



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

JÉSSICA ROMUALDO SOUTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES
DE ESPÉCIES DE *PIPER* (PIPERACEAE) POR BIOAUTOGRAFIA**

Campina Grande, PB.

Julho 2014

JÉSSICA ROMUALDO SOUTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES
DE ESPÉCIES DE *PIPER* (PIPERACEAE) POR BIOAUTOGRAFIA**

Trabalho apresentado ao curso de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de Farmacêutico (a).

Professor(a) orientador(a): Dr^a RAÏSSA MAYER RAMALHO CATÃO

Campina Grande, PB.

Julho 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.

S726a Souto, Jéssica Romualdo.

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de espécies de piper (piperaceae) por bioautografia [manuscrito] / Jéssica Romualdo Souto. - 2014.

34 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Profa. Dra. Raissa Mayer Ramalho Catão, Departamento de Farmácia".

1. Atividade antimicrobiana. 2. Extratos vegetais. 3. Plantas medicinais. 4. Bioautografia. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES
DE ESPÉCIES DE *PIPER* (PIPERACEAE) POR BIOAUTOGRAFIA**

Trabalho apresentado ao curso de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de Farmacêutico (a).

Aprovado em 18 / 07 / 2014



Prof. Dr. Raissa Mayer Ramalho Catão / UEPB

Orientadora



Prof. Dr. Harley da Silva Alves / UEPB

Examinador



Prof. Dr. Thulio Antunes de Arruda / UEPB

Examinador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marco e Genize, que com muito amor e apoio, não mediram esforços para realização do meu maior sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, sempre presente nos meus pensamentos, nas minhas orações, me guiando nos momentos de aflições e iluminando meus momentos de alegria. Foi Ele o verdadeiro responsável por minha vida, por todo o caminho percorrido e pela realização do meu maior sonho!

Aos meus pais, Marco e Genize, pela minha vida, pelo amor e dedicação ao longo desta caminhada, pelos esforços e sacrifícios para proporcionar a realização do meu sonho. Tudo o que sou devo a vocês. Esta conquista é para vocês!

A minha orientadora, Professora Raïssa, que quando eu mais precisei ela aceitou me orientar. Obrigada pelo grande empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

Ao Professor Harley, que foi de grande importância no desenvolver dos meus experimentos na área de cromatografia, sem o senhor eu não teria conseguido. Desculpe pelos apertados, por todo o tempo gasto me ensinando, por todo o material cedido, mas principalmente, pela grande atenção e apoio!

Aos meus irmãos, Katiúscia e Ricardo, sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amor, Renan, por acreditar mais em mim do que eu mesma, por todo o apoio, amor, carinho, cuidado, pelas inúmeras ajudas, pela paciência principalmente no final dessa jornada. Você foi, e é, essencial nos meus dias. Essa conquista é parte da construção do nosso futuro!

Ao meu avô Antônio, que sempre prezou pela educação dos netos. Sinto muito a sua falta. O senhor sempre estará nos meus pensamentos e no meu coração!

À minha turma 2009.2, levarei uma grande saudade dos nossos melhores momentos!

À minha comissão de formatura, em particular, Jéssica Rangel e Jéssica Ohanna por toda a força, companheirismo e amizade, ao meu primeiro amigo de universidade Gustavo, por toda amizade compartilhada, e principalmente a Wilminha, que foi essencial na parte experimental do meu TCC!

O meu muito obrigado a todos que participaram e contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui.

A caminhada foi longa, com percursos difíceis, mas com grandes momentos de alegria e realização. O meu maior SONHO acabou de se realizar!

"Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade."

Paulo Coelho.

RESUMO

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos utilizados no combate e/ou controle dos micro-organismos permanece significativa no contexto científico mundial, sendo os produtos naturais, dentre eles os produtos vegetais, potenciais fontes de novos agentes antibacterianos e antifúngicos. Neste estudo, avaliou-se a atividade antimicrobiana de espécies de *Piper* por bioautografia. Foram testados os extratos etanólicos brutos (EEB) e frações hexânicas de *Piper arboreum*, *Piper caldense*, além dos extratos etanólicos brutos (EEB) e fração clorofórmica de *Piper mollicoum*, frente a 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. Após a separação dos fitoconstituintes por eluição em placas de cromatografia em camada delgada (CCDA), verificou-se que tanto o extrato etanólico bruto (EEB) como a fração hexânica (HEX) de *Piper caldense* apresentaram constituintes ativos frente à cepa de *S. aureus* testada, porém não apresentaram atividade diante das demais cepas microbianas. Os extratos e frações de *Piper arboreum* e *Piper mollicoum* não apresentaram fitoconstituintes ativos diante desta metodologia. Entretanto, ressalta-se a necessidade de realização de estudos posteriores, utilizando metodologias que permitam não só a separação dos fitoconstituintes como também, possibilitem o isolamento, a identificação e a quantificação dos produtos ou moléculas ativas, em cada parte da planta, contribuindo desta forma para ampliar o conhecimento do potencial antimicrobiano das espécies vegetais estudadas.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade Antimicrobiana. Extratos vegetais. Plantas medicinais. Bioautografia.

ABSTRACT

The need for the development of new drugs used in combat and/or control of microorganisms remains significant in world scientific context, being the natural products, among them the plant products, potential sources of new antibacterial and antifungal agents. This study evaluated the antimicrobial activity of *Piper* species by bioautography. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: crude ethanol extracts (BSE) and fractions Hexânicas *Piper arboreum*, *Piper caldense*, and crude ethanol extracts (BSE) and chloroform fraction of *Piper mollicoum* against four standard American Type Culture Collection (ATCC) strains were evaluated, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC 76645. After the separation of phytochemicals, it was found that both the crude ethanolic extract (CEE) as the hexane fraction (HEX) *Piper caldense* presented active constituents facing the strain of *S. aureus* tested, however showed no activity on other microbial strains. The extracts and fractions of *Piper arboreum* and *Piper mollicoum* showed no active phytochemicals in front of this methodology. However, it should be noted the need for further studies, using methodologies that allow not only the separation of phytochemicals as well as allow the isolation, identification and quantification of products or active molecules, in every part of the plant, contributing in this way to enlarge the knowledge of the antimicrobial potential plant species studied.

KEYWORDS: Antimicrobial Activity. Plant extracts. Medicinal plants. Bioautography.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3.1 As plantas como antimicrobianos	13
3.2 Família Piperaceae Baill	14
3.3 Gênero <i>Piper</i> Linnaeus	15
3.4 Considerações gerais sobre os micro-organismos utilizados neste estudo	16
3.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
3.4.2 <i>Escherichia coli</i>	17
3.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.4.4 <i>Candida albicans</i>	18
3.5 Bioautografia.....	18
3.5.1 Bioautografia de contato ou difusão no ágar	19
3.5.2 Imersão ou método da sobreposição do ágar	19
3.5.3 Bioautografia direta	20
4 METODOLOGIA.....	21
4.1. Classificação da pesquisa e local do estudo.....	21
4.2. Origem dos extratos etanólicos brutos (EEB) e frações	21
4.3. Preparação dos produtos para análise	21
4.4. Caracterização dos micro-organismos	22
4.5. Meios de cultura.....	22
4.6. Caracterização dos micro-organismos	22
4.7. Cromatografia em camada delgada (CCDA) e ensaio da atividade antimicrobiana por bioautografia	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Há séculos, os mais diferentes povos têm procurado tratar males e 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 (SIMÕES et al., 2007).

A biodiversidade da flora brasileira constitui um grande potencial para pesquisas e estratégias que visam à obtenção de novos fármacos e medicamentos no Brasil. De modo que, considerando a complementaridade e integração entre os conhecimentos desenvolvidos pela ciência e tecnologia e os conhecimentos da medicina tradicional e o uso popular, criaram-se perspectivas para o desenvolvimento sustentável, o fortalecimento da educação ambiental e o respeito à propriedade intelectual e ao patrimônio genético nacional (SIMÕES et al., 2007).

Historicamente, o uso dos extratos das plantas medicinais e aromáticas como antisséptico é reconhecido desde antiguidade, enquanto que desde o início do século XX, os pesquisadores tentam caracterizar esta propriedade no laboratório (DORMAN; DEANS, 2000).

Na área farmacêutica, os extratos vegetais continuam sendo uma rica fonte de novas moléculas que podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fontes de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fármacos (princípios ativos), como para a obtenção de adjuvantes (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; VORAVUTHIKUNCHAI; KITPPIPIT, 2005).

As substâncias antimicrobianas representam um dos principais avanços terapêuticos nas últimas décadas. Contudo, apesar da enorme gama de fármacos antibacterianos e antifúngicos disponíveis, e da sua evolução química e farmacológica, o uso indiscriminado destes medicamentos resultou no aparecimento de patógenos resistentes (ARESI, 2011).

Em 2004, estimou-se que mais de 70% das bactérias patogênicas apresentavam resistência a pelo menos um antibiótico disponível para uso clínico. Desta maneira, a necessidade permanente do desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos micro-organismos permanece significativa no contexto científico mundial, sendo os produtos naturais potenciais fontes de novos agentes antibacterianos e antifúngicos (ARESI, 2011).

As plantas com eficácia comprovada são possíveis matérias-primas para medicamentos, devendo possuir garantia de qualidade, desde o cultivo. Nesta perspectiva

entende-se que planta medicinal deve ser isenta de substâncias que poderiam influenciar na qualidade final do fitoterápico (DIAS, et al., 2006).

Os metabólitos secundários desenvolvem um papel de significativa importância nas espécies vegetais, pois além de serem responsáveis pelo aroma, odor e pigmentos das plantas, servem como mecanismos de defesa contra micro-organismos, insetos e herbívoros. Ao contrário dos metabólitos primários, eles possuem distribuição restrita, ou seja, são encontrados em concentrações relativamente baixas em plantas e micro-organismos, apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e são caracterizados por uma enorme diversidade química e marcantes atividades biológicas (ARESI, 2011).

Havendo atividade antimicrobiana, substâncias isoladas ou frações dos extratos das mais variadas plantas, são facilmente constatadas pela bioautografia. A bioautografia é um ensaio eficiente na determinação da atividade antimicrobiana, a qual ressalta a alta sensibilidade da técnica, pois salienta que menos de 2,5µg de substância antimicrobiana forma halo de inibição visível. Essa proporciona a identificação das frações das substâncias responsáveis pela ação antimicrobiana, por esse motivo tem sido amplamente difundida (MÜLLER, 2006).

Dentro deste contexto, este trabalho procura mostrar a relevância da bioautografia como possibilidade metodológica aplicada aos estudos para avaliação da atividade antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações de espécies de *Piper* pelo método de bioautografia.

2.2 Objetivos específicos

- Promover a separação dos compostos dos extratos e frações hexânicas de *Piper arboreum* e *Piper caldense*, e do extrato e fração clorofórmica de *Piper mollicomum* por cromatografia em camada delgada (CCDA);
- Avaliar a atividade antimicrobiana das frações dos extratos frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 76615 pelo método da bioautografia;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 As plantas como antimicrobianos

Substâncias antibióticas ou antimicrobianas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas, com processos sem limites dentro da terapêutica medicamentosa. O referido grupo de medicamentos diminui, de forma efetiva, o efeito de espécies microbianas patogênicas e oportunistas responsáveis pelas mais variadas patologias que tanto provocam a incapacidade prolongada ou óbito de seres humanos, sem restrição de faixa etária, situação sócio-econômica ou estado de saúde do indivíduo atingido (JUSTEN, 2007).

O problema da resistência microbiana toma-se cada vez mais preocupante comprometendo o futuro de novas drogas antimicrobianas. Por isso, ações devem ser dirigidas, buscando minimizar esse problema, tais como um maior controle no uso de antibióticos; contínuas pesquisas para melhor entender os mecanismos genéticos de resistência, e por último, ampliar os estudos para obtenção de novas drogas naturais, semi-sintéticas ou sintéticas. Deve-se ainda considerar o problema da baixa imunidade por parte dos pacientes e o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes que acarretam infecções com alta mortalidade, principalmente, em hospitais (NASCIMENTO et al., 2000; STAPLETON et al., 2004).

O trabalho da natureza e do homem vem definindo espécies com propriedades medicinais ao longo das Eras. No Reino Plantae observa-se uma grande variedade de espécies medicinais empregadas no combate às enfermidades diversas (MÜLLER, 2006). Muitas das propriedades terapêuticas das plantas são relatadas pela população, sendo confirmadas em sua maioria, nos estudos científicos. Tais propriedades proporcionam o desenvolvimento de vários fármacos, sejam estes obtidos por síntese a partir da molécula protótipo ou através do isolamento (SARAIVA, 2007).

As pesquisas dirigidas à obtenção de novas drogas com atividade antimicrobiana ocorrem em diversas partes do mundo, sendo que boa parte destas, se referem a ativos oriundos de vegetais. Assim resulta a importância, principalmente no Brasil, com a grande diversidade de sua flora, fazer um *screening* das espécies vegetais, principalmente aquelas de uso popular, evidenciando por testes laboratoriais a atividade dos extratos brutos e prosseguindo com um estudo fitoquímico para avaliar as propriedades das diferentes frações obtidas. No tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil sob

forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, porém sem nenhuma evidência científica da sua eficácia (PESSINI et al., 2003).

Os componentes com potencial ação antibiótica destacam-se os resultados obtidos com óleos essenciais ricos em mono e sesquiterpenos, alcalóides, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, triterpenos, entre outros que apresentam atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas, bactérias Gram negativas, *Mycobacterium*, leveduras e fungos filamentosos (CECHINEL FILHO; YOUNES, 1998; NEPOMUCENO et al., 2003).

Devido todos estes aspectos, vê-se um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais, para fins terapêuticos, aliadas ainda a boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e as altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos, desde a última década (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

3.2 Família Piperaceae Baill

As espécies de Piperaceae encontram-se evolutivamente na base das angiospermas e têm sido investigadas como modelos visando reconstruir suas linhagens evolutivas. O processo evolutivo destas espécies envolve fatores abióticos e bióticos, entre os quais a predação por insetos e a presença de micro-organismos associados que podem ter afetado de forma considerável a perpetuação das espécies (RESEM, 2004).

A família Piperaceae pertence à superordem Nymphaeiflorae, ordem Piperales e é formada por cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis* englobando cerca de 2000 espécies que possuem hábito herbáceo, arbustivo ou, raramente, arbóreo. Em termos econômicos, científicos e culturais, a família Piperaceae Baill é uma das mais importantes da ordem Piperales (SANTOS et al., 2001). No Brasil, ela é representada por aproximadamente 460 espécies pertencentes a cinco gêneros nativos: *Pothomorphe* Miq., *Sarcorrhachis* Trel., *Peperomia* Ruiz et Pav., *Ottonia* Spreng e *Piper* L. (MABBERLEY, 1997; ROSA; SOUZA, 2004). As espécies desta família são geralmente ervas trepadeiras ou eretas, arbustos e menos frequentemente árvores, apresentando um elevado valor comercial, econômico e medicinal (DOMINGUEZ; ALCORN, 1985).

De importância econômica e medicinal, algumas espécies fazem parte do mercado mundial, como a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e outras são usadas de modo empírico pelas populações do Brasil em diferentes doenças (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006).

Espécies de Piperaceae têm sido utilizadas na alimentação, como inseticidas e, também, na medicina tradicional devido ao acúmulo de diferentes classes de metabólitos biologicamente ativos, além de metabólitos de biossíntese mista (BALDOQUI et al., 2009).

3.3 Gênero *Piper* Linnaeus

O gênero *Piper* é o maior da família Piperaceae, com pelo menos 1000 espécies distribuídas especialmente na região neotropical do globo terrestre, onde cerca de dois terços das espécies descritas são encontradas. A maioria dos seus representantes habita lugares úmidos, quentes e várzeas de florestas tropicais e sua diversidade e abundância geralmente diminuem com o aumento da altitude ou com o decréscimo da precipitação (JARAMILLO et al., 2001; DYER; PALMER, 2004).

Morfologicamente, as espécies de *Piper* são relativamente uniformes, com folhas simples e alternadas e caules divididos por nodos salientes, onde os galhos quebram-se com mais facilidade, semelhante aos nodos observados em bambus ou na cana de açúcar. Suas inflorescências também são características, as quais geram espigas ou infrutescências. Suas espécies são geralmente arbustivas e herbáceas, porém ocorrem em diversas formas, sendo observadas também pequenas árvores (DYER; PALMER, 2004).

As espécies de *Piper* têm grande importância comercial, econômica e medicinal em diferentes países (YAO et al., 2009). São importantes plantas medicinais, usadas na medicina chinesa e nas práticas de medicina popular da América Latina e do Ocidente Indiano. São aplicadas para tratar asma, bronquite, febre, doenças gastrointestinais, e reumatismo, e as preparações obtidas destas plantas têm demonstrado efeitos anti-inflamatório, inseticida, anti-hipertensivo, antidiabéticos, imunomodulador e antimutagênico (BEZERRA et al., 2008).

A espécie *Piper arboreum* é popularmente conhecida como fruto de morcego, alecrim-de-Angola, pau-de-Angola ou beto-preto (AGRA et al., 2008). Popularmente é utilizada no Brasil, na forma de decocto para o tratamento de reumatismo, bronquite, gripe e resfriado (RAMOS; KATO, 2009) além de também ser empregada contra doenças venéreas e do trato urinário (REGASINI et al., 2009).

A espécie *Piper caldense* C. DC., conhecida como “pimenta d’arda”, é utilizada na Paraíba como sedativa, antídoto para picadas de cobras, para dores de dente, bem como na forma de compressa no local afetado para alívio da dor (CARDOSO JÚNIOR; CHAVES, 2003).

A espécie *Piper mollicomum* Kunth distribuiu-se no Brasil, na região Amazônica e na Mata Atlântica (LAGO et al., 2007), sendo sua tintura utilizada pela medicina popular para o tratamento de doenças hepáticas e contra indigestão. Esta espécie é conhecida popularmente pelos nomes de pariparoba, jaguarandi, jaborandi ou jaborandi-manso (DUARTE et al., 2007)

3.4 Considerações gerais sobre os micro-organismos utilizados neste estudo

3.4.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* compreende um grupo de bactérias pertencentes à família Staphylococcaceae (KONEMAN et al., 2008), as quais são cocos Gram positivos, com teste de catalase-positivos, que se organizam de diferentes formas, podem se dispor desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou em agrupamentos. Fazem parte da microbiota normal do homem e animais. Esses micro-organismos apresentam os mais variados fatores de virulência, como coagulase, catalase, alfatoxina, betatoxina, esfoliatina entre outras, os quais são responsáveis pela patogenicidade da bactéria (SANTOS et al., 2007; TRABULSI e ALTESTHUM, 2008; TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

Os *Staphylococcus aureus* são cocos dispostos em forma de “cacho de uvas”, produtores de pigmentos amarelo-dourado, caracterizando-se por ser coagulase, Dnase e catalase positivos. Estes micro-organismos são patógenos humanos e de outros mamíferos, e integram a flora da pele (comensais), embora como patógenos oportunistas possam causar infecções (SARAIVA, 2007).

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno que pode ser encontrado na microbiota de 30 a 70% da população (LINDSAY; HOLDEN, 2004), colonizando a pele úmida em diferentes regiões (narinas, axilas, períneo e intestino) de pessoas saudáveis onde podem permanecer colonizando por longos períodos sem causar nenhuma patologia infecciosa, porém em determinadas circunstâncias e, conjuntamente a seus fatores de virulência exibem sua patogenicidade, podendo invadir o organismo do indivíduo provocando infecções frequentemente agudas e piogênicas. Assim, dentre as infecções da pele provocadas por este micro-organismo, destacam-se pela frequência: o furúnculo, a celulite, o impetigo, além das infecções cirúrgicas, pós-operatórias (CORBELLA et al., 1997).

Historicamente, a emergência de cepas de *Staphylococcus aureus* com altos níveis de resistência a penicilina foi seguido pelo desenvolvimento e aumento da resistência as penicilinas semi-sintéticas (metecilina, oxacilina, nafcilina), aos macrolídeos, as tetraciclina,

aos aminoglicosídeos, determinando que a terapêutica das infecções estafilocócicas constituam um desafio global (SADERI et al., 2005)

3.4.2 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* pertence à família Enterobacteriaceae, apresentando-se como bacilos Gram negativos, móveis ou não. Fazem parte da microbiota intestinal, tornando-se patogênico em localizações extra intestinais ou mesmo intestinais. Em meio de cultivo ágar eosina metileno blue (BEM), apresenta colônias esverdeadas, com brilho metálico e geralmente com centro mais escuro. Esta espécie compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados com anti-soros preparados com três tipos de antígenos que ocorrem na espécie: O, K e H. Os sorogrupos que são encontrados na microbiota intestinal podem causar infecções urinárias, meningites e septicemia, e outros tipos de infecção. Há, pelo menos, seis categorias da espécie que causam infecções: *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EaggEC), *Escherichia coli* que adere difusamente (DAEC) (PRETTO, 2005).

3.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* é constituído por bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose e a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é responsável por 70% das infecções causadas por este gênero. Uma das principais características desta espécie é a capacidade de produzir um pigmento de cor azul-esverdeado, denominado piocianina e pioverdina. Habitam solo, água e vegetais, podendo ser encontrada também na pele, fezes e garganta em 3 a 5% dos indivíduos normais. Em pacientes hospitalizados a colonização pode ser bastante elevada. Este micro-organismo causa infecções tipicamente oportunistas, em processos cirúrgicos, queimaduras, pós cateterização urinária, pneumonias principalmente após procedimentos de intubação, podendo resultar em bacteremias severas. A identificação fenotípica do micro-organismo é feita através de suas características bioquímicas e produção de pigmentos das cepas isoladas do material proveniente do processo infeccioso. O gênero *Pseudomonas* é naturalmente resistente aos antimicrobianos betalactâmicos, tetraciclina e outros. No entanto, pode ser sensível aos aminoglicosídeos e algumas penicilinas semi-sintéticas (carbenicilina) (PRETTO, 2005).

3.4.4 *Candida albicans*

Os fungos são capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. O gênero *Candida* é, sem dúvida, o mais importante, mas existe outras leveduras no ambiente hospitalar, tanto em vegetais, ar atmosférico e água, quanto na pele e no trato gastrointestinal dos pacientes e funcionários, que podem causar quadros infecciosos (ANVISA, 2004).

Esta espécie de levedura frequentemente está presente nos isolamentos a partir de amostras biológicas. Isso se deve ao fato de ser um agente colonizador habitual de pele e mucosas humanas, tendo uma média de portadores de 25% a 30% na cavidade oral, com maior incidência em lactentes, crianças pequenas e pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana - HIV. Apresenta um rápido crescimento, em meios de cultura apropriados, alcançando a maturidade em três dias. As colônias são brancas a cremes, lisas, macias, cerosas, brilhantes e pastosas, tornando-se rugosas ao envelhecimento das colônias (SILVA & NEUFELD, 2006).

3.5 Bioautografia

A bioautografia é um método de detecção pós-cromatográfico, baseado na separação das substâncias por cromatografia em papel ou cromatografia em camada delgada. Ensaio bioautográfico podem ser usados para detectar substâncias antibacteriana, antifúngicas, antiprotozoários e antioxidantes (COLORADO; GALEANO; MARTÍNEZ, 2007; HOSTETTMANN et al., 2008).

O método bioautográfico foi acrescentado aos tradicionais protocolos usados na pesquisa de produtos naturais com atividade antimicrobiana em 1946, por Goodall e Levi. Este método é bem difundido e usado principalmente por pesquisadores de laboratórios de química de produtos naturais, devido às facilidades encontradas no desenvolvimento do mesmo (VALGAS, 2002).

A finalidade deste tipo de ensaio é localizar e visualizar zonas de inibição de substâncias ou frações que foram aplicadas na cromatoplaça e que possuam atividade antimicrobiana. A principal vantagem desta técnica é permitir o isolamento de substâncias com atividades antimicrobianas com maior objetividade, as quais estão presentes em misturas

complexas (POTTERAT; HAMBURGER, 2007; COLORADO; GALEANO; MARTÍNEZ, 2007; HOSTETTMANN et al., 2008).

Devido à sua grande variabilidade, diversos fatores podem influenciar o método bioautográficos, tornando sua padronização difícil. Dessa forma, alguns parâmetros devem ser considerados, como fase móvel e seus aditivos, tipo de adsorvente, esterilização da cromatoplaça, micro-organismo teste (tipo de crescimento e concentração do inóculo), tempo de incubação, reagentes de detecção e a utilização de estufa em atmosfera úmida (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005).

Os métodos bioautográficos são geralmente divididos em três categorias: difusão no ágar ou bioautografia de contato, imersão ou método de sobreposição do ágar e bioautografia direta (SCORZONI et al., 2007).

3.5.1 Bioautografia de contato ou difusão no ágar

Neste método, as cromatoplaças são colocadas sobre a superfície das placas contendo o ágar previamente inoculado com o micro-organismo. O princípio do método baseia-se na difusão do composto antimicrobiano (contato direto) na placa cromatográfica para a placa de ágar inoculado. As manchas com atividade antimicrobiana apresentam-se bem localizadas, e as zonas de inibição podem ser facilmente visualizadas pelo uso de cepas de micro-organismos adequados e principalmente pela atividade de reagentes de detecção. É um ensaio que pode ser aplicado à compostos polares ou moderadamente polares (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005; KHURRAM et al., 2009)

3.5.2 Imersão ou método da sobreposição do ágar

Neste ensaio, a cromatoplaça é recoberta com o meio de cultura e depois da solidificação do ágar as placas são inoculadas com o micro-organismo. Neste variante, os compostos ativos aplicados na cromatoplaça devem difundir da fase estacionária para a camada de ágar. Após ser mantida em estufa, a 37°C por 24h, a placa é borrifada com sal de tetrazólio o qual é convertido em formazana e o micro-organismo é corado, gerando zonas claras de inibição. O tetrazólio cora tecido vivo, por isto, quando utilizado em micro-organismo, os colorem e onde não há crescimento a visualização do halo fica mais visível (CHOMA, 2005).

Nesta técnica há duas formas de aplicação de inóculo bacteriano: o primeiro ocorre pela aplicação da suspensão bacteriana na superfície do gel com o auxílio de swab e o segundo pela inoculação ou incorporação da bactéria ao ágar antes que este seja vertido sobre a cromatoplaça. Em estudo realizado comparando-se as duas formas de contato do inóculo, concluiu-se que ambas podem ser empregadas e que não há diferença significativa entre as mesmas (VALGAS, 2002).

O método da sobreposição do ágar é considerado essencial na bioautografia, pois o meio de cultura prevê condições ótimas para o crescimento bacteriano, entretanto, o uso de meio contendo ágar tem sido considerado a grande desvantagem desta técnica por dificultar a difusão dos compostos de baixa difusão, obtendo-se um contraste ruim (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005).

3.5.3 Bioautografia direta

Este ensaio pode ser dividido em três partes: o cultivo do micro-organismo para o teste, a separação cromatográfica e a detecção pós-cromatográfica (HORVATH et al., 2010). Neste método, uma cultura líquida do micro-organismo é derramada ou borrifada sobre a cromatoplaça e a cultura do micro-organismo cresce diretamente sobre a cromatoplaça (CHOMA, 2005; MASOKO; ELOFF, 2005; SHAI et al., 2008; SHAI; MACGAW; ELOFF, 2009).

O crescimento dos micro-organismos só ocorre após as placas serem mantidas em estufa sob atmosfera úmida, sendo este fator, a principal dificuldade do método. A localização da atividade antimicrobiana pode ser facilmente visível assim como os compostos antibacterianos que aparecem como manchas claras sobre um fundo vermelho, devido a conversão do sal de tetrazólio em formazana. Nesta técnica não há a necessidade da difusão do adsorvente para o ágar e substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis estão em contato direto com o micro-organismo e o meio de crescimento (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 Classificação da Pesquisa e Local do Estudo

Trata-se de um estudo experimental realizado nos Laboratórios de Atividade Antimicrobiana e Fitoquímica da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) na cidade de Campina Grande, Paraíba, Brasil.

4.2 Origem dos Extratos Etanólicos Brutos (EEB) e Frações

Os extratos etanólicos brutos (EEB), bem como as frações dos mesmos, foram obtidos em parceria com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba – LTF/UFPB, onde foram realizadas as etapas que envolveram o estudo etnobotânico e o processamento do material vegetal para a posterior obtenção do extrato etanólico bruto (EEB), da fração hexânica (HEX) e da fração clorofórmica (CHCl₃).

Para obtenção dos extratos foram utilizadas as folhas de *Piper arboreum* e *Piper mollicomum*; e o caule de *Piper caldense*. Além dos EEB, foram utilizados nesta pesquisa as frações hexânicas (HEX) de *Piper arboreum* e *Piper caldense*, e a fração clorofórmica (CHCl₃) de *Piper mollicomum*. As concentrações dos produtos obtidos foram correspondentes ao rendimento do procedimento de extração realizado, originando produtos com concentração diferentes entre si, estas foram usadas como concentração inicial para o teste de atividade antimicrobiana.

4.3 Preparação dos produtos para análise

As amostras foram recebidas para análise em frascos de vidro âmbar, contendo identificação de espécie. O EEB e as frações foram solubilizados em 1,0 mL de uma solução do solvente correspondente à extração ou partição, sendo posteriormente submetidas a um banho de ultrassom (Ultrasonic 1440 A) por 15 minutos a 37°C.

4.4 Caracterização dos micro-organismos

Para determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 76615. As cepas selecionadas foram estocadas e mantidas em meios de culturas apropriados, de acordo com as recomendações do fornecedor.

4.5 Meios de cultura

Para o cultivo de bactérias foi utilizado o meio ágar Muller-Hinton, para o cultivo de fungos foi utilizado o meio ágar Sabouraud. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante.

4.6 Preparação da suspensão microbiana (Inóculo)

Após o enriquecimento em caldo de Brain Heart Infusion (BHI), uma alíquota de cada crescimento foi semeada através da técnica de esgotamento por estrias em meios de culturas apropriados, ágar Muller-Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para fungos, e incubado a 37°C por 24 horas, 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 (NaCl a 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, 2009).

4.7 Cromatografia em camada delgada (CCDA) e ensaio da atividade antimicrobiana por bioautografia

A bioautografia reproduzida neste estudo foi a Bioautografia de Imersão ou método da sobreposição do ágar. Foram utilizadas placas de sílica-gel GF₂₅₄. As placas foram colocadas em estufa à temperatura de 100°C por 1 hora para ativação e eliminação da umidade. Para realização do ensaio cromatográfico de camada delgada (CCDA), aplicaram-se com capilar os extratos na cromatoplaça de sílica-gel. Após a eluição das amostras, as placas cromatográficas foram armazenadas em estufa a 37°C por 24 horas até a total volatilização da fase móvel.

Para determinação da atividade antimicrobiana por bioautografia, em condições assépticas, 20 mL de ágar (ágar Müller-Hinton ou ágar Sabouraud), mantidos a 40°C contendo 1,0 mL de suspensão de cada micro-organismo foi vertido na cromatoplaça acondicionada em placa de Petri. As placas cromatográficas, contendo os extratos, ficaram cobertas com uma camada do meio de cultura inoculado. O procedimento foi realizado para todos os micro-organismos. Após solidificação do meio, as placas que continham bactérias foram incubadas em estufa com temperatura de 37°C, durante 24 horas. As placas que continham inóculo fúngico (leveduras) foram incubadas em estufa com temperatura de 25°C, durante 48 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata. Após o tempo de crescimento dos micro-organismos, a bioautografia foi revelada com uma solução de tetrazólio à 2,5mg/mL para melhor visualização dos halos de inibição. A atividade antimicrobiana foi avaliada visualizando-se a área de inibição (DIAS, et al., 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os EEB e as frações das espécies de Piper foram eluídos em sistemas de solventes específico para a polaridade de cada extrato. Para a eluição das placas com os EEB e as frações HEX de *Piper arboreum* e *Piper caldense* foi utilizado o eluente Cloreto de Metileno PA; para a eluição das placas com os EEB e as fração CHCl_3 de *Piper mollicomum* foi utilizado o sistema de eluentes: Acetato de Etila 2% em Cloreto de Metileno PA.

Os resultados obtidos indicam que o EEB e a fração HEX de *Piper arboreum* não apresentaram atividade frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 76615, fato caracterizado pela ausência do halo de inibição de crescimento nas cromatoplas, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Piper arboreum* frente às cepas ATCC por bioautografia

Atividade antimicrobiana		
<i>Piper arboreum</i>		
Micro-organismos	Produtos testados	
testados	Extrato Etanólico Bruto	Fração Hexânica
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Inativo	Inativo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Inativo	Inativo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Inativo	Inativo
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	Inativo	Inativo

Tais resultados se contrapõem aos obtidos por Nascimento et al. (2012), em ensaio de atividade antibacteriana por difusão em ágar, no qual os extratos diclorometânico e da fase clorofórmica das folhas de *Piper arboreum* foram ativos frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA). Esta divergência de resultados pode ser justificada devido à diferença da metodologia utilizada. É relevante ressaltar que as frações em estudo pelo autor também divergem das utilizadas no presente estudo, também os autores não fizeram menção às linhagens utilizadas nos seus estudos que podem ser diferentes das utilizadas neste. De modo que, não se pode afirmar que as linhagens sejam as mesmas. Um “possível” efeito sinérgico dos metabólitos da *Piper arboreum* poderá vir a influenciar na atividade bacteriana,

já que a separação das frações não obteve resultados significantes. Logo, este conjunto de justificativas poderá ter desencadeado a inatividade da *Piper arboreum* no corrente estudo.

A tabela 2 mostra que, a partir dos resultados obtidos com o EEB e a fração HEX de *Piper caldense*, verificou-se atividade frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923, indicada pela formação de um halo de inibição de crescimento tanto para o EEB (figura 1), quanto para a fração HEX (figura 2). Tanto no EEB quanto na fração HEX, as frações ou bandas que mostraram atividade frente à cepa de *S. aureus* ATCC ATCC 25923 apresentaram-se nas mesmas posições e foram denominadas de banda número 4. No entanto, não houve formação do halo de inibição nas cromatoplacas incubadas com as cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 76615.

Tabela 2 - Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Piper caldense* frente às cepas ATCC por bioautografia

Atividade antimicrobiana		
<i>Piper caldense</i>		
Micro-organismos testados	Produtos testados	
	Extrato Etanólico Bruto	Fração Hexânica
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Ativo	Ativo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Inativo	Inativo
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Inativo	Inativo
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	Inativo	Inativo

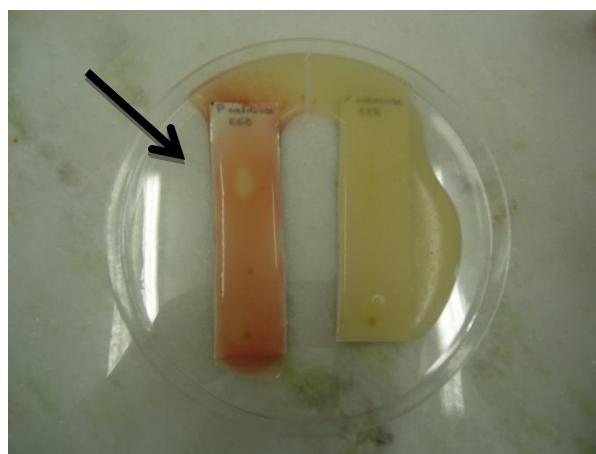


Figura 1 – Bioautografia do EEB de *Piper caldense* frente a *S. aureus* ATCC 25923

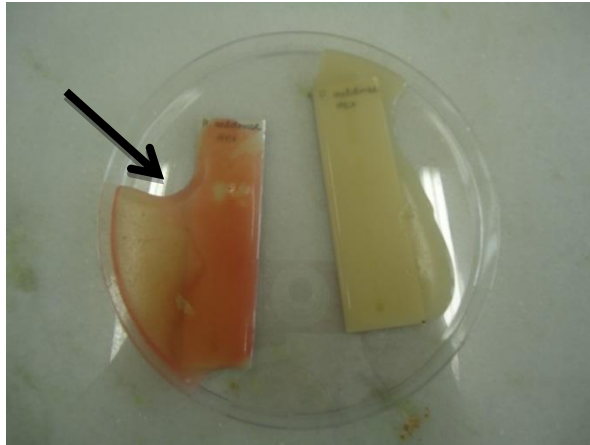


Figura 2 – Bioautografia da fração HEX de *Piper caldense* frente a *S. aureus* ATCC 25923

Segundo Justen (2007), o extrato bruto da espécie *Piper caldense* foi ativo contra a bactéria Gram positiva, *S. aureus* ATCC 25923, apresentando o valor de concentração inibitória mínima (0,39 mg/mL) quando comparado com os extratos de *Piper caldense*, *Piper cernuum* e *Piper lindergii* por ele analisados.

Estudos anteriores observaram atividade dos extratos etanólicos brutos obtidos das folhas de *Piper caldense* na inibição do crescimento bacteriano (Cordova et al., 2010). Dessa forma, tanto as folhas quanto o caule de *Piper caldense* apresentam substâncias que desempenham atividade antimicrobiana. Portanto, a partir da bioautografia, pode-se identificar e isolar a fração do extrato responsável por essa atividade.

Ainda com base nos resultados, observou-se que tanto o EEB quanto a fração CHCl_3 de *Piper mollicomum* não apresentaram atividade frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 76615, visto que não houve formação de halo de inibição nas cromatoplasmas (Tabela 3), nas condições deste estudo.

Tabela 3 - Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Piper mollicomum* frente às cepas ATCC por bioautografia

Atividade antimicrobiana		
<i>Piper mollicomum</i>		
Micro-organismos testados	Produtos testados	
	Extrato Etanólico Bruto	Fração Clorofórmica
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Inativo	Inativo
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Inativo	Inativo

<i>E. coli</i> ATCC 25922	Inativo	Inativo
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	Inativo	Inativo

Segundo Pool-Zobel et al. (1993), a menor sensibilidade das bactérias Gram negativas aos antimicrobianos pode ser justificada pelo fato destes micro-organismos apresentarem uma membrana mais externa, que pode impedir a entrada de moléculas estranhas introduzidas no meio, inclusive de antibióticos. Além do mais, o espaço periplasmático contém enzimas, que são capazes de quebrar estas moléculas, inativando-as. Para Holley e Patel (2005), a membrana dual apresentada pelas bactérias Gram negativas forma um envelope complexo, responsável pela maior resistência destes micro-organismos. Consequentemente, dificultando a permeabilidade a várias substâncias, incluindo os extratos vegetais.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os relatos de autores que também demonstraram que os extratos de *Piper arboreum*, *Piper caldense* e *Piper mollicomum* não foram ativos para as linhagens de bactérias Gram negativas testadas (POOL-ZOBEL et al., 1993; HOLLEY; PATEL, 2005).

A partir dos resultados obtidos por bioautografia de extratos de *Piper arboreum*, *P. caldense* e *Piper mollicomum* observou-se que os mesmos não apresentaram atividade antifúngica frente a *C. albicans* ATCC 76615, Estes dados estão em discordância em relação aos estudos de Justen (2007), que relata que extratos brutos de *Piper caldense*, apresentaram atividade antifúngica frente à *C.albicans* ATCC 10231, apresentando CIM de 0,78 mg/mL. Este fato pode ser explicado pelo fato das cepas em estudo, assim como as metodologias utilizadas terem sido diferentes.

Os EEB e as frações que não apresentaram atividade nesse estudo não podem ter sua atividade antimicrobiana descartada, uma vez que diferentes metodologias podem ser utilizadas visando analisar melhor o comportamento dos produtos e/ou frações que poderiam ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana do produto testado, tanto na forma de extrato quanto na forma de fitoconstituintes isolados. É relevante ressaltar que a presença de diferentes efeitos, sinergismo e antagonismo entre os metabólitos pode ser um fator limitante para que haja diferentes formas de apresentação da atividade antimicrobiana.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no estudo da atividade antimicrobiana de espécies de *Piper*, concluiu-se que:

- A bioautografia é um ensaio eficiente e sensível na determinação da atividade antimicrobiana de produtos vegetais.
- Os EEB e as frações HEX e CHCl₃ de *Piper arboreum* e *Piper mollicomum* não apresentaram metabólitos com atividade antimicrobiana frente as linhagens microbianas utilizadas neste estudo.
- O EEB assim como a sua fração da *Piper caldense* apresentam comportamentos semelhantes. Em ambos os produtos observou-se mesmo número de bandas, sendo a 4^a banda constituída por metabólitos com atividade para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.
- Sugere-se futuro isolamento, identificação e quantificação do fitoconstituente, ativo, presente na 4^a banda do EEB e da fração HEX da *P. caldense*, para determinação do seu potencial antimicrobiano. Estes aspectos são extremamente importantes na perspectiva do desenvolvimento de um produto farmacêutico.

REFERÊNCIAS

AGRA, F.M.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.472-508, 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. 2004. Disponível em:

□http://www.anvisa.gov.br/servicos/medicamentos/manuais/microbiologia/mod_7_2004.pdf□. Acesso em: 20 mai. 2014.

ARESI, C. **Avaliação da Potencial Atividade Antimicrobiana de Produtos de Origem Natural: Estudo Bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L.Taub**. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – Santa Catarina, 2011.

BALDOQUI, D.C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; KATO, M.J.; MARQUES, M.O.M. Flavonas, Lignanas e Terpenos de *Piper umbellatum* (Piperaceae). **Química Nova**, v.32, n.5, p.1107-1109, 2009.

BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ALENCAR, N.M.N.D.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; ALVES, E.R.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* grow inhibition of sarcoma 180 by piperlangumine, na alkaliod amide from the *Piper* species. **Journal of Applied toxicology**, v.28, p.599-607, 2008.

BOTZ, L.; KOCSIS, B.; NAGY, S. Bioautografy In: WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. **Encyclopedia of Analytical Science**. 2 ed. Oxford: Elsevier, 2005.

CARDOSO JÚNIOR, E.L.; CHAVES, M.C.O. Caldensin, a new N-methylaristolactam alkaloid from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.3, p.216-218, 2003.

CECHINEL FILHO, V.; YOUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CHOMA, I. The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. **LC-GC Europe**, v.18, n.9, p.482-488, 2005.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI - 2002. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**. Document M100–S19. CLSI, Wayne, Pa, 2009.

COLORADO, J.R.; GALEANO, E.J.; MARTÍNEZ, A.M. Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. **Vitae, Revista da la Facultad de Química Farmacêutica**, v.14, n.1, p.67-71, 2007.

CORBELLA, X; DOMINGUEZ, M.A.; PUJOL, M.; AVATS, J.; SENDRA, M.; PALLARES, R.; ARIZA, J.; GUDIOL, F. *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.16. n.5, p.351-357, 1997.

CORDOVA, S.M.; BENFATTI, C.S.; MAGINA, M.D.A.; GUEDES, A.; CORDOVA, C.M.M. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n.4, p.241-244, 2010.

DIAS, J.F.G.; VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL O.G; AUER, C.G.; JUNIOR, A.G.; OLIVEIRA, A.B.; FERRONATO, M.L. Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Extratos Etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd., Asteraceae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, vol.16, n.1, p. 83-87, 2006.

DOMINGUEZ, X.A.; ALCORN, J.B. Screening of medicinal plants used by huastec mayans of northeast México. **Journal of Ethnopharmacology**, v.13, p.157-163, 1985.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-316, 2000.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oil from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.197-201, 2007.

DYER, L.A.; PALMER, A.D.N. *Piper*: A model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution. 1. ed. Boston: Academic Publishers, 2004.

GIBBONS, S.; OHLENDORF, B.; JOHNSEN, I. The Genus *Hypericum*: available resource of anti-Staphylococcal Leads. **Fitoterapia**, v.73, p.300-304, 2002.

GUIMARÃES, E.F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.57, n.3, p.569-589, 2006.

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

HORVATH, G.; JAMBOR, N.; VEGH, A.; BOSZORMENYI, A.; LEMBERKOVICS, E.; HETHELYI, E.; KOVACS, K.; KOCSIS, B. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, p.178-182, 2010.

HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M.P.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F. **Handbook of Strategies for The Isolation of Bioactive Natural Products**. 1. ed. Bogota: CYTED, 2008.

KHURRAM, M.; KHAN, M.A.; HAMEED, A.; ABBAS, N.; QAYUM, A.; INAYAT, H. Antibacterial Activities of *Dodonaea viscosa* using Contact Bioautography Technique. **Molecules**, v.14, p.1332-1341, 2009.

KONEMAN, E.; JR., W.W.; ALLEN, S.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.88, p.706-716, 2001.

JUSTEN, M. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Espécies do Gênero *Piper***. 2007. 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Regional de Blumenau, Blumenau - Santa Caratina, 2007.

LAGO, J.H.G.; YOUNG, M.C.M.; REIGADA, J.B.; SOARES, M.G.; ROESLER, B.P.; KATO, M.J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *Piper lhotzkyanum* (Piperaceae). **Química Nova**, v.30, n.5, p.1222-1224, 2007.

LINDSAY, J.A.; HOLDEN, M.T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? **Trends in Microbiology**, v.12, n.8, p.378-385, 2004.

MABBERLEY, D.J. **The Plant Book: A Portable Dictionary of The Higher Plants**. New York: Cambridge Univ. Press, 1997.

MASOKO, P.; ELOFF, J.N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.12, p.1424-1431, 2005.

MÜLLER, J.B. **Avaliação das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e Antinociceptiva das Folhas da *Luehea divaricata* Martius**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - Rio Grande do Sul, 2006.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247-256, 2000.

NASCIMENTO, S.; SILVA, M.; SILVA, R.; ARAUJO, J.; RAMOS, C. Estudo preliminar da atividade bactericida dos extratos dos tecidos de *Piper arboreum* frente *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA. **Associação Brasileira de Química**, 2012.

NEPOMUCENO, D.C.; YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. Atividade antibacteriana e fracionamento direcionado do extrato orgânico obtido de *Tovomita* sp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.3-4, 2003.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.1, p.21-24, 2003.

POOL-ZOBEL, B.L.; MUNZNER, R.; HOLZAPFEL, W.H. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the *S. Typhimurium* mutagenicity assay. **Nutrition and Cancer**, v.20, n.3, p.261-270, 1993.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. Natural products in drug discovery – concepts and approaches for tracking bioactivity. **Current Organic Chemistry**, v.10, n.8, p.899-920, 2007.

PRETTO, J. B. **Potencial Antimicrobiano de Extratos, Frações e Compostos Puros Obtidos de Algumas Plantas da Flora Catarinense**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale Itajaí, Itajaí – Santa Catarina, 2005.

RAMOS, C.S.; KATO, M.J. Hidrólise de benzoato de metila de *Piper arboretum* pelo besouro *Naupactus bipes*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.20, n.3, p.560-563, 2009.

REGASINI, L.O.; COTINGUIBA, F.; MORANDIMA, A.; KATO, M.J.; MENDES-GIANNINI, M.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Antimicrobial activity of de *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.12, p.2866-2870, 2009.

RESEM – XXVI Reunião Anual sobre Evolução Sistemática e Ecologia Micromoleculares, 2004, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense. **Evolução Metabólica em Espécies de Piperaceae**. Livro de anais, p.27, 2004.

ROSA, S.M.; SOUZA, L.A. Estruturas de reprodução de *Piper amalago* var. *medium* Liannaes (Piperaceae). **Acta Científica Venezuelana**, v.55, p.27-34, 2004.

SADERI, H.; OWLIA, P.; SHANRBANOOIE, R. Vancomycin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Archives Iranian Medicine**, v.8, n.2, p.100-103, 2005.

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

SANTOS, P.D.R.; MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. Essencial analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v.58, p.547-551, 2001.

SARAIVA, A.M. **Estudo Farmacognóstico e Determinação da Atividade Biológica de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. e *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA Multirresistentes**. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife - Pernambuco, 2007.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; GIANINNI, M.J.S.M. The use of Standard methodology for determination of antifungal activity of Natural Products against medical yeasts *Candida* sp. And *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.3, p.391-397, 2007.

SHAI, L.J.; MCGAW, L.J.; ADEROGBA, M.A.; MDEE, L.K.; ELOFF, J.N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.238-244, 2008.

SHAI, L.J.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Extracts of the leaves and twigs of the threatened tree *Curtisia dentata* (Cornaceae) are more active against *Candida albicans* and other microorganisms than the stem bark extract. **South African Journal of Botany**, v.75, p.363-366, 2009.

STAPLETON, P.D; SHAH, S.; ANDERSON, J.C.; HARA, Y.; HAMILTON-MILLER, J.M.T.; TAYLOR, P.W. Modulations of β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.462-467, 2004.

SILVA, C.H.P.M & NEUFELD, P.M. **Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessidade da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.35-40, 2002.

SIMÕES, C.M.O., *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre-RS: Editora UFRGS/UFSC, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L.R.; ALTESTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VALGAS, C. **Avaliação de métodos de Triagem para determinação de atividade antibacteriana de Produtos Naturais**. 2002. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Santa Catarina, 2002.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.P.; KITPPIPIT, L. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Infection**, v.11, p.493-512, 2005.

YAO, C.Y.; WANG, J.; QIAN, F.G.; XIE, J.; PAN, S.L. Laetispicine, anamidealkaloid from *Piper laetispicum*, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice. **Phytomedicine**, v.16, p.823-829, 2009.