



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO INTERATIVO *in vitro* DE  
EXTRATOS, FASES E COMPOSTOS ISOLADOS DE  
*Piper montealegreanum* YUNCKER**

CAMPINA GRANDE – PB  
2014

**WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO INTERATIVO *in vitro* DE  
EXTRATOS, FASES E COMPOSTOS ISOLADOS DE  
*Piper montealegreanum* YUNCKER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia com especialização Generalista da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raïssa Mayer Ramalho Catão

CAMPINA GRANDE – PB  
2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

R672a Rocha, Wilma Raianny Vieira da.  
Atividade antimicrobiana e efeito interativo in vitro de extratos, fases e compostos isolados de *Piper montealegreanum* Yuncker [manuscrito] / Wilma Raianny Vieira da Rocha. - 2014.  
28 p. : il.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.  
"Orientação: Profa. Dra. Raïssa Mayer Ramalho Catão, Departamento de Farmácia".

1. Atividade antimicrobiana. 2. Produtos naturais. 3. Efeitos biológicos. I. Título.

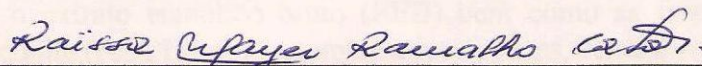
21. ed. CDD 615.321

WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

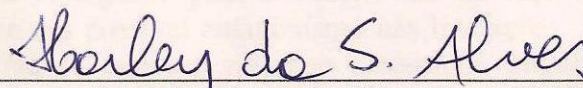
**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO INTERATIVO *in vitro* DE  
EXTRATOS, FASES E COMPOSTOS ISOLADOS DE  
*Piper montealegreanum* YUNCKER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Farmácia com especialização  
Generalista da Universidade Estadual da  
Paraíba, em cumprimento à exigência para  
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

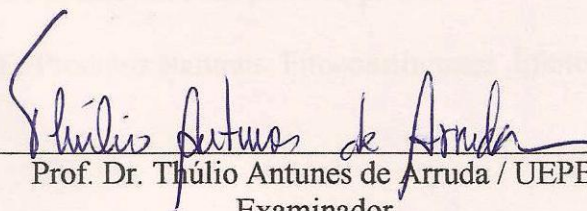
Aprovada em ~~11/07~~ 2014.



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Raissa Mayer Ramalho Catão / UEPB  
Orientadora



Prof. Dr. Harley da Silva Alves / UEPB  
Examinador



Prof. Dr. Thúlio Antunes de Arruda / UEPB  
Examinador

# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO INTERATIVO *in vitro* DE EXTRATOS, FASES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Piper montealegreanum* YUNCKER

ROCHA, Wilma Raianny Vieira

## RESUMO

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos dentre eles a síntese de novas moléculas e modificação molecular de substâncias naturais. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto (EEB), duas fases particionadas (FP) e dois compostos isolados (CI) de *Piper montealegreanum* Yuncker, determinar a concentração inibitória mínima – CIM dos produtos ativos e a interação dos produtos testados com os seguintes antimicrobianos: ampicilina 10mcg (AMP), gentamicina 10mcg (GEN), ciprofloxacino 5mcg (CIP), cloranfenicol 30mcg (CLO), sulfametoxazol 25mcg (SUT), tetraciclina 30mcg (TET), eritromicina 5mcg (ERI), fluconazol 10mcg (FLU) e nistatina 10UI (NY). A avaliação da atividade antimicrobiana e as interações foram realizadas pelo método de disco difusão. Para a interação foram adicionados 20µL da solução de cada produto ao disco do antimicrobiano, os solventes utilizados no preparo dos produtos também foram testados durante a avaliação da atividade antimicrobiana bem como nas interações. Foram testadas quatro cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 76645. Foi possível verificar que tanto o extrato etanólico bruto (EEB) bem como as fases clorofórmica (CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (ACOEt) mostraram-se ativos apenas frente a cepa de *S. aureus* apresentando halos de inibição variando entre 8 a 12mm de diâmetro. As interações realizadas com os antimicrobianos demonstraram potencial de modificação do comportamento da droga *in vitro*, frente as cepa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* verificando possível antagonismo na maioria das interações, já diante da cepa de *E. coli* verificou-se possível sinergismo para a maioria das interações, assim como diante da cepa de *C. albicans*. Através dos resultados é possível concluir que *P. montealegreanum* apresentou atividade antibacteriana, bem como as interações realizadas apresentaram potencial de modificação do comportamento dos antimicrobianos, sendo importante que em estudos futuros seja realizada a identificação e concentração das substâncias ativas em cada parte da planta.

**PALAVRAS-CHAVE:** Piperaceae. Produtos naturais. Efeitos Biológicos.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento as doenças estão relacionadas com a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos (KIMATI et al., 1997). Neste contexto e do decorrente uso etnomedicinal, a fitoterapia é amplamente praticada. Dentre as plantas medicinais mais utilizadas pela população, poucas têm ações comprovadas. Contudo, o uso popular tradicionalmente consolidado tem sido utilizado como guia para pesquisas farmacológicas (ELISABETSKY, 1987; BABU et al., 1997).

O tratamento de doenças infecciosas vem se tornando um problema que cresce significativamente, tendo em vista a disseminação da resistência bacteriana, causando incertezas quando se trata de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos. Dessa forma surge a necessidade de se buscar novos compostos com atividade antimicrobiana que possam servir como alternativa terapêutica no combate a esses micro-organismos. De acordo com Gonçalves et al. (2011), a importância de se estudar a aplicação de novas substâncias obtidas a partir da extração de princípios ativos de diversas espécies vegetais é importante para encontrar formas de inibir ou combater esses patógenos, que constantemente apresentam resistência a antibióticos usuais.

Há séculos, os mais diferentes povos têm procurado tratar doenças com o uso de plantas, sendo que nos últimos 50 anos, pesquisadores dos mais diversos países dedicaram-se a estudar vegetais a fim de validar cientificamente seu poder de prevenir e tratar uma série de problemas. O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES, 2007).

Diante do conhecimento do potencial de atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana) e de outras atividades biológicas existentes em espécies do gênero *Piper*, o que conduziu a realização dessa pesquisa foi o estudo sobre a possibilidade de encontrar atividade biológica, também, nos produtos oriundos do metabolismo secundário dessas espécies vegetais, testando para tanto o extrato etanólico bruto, as fases particionadas e de dois flavonóides isolados, obtidos de *Piper montealegreanum* Yuncker: uma flavanona e da mistura dessa com uma chalcona denominados de 8-formil-3',5-dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona e 3'-formil-3,4',6'-trihidroxi-2'-metoxi-5'-metilchalcona respectivamente, frente às cepas padrão provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana (AA) do extrato etanólico bruto (EEB), das fases particionadas (FP) com solventes em polaridade crescente e dos compostos isolados (CI) de *Piper montealegranum* Yuncker frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 76645, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e interações *in vitro* entre antibióticos de uso convencional, EEB e FP.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Família Piperaceae

A família Piperaceae compreende, aproximadamente, três mil espécies distribuídas em oito gêneros, dentre os quais se destacam os gêneros *Piper* e *Peperomia*. Esta família é muito importante como fonte de substâncias, devido ao seu potencial farmacológico, assim como pela ampla ocorrência e abundância no Brasil onde várias espécies dessa família foram referidas por suas propriedades etnomedicinais. Geralmente, as plantas desses gêneros podem ser encontradas como arbustos, ervas e pequenas árvores. (MABBERLEY, 1997; MENDES et al., 2011).

As investigações fitoquímicas de espécies de *Piperaceae* têm mostrado a presença de metabólitos do ácido mevalônico (monoterpenos e sesquiterpenos), do ácido acético/ácido chiquímico (flavonóides) e vias do ácido chiquímico (lignóides, arilpropanóides e amidas). Os metabólitos mais frequentemente isolados são amidas, aristolactamas, lignóides e fenilpropanóides. Frequentemente observa-se o isolamento de flavonóides, representados por flavonas, diidroflavonas, chalconas e diidrochalconas (SENGUPTA; RAY, 1987).

### 2.2 Atividades farmacológicas e biológicas atribuídas ao gênero *Piper*

Dentre as atividades farmacológicas e biológicas atribuídas ao gênero *Piper* destacam-se as espécies de *Piper regnellii* com atividade antileishmania e antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras (PESSINI et al., 2003; NAKAMURA et al., 2006), *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* com atividade tripanocida (REGASINI, 2009), *Piper aduncum* com atividade sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis* (MAGALHÃES, 2010), *Piper hostmannianum* com a potente atividade antiplasmodial de seus flavonóides (PORTET et al., 2007), além da *Piper hispidinervum* com atividade inseticida de frente a lagarta *Spodoptera frugiperda* (LIMA et al., 2009).

Podem ainda ser citadas as espécies de *Piper umbellatum* com propriedades antifúngicas e antioxidante de aristolactamas (TABOPTA et al., 2008), *Piper tuberculatum* com o efeito mutagênico de pipartina de um alcalóide isolado (BEZERRA



et al., 2008), *Piper methysticum* apresentando atividade sedativa, relacionada com a transmissão dopaminérgica e serotoninérgica (SIMÕES, 2007) e *Piper aduncum* a atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*, atividade antifúngica contra *Penicillium oxalicum* e atividade antiviral contra poliovírus (ASPREY et al., 1953; NAIR et al., 1990; DÉVÉHAT et al., 2002).

Além disso, em estudo preliminar com 7-hidroxi-5,8-dimetoxiflavanona, flavonóide isolado de *Piper glandulosissimum*, foi observada atividade antifúngica contra *Tichophyton mentagrophytes* e *Microsporium canis* e atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (SANTOS, 2004).

### 2.3 *Piper montealegreanum* Yuncker

*Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) é um arbusto nativo do norte Brasil (Yuncker, 1972). Atualmente na literatura existe um número limitado de estudos químicos e que envolvem avaliação da atividade biológica desta espécie. Segundo Alves et al. (2011) foi possível isolar três compostos inéditos a partir do EEB partes aéreas desta espécie, dois flavonóides [(S)-8-formil-3',5-diidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona (1) e 3'-formil-3,4',6'-triidroxi-2'-metoxi-5'-metilchalcona (2)] e um fenilpropanóide [3,4-metilenodioxo-5-metoxi-7,8-diidrocinamato de etila (3)]. Os flavonóides foram disponibilizados para realização deste estudo.

### 2.4 Micro-organismos testados

Inúmeras são as espécies microbianas de importância clínica. Porém, neste estudo, optou-se por avaliar quatro espécies representadas por:

- *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos Gram positivos aeróbios facultativos, freqüentemente encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas e furúnculos) até infecções graves, tais como: pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia (SANTOS et al., 2007).

- *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete Gram negativo aeróbio, não-fermentador, que se apresenta sob a forma de bastonetes, movidos por flagelos polares (TRABULSI et al., 1999) envolvidas principalmente em infecções hospitalares.

- *Escherichia coli* é um bacilo gram negativo anaeróbio facultativo envolvido em septicemias e em choque induzido por endotoxinas, responsável também por infecções do trato urinário e de feridas. (KONEMAN et al., 2001).

- *Candida albicans* é um fungo leveduriforme, sem dúvida alguma a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e em casuísticas de todas as partes do mundo. Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azólicos são conhecidos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos (TRABULSI et al., 1999).

## 2.5 Resistência Microbiana

São considerados micro-organismos resistentes, do ponto de vista epidemiológico, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, EUA, aqueles que sobrevivem a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob a perspectiva laboratorial, entende-se como o crescimento de uma bactéria *in vitro* na presença de concentrações séricas de antibiótico ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que interfeririam em suas funções de crescimento e, às quais seriam habitualmente sensíveis (AZEVEDO, 2005).

Diversos fatores podem contribuir para a ocorrência ou disseminação da resistência bacteriana, dentre os quais aqueles relacionados ao hospedeiro e à pressão seletiva gerada pelos agentes antimicrobianos (AZEVEDO, 2005), sendo a resistência um fenômeno complexo, envolvendo: micro-organismo, paciente, agente antimicrobiano e, ambiente separadamente e/ou em interação (MURTHY, 2001).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

As folhas de *Piper montealegreanum* Yuncker foram coletadas no *campus* de pesquisas do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém-PA. O material botânico foi identificado pela professora Dra. Elsie Guimarães do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e uma exsicata foi depositada no herbário do Museu Emílio Goeldi, localizado em Belém-PA, sob n° MSP-010 e posteriormente enviadas ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba – LTF/UFPB para estudo fitoquímico.

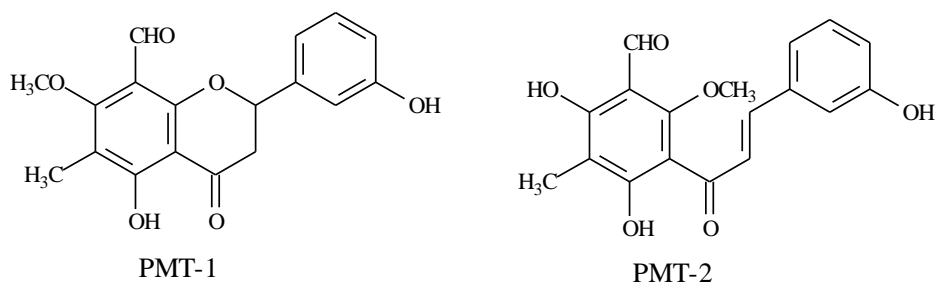
#### 3.2 Origem dos extratos, fases e compostos isolados

O extrato etanólico bruto (EBB), bem como as fases particionadas (FP) do mesmo e os compostos isolados (CI) foram obtidos em parceria com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – LTF/UFPB, onde foram realizadas as etapas de procedimento fitoquímico abordando o recebimento e processamento do material vegetal, obtenção do extrato etanólico bruto (EEB), *screening* fitoquímico, fracionamento e purificação dos EEB e identificação/elucidação das substâncias isoladas.

Para obtenção do EEB foram utilizadas as folhas de *Piper montealegreanum* Y., para obtenção das FP foram utilizados os solventes clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e acetato de etila (ACOEt), sendo os rendimentos dos extratos e fases obtidas utilizados como concentração inicial das soluções analisadas nesse estudo.

O estudo fitoquímico realizado previamente pelo LTF/UFPB sugeriu a presença de alcalóides, flavonóides e terpenos no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Piper montealegreanum* Y. Segundo Alves (2004) foi possível isolar e identificar flavonóides inéditos codificados como PMT-1 e PMT-2 tratando-se, respectivamente, de: 8-formil-3',5-dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona e 3'-formil-3,4',6'-trihidroxi-2'-metoxi-5'-metilchalcona (Figura 1). A elucidação estrutural de PMT-1 e PMT-2 foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas: ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, uni e bidimensionais, infravermelho, ultravioleta e espectroscopia de massas.

Foi recebido para os testes a penas o PMT-1 isolado e uma mistura de PMT-1 e PMT-2 (V:V), não tendo sido testado o PMT-2 isolado.



**Figura 1** - Estrutura molecular de PMT-1 e PMT-2

Fonte: ALVES, 2011.

Este estudo contou, portanto, com o total de cinco (5) produtos testados frente as cepas ATCC. As concentrações dos produtos obtidos foram correspondentes ao rendimento do procedimento de extração realizado, originado produtos com concentração diferentes entre si, as quais foram usadas como concentração inicial para os testes de atividade antimicrobiana.

**Tabela 1** - Identificação dos produtos testados e suas respectivas concentrações

Planta	Produtos Testados	Concentração inicial (mg/mL)
<i>P. montealegreanum</i> Y.(folhas)	Mistura de PMT-1 e PMT-2	15,2
	PMT-1	18,3
	Extrato etanólico bruto (EEB)	384
	Fase clorofórmica (CHCl <sub>3</sub> )	95
	Fase acetato de etila (ACOEt)	411
<b>Total de produtos testados (nº e %)</b>		5 (100%)

**Legenda:** PMT-1- 8-formil-3',5-dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona; PMT-2- 3'-formil-3,4',6'-trihidroxi-2'-metoxi-5'-metilchalcona

### 3.3 Preparação dos produtos para análise

As amostras foram recebidas para análise em frascos de vidro âmbar, contendo identificação de espécie e rendimento (mg) do produto. O EEB, as FP e os CI foram solubilizados em 1,0 mL de uma solução do solvente correspondente a extração ou partição sendo posteriormente submetidas a um banho de ultrassom (Ultrasonic 1440 A) por 15 minutos.

### **3.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana (AA)**

#### **3.4.1 Micro-organismos**

Para este estudo foram utilizadas cepas microbianas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Escherichia coli* ATCC (25922), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) e *Candida albicans* ATCC (76645) recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2010).

#### **3.4.2 Meios de cultura**

Para garantir a viabilidade dos micro-organismos em estoque, foi utilizado o Caldo de enriquecimento BHI (Brain Heart Infusion). E para o cultivo foi utilizado o meio Ágar Muller-Hinton e Ágar Sabourand, preparado em placas de Petri, contendo uma camada de ágar de 4mm de espessura, respectivamente para bactérias e leveduras. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante DIFCO®.

#### **3.4.3 Preparação dos inóculos**

Após o enriquecimento em Caldo BHI, uma alíquota de cada crescimento foi semeada através da técnica de esgotamento por estrias em Ágar Muller Hinton para bactérias, incubando a 37°C por 24h e Ágar Sabourand para a levedura incubando a 30°C por 24/48h, permitindo dessa forma que os micro-organismos estivessem em crescimento exponencial, o que garante segurança maior durante a realização da análise. Após esse período de incubação, algumas colônias foram diluídas em solução salina estéril 0,85% até atingirem a turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland, valor equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL originando uma suspensão bacteriana padrão (CLSI, 2010).

#### **3.4.4 Determinação da atividade antimicrobiana**

Foi realizada inicialmente uma triagem da atividade antimicrobiana do EEB e suas fases frente as cepas microbianas. Utilizando *swabs* esteréis que foram mergulhados na solução salina contendo a suspensão bacteriana previamente padronizada, sendo posteriormente semeados por toda a superfície do meio de cultura (Agar Mueller-Hinton ou Ágar Sabourand) em diversas direções o que permite um crescimento uniforme e confluyente. Em seguida foram adicionados discos de papel de filtro estéreis (CEFAR®) de 6 mm de diâmetro, previamente impregnados com 20µL de cada produto a ser testado,

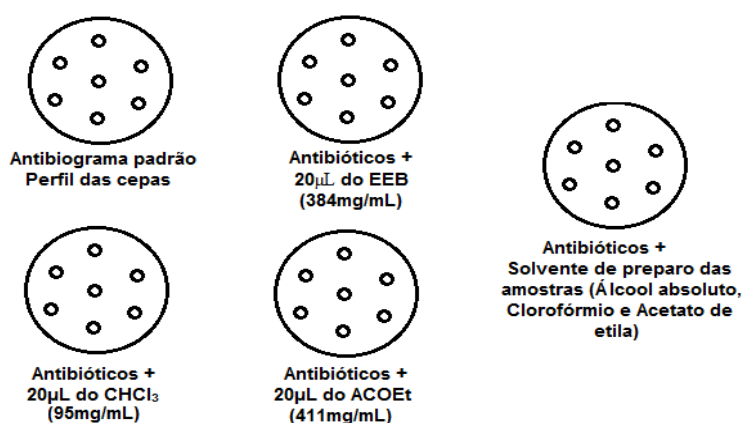
sendo distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar (CLSI, 2010), garantindo que haja espaço para formação de possíveis halos de inibição.

Como controles negativos foram testados todos os solventes utilizados na preparação dos extratos e fases, utilizando-se a mesma metodologia empregada para os produtos em avaliação. Após o semeio e distribuição dos discos, as placas foram incubadas a 37°C/24 h para bactérias e 30°C/24-48h para leveduras, sendo observada a formação de halos de inibição de crescimento, que foram medidos com auxílio de um halômetro (BAUER, KIRBY & TURCK, 1966; CLSI, 2010).

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram expressos pela média aritmética dos valores dos halos de inibição de crescimento, considerando-se como ativo o produto que apresentou halo com diâmetro igual ou superior a 8 mm (PAREKH, CHANDA, 2007; CATÃO, 2007).

### 3.4.5 Determinação *in vitro* do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos convencionais e interação com os produtos vegetais

Foram realizados antibiogramas por disco-difusão em meio sólido de acordo com as recomendações do CLSI (2010). Para os testes de interação foram adicionados 20µL das soluções do EEB, das fases CHCl<sub>3</sub> e ACOEt nos discos contendo os antibióticos, já em outro foram adicionados 20µL de cada diluente utilizado no preparo das soluções que foram álcool absoluto, clorofórmio e acetato de etila e por fim o antibiograma convencional, observando comparativamente se a adição dos produtos acarretaria alguma alteração no tamanho dos halos dos antibióticos isolados, conforme mostra a figura 2.



**Figura 2** – Esquema de realização da interação *in vitro* dos produtos vegetais e antimicrobianos para cada cepa

Os antimicrobianos selecionados para *S. aureus* foram: ampicilina 10mcg (AMP), gentamicina 10mcg (GEN), ciprofloxacino 5mcg (CIP), cloranfenicol 30mcg (CLO), sulfametoxazol 25mcg (SUT), tetraciclina 30mcg (TET) e eritromicina 5mcg (ERI), bem como para a cepa de *E. coli* exceto a eritromicina, enquanto que para *P. aeruginosa* foram testados apenas os discos de CIP e GEN, todos da marca CECON®. Para a cepa de *Candida albicans* foram testados os antifúngicos fluconazol 10mcg (FLU) e nistatina 10UI (NY).

Considerou-se presença de efeito interativo quando houve alteração do diâmetro dos halos de inibição de crescimento microbiano após esta adição. E, como efeito interativo sinérgico, quando o diâmetro do halo de inibição formado pela combinação do produto teste e o antimicrobiano, apresentou aumento  $\geq 2$ mm quando comparado com o halo de inibição formado pela ação do antibiótico testado isoladamente. Quando da formação de halo de inibição decorrente da ação combinada apresentou diâmetro inferior àquele desenvolvido pela ação isolada do antibiótico considerou-se efeito antagônico (OLIVEIRA et al., 2006). Os testes foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética dos halos de inibição.

### **3.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A determinação das CIMs dos produtos ativos também foi realizada por difusão de discos em meio sólido, tomando a concentração inicial como equivalente a 100%. Os produtos que apresentaram atividade antimicrobiana foram diluídos no solvente de obtenção do extrato ou fase, obtendo-se concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125% e novamente testados. A CIM foi determinada observando-se a menor diluição do produto testado, capaz de inibir o crescimento bacteriano, determinado pela presença de halo de inibição do crescimento, após incubação por 24h/37°C (FABRY, et al., 1998; CONSENTINO et al., 1999; ALVES et al., 2000; CATÃO, 2007). Os testes foram realizados em triplicata e os halos de inibição de crescimento formados foram medidos com auxílio de um halômetro, tendo os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros obtidos nos três ensaios e, considerado como suscetível, o halo com uma dimensão igual ou superior a 8 mm de diâmetro (PAREKH et al., 2007; CATÃO, 2007).

### **3.6 Análise estatística**

Os dados foram expressos pela média aritmética dos valores dos halos de inibição de crescimento realizada entre os três valores obtidos pela triplicata dos experimentos, bem como foram expressos os dados de desvio padrão dos resultados.



#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que o EEB e as fases  $\text{CHCl}_3$  e ACOEt de *P. montealegreanum* apresentaram atividade frente a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 com halos de inibição que variaram de 8 a 12 mm. Enquanto que a mistura dos flavonóides PMT-1 + PMT-2 (V:V), assim como o PMT-1 isolado não foram capazes de inibir o crescimento de nenhuma das cepas.

**Tabela 2** - Avaliação da atividade antimicrobiana de diferentes produtos derivados de *P. montealegreanum* Y.

Planta	Produtos Testados / Concentração inicial (mg/mL)	Micro-organismos			
		Diâmetro dos halos (mm) / Desvio padrão dos halos			
		A	B	C	D
<i>P. montealegreanum</i> Y. (folhas)	Mistura de PMT-1 e PMT-2 [15,2]	0	0	0	0
	PMT-1[18,3]	0	0	0	0
	Extrato etanólico bruto (EEB) [384]	9,33±1,63	0	0	0
	Fase clorofórmica ( $\text{CHCl}_3$ ) [95]	12±2,82	0	0	0
	Fase acetato de etila (ACOEt) [411]	8,33±1,00	0	0	0

**Legenda:** PMT-1 - 8-formil-3',5-dihidroxi-7-metoxi-6-metilflavanona; PMT-2 - 3'-formil-3,4',6'-trihidroxi-2'-metoxi-5'-metilchalcona; A - *Staphylococcus aureus*; B - *Escherichia coli*; C - *Pseudomonas aeruginosa*; D - *Candida albicans*

O fato desses produtos não terem apresentado atividade antimicrobiana por difusão diante dos outros micro-organismos, não determina a sua inatividade. Os testes de atividade antimicrobiana devem ser realizados por pelo menos duas metodologias distintas (CATÃO, 2007). Tanto que segundo Pinto et al. (2012) em estudo realizado por meio da técnica de microdiluição em placa utilizando a fase ACOEt de *P. montealegreanum* e os mesmos flavonoides, PMT-1 e PMT-2, foi observada atividade antibacteriana frente à cepas de *Bacillus subtilis* (CCT 0516), *E. coli* (ATCC 2536), *P. aeruginosa* (ATCC 8027) e *P. aeruginosa* (ATCC 25619) com CIM variando de 32 a 512 mg/mL. Este fato comprova que os diferentes métodos de análise de atividade antimicrobiana podem sofrer inúmeros fatores interferentes, tais como difusão da substância e os meios de cultura utilizados (OSTROSKY et al., 2008).

Dos cinco produtos testados neste estudo, três (60%) foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, entretanto, foram inativos frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*.

Segundo Pool-Zobel et al.(1993), as bactérias Gram negativas por apresentarem uma membrana mais externa, que estaria impedindo a entrada de numerosas moléculas de antibióticos e o espaço periplasmático por conter enzimas, que são capazes de quebrar moléculas estranhas introduzidas no meio, pode justificar a menor sensibilidade das cepas Gram negativas, conforme foi possível observar neste estudo. A membrana dual apresentada pelas bactérias Gram negativas forma um envelope complexo, sendo responsável pela menor sensibilidade destes micro-organismos frente aos extratos vegetais (HOLLEY et al., 2005).

Observou-se entre os produtos ativos que a menor CIM foi apresentada pela fase  $\text{CHCl}_3$  (95mg/mL), seguida pelo EEB (348mg/mL) e pela fase ACOEt (411mg/mL), frente a linhagem de *S. aureus* ATCC 25923, respectivamente com halos de 12, 9 e 8 mm de diâmetro (TABELA 3).

É importante ressaltar que foram considerados ativos os produtos que apresentaram halos de inibição de crescimento  $\geq 8\text{mm}$  (CATÃO, 2007), no entanto também é conveniente lembrar que não se pode determinar que um produto seja mais ativo que outro apenas em função do tamanho dos halos formados, visto que alguns interferentes devem ser considerados, dentre eles, a difusibilidade dos produtos testados.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que a fase  $\text{CHCl}_3$  apresentou maior difusibilidade que o EEB, supondo-se que as substâncias que compõem o EEB de alguma forma interferiram entre si na difusibilidade.

**Tabela 3** - Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos derivados de *P. montealegreanum* Y.

Planta	Fase	Concentração testada		Micro-organismos/Diâmetro dos halos (mm)			
		mg/mL	CIM	A	B	C	D
<i>P. montealegreanum</i> Y. (folhas)	EEB	348	100%	9	0	0	0
		174	50%	0	0	0	0
		87	25%	0	0	0	0
	F. $\text{CHCl}_3$	95	100%	12	0	0	0
		48	50%	0	0	0	0
		24	25%	0	0	0	0
	F. ACOEt	411	100%	8	0	0	0
		205	50%	0	0	0	0
		103	25%	0	0	0	0

**Legenda:** A – *Staphylococcus aureus*; B – *Escherichia coli*; C – *Pseudomonas aeruginosa*; D - *Candida albicans*; EEB – Extrato etanólico bruto;  $\text{CHCl}_3$  – Fase clorofórmica; ACOEt – Fase acetato de etila.

Verificou-se que os extratos, fases e compostos não apresentaram atividade antifúngica, frente a *C. albicans*. Esses resultados são relevantes visto que, ainda não foram encontrados relatos na literatura sobre atividade antifúngica de produtos derivados de *P. montealegreanum*.

A confirmação do perfil de sensibilidade das cepas, apresentado na tabela 4, mostra que todos os antimicrobianos testados estavam de acordo com os limites desejados com as recomendações do CLSI (2010).

**Tabela 4** - Avaliação do efeito da associação do EEB e das fases  $\text{CHCl}_3$  e ACOEt com antifúngicos frente a cepa padrão ATCC de *Candida albicans*, por disco difusão

Micro-organismos	Antimicrobianos/Halos de inibição (mm)								
	AMP	GEN	CIP	CLO	SUT	TET	ERI	FLU	NY
<i>S. aureus</i>	28	19	23	23	24	29	25	NT	NT
<i>E. coli</i>	17	20	30	21	25	20	NT	NT	NT
<i>P. aeruginosa</i>	NT	20	28	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>C. albicans</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	25	23

**Legenda:** EEB – Extrato etanólico bruto (384mg/mL);  $\text{CHCl}_3$  – Fase clorofórmica (95mg/mL); ACOEt – Fase acetato de etila (411mg/mL); NT<sup>a</sup> – Não testado para bactérias Gram negativas; NT<sup>b</sup> – Não testado para *Pseudomonas aeruginosa*.

Em relação à avaliação da interação entre os produtos testados e os antimicrobianos convencionais foi possível verificar, por meio da comparação dos diâmetros dos halos de inibição, que os efeitos apresentados foram compatíveis tanto com sinergismo como de antagonismo. É relevante ressaltar que não foi encontrada, na literatura pesquisada, estudos anteriores envolvendo a interação dos extratos de *Piper montealegreanum* com antimicrobianos de uso convencional.

Estudos prévios têm relatado a importância da interação de extratos de plantas em concentrações variadas com diferentes tipos de antimicrobianos, na inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos e multirresistentes a drogas (SIBANDA, OKOH, 2007; SILVA, FERNANDES, 2010; AHMED et al., 2010; ČIRKOVIC et al., 2012; USHIMANU, 2012).

Como demonstra a tabela 5, a maioria das interações dos antimicrobianos com os produtos vegetais resultou em efeito antagônico diante da cepa de *S. aureus* ATCC 25923, havendo redução dos diâmetros dos halos de inibição dos antibióticos usados como controle, excetuando-se a ampicilina 10mcg (AMP), que ao interagir com os produtos resultou na formação de halos de inibição maiores quando testados isoladamente, exibindo um possível efeito sinérgico.

**Tabela 5** - Avaliação do efeito interativo de produtos vegetais e antimicrobianos frente a cepas ATCC de bactérias de importância clínica

Antibacterianos e Associações	Micro-organismos / Diâmetro dos halos (mm)/ Desvio padrão		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
AMP (10mcg)	28,33±0,58	17±1,00	NT <sup>b</sup>
AMP+EEB	32,67±1,15	20,33±0,58	NT <sup>b</sup>
AMP+CHCl <sub>3</sub>	30,67±1,15	20,67±1,15	NT <sup>b</sup>
AMP+ACOEt	28,33±0,58	21±1,00	NT <sup>b</sup>
GEN (10mcg)	19,33±0,58	19,67± 1,15	20±1,00
GEN+EEB	12,67±1,15	0	0
GEN+CHCl <sub>3</sub>	14,67±1,15	8,67±1,15	9,67± 0,58
GEN+ACOEt	11,67± 0,58	0	0
CIP (5mcg)	22,67±0,58	30,33±0,58	27,67±0,58
CIP+EEB	14,67±1,15	33,33±1,15	14,33±0,58
CIP+CHCl <sub>3</sub>	17,67±0,58	35,33±1,15	17,33±0,58
CIP+ACOEt	10,33±0,58	30,67±1,15	9,67±0,58
CLO (30mcg)	23±1,00	21,33±0,58	NT <sup>b</sup>
CLO+EEB	19,67±0,58	28,33±0,58	NT <sup>b</sup>
CLO+CHCl <sub>3</sub>	19,67±0,58	28,33±0,58	NT <sup>b</sup>
CLO+ACOEt	20,33±0,58	23,67± 0,58	NT <sup>b</sup>
SUT (25mcg)	23,67±0,58	24,67±0,58	NT <sup>b</sup>
SUT+EEB	18,33±0,58	26,67±0,58	NT <sup>b</sup>
SUT+CHCl <sub>3</sub>	20,67± 1,15	28,33±1,15	NT <sup>b</sup>
SUT+ACOEt	9,67±0,58	26,67±0,58	NT <sup>b</sup>
TET (30mcg)	29±1,00	20,33±0,58	NT <sup>b</sup>
TET+EEB	28,33±0,58	25,67±0,58	NT <sup>b</sup>
TET+CHCl <sub>3</sub>	25,67±0,58	22,67±1,15	NT <sup>b</sup>
TET+ACOEt	26,67±1,15	25±1,00	NT <sup>b</sup>
ERI (5mcg)	24,67±1,15	NT <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>
ERI+EEB	15,33±1,15	NT <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>
ERI+CHCl <sub>3</sub>	17±1,00	NT <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>
ERI+ACOEt	11,33±0,58	NT <sup>a</sup>	NT <sup>b</sup>

**Legenda:** EEB – Extrato etanólico bruto (384mg/mL); CHCl<sub>3</sub> – Fase clorofórmica (95mg/mL); ACOEt – Fase acetato de etila (411mg/mL); NT<sup>a</sup> – Não testado para bactérias Gram negativas; NT<sup>b</sup> – Não testado para *Pseudomonas aeruginosa*.

Considerando que os *S. aureus* são micro-organismos que podem apresentar diversos fatores de virulência além da capacidade de apresentar multirresistência a vários antimicrobianos, são, portanto, de grande relevância clínica, especialmente em ambiente hospitalar (BOUCHER, COREY, 2008; KÖCK et al., 2010).

É possível perceber que cada extrato se comporta de forma específica, segundo Almeida et al. (2013) demonstrou a interação do extrato de *Allium sativum* com gentamicina e tetraciclina, onde foi possível verificar efeito sinérgico frente ao *S. aureus*, diferentemente dos dados deste estudo onde foi observado antagonismo para estes dois antimicrobianos.

Observou-se em relação a *E.coli* ATCC 25922 que a maioria das interações dos antimicrobianos com os produtos vegetais resultou em efeito sinérgico havendo um aumento dos halos de inibição dos antimicrobianos usados como controle, com exceção da gentamicina (10mcg) que ao interagir com os extratos testados resultou na formação de halos de inibição menores quando comparados ao controle, exibindo um possível efeito antagônico (TABELA 5). De acordo com Von Baum & Marre (2005), linhagens patogênicas de *E. coli* tem sido identificadas como causa de infecções no trato urinário, meningite neonatal, septicemia nosocomial e enterites e a resistência a pelo menos duas classes de antimicrobianos tem sido um achado frequente, restringindo as opções terapêuticas disponíveis. Fato este que impulsiona o uso de antibioticoterapia combinada quer seja com antimicrobianos tradicionais quer seja na busca de novas substâncias (COATES et al., 2011). Dessa maneira os dados deste estudo foram favoráveis diante desta cepa, demonstrando um comportamento de possível sinergismo entre a maioria dos produtos testados e os antimicrobianos de uso convencional.

Vários componentes de extratos podem aumentar a permeabilidade da membrana celular, auxiliando na penetração de antibióticos (HELANDER et al.,1998). A interferência com os sistemas enzimáticos das bactérias também pode ser um potencial mecanismo de ação (WENDAKOON, SAKAGUCHI, 1995).

Foi possível ainda verificar que frente a *P. aeruginosa* ATCC 27853 todas as interações provocaram possível efeito antagônico, diminuindo os halos de inibição de crescimento ou mostrando-se indiferente já que não provocou efeito sobre o diâmetro dos halos (TABELA 5). Esta espécie bacteriana é um dos principais agentes de infecção em indivíduos imunodeprimidos, raramente afeta indivíduos saudáveis (RUDNICK et al., 1995). Sua importância clínica está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como a resistência natural e adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes (LINCOPAN et al., 2008)

De acordo com a tabela 5 é possível verificar que para todas as cepas ensaiadas diante de todas as interações realizadas *in vitro*, o comportamento de sensibilidade das

cepas diante do aminoglicosídeo gentamicina (10mcg), foi modificado apresentando um perfil de resistência e/ou indiferença após as interações. Segundo a INFARMED (2012) no interior da célula bacteriana, os aminoglicosídeos como a gentamicina ligam-se aos polissomas (principalmente à subunidade 30S) e interferem com a síntese proteica ao induzirem uma interrupção prematura da tradução, bem como leituras incorretas do RNA mensageiro (mRNA). Os produtos testados podem ter efeito negativo sobre o mecanismo de ação descrito da gentamicina, necessitando ainda de estudos futuros para determinação do mecanismo de interação.

Com relação ao efeito interativo entre os antifúngicos e os produtos vegetais frente a cepa de *C. albicans* ATCC 76645 foi possível identificar que todas as interações tanto com o fluconazol como com a nistatina apresentaram efeito antagônico uma vez que após a interação o valor dos halos de inibição passaram a ser nulos para o fluconazol e havendo redução dos halos para nistatina, como mostra a tabela 6. Não foram encontrados relatos na literatura pesquisada sobre interação de extratos e fases de *P. montealegreanum* frente a antifúngicos.

**Tabela 6** - Avaliação do efeito da associação do EEB e das fases  $\text{CHCl}_3$  e ACOEt com antifúngicos frente a cepa padrão ATCC de *Candida albicans*, por disco difusão

Antifúngicos e Associações	<i>Candida albicans</i> ATCC 76645	
	Diâmetro dos halos (mm)	Desvio padrão (mm)
FLU (10mcg)	24,67	±0,82
FLU+EEB	0,00	±0,00
FLU+ $\text{CHCl}_3$	0,00	±0,00
FLU+ACOEt	0,00	±0,00
NY (10UI)	22,67	±1,15
NY+EEB	15,33	±1,15
NY+ $\text{CHCl}_3$	19,33	±1,15
NY+ACOEt	18,66	±1,15

**Legenda:** EEB – Extrato etanólico bruto (384mg/mL);  $\text{CHCl}_3$  – Fase clorofórmica (95mg/mL); ACOEt – Fase acetato de etila (411mg/mL).

O uso de antibioticoterapia combinada ou associada também é um fato nos dias atuais. Entretanto, diversos autores relatam estudos sobre diferentes efeitos causados pelo uso associado de produtos naturais e antimicrobianos convencionais (SWERTS; COSTA, 2005; OLIVEIRA et al., 2006; AHMED et al., 2010). Considerando as propriedades biologicamente ativas desses produtos, aproximadamente 80% da população mundial recorrem a essa prática como alternativa e ou associações terapêuticas em diferentes abordagens patológicas (WHO, 2000).

## 5 CONCLUSÃO

- Produtos vegetais de *P. montealegreanum* apresentaram atividade antibacteriana apenas frente a cepa *S. aureus* ATCC 25923 e não apresentaram atividade antifúngica;
- As interações apresentaram potencial de modificação de comportamento do antibiótico *in vitro*, justificado pelo aumento/diminuição dos halos de inibição, destacando-se o possível efeito sinérgico frente a cepa de *E. coli* ATCC 25922, uma vez que mesmo os produtos testado não apresentaram atividade, mas conseguiram modificar o comportamento do antibiótico diante desta cepa;
- O fato de certos produtos não apresentarem atividade pela metodologia descrita por este estudo não descarta sua inatividade sendo necessário realizar testes de atividade antimicrobiana por outras metodologias;
- Novos estudos ainda devem ser realizados para que os produtos sejam padronizados e usados em concentrações que garantam o efeito terapêutico.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por mais esta realização, pela saúde, força e paciência que Ele me proporcionou ao longo dessa caminhada e agradecer desde já as futuras realizações nessa nova etapa da minha vida.

A minha família por completo, mas em especial as pessoas que são a razão da minha existência: Minha mãe, Vilma, pelo apoio de sempre e por me ensinar o que é responsabilidade e respeito, meu pai, Ronaldo, por me ensinar o que é caráter e acima de tudo seguir em frente e a minha irmã, Valma Ravanny, que como uma mulher sábia me ensina sempre ao longo da passagem dos meus dias ao lado dela.

Ao meu cunhado Sonildo Nóbrega por estar ao meu lado e ser meu irmão mais velho além de me ajudar a pensar estatisticamente.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Raíssa Ramalho, que não é apenas minha orientadora acadêmica, mas também profissional, por sempre me acolher, me aceitar, me ouvir e me respeitar acima de tudo, como pessoa e futura colega de profissão e por me tratar sempre como uma filha sua.

Ao professor Dr. Harley Alves, por acreditar e confiar em mim, este trabalho foi fruto da nossa interação e confiança mútuas, e eu espero que continue por muitos anos a frente.

Ao professor Dr. Thúlio Arruda, por ser sempre luz durante minha caminhada e ter sempre uma boa palavra de apoio, além da colaboração na avaliação deste trabalho.

A minha colega de laboratório, Luanne Eugênia, que me ensinou muito durante meus experimentos, desde o ano de 2011, e me mostrou que responsabilidade e compromisso não têm idade.

A minha turma de Farmácia 2009.2 por estarem ao meu lado nessa vitória e por fazerem os dias penosos serem mais leves, mas em especial a Andressa, Jéssica Ohanna e Gustavo meus verdadeiros amigos que a minha profissão me deu, com os quais construí uma relação de confiança e amor ao longo da graduação que certamente permanecerão.

As minhas amigas Anny Louise, Julianny Campos e Dalila Rodrigues por me fazerem esquecer, com inúmeras gargalhadas verdadeiras, as minhas preocupações com a universidade e que tornam meus dias mais luminosos.

As minhas colegas de trabalho, Camilla Pinheiro, Mayara Spencer e Katharina Porto por toda a ajuda, apoio e por serem grandes espelhos profissionais.

A todos os que me apoiaram de alguma forma, com qualquer gesto que seja, mesmo que pequeno, com um olhar ou uma palavra sincera ao longo dos corredores da UEPB.

Muito obrigada!!!



**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO INTERATIVO *in vitro* DE  
EXTRATOS, FASES E COMPOSTOS ISOLADOS DE  
*Piper montealegreanum* YUNCKER**

ROCHA, Wilma Raianny Vieira

**ABSTRACT**

A systematic method for obtaining new substances for therapeutic purposes research can be performed through various processes among them the synthesis of new molecules and molecular modification of natural substances. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the crude ethanol extract (BSE), two partitioned phases (FP) and two isolated compounds (CI) *Piper montealegreanum* Yuncker, determine the minimum inhibitory concentration - MIC of active products and the interaction of products tested with the following antibiotics: ampicillin 10mcg (AMP), 10mcg gentamicin (GEN), 5mcg ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol 30mcg (CLO), sulfamethoxazole 25mcg (SUT) 30mcg tetracycline (TET), erythromycin 5mcg (ERI), fluconazole 10mcg (FLU) and 10 IU nystatin (NY). Evaluation of the antimicrobial activity and interactions were performed by disk diffusion method. For interaction were added 20µL of the solution to each product antimicrobial disc, the solvents used in the preparation of the products were also tested during the evaluation of antimicrobial activity and interactions. . Standard four American Type Culture Collection (ATCC) strains were tested: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC 76645 was possible to verify that both the crude ethanol extract (BSE) and the chloroform phases (CHCl<sub>3</sub>) and ethyl acetate (AcOEt) were active only against strains of *S. aureus* presenting inhibition zones ranging from 8 to 12mm in diameter. Interactions held with the demonstrated antimicrobial potential of behavior modification drugs *in vitro*, opposite the strain of *S. aureus* and *P. aeruginosa* checking possible antagonism in most interactions, already before the strain of *E. coli* was verified for possible synergism most interactions, as well as on the strain of *C. albicans*. From the results it can be concluded that *P. montealegreanum* showed antibacterial activity and interactions performed showed potential for behavior modification of antimicrobial agents, it is important that future studies on the identity and concentration of the active substances in each part of the plant is performed.

**KEYWORDS:** *Piperaceae*. Natural Products. Biological Effects.

**REFERÊNCIAS**

- AHMED Z. et al. Synergistic Effect of *Salvadora persica* Extracts, Tetracycline and Penicillin Against *Staphylococcus aureus*. **African J. of Basic & Appl. Sci.** 2(1-2):25-29, 2010.
- ALMEIDA, G. D. et al. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 4, p. 487-492, 2014.
- ALVES, T. M. A., et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ALVES, H.S. **Investigação fitoquímica de partes aéreas de *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae)** Dissertação. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – LFT, UFPB, João Pessoa, 2004.
- ALVES, H. S.; SOUZA, M. F.V.; CHAVES, M. C. O. Three new compounds from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1610-1615, 2011.
- ASPREY, G. F.; THORNTON, P. Medicinal plants of Jamaica. Part I. **West Indian med. j.** v. 2, n. 4, p. 233-52, 1953.
- AZEVEDO F.M. **Microrganismos multirresistentes**. In: Oliveira AC. Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 341-47.
- BABU, S.P.S. et al. Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. **Jpn J Pharmacol** 75: 451-454. 1997
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BEZERRA, D.P. et al. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, un alkamide of *P. tuberculatum*, in yeast and mammalian. **Mutation Research**, v.652, p.164-174, 2008.
- BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. Supplement 5, p. S344-S349, 2008.
- CATÃO, R. M. R. **Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes**. 2007, 127p. Tese (doutorado em Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). LTF/Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.
- ĆIRKOVIC I., JOVALEKC M., JEGOROC B. In vitro antibacterial activity of garlic and synergism between garlic and antibacterial drugs. **Arch Biol Sci.** 2012;64(4):1369-75.
- COATES A.; HALLS G.; HU Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? **Br J Pharmacol**, 163:184-194, 2011.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA, 2010.

CONSENTINO, S. et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of sardinian thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

DÉVÉHAT, F.L. et al. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**. v.73, p. 400-405, 2002.

ELISABETSKY E. **Pesquisa em plantas medicinais**. Ciências e Cultura 39: 607-702. 1987

FABRY, W. et al. Antibacterial activity of east African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, p.79-84, 1998

GONÇALVES, D. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.197-202, 2011.

HELANDER, I. M., ALAKOM, I. H. L., LATVA, K. K., MATTILA, S. T., POL, I., SMID, E. J., GORRIS, L. G. M. & VON, W. A. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 46: 3590-3595, 1998.

HOLLEY, R.A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiol.**, v.22, n.4, p.273-292, 2005.

INFARMED. Legislação Farmacêutica Compilada. 2012 01-04-2012 [cited 2013]; Available from: <http://www.infarmed.pt>.

KIMATI, H., J. GIMENEZ, C. SOAVE, F. N. KUROZAWA, F. BRIGNANI NETO, & L. W. BETTIOL. **Guia de fungicidas agrícolas - recomendações por cultura**. Vol. I. , 2. ed. Grupo Paulista de Fitopatologia, Jaboticabal. 225 p. 1997.

KÖCK, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. 2010. Available from: [www.eurosurveillance.org](http://www.eurosurveillance.org)

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico** : Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro : Medsi, 2001.

LINCOPAN N., TRABULSI L.R., *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. Microbiologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. p. 369-81.

LIMA, R. K., et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae). **Acta amazônica**, v. 39, n. 2, 2009.

MABBERLEY, D.J. The plant book. A portable dictionary of the vascular plants. 2 ed. 858p Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

MAGALHÃES, C. F. **Efeito de extratos e frações de Piper aduncum sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis***. 2010, 52f (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas) Programa de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares – SP.

MENDES, L.P.M. et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MURTHY R. Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. **Chest**. 2001;119(2 suppl):405S-411S.

NAIR, M. G.; BURKE, B. A. Insecticidal Properties of some metabolites of Jamaican *Piper* spp. and the amides synthesized from 5,6-Z and E-butenolides of *Piper fadyenii*. **Agriculture and Biological Chemistry**, v.50, p.3053-3058, 1986.

NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

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. **Rev Bras Farmacogn** 18: 301-307, 2008.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turk J Biol.**; v. 31, p.53, 2007.

PESSINI, G. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

PINTO, D. S. et al. Antibacterial and Hemolytic Activities from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). **Anti-Infective Agents**, v.10, p.1-5, 2012.

POOL-ZOBEL, B. L. et al. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the S. typhimurium mutagenicity assay. **Nutrition and cancer**, v. 20, 1993.

PORTET, B. et al. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 1312, 2007.

REGASINI, L.O. et al. Atividade tripanocida de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v. 19, p. 199-203, 2009.

RUDNICK, J.R. et al. An outbreak of pyrogenic reactions in chronic hemodialysis patients associated with hemodialyzer reuse. **J Artif Organs**;v. 19, p. 289-94, 1995

SANTOS, F.P. **Chalconas e flavanonas isoladas das partes aéreas de *Piper glandulosissimum***. 2004. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais e Sintéticos

Bioativos). Programa de Química de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa - PB.

SANTOS, André Luis et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**; v. 43; n. 6; p. 413-423; Dezembro 2007.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of Piper: a review. **Fitoterapia**, v.58, n.3, 1987.

SIBANDA T, OKOH A.I. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. **Afr J Biotechnol.** 2007;6(25):2886-96.

SILVA N.C.C., FERNANDES J.A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **J Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.** 2010;16(3):402-13.

SIMÕES, C.M.O (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6º edição. Porto Alegre-RS: Editora UFRGS/UFSC, 2007.

SWERTS M.S.O.; COSTA A.M.D.D.; FIRINI J.E. Associação de clorexidina e própolis atuando na inibição da aderência de *Streptococcus* spp. **Rev Int Periodontia Clín.** 2:10-16, 2005.

TABOFTA, T.K. et al. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Phytochemistry**, v.9, n.1726, 2008.

TRABULSI, LR et al. **Microbiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1999. p.75-86.

USHIMANU P.I., BARBOSA L.M., FERNANDES A.A.H., DI STASI L.C., JUNIOR A.F. In vitro antimicrobial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. **Nat Prod Res.** 2012;26(16):1553-7.

VON BAUM H., MARRE R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **Int J Med Microbiol**, 2005; 295: 503-511.

WENDAKOON, C.; SAKAGUCHI. M. 1995. Inhibition of amino acid de carboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal Food Products**, 58: 280-283.

World Health Organization - WHO. WHO General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva: WHO; 2000

YUNCKER, Truman G. The Piperaceae of Brazil III–Peperomia; Taxa of uncertain status. **Hoehnea**, v. 4, n. 7, p. 1-236, 1974.