal humana poucas horas após o nascimento. É considerado um microrganismo comensal inofensivo da flora normal, existindo cepas que podem ser patogênicas e gerar doenças como a diarreia. Este microrganismo também é responsável por infecções extra-intestinais, como *E. coli uropatogênica*, associadas às infecções do trato urinário e a *E. coli* relacionada a meningite/sepsis (NOBRE, 2017; RUSSO e JOHSON, 2000).

Sua maior diferença de outros microrganismos é a capacidade de gerar doenças por causa de sua informação genética relacionada a produção de toxinas, destruição de tecidos, interferência no metabolismo da célula, capacidade de adesão e invasão de células hospedeiras (FAO, 2017).

### 2.8.3 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* é uma bactéria não patogênica, que faz parte da família bacillaceae. Se caracteriza por ser um bastonete gram-positivo, aeróbico facultativo, produtor de ácido acético que é formado de esporos e é bastante encontrado nas águas e nos solos.



**Figura 9** - (a) imagem de microscópio da *B. subtilis* (fonte: ASM MicrobelLibrary); (b) colônia de *B. subtilis* cultivado em ágar (Fonte:wikimedia)

Este microrganismo se torna prejudicial ao ser humano a partir do momento em que as colônias crescem de modo desordenado causando infecções, sendo esta alimentares. A pessoa contaminada pode sentir os efeitos em torno de 10 minutos, podendo durar até dois dias. (HOLANDA, 2017)

### 2.8.4 *Candida albicans* e *Candida utilis*

*Candida* é um gênero de fungos que faz parte da família Cryptococcacea. Este gênero cresce como leveduras e pode ser encontrado em vários ecossistemas, solo, alimentos, água e faz parte da microbiota de homens e animais. Esses microrganismos possui uma enorme capacidade adaptativa, as leveduras se desenvolvem tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose. (MYER, WILSON, HUBE, 2013; GIOLO, 2010)

O gênero *Candida* exibe cerca de 200 espécies. *Candida albicans* é considerada a espécie mais patogênica oportunista, por ser a mais isolada em humanos. É válido também destacar outras espécies que tem sido observadas nas ultimas décadas, como a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. catenulata*, *C. utilis*, *C. viswanathii* e *C. zeylanoides*. Apesar de serem não-*albicans*, possuem certa relevância médica pois tem sido cada vez mais implicadas em processos infecciosos humanos, como a candidíase (GIOLO, 2010; HSUEH et al, 2005)

*C. albicans* e algumas outras espécies da cândida estão presentes em 75% da população, e reside como inofensivo na maioria das vezes no intestino, trato urinário e pele. Entretanto, essas mesmas leveduras podem se tornar patogênicas, caso ocorra um desequilíbrio em sua relação com o hospedeiro, isso acontece, quando há, por exemplo, uma redução da imunidade. (BERMAN, 2012; MYER, WILSON, HUBE, 2013; GIOLO, 2010)

*C. Utilis* é outra espécie do gênero *Candida* que vem ganhando destaque por ser amplamente empregada na área industrial, seu principal uso é em reações de fermentação alcóolica, resultando em diversos compostos orgânicos, como o acetaldeído. Como patógeno, acontece com pouca frequência em fungemias (de baixa virulência, não acomete indivíduos imunocompetentes, podendo ser encontrada no trato digestivo de pacientes hospitalizados), e em cultura gera um distinto aroma que se assemelha ao de pera. (BOUGNOUX, 1993).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 MATERIAL VEGETAL**

A espécie vegetal selecionada para estudo foi a *Piper marginatum*. O tecido utilizado para os experimentos foram as folhas, sendo coletadas na Reserva de Dois irmãos situado na cidade do Recife no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

### 3.2 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os reagentes utilizados para obtenção dos óleos essenciais foram obtidos comercialmente, com pureza P.A., dos fornecedores Vetec, Cinética, Dinâmica e Sigma Aldrich.

### 3.3 OBTENÇÃO DOS OLÉOS ESSENCIAIS

As folhas frescas de *P. marginatum* foram pesadas e em seguida trituradas em um liquidificador com o mínimo de água, e acondicionadas em um balão de fundo redondo com a solução (ácida e básica) preparada anteriormente e submetidos à hidrodestilação utilizando um aparelho do tipo Clevenger modificado por 2h. Em seguida, o hidrolato foi recolhido e os óleos essenciais foram extraídos três vezes com clorofórmio (20mL). As soluções contendo clorofórmio foram tratadas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a fim de remover toda água. Desta forma, as soluções foram filtradas e concentradas em rotaevaporador. Os óleos essenciais foram pesados e armazenados em um recipiente de vidro devidamente fechado na geladeira à temperatura inferior à 8°C. O rendimento foi calculado e expresso em percentual de acordo com a seguinte expressão:

$$R(\%) = \frac{M_{\text{óleo}}}{M_{\text{planta}}} \times 100$$

Onde:

R(%) = rendimento da produção de óleo essencial.

*M<sub>óleo</sub>* = massa de óleo obtida (em g).

*M<sub>planta</sub>* = massa das partes aéreas folhas (em g).

#### 3.3.1 Obtenção do óleo essencial da *P. marginatum* em meio ácido

Foram coletadas 930g de folhas da *P. marginatum* e trituradas com o mínimo de água destilada no liquidificador. Para hidrodestilação das folhas de *Piper marginatum* em meio ácido foi preparado uma solução de ácido sulfúrico: ácido nítrico na proporção molar (1:1) em um volume de 2L.

### **3.3.2 Obtenção do óleo essencial da *P. marginatum* em meio básico**

Foram coletadas 610g de folhas e trituradas com o mínimo de água destilada no liquidificador. Para hidrodestilação das folhas de *P. marginatum* em meio básico, foi preparado uma solução de hidróxido de potássio 5 Mol.L<sup>-1</sup> em um volume de 1L.

### **3.3.3 Obtenção do óleo essencial da *P. marginatum* em meio neutro**

Foram coletadas 650g de folhas e trituradas com o mínimo de água destilada no liquidificador. Para hidrodestilação das folhas de *Piper marginatum* foi utilizado um volume de 1L de água destilada.

## **3.4 ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM)**

A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada em um CG-EM da VARIAN utilizando-se uma de capilaridade com sílica (30m x 0,25mm x 0,25 m). A temperatura da coluna foi programa para 60°C até 240 à 3°C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 240°C e 280°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio, fluxo de 1,5 mL/min, (1:50). Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV por IE. A velocidade de leitura fi de 0.5 scans-1 de m/z 40 a 650. Os óleos essenciais foram analisados por CG/EM, e a identificação foi feita com base na comparação dos índices de retenção (VAN DEN DOLL; KRATZ, 1963), bem como por comparação computadorizada do espectro de massa obtido com aqueles contidos na biblioteca de espectro de massa do NIST do conjunto de dados CG/MS. (ADAMS, 2007).

## **3.5 ATIVIDADE BIOLÓGICA**

### 3.5.1 Atividade antimicrobiana

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Agroindustrial da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Locado no Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) – Dois Irmãos/ Recife-PE. Para avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antimicrobiana, foram utilizados cinco microrganismos provenientes da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco descritos na tabela abaixo. A suspensão dos microrganismos foi padronizada pela turvação aparente no tubo de ensaio contendo solução salina preparada a 0,9g/mL de NaCl.

**Tabela 1** - Bactérias utilizadas na atividade antimicrobiana.

Bactérias	Espécies	Código de identificação
Grã-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	(02)
	<i>Bacillus subtilis</i>	(86)
Grã-negativas	<i>Escherichia coli</i>	(224)

**Tabela 2** – Fungos utilizados na atividade antimicrobiana.

Fungos	Espécies	Código de identificação
-	<i>Candida albicans</i>	(1007)
-	<i>Candida utilis</i>	(1009)

### 3.5.2 Determinação da concentração mínima inibitória – CMI

O teste de CMI foi realizado através da técnica de microdiluição, em multiplacas com 96 poços, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	µg/mL
A	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	2500
B	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	1250
C	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	625
D	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	312.5
E	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	156.2
F	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	78.1
G	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	39.0
H	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●	19.5
	M	S	MI	P		A1				A2			

M= Meio, S= Solvente+Meio, MI= Microrganismo+Meio, P= Padrão+Meio, Amostra 1, Amostra 2. *Fonte:* (AQUINO, 2016).

**Figura 10** – Padronização das multiplicas

Pesou-se 20mg das amostras, cada uma em um respectivo eppendorf e completou-se com solvente diclorometano até o volume 1mL. Para o Quimioterápico padrão foi pesado analiticamente 1g de Metronidazol (padrão das Bactérias Gram Positivas e Gram Negativas) e Fluconazol (padrão dos fungos). Para o CMI (Concentração Mínima Inibitória) foram utilizados 25µL das amostras que foram preparadas para fazer as soluções teste com os óleos com os perfis químicos modificados de *P. marginatum* em meio ácido, básico e o óleo sem modificações. Cada microrganismo foi adicionado em uma multiplica e para cada análise utilizou-se duas placas, onde na primeira em quatro colunas diferentes estavam contidos: o quimioterápico padrão, o solvente, microrganismo e o meio de cultura. Nas demais colunas estavam distribuídos duas amostras. Na segunda placa estavam presentes apenas as amostras distribuídas em 9 colunas. Utilizou-se o meio líquido Mueller Hinton (MH) para Bactérias Gram Positivas e Gram Negativas e o meio Sabouraud (Sab) para Fungos Leveduriformes. Nos poços da solução teste, (Linha A, Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12), foram distribuídos 175µL de meio líquido e adicionou-se 25 µL da solução preparada com a amostra, totalizando nesta primeira linha 200 µL. Nas demais linhas (B, C, D, E, F, G e H, Colunas 6, 7, 8 e 10, 11, 12), coloca-se 100 µL de meio. Na coluna com o solvente, colocou-se 75µL de meio e 25µL de solvente. Na coluna do microrganismo colocou-se 100µL de meio e 10µL dos inócuos



microbianos padronizados. Na coluna do padrão colocou-se 97,5µL de meio e 2,5µL da solução Padrão. Depois iniciou-se a microdiluição seriada, onde o primeiro poço da linha A contendo 200µL (175µL de meio líquido e adicionou-se 25 µL da solução preparada com a amostra) foi homogeneizado e retirados 100µL e depositados no poço da linha B, se sucedeu o mesmo procedimento e depositados na linha C e assim sucessivamente até a linha H. Por fim todos os poços apresentaram 100µL e a diluição iniciou com 2500 e finalizou no ultimo poço com até 19.5µg/mL. No término desta etapa adicionou-se 10µL nos inóculos microbianos em todos os poços, exceto nos poços da coluna com o meio de cultura, na coluna com o solvente e na coluna com o padrão. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 a 24 horas para as bactérias e por 48 a 72 horas para Fungos Filamentosos e Fungos Leveduriformes.

### **3.5.3 Leitura da microplaca**

Após o período de cultivo, as microplacas foram reveladas com a adição de 10µL da solução de risazurina a 0,01% que é umas soluções reveladoras a partir da mudança de coloração, e incubadas por 2 horas ao abrigo de luz para que ocorresse a mudança de coloração nos poços. O teste de CMI define como a menor concentração de um produto testado é capaz de inibir o crescimento de microrganismos, evidenciado pela cor azul inalterada.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *P. marginatum* EM MEIO ÁCIDO, BÁSICO E NEUTRO**

Como apresentado na tabela 3, os rendimentos dos óleos essenciais em meio ácido foram baixos quando comparado ao rendimento do óleo essencial em meio neutro e básico.

**Tabela 3** – Rendimentos das extrações dos óleos essenciais

Meio	Massa do material vegetal (g)	Massa do óleo essencial (g)	Rendimento (%)
Neutro	650	0,827	0,127
Ácido	930	0,027	0,060
Básico	610	0,716	0,117

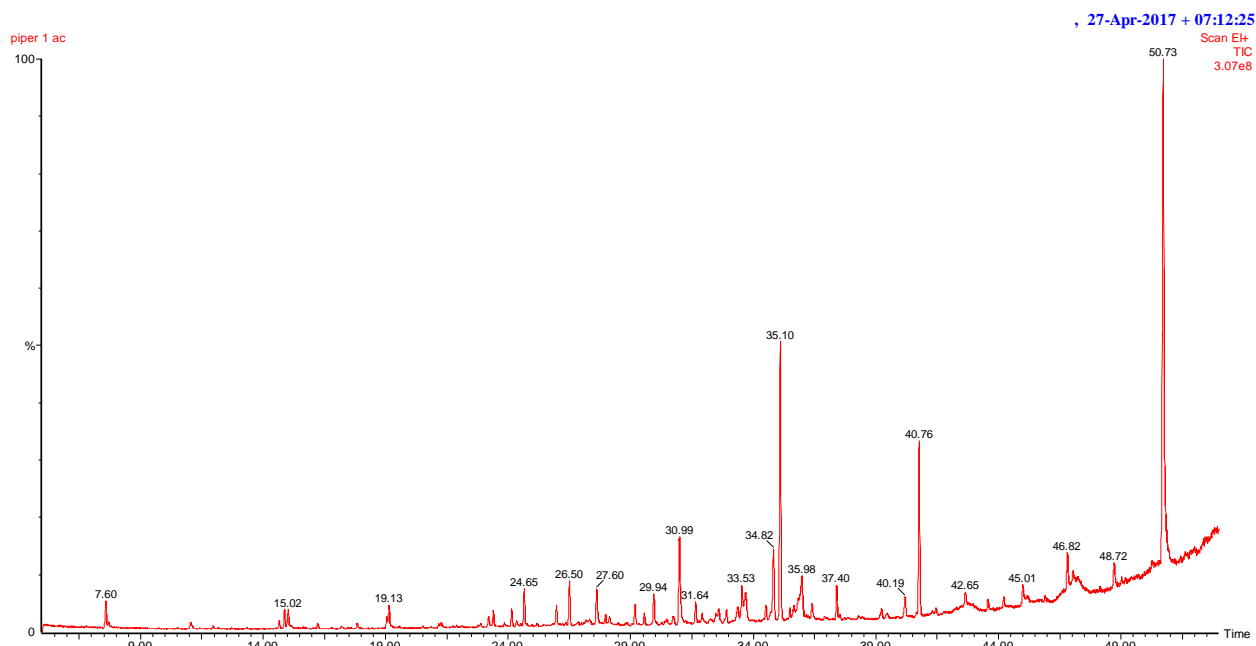
#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os constituintes químicos identificados nos óleos essenciais das folhas em meio ácido, básico e neutro estão listados nas tabelas 4, 5 e 6, na ordem de eluição.

**Tabela 4** - compostos identificados no óleo essencial das folhas da *P. marginatum* extraído em meio ácido

Substância	IR*	AI*
Ácido 5-Metil-Hexanóico	1029	1033
p-Metil Acetofenona >	1185	1179
Ácido Nonanóico	1282	1267
4,8-β-epoxi Cariofileno	1408	1423
Ishwanoe	1452	1465
	1479	X
E-y-Bisabolena	1536	1529
Álcool Cariofilenol	1560	1570
Dilapiol	1626	1620
1,4-hidroxi-9-epi-E-Cariofilenila<	1659	1668
	1666	X
E-Asarona	1689	1675
Z-Lingustilido	1726	1726
	2119*	2119*
1-Docoseno	2190	2190

\*Composto majoritário da *P. Marginatum* obtido em meio ácido

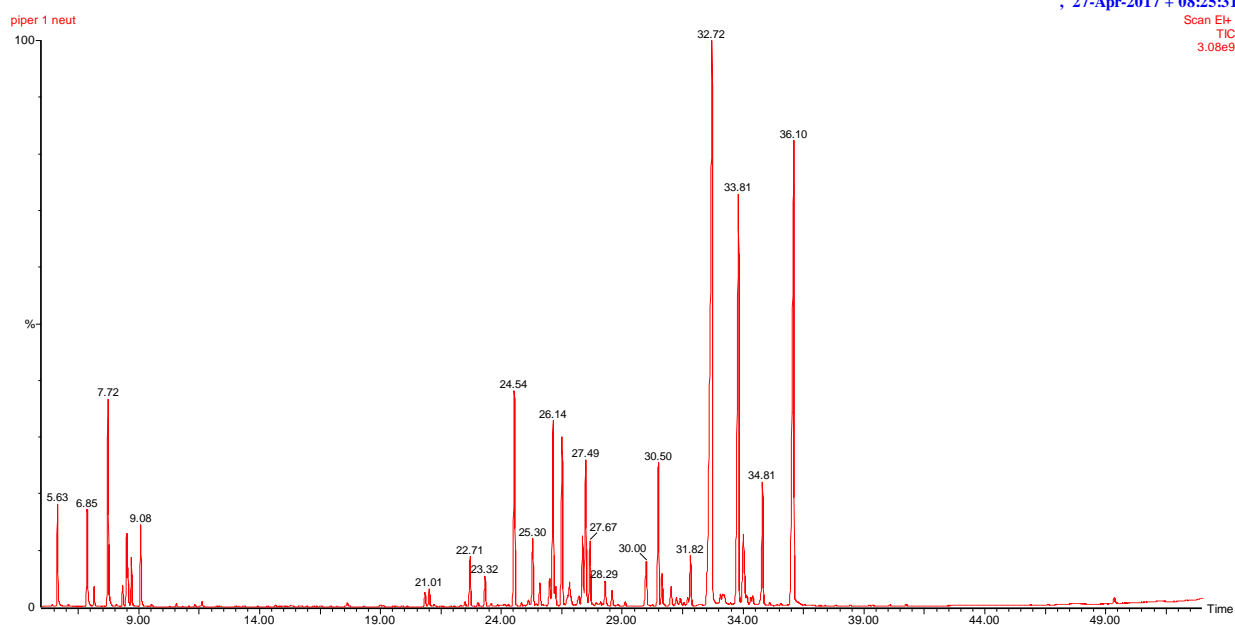


**Figura 11** – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum* obtidos em meio ácido.

**Tabela 5** - compostos identificados no óleo essencial das folhas da *P. marginatum* extraído em meio neutro.

Substância	IR*	AI*
$\alpha$ -Pineno	926	932
$\beta$ -Pineno	973	974
$\beta$ -Fellandreno	1029	1025
Z-Ocimeno ZÉ-/ocimeno	1040	1044(E)/1032(Z)
$\alpha$ -Elemeno	1325	1135
isoledenoo	1364	1374
	1405	X
Aromadendreno	1424	1439
Croweacina	1443	1457
$\alpha$ --Amorfeno	1476	1483
Himachaleno	1480	1481+/-
E-Metilsoeugenol	1495	1491
	1536	X
E-Nerolidol	1548	1561
Carotol	1582	1594+/-
Z-Asarona*	1603*	1616*
Dilapiol	1630	1620
4,6-Dimetoxi-5-vinil-1,2-benzodioxido	1658	1653
E-Asarona*	1689	1675

\*Composto majoritário da *P. Marginatum* obtido em meio neutro

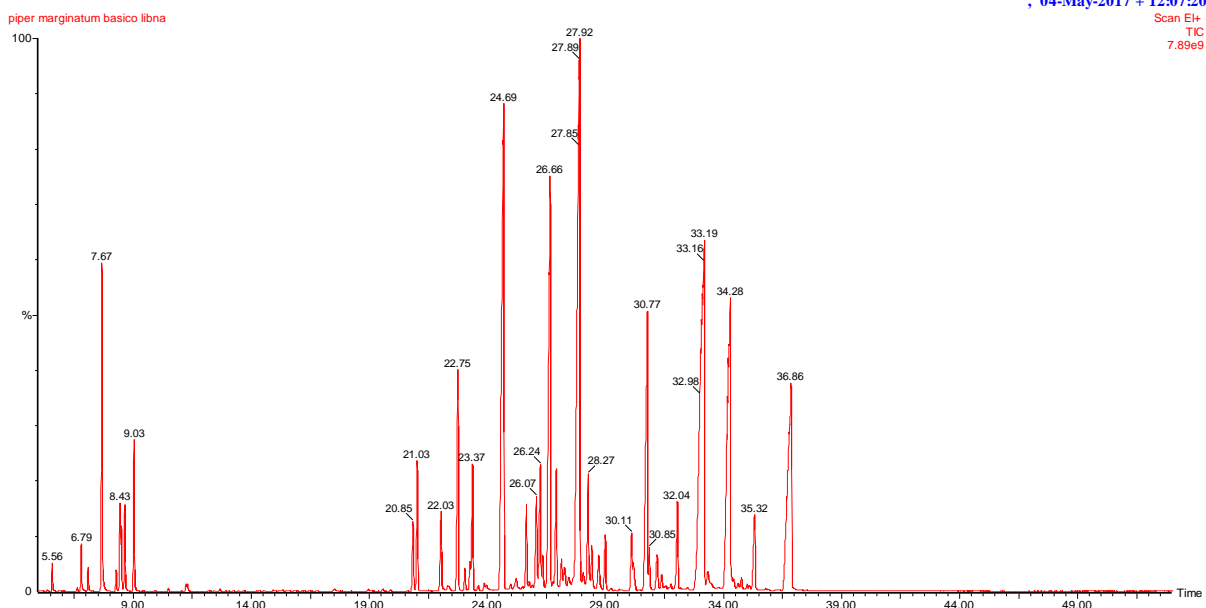


**Figura 12** – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum* obtidos em meio neutro.

**Tabela 6** - compostos identificados no óleo essencial das folhas da *P. marginatum* extraído em meio básico.

Substância	IR*	AI*
$\alpha$ -Pineno	925	932
$\beta$ -Pineno	970	974
$\beta$ -Fellandreno	1026	1025
	1040	X
$\gamma$ -Terpineno	1039	1054
$\alpha$ -Elemeno	1321	1335
$\alpha$ -Elemeno	1326	1335
$\beta$ -Elemeno	1349	1334
	1365	X
$\beta$ -Bourboneno	1379	1387
Carofileno	1410	1417
$\alpha$ -Humuleno	1441	1452
Metiliseugenol	1447	1451
	1455	X
Macrocarpeno*	1483*	1470*
Viridifloreno	1493	1496
	1540	1529
<i>E</i> -Nerolidol	1555	1561
Guaiol	1586	1600
<i>Z</i> -Asarona	1615	1616
Exalatacina	1643	1655
<i>E</i> -Asaronae	1672	1675
	1711	X

\*Composto majoritário da *P. Marginatum* obtido em meio básico



**Figura 13** – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum* obtidos em meio básico.

De acordo com MORAES, *et al.*, (2014), os compostos majoritários obtidos do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum* em seu trabalho “Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum*” (*Variação circadiana do óleo essencial de Piper marginatum*) foram a (Z)-asarona e (E)-asarona analogamente aos compostos majoritários obtidos pelo óleo da *Piper marginatum* em meio neutro neste trabalho de pesquisa. O composto macrocarpeno encontrado como majoritário na extração do óleo em meio básico não foi encontrado no estudo de MORAES, *et al.*, (2014). Assim como a (Z)-asarona composto majoritário no estudo de 2014, não foi identificada na extração em meio ácido.

#### 4.3 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA – CMI

Na Tabela 7, estão representados os valores das concentrações das atividades antimicrobianas das amostras dos óleos essenciais extraídos em meio ácido, básico e neutro. A amostra PÁcido corresponde ao óleo modificado em meio ácido das folhas de *P. marginatum*, a amostra PBásico corresponde ao óleo essencial extraído em meio básico das folhas de *P. marginatum* e Pneutro ao óleo essencial extraído em água destilada.

O óleo essencial obtido em meio ácido apresentou CMI que variou entre 78,1 a 625 µg/mL, com a menor CMI para a bactéria gram-negativa *E. coli* e o fungo *C. utilis*, e maior para gram-positiva *B. subtilis* e *S. aureus*. Ambas CMI, do meio básico e neutro variaram entre 625 e 2500 µg/mL para os microrganismos testados. É válido ressaltar que a ação antibacteriana das plantas ocorre em sua maioria para bactérias Gram-positivas devido aos metabólitos secundários que protegem as plantas do seu meio externo, ao qual é rodeado de gram-positivas (JUSTEN, 2007).

A partir da tabela 7, pode-se observar que a PÁcido, nas bactérias *B.subtilis* (86), *S. aureus* e *E. coli* (224), apresentou resultados mais satisfatórios quando comparado ao ao PBásico e PNeutro. Nos fungos *Candida albicans* (1007) e *Candida utilis* (1009) a PÁcido também apresentou melhores resultados. O óleo obtido em meio ácido merece destaque pelo seu resultado satisfatório frente a gram-negativa *E. coli* quanto ao fato da ação de antibióticos em bactérias Gram-negativas ser lenta, isto acontece pois as bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular composta de várias camadas que diferem na sua composição química, e conseqüentemente, é mais complexa que as paredes das Gram-positivas, que apesar de mais espessa, apresentam predominantemente um único tipo de macromolécula, a mureína (ácido n-acetil murâmico) (JAWETZ, 1991).

De acordo com ALIGIANNIS et al. (2001) são considerados como de forte atividade antimicrobiana óleos que apresentaram CMI de até 500 µg/mL; de atividade moderada, os que apresentaram CMI entre 600 e 1500 µg/mL; e de fraca atividade os que apresentaram CMI acima de 1600 µg/mL. O PÁcido apresentou CMI para o microrganismo *B. subtilis* (86) de 625 µg/mL tendo como resultado uma atividade moderada. Em ambos os fungos a PBásico apresentou uma atividade moderada com CMI 1250 µg/mL para *Candida albicans* (1007) e 625 µg/mL para *Candida utilis* (1009). A PNeutra apresentou atividade moderada apenas para o microrganismo *Candida utilis* com CMI de 625 µg/mL e não apresentou atividade satisfatória para os demais microrganismos.

Considerando que óleos não são frações purificadas, os resultados de atividade antimicrobiana apresentam potencial satisfatório para o desenvolvimento de antimicrobianos naturais.

**Tabela 7:** Concentração Mínima Inibitória –CMI das amostras dos óleos essenciais obtidos em meio ácido, básico e neutro.

<b>Microrganismos</b>	<b>PÁcido</b>	<b>PBásico</b>	<b>PNeutro</b>
<b><i>B. subtilis</i> (86) (+)</b>	625µg/mL	>2500µg/mL	>2500µg/mL
<b><i>E. Coli</i> (224) (-)</b>	78,1µg/mL	2500µg/mL	2500µg/mL
<b><i>S. aureus</i> (02) (+)</b>	625µg/mL	2500µg/mL	<2500µg/mL
<b><i>C. albicans</i> (1007)</b>	312,5µg/mL	1250µg/mL	2500µg/mL
<b><i>C. utilis</i>(1009)</b>	78,1µg/mL	625µg/mL	625µg/mL

## 5. CONCLUSÕES

- É possível a obtenção de óleos essenciais em diferentes meios de pH
- Houve mudança no perfil químico dos óleos extraídos em meio ácido, básico, neutro
- A mudança de meio durante a extração potencializa a atividade biológica, quanto a alguns microrganismos, como pode ser observado na extração em meio ácido.
- O óleo essencial obtido em meio ácido apresentou melhores resultados quando comparados com o meio básico e o meio neutro.



## 6. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadupole mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, Carol Stream, Illinois, 468p, 2007.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal Agricola Food Chemistry**, v. 40, n.9, p.4168-4170, 2001.

AMARAL, P.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V. Química combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Porto Alegre, v. 39, n. 4, p. 351-363, 1 dez. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. **Diretriz Nacional par Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Diretriz+Nacional+para+Elabora%C3%A7%C3%A3o+de+Programa+de+Gerenciamento+do+Uso+de+Antimicrobianos+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde/667979c2-7edc-411b-a7e0-49a6448880d4>. Acesso em: 22 Ago de 2019.

ANDRADE, E. H. A. GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. **Variabilidade química em óleos essenciais das espécies de Piper da Amazônia**. 22ªed. FEQ/UFGA, Belém, Pará, 2009, 448p.

ANDRADE, E. H. A. *et al.* **Variabilidade na composição do óleo essencial de *Piper marginatum sensu lato***. Química e Biodiversidade. v. 5, n. 1, 2008, p.197-208.

AUTRAN, E. S. *et al.* **Composição química, impedimento da ovoposição e atividades larvicidas contra o *Aedes aegypti* de óleos essenciais de *piper marginatum* Jacq. (Piperaceae)**. Bioresource Technology, v.100, n.1, p.2284-2288, 2009.

AZAMBUJA, Wagner. **Métodos de extrações de óleos essenciais. Óleos essenciais, 2012**. Disponível em: <https://www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/>. Acesso em: 20 de set. de 2019.

BARBERATO FILHO, Silvio. **Pesquisa e desenvolvimento de fármacos no Brasil: estratégias de fomento**. 2006. 192 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-17092006-020055/publico/Barberato-Filho.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

BARREIRO, Eliezer J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000300012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300012&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 20 Aug. 2019.

BERMAN, Judith. *Candida albicans*. **Current Biology**, Minneapolis, USA, v. 22, n. 16, p.1-3, out. 2012.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J.. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 545 p BOUGNOUX, M. E.; GUEHO, E.; POTOCKA, A. Resolutive *Candida utilis* fungemia in a nonneutropenic patient. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n. 6, p. 1644-1645, 1993.

BROCCHINI, S. Combinatorial chemistry and biomedical Polymer development. Adv. Drug Deliv. **Rev.,Amsterdam**, Zurich, Switzerland, v. 53, p. 123-130, 2001.

BRU, Jennifer; GUZMAN, Juan David. Medicina popular, fitoquímica e aplicação farmacológica de *Piper marginatum*. **Rev. bras. farmacogn.** Curitiba, v. 26, n. 6, p. 767-779, dezembro de 2016. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2016000600767&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2016000600767&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 20 de setembro de 2019.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement (June 2010, Update). CLSI document M100-S20-U. CLSI, Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standard Institute**, 2010.

COSTA-LOFUTO, L. V. *et al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticancer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da universidade federal do Ceará. **Revista virtual de química**, Fortaleza, v.2, p.47-58, 2010.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98- 106, 2008.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. **Columbia University Press**, New York. 1262p, 1981.

CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 49., 2009, São Paulo. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais**. Jaguariúna, Sp: Embrapa, 2009. 14 p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/577686/1/2009AA051.pdf>>. Acesso em: 07 set. 2019.

COSTA, Paulo R. R. 2009, Rio de Janeiro. **Virtual química: Produtos Naturais como Ponto de Partida para a Descoberta de Novas Substâncias Bioativas: Candidatos a Fármacos com Ação Antiofídica, Anticâncer e Antiparasitária**. Rio de Janeiro: Sdq, 2009. 9 p. Disponível em: <<http://rvq.sdq.org.br/imagebank/pdf/v1n1a08.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

DEMUNER, A.J. *et al.* Seasonal variation in the chemical composition and antimicrobial activity of volatile oils of three species of *Leptospermum* (Myrtaceae) grown in Brazil. **Molecules**, Basel, Switzerland, v.16, p.1181-1191, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6259844/pdf/molecules-16-01181.pdf>. Acesso em: 09 set. 2019.

DYER, L. A., PALMER, A. D. N. **Piper**: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and Evolution. Kluwer Academic Publishers. New York, 228p., 2004. Disponível em: <https://wolfweb.unr.edu/~ldyer/KI059-Dyer-all.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2019.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Preventing *Escherichia coli* in food. 2011. Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/FAO\\_E.Coli\\_FCC\\_2011.06.231.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/FAO_E.Coli_FCC_2011.06.231.pdf) Acesso: 23 set. 2019.

FREITAS, Paulo Chanel Deodato de. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família piperaceae: pothomorphe umbellata (L.) Miq. e Piper**

**regnellii (Miq.) C. DC.** 2000. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-28082008-104803/en.php>>. Acesso em: 23 ago. 2019.

FENNIRI, H. Combinatorial Chemistry. Oxford: **Oxford Press**, 2000, UK. 476p.

GORDON, E. M.; KERWIN Jr, J. F. Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery. **Wiley-Liss**, New York, 516p, 1998.

GUIMARAES, Elsie Franklin; GIORDANO, Luiz Carlos da Silva. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2175-78602004000100021&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-78602004000100021&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 20 ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-78602004558402>

GONÇALVES L. A., *et al.* 2003. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Viçosa, MG, v.6, n. 1, p.8-14, 2003.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.46, n.3, p.225-234,2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442010000300009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442010000300009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt). Acesso em 25 set. 2019.

HSUEH, P.R. *et al.* Antifungal susceptibilities of clinical isolates of *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* Species from Taiwan: Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan Program Data from 2003. **Antimicrob. Agents Chemother.** Taiwan, v. 49, p.512 -517, 2005. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/aac/49/2/512.full.pdf>. Acesso em 20 set. 2019.

HOLANDA, Luís Eduardo Gomes de. **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DOS DIFERENTES TECIDOS DE *Morinda citrifolia* Linn RUBIACEAE.** 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pe, 2017. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/7924/2/Luis%20Eduardo%20Gomes%20de%20Holanda.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2019.

JARAMILLO, A. M. *et al.* A Phylogeny of the Tropical Genus Piper Using ITS and the Chloroplast Intron psbJ–petA. **Systematic Botany**. New York, v. 33, p. 647–660, 2008.

JAWETZ, E.; MELNICK J.L.; ADELBERG E.A.; BROOKS G.T.; BUTEL J.S.; ORNSTON, L.N. **Microbiologia Médica**. 18ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 1991

JUSTEN, M. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies do gênero Piper. Blumenau. (**Dissertação de Mestrado**) **Universidade Regional de Blumenau (FURB), Ciências Farmacêuticas**, 2007.

KOEHN, F. E. CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug Discovery. **Nature reviews drug Discovery**. New York, vol. 4, p. 206-220, 2005. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd1657#Abs2>. Acesso em 23 Ago 2019.

JACOB, R. G. Óleos Essenciais como Matéria-Prima Sustentável para o Preparo de Produtos com Maior Valor Agregado. **Revista Virtual de Química**, Pelotas, Rs, v. 9, n.1, p.1-23, 29 dez. 2016. Disponível em: <<http://rvq.sbgq.org.br/imagebank/pdf/JacobNoPrelo.pdf>>. Acesso em: 7 set. 2019.

MARQUES, Joaquim V. **Atividade biológica de amidas e análogos de espécie de piper e estudos biossintéticos**. 2009. 371 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-15062009-100356/publico/TeseJoaquimVMarques.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2019.

MONTANARI, R.M. *et al.* Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, Viçosa, MG, v.16, p.9728-9740, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6268019/pdf/molecules-17-09728.pdf>. Acesso: 7 set. 2019.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B.. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, Alemanha, v. 2, n. 4, p.119-128, jan. 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/figure/10.4161/viru.22913?scroll=top&needAccess=true>>. Acesso em: 25 set. 2019.

MM Moraes, TMG da Silva, RR da Silva, CS Ramos, CAG da Camara. 2014. Cicardian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 13(3): 270 – 277.

NASCIUTTI, Priscilla Regina. **DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS**. 2012. 36 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012. Disponível em: <[http://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/1%C2%B0\\_Semin%C3%A1rio\\_PRISCILLA\\_NASCIUTTI.pdf?1350665635](http://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/1%C2%B0_Semin%C3%A1rio_PRISCILLA_NASCIUTTI.pdf?1350665635)>. Acesso em: 20 ago. 2019.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. & SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002: A detailed analysis and description of current natural-product-derived therapeutic agents. *J. Nat. Prod.*, V.66, p.1002–1037,2003.

NOBRE, Héli da Soleane Mendonça Ferreira. **Atividade antimicrobiana de extratos e óleo essencial da *Piper obliquum* Ruiz & Pavon**. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2017. Disponível em: <[http://www.pgdra.unir.br/uploads/85796698/menus/dissertacoes/6812\\_helida\\_soleane\\_dissertacao\\_2015\\_2017.pdf](http://www.pgdra.unir.br/uploads/85796698/menus/dissertacoes/6812_helida_soleane_dissertacao_2015_2017.pdf)>. Acesso em: 22 set. 2019.

OLIVEIRA, L. G.; PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 36, n. 10 p. 1577-1586, 2013. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/28941/1/S0100-40422013001000015.pdf>. Acesso em 22 ago. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OPAS/OMS). **El papel del farmacéutico en el sistema de atención de salud. Informe de la Reunión de la OMS: Buenas Prácticas de Farmacia. Normas de Calidad de los Servicios Farmacéuticos**. Tokio, Japón, 1993. 35p. Disponível em: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/ime9848.pdf>. Acesso em: 02 de outubro de 2019.

PARMAR, V. S. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, v.46, p.597-673, 1997.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova*, São Paulo, v.25, supl.1, p.45-61, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000800009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000800009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 20 Aug. 2019.

RAMOS, L. S. *et al.* Essential oil from *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p 712-713, 1986.

REIGADA, Juliana Beltrame. **Bioprospecção em espécies de Piperaceae**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-29072009-114008/publico/DissertJulianaReigada.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2019.

RUSCHEL, Daniel. **O gênero piper (PIPERACEAE) no Rio Grande do Sul**. 2004. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/77970/000425642.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 23 ago. 2019.

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

SÁNCHEZ, Y. *et al.* Projeto do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq. e seus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson. **Rev. Protec.** V. 27, p.39-44, 2012.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.43, n.6, p.413-423, Dec. 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442007000600005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442007000600005&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 22 Set. 2019.

SILVA, A. F. *et al.* Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v.6, p.1-7. 2003. Disponível em: [http://www.sbpmed.org.br/download/issn\\_03\\_2/artigo1\\_v6\\_n1.pdf](http://www.sbpmed.org.br/download/issn_03_2/artigo1_v6_n1.pdf). Acesso em: 25 set. 2019.

SILVA, C. J. *et al.* Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v.33, p.104-108, 2010.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinispellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 143-145, 2007.

SILVA, R. F. 92f. 2006. **Metabolitos secundários das raízes de Piper crassinervium Kunth (Piperaceae)**. Dissertação de Mestrado. São Paulo, SP: USP, 2006. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-20042007-103159/publico/Dissertacaorenata.pdf>. Acesso em 23 set. 2019.

SOUZA, C. O. *et al.* Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, PA, v.7, n. 2, p. 79-91, 2016. Disponível em <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232016000200079&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232016000200079&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso: 23 set. 2019.

SOUZA, L. O. **ATIVIDADE INSETICIDA, RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE Piper callosum Ruiz & Pav.** 2019. 33 f. Monografia (Especialização) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2019. Disponível em: <[http://200.129.163.19:8080/bitstream/prefix/5636/9/TCC\\_LuaneSouza\\_Farmacia.pdf](http://200.129.163.19:8080/bitstream/prefix/5636/9/TCC_LuaneSouza_Farmacia.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2003. 690 p. Disponível em: <<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/PlantPhysiologyTaiz2002.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2019.

VOGLER, B. *et al.* Chemical constituents of the essential oils of three *Piper* species from Monteverde, Costa Rica. **J. Essent. Oil Bear. Plants**, v.9, p.230-238, 2006.

TEBBS, M.C.. Piperaceae. In: Kubitzki, K., Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (eds.). Flowering plants; Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families. Springer Verlag, Berlin, p. 516-520, 1993.

VAN DEN DOLL, H.; KRATZ P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**. Union beach, U.S.A. v. 11, p.463-471, 1963.

VIEGAS, C. J.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a medicina medicinal moderna. **Quím. Nova**, São Paulo, v.29, n. 2, p. 326-337, abril de 2006. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422006000200025&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000200025&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 20 Ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>.



VELOSO, R. A. *et al.* Composição e fungitoxicidade do óleo essencial de capim-citronela em função da adubação orgânica. **Pesq. agropec. Bras.**, Brasília, v.47, n. 12, p. 1707-1713, dezembro de 2012. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2012001200005&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2012001200005&lng=en&nrm=iso)>. acesso em 07 set. 2019.

WADT, L. H. O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of "Pimenta Longa" genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, SP, v. 27, n. 1, p. 74-82, 2004.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibioticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**, Brasília, v. 1, n. 4, mar. 2004.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó, **Argos**. 120p. 2001.