



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB  
MESTRADO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR - MBM

ANA CRISTINA ALBUQUERQUE DA SILVA

**PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LUZ DE LED AZUL  
SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
ESPÉCIES DE *Piper* (Piperaceae) E MODULAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBIÓTICA**

CRATO - CE

2019

ANA CRISTINA ALBUQUERQUE DA SILVA

**PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LUZ DE LED AZUL  
SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
ESPÉCIES DE *Piper* (Piperaceae) E MODULAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBIÓTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de MESTRE EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR.

Orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

Co-orientador:

Prof. Dr. Edinardo Fagner Ferreira Matias

CRATO – CE

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA  
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva CRB 3/1000

Silva, Ana Cristina Albuquerque da.  
S586p Perfil químico e avaliação do efeito da luz de led azul sobre a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de *Piper* (Piperaceae) e modulação da atividade antibiótica/ Ana Cristina Albuquerque da Silva. – Crato-CE, 2019  
56p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA  
Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho  
Co-orientador: Prof. Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias

1. Atividade antibacteriana, 2. Terapia fotodinâmica, 3. LED azul, 4. Piperaceae, 5. Resistência bacteriana; I. Título.

CDD: 615.372

ANA CRISTINA ALBUQUERQUE DA SILVA

**PERFIL QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LUZ DE LED AZUL  
SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
ESPÉCIES DE *Piper* (Piperaceae) E MODULAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBIÓTICA**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA EM: 26 / 07 / 2019.

RESULTADO: Aprovada

**BANCA EXAMINADORA:**

**Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Orientador)**  
Departamento de Química Biológica – URCA

**Prof. Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias (Co-orientador)**  
Departamento de Biomedicina - UNILEÃO

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues (Membro interno)**  
Departamento de Biomedicina - UNILEÃO

**Prof. Dr. Aracélio Viana Colares (Membro externo)**  
Departamento de Departamento de Biomedicina – UNILEÃO

**Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Suplente)**  
Departamento de Química Biológica – URCA

*Dedico este trabalho a minha mãe, que em mim sempre depositou toda confiança, que acredita e, sempre acreditou em meus sonhos, me ajudando a realizá-los.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer sempre presente, me iluminando e dando-me forças para enfrentar e superar todas as tribulações.

Ao meu orientador **Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho** pela ajuda durante esse período.

Ao meu co-orientador **Dr. Edinaldo Fagner Ferreira Matias**, mentor deste trabalho, por todo o apoio.

À minha mãe **Francisca Erivanda Albuquerque da Silva** e toda minha família pela confiança durante a nossa jornada.

Aos meus amigos pelo carinho e apoio. Em especial ao meu amigo **Jefferson de Sales Diodato** por toda ajuda durante esse processo.

Ao Professor **Dr. Luiz Everson Silva** do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pelo fornecimento dos óleos essenciais utilizados neste estudo.

Aos Professores do Mestrado em Bioprospeção Molecular da Universidade Regional do Cariri, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

À FUNCAP pelo apoio financeiro.

*“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.*

(Josué 1:9)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 OBJETIVOS .....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
3.1 Considerações farmacológicas.....	19
3.2 Metabólitos secundários e óleos essenciais .....	20
3.2.1 Terpenos .....	20
3.2.2 Fenilpropanoides .....	21
3.3 Resistência bacteriana .....	21
3.4 Aminoglicosídeos.....	23
3.5 Resistência à aminoglicosídeos .....	24
3.6 <i>Light Emithing Diodes</i> (LED).....	25
3.6.1 Luz de LED azul .....	26
3.7 Terapia fotodinâmica antimicrobiana.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Obtenção do material vegetal, extração e identificação dos óleos essenciais .....	29
4.2 Aparelho de LED .....	29
4.3 Cepas bacterianas .....	29
4.4 Preparo dos óleos essenciais .....	30
4.5 Preparo dos Inóculos e antibióticos .....	30
4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	30
4.7 Modulação da atividade antibiótica .....	31
4. 8 Análise Estatística .....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Composição química.....	32
5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	36
5.3 Modulação da atividade antibiótica .....	37
5.4 Efeito da luz de LED sobre a modulação da atividade antibiótica .....	41
6 CONCLUSÃO .....	
REFERÊNCIAS .....	
ANEXOS	



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- aBL – *Blue antimicrobial light* (luz azul antimicrobiana)
- AAC – Acetiltransferases de aminoglicosídeos
- AmPDT – *Antimicrobial Photodynamic Therapy*
- ANT – Fosfotransferases de aminoglicosídeos
- APH – Adenililtransferases de aminoglicosídeos
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BHI – *Brain Heart Infusion*
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EC – *Escherichia coli*
- eV – Elétron volt
- ERO's – Espécies reativas de oxigênio
- FS – Fotossensibilizador
- IR – Índice de retenção
- LED – *Ligth Emitting Diodes*
- LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA)
- PDT – *Photodynamic Therapy*
- SA – *Staphylococcus aureus*
- Tn – Transposon
- UV – Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Representação química dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides.....20
- Figura - 2** Esquematização da alteração enzimática dos aminoglicosídeos.....24
- Figura 3 -** Diagrama de Jablonski: estados energéticos de uma molécula e as transições entre elas.....27
- Figura 4 -** Representação dos principais constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* Aubl.....34
- Figura 5 -** Representação dos principais constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* L.....35
- Figura 6 -** Representação dos principais constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* Kunth.....35
- Figura 7 -** Óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* (OEPar) em associação com antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*.....38
- Figura 8 -** Óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* (OEPar) em associação com antimicrobianos contra *Escherichia coli*.....38
- Figura 9 -** Óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* (OEPad) em associação com antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*.....39
- Figura 10 -** Óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* (OEPad) em associação com antimicrobianos contra *Escherichia coli*.....39

<b>Figura 11 -</b>	Óleo essencial das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> (OEPg) em associação com antimicrobianos	contra	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
<b>Figura 12 -</b>	Óleo essencial das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> (OEPg) em associação com antimicrobianos	contra	<i>Escherichia coli</i> .....	40
<b>Figura 13 -</b>	Efeito da luz de LED azul sobre a atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Piper arboreum</i> o efeito modulador de aminoglicosídeos.....			42
<b>Figura 14 -</b>	Efeito da luz de LED azul sobre a atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> o efeito modulador de aminoglicosídeos.....			42
<b>Figura 15 -</b>	Efeito da luz de LED azul sobre a atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i> o efeito modulador de aminoglicosídeos.....			43

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1 -</b>	Composição química dos óleos essenciais de <i>Piper arboreum</i> , <i>Piper aduncum</i> e <i>Piper gaudichaudianum</i> .....	32
<b>Tabela 2 -</b>	Concentração Mínima.....	Inibitória 36
<b>Quadro 1 -</b>	Descrição dos tipos de mutação.....	22

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1 -** Comprovante de submissão – ARTIGO 1  
Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blues LED lights in the  
enhancement of the antibiotic activity of drugs against MDR.....59
- ANEXO 2 -** Comprovante de submissão – ARTIGO 2  
GC-MS characterization and avaluation of antibacterial bioactivities of  
the essential oils from *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. and  
*Piper gauduchaudianum* Kunth.....60

## RESUMO

O desafio da quimioterapia antibacteriana é encontrar agentes seguros e seletivos com potência que não será comprometida pela resistência desenvolvida. A fototerapia pode ser considerada uma alternativa para controlar a resistência bacteriana. Como uma abordagem inovadora não antibiótica, a luz azul antimicrobiana (aBL) no espectro de 400-470 nm demonstrou suas propriedades antimicrobianas e, devido às suas características multi-alvo a capacidade dos microrganismos desenvolver resistência é reduzida significativamente. O gênero *Piper* amplamente distribuído em regiões subtropicais é conhecido por suas ervas aromáticas. *Piper arboreum* Aubl. (pau-de-angola) apresenta atividade antifúngica, tripanocida, antibacteriana e anti-oxidante, *Piper aduncum* L. (pimenta-de-macaco) possui atividades antibacteriana e antifúngica e *Piper gaudichaudianum* Kunth (pariparoba) possui efeito fungicida, inseticida, anti-inflamatório. Este trabalho objetivou realizar a identificação química e avaliar o efeito da luz de LED azul sobre a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de *Piper* e modulação da atividade antibiótica, utilizando o método de microdiluição em caldo, com placas de 96 poços que foram expostas à luz de LED azul por 20 minutos. Os componentes químicos foram caracterizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, que revelou  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol (31,38 %), germacreno A (13,33 %) e germacreno B (21,53 %) como constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Piper arboreum* (OEPar), *Piper aduncum* (OEPad) e *Piper gaudichaudianum* (OEPg), respectivamente. Frente *Staphylococcus aureus* multirresistente, houve atividade significativa, corroborando com relatos na literatura, de que bactérias Gram - positivas são mais susceptíveis à atividade antibacteriana. Os óleos essenciais modularam o efeito dos antibióticos norfloxacino e gentamicina, tendo sobre este último maior efeito, porém para a eritromicina não foi observado efeito estatisticamente significativo. Os óleos essenciais modularam o efeito dos antibióticos amicacina e gentamicina e, quando expostos ao LED azul esse efeito foi potencializado. A aBL na ausência do óleo essencial também apresentou a capacidade de modular a atividade antibiótica dos aminoglicosídeos analisados neste estudo, mostrando em sua maioria efeito sinérgico. Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os óleos essenciais obtidos de *P. arboreum*, *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum* interferem na ação de antibióticos contra bactérias expostas a luz de LED azul. A luz de LED azul apresentou atividade inibitória sobre o crescimento bacteriano, bem como sobre a ação de antibióticos que não são fotoativos.

**Palavras – chave:** Atividade antibacteriana, terapia fotodinâmica, LED azul, Piperaceae, resistência bacteriana.

## ABSTRACT

The challenge of antibacterial chemotherapy is always safe and selective in order to generate a negative response to resistance to death. Phototherapy may instead be an alternative to control bacterial resistance. As an innovative non-antibiotic test, an antimicrobial blue light (aBL) not 400-470 nm demonstrated its antimicrobial properties and due to its multi-target characteristics the ability of microorganisms to dampen energy was significantly reduced. This code is then sent by subtropical regions is known for its aromatic herbs. *Piper arboreum* Aubl. (Pau de angola) has antifungal, trypanocidal, antibacterial and anti-oxidant activity, *Piper aduncum* L. (Pimenta de macaco) has antibacterial and antifungal activities, and *Piper gaudichaudianum* Kunth (Pariparoba) has fungicidal, insecticidal, anti - report This work aimed to perform a chemical and significant proof of the effect of sunlight on the antibacterial activity of essential oils of Piper species and the modulation of antibiotic activity, using the broth microdilution method, with 96-well plates that exposed the Blue LED light for 20 minutes. The chemical components were characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry, queß-copaen-4- $\alpha$ -ol (31.38%), germacrene A (13.33%) and germacrene B (21.53%). They constitute the majority of the essential oils of *Piper arboreum* (OEPar), *Piper aduncum* (OEPad) and *Piper gaudichaudianum* (OEPg), respectively. Fracture *Staphylococcus aureus* multiresistant was a significant activity, corroborating reports in the literature that bacteria are more susceptible to antibacterial activity. The oils are modular and the effect of norfloxacin and gentamicin antibiotics having on the greatest effect, however, for an erythromycin were not statistically significant impeded. Essential oils are the effect of amikacin and gentamicin antibiotics and, when exposed to LED, the effect is enhanced. A aBL has also been essential in its ability to modulate the antibiotic activity of aminoglycosides in the present study, showing its greater synergistic efficacy. In conclusion, the results obtained in this study demonstrated that the results were compared with antibacterial, antiinflammatory and bacterial action. Blue LED light showed inhibitory activity on bacterial growth as well as the action of non-photoactive antibiotics.

**Key-Words:** Antibacterial activity, photodynamic therapy, blue LED, Piperaceae, bacterial resistance.

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a medicina tradicional é pautada na sua antiguidade, compreendendo o somatório de conhecimentos, competências e práticas que repousam sobre teorias, crenças e experiências próprias a diferentes culturas, sejam elas explicáveis ou não pela metodologia científica hegemônica no campo da saúde, mas que são utilizadas para a preservação da saúde, assim como para a prevenção, o diagnóstico e a melhoria ou mesmo o tratamento de doenças físicas ou mentais. (WHO, 2013).

A riqueza da biodiversidade da flora brasileira, associada aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, permite aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais, os quais podem se constituir em modelos tanto para a síntese de fármacos quanto de outros produtos para aplicação agrícola ou florestal (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A espécie *Piper arboreum* Aubl. conhecida popularmente como pau-de-angola, jaborandi, pimenta do mato possui pirrolidina antifúngica, tripanocida, antibacteriana e anti-oxidante (LUIS et al., 2008; REGASINI et al., 2009a; REGASINI et al., 2009b). *Piper aduncum* L. conhecida popularmente como jaborandi do mato, pimenta-de-macaco, erva de jaboti (BOTSARIS, 1997) possui atividades antibacteriana, antifúngica (BASTOS et al., 2004; MAIA et al., 2001), antiprotozoário, larvicida, inseticida (FAZOLIN et al., 2005; LAROCQUE et al., 1999). *Piper gaudichaudianum* Kunth é conhecida popularmente como pariparoba ou jaborandi (GUIMARÃES; VALENTE, 2001), suas folhas são utilizadas na medicina popular para aliviar dor de dente. Outros estudos relatam atividades biológicas como efeito fungicida, inseticida, anti-inflamatória, larvicida e analgésica (LAGO et al., 2004; MORAIS et al., 2007).

Devido ao abuso generalizado de antibióticos, o número de bactérias multirresistentes (super-bactérias) vêm aumentando significativamente, ocasionando o aumento das taxas de morbidade e mortalidade em doenças relacionadas. O Centro Nacional de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) informou que nos Estados Unidos, pelo menos 2 milhões de casos de infecções graves são causados por uma ou mais bactérias resistentes a antimicrobianos a cada ano, dos quais 30.000 pacientes morrem de tais infecções (THOMAS et al. 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou em abril de 2014 que as bactérias resistentes a antibióticos estão se



espalhando pelo mundo o qual está entrando em uma era pós-antibiótica. Sem qualquer ação, doenças infecciosas incuráveis e ferimentos leves poderão levar à morte, o que pode evoluir para uma crise global de saúde (SMITH, 2014).

Diversos estudos são realizados com a finalidade de diminuir a resistência bacteriana, utilizando extratos vegetais, óleos essenciais, partículas sintéticas, peptídeos, diodos emissores de luz, lasers. A modalidade de tratamento denominada Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sua origem do termo em inglês *Photodynamic Therapy* (PDT). Trata-se de uma técnica muito utilizada para o tratamento do câncer de pele, uma vez que, quando comparada aos tratamentos cirúrgicos convencionais para esse tipo de lesão, é considerada como minimamente invasiva, não havendo a exigência de remoção do tecido lesionado (GAD et al, 2004). Esta terapia, quando utilizada no controle microbiano pode ser chamada de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (AmPDT), do inglês *Photodynamic Therapy Antimicrobial Chemotherapy* (WAINWRIGHT, 1998).

Em virtude da grande dificuldade encontrada no tratamento de infecções provocadas por bactérias multirresistentes, é notória a necessidade de novas substâncias antimicrobianas que sejam eficazes no combate a microrganismos. A fotoinativação utilizando a luz de LED tem se mostrado uma alternativa de grande relevância na terapia antimicrobiana, uma vez que os microrganismos estão menos susceptíveis a desenvolver resistência devido ao seu mecanismo de ação, que consiste na produção de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para a célula do agente patogênico (WANG et al. 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Identificar a composição química e o efeito da luz de LED azul sobre a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de *Piper* e modulação da atividade antibiótica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth por meio de Cromatografia acoplada a espectrometria de massas (CG/MS);
- Investigar a atividade antibacteriana e moduladora dos óleos essenciais de *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth por contato direto;
- Avaliar o efeito da luz de LED azul sobre a atividade antibacteriana e moduladora dos óleos essenciais de *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth à aminoglicosídeos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Considerações farmacológicas

As espécies da família Piperaceae apresentam grande importância comercial e agrônômica, em virtude da utilização como condimentares, alimentícias e emprego na medicina popular (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2005). Uma espécie de grande importância e muito conhecida desta família é a pimenta do reino (*Piper nigrum* L.), utilizada como especiaria em diversos países (SRINIVASAN, 2007). Outras espécies do gênero *Piper* também são bastante utilizadas, principalmente no Brasil, muitas são de grande importância devido a atividades farmacológicas comprovadas em diversos estudos (GOGOSZ et al., 2012).

As folhas e raízes de *P. aduncum* L. são utilizadas na medicina popular em forma de chás para o tratamento de diarreia, disenteria, náuseas, úlceras e infecções do trato geniturinário (COOK, 2016).

Pesquisas realizadas utilizando o óleo essencial desta espécie mostram propriedades antiprotozoária (MONZOTE et al., 2004; VILLAMIZAR et al., 2017), anti-helmíntica (GAÍNZA et al., 2016), antioxidante (RODRIGUEZ et al., 2013) e inseticida (MAMOOD et al., 2017; SOUTO et al., 2012). De acordo com estudos presentes na literatura, o composto principal de *P. aduncum*, dillapiole, é responsável pelas atividades larvicida, fungicida, inseticida (MAIA et al., 1998, ALMEIDA, 2004). O óleo essencial das folhas de *P. aduncum* mostrou atividade antifúngica e antibacteriana (VALADARES et al., 2018).

Na medicina popular as folhas e o caule de *P. arboreum* Aubl. são utilizados para tratamento de doenças venéreas e, infecções do trato urinário (AGRA et al., 2007). O óleo essencial de *P. arboreum* apresenta considerável atividade moluscida contra *Biomphalaria glabrata*, atividades citotóxica, inseticida, fungicida e antimicrobiana (SANTOS et al., 2001; CONSTANTIN et al., 2001).

A infusão das folhas de *P. gaudichaudianum* Kunth é utilizada na medicina popular para aliviar dor de dente, as raízes são utilizadas como anti-inflamatório e contra doenças hepáticas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). O óleo essencial das folhas desta espécie apresenta atividade anti-inflamatória e larvicida (MORAIS et al., 2007), bem como efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em células V79 de mamíferos (PÉRES et al., 2009).

### 3.2 Metabólitos secundários e óleos essenciais

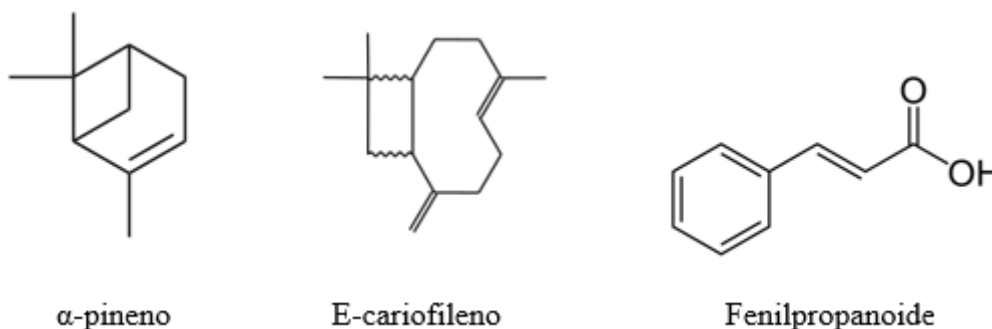
Metabólitos secundários tais como os alcaloides, terpenoides, antocianinas, esteroides, flavonoides, quinonas e ligninas apresentam-se como grupos bastante diversificados em estrutura e tamanho, tendo distribuição em todo reino vegetal. Estes compostos apresentam também aplicações comerciais como fármacos, corantes, inseticidas (BURT, 2004; VERPOORTE; MEMELINK, 2002).

Os óleos essenciais são exemplos de misturas destes compostos, complexos naturais, voláteis e com forte odor. Na natureza os óleos essenciais desempenham papel importante na proteção das plantas, como agentes antibacterianos, antivirais, inseticida e contra herbívoros. São líquidos, voláteis, solúveis em solventes orgânicos, são sintetizados por toda a planta, como folhas, caule, sementes, frutos, cascas (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

Em sua maioria são caracterizados pela presença de dois ou três componentes em altas concentrações (20 – 70 %) e outros componentes em menor concentração. Os principais compostos, que são chamados de majoritários, determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (PALAZZOLO; LAUDICINA; GERMANÀ, 2013).

Os óleos essenciais são compostos basicamente por monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), fenilpropanoides (Figura 2) (FRANZ, 2010).

**Figura 1** – Exemplos de estrutura química encontrados nos óleos essenciais. Monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides.



Fonte: <https://uniquim.iqumica.unam.mx/compuesto-item/a-pineno-1613/> (2019)

#### 3.2.1 Terpenos

Os terpenos constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo classificados pelo número de carbonos, o qual é resultado do número de

moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) presentes em sua estrutura. Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são monoterpenos (C10) e sequiterpenos (C15), que cada vez são mais estudados devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (DUBEY et al., 2003).

Dentre os diversos compostos que podem fazer parte da composição dos óleos essenciais, o timol e o carvacrol se destacam devido suas pronunciadas atividades antimicrobiana. Estes monoterpenos aromáticos são os constituintes principais dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (*Lamiaceae*), *Origanum compactum* (*Labiatae*), *Acalypha phleoides* (*Euphorbiaceae*) (PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

### 3.2.2 Fenilpropanóides

Os fenilpropanóides são formados a partir do ácido chiquímico, que conduz às unidades básicas: ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico. Estes últimos, por meio de reduções enzimáticas produzem propenilbenzenos e/ou alilbenzenos e, por meio de oxidações degradativas das cadeias laterais, podem gerar aldeídos aromáticos; as ciclizações enzimáticas intramoleculares produzem as cumarinas (CONNOLLY; HILL, 2007).

### 3.3 Resistência bacteriana

A resistência antibiótica tem se tornado cada vez mais comum, se caracterizando como uma ameaça de saúde extremamente perigosa. É indiscutível que a resistência a antibióticos é potencialmente fatal e o uso extensivo de antibióticos é o fator mais importante para resistência a antibióticos (BUSH et al., 2011; COWEN et al., 2014; HAMPTON, 2013).

A forma como esses medicamentos são utilizados em ambientes ambulatoriais, hospitalares e domésticos no tratamento ou profilaxia de doenças humanas; na pecuária (MEIRELES, 2008), como por exemplo, para a produção de animais de corte como frangos (ALLIX, 2010) e para o tratamento de mastite em bovinos (SILVA et al., 2012); e da utilização de produtos ‘banais’, sem finalidade terapêutica que possuem em suas formulações antibióticos favorecendo a seleção de patógenos resistentes no meio ambiente e que podem causar doenças de difícil tratamento (ORÚS et al., 2015).

A resistência aos antimicrobianos pode ser: 1) uma característica intrínseca de certas espécies de bactérias que podem resistir à ação de um dado antibiótico como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie (BLAIR et al., 2015); 2) adquirida como resultado de mutações que podem ocorrer durante a replicação celular ou serem induzidas por intermédio de agentes mutagênicos como radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (ERO's) (BAPTISTA, 2013), o Quadro 1 descreve os tipos de mutações que podem ocorrer; 3) adquirida pela aquisição de material genético exógeno anteriormente presente em outros microrganismos que contenham genes de resistência que são propagados por meio de mecanismos de transferência gênica horizontal (TAVARES, 2000; COSTA, 2016) como a conjugação bacteriana, a transformação e a transdução (DZIDIC et al., 2008).

**Quadro 1** – Descrição dos tipos de mutações.

<b>Tipo de mutação</b>	<b>Descrição</b>	<b>Consequências da mutação</b>
Reposição	Transição Troca de uma pirimidina por outra ou de uma purina por outra	Formação de códons <i>nonsense</i> que origina peptídeos incompletos ou
	Transversão Troca de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa	Formação de códons <i>missense</i> que altera a proteína
Deleção	Macrodeleção Remoção de vários nucleotídeos	Peptídeos incompletos
	Microdeleção Remoção de um ou dois nucleotídeos	<i>Frame shift</i> resulta em códons <i>nonsense</i> ou em peptídeos incompletos
Inserção	Macroinserção Inclusão de vários nucleotídeos	Peptídeos incompletos
	Microinserção Inclusão de um ou dois nucleotídeos	<i>Frame shift</i> resulta em códons <i>nonsense</i> ou em peptídeos incompletos
	Remoção de uma porção	Codificação de proteínas

Inversão	de DNA e inserção da não funcionais mesma em outro local do cromossomo de forma invertida
----------	--

Fonte: NEIHARDT (2004) (ADAPTADO).

As bactérias portadoras de resistência intrínseca ou de genes de resistência apresentam maior adaptação e tolerância à pressão seletiva que os antibióticos impõem ao meio, devido às capacidades bioquímicas que tais microrganismos podem expressar (KUMAR; VARELA, 2013), que favorecem seu desenvolvimento por reduzir a competição por espaço e nutrientes no meio com as células que não possuem mecanismos de resistência, selecionando os microrganismos menos susceptíveis ou resistentes aos agentes inibitórios dentro de uma comunidade microbiana (GUSTAVO, 2008).

### 3.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são usados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas aeróbias. Fazem parte desta classe antibióticos como gentamicina, tobramicina e amicacina que são utilizados no tratamento de infecções nosocomiais em associação com  $\beta$ -lactâmicos e a estreptomicina e a canamicina indicados no tratamento da tuberculose e brucelose. (GOODMAN; GILMAN'S, 2008; KATZUNG, 2007).

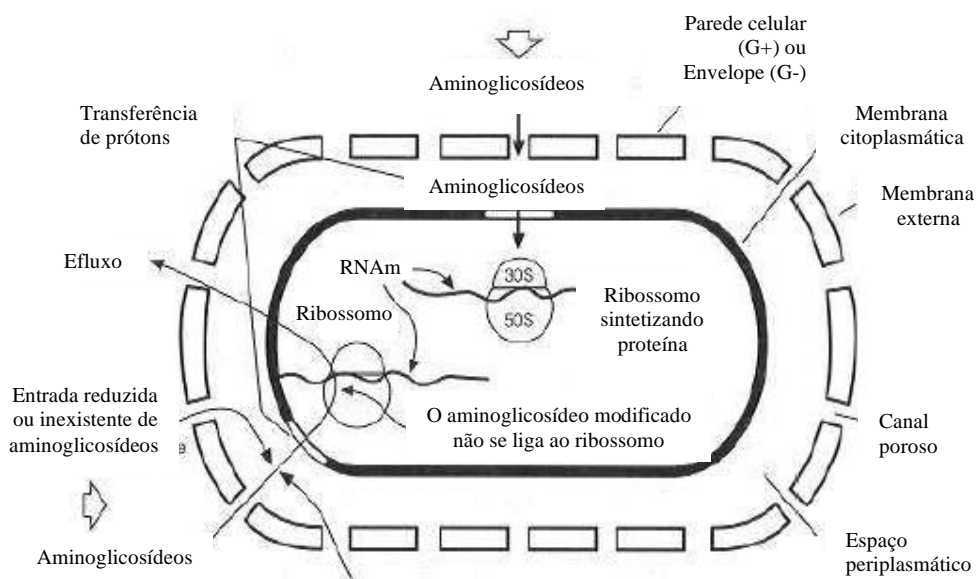
A atividade bactericida dos aminoglicosídeos permanece mesmo com a diminuição da concentração sérica abaixo da concentração inibitória mínima (CIM). Estes antibióticos penetram no interior das bactérias Gram-negativas, por difusão facilitada através de porinas presentes na membrana externa. O local de ação é a subunidade 30S dos ribossomos, que é composto por vinte e uma proteínas e uma molécula 16S de RNA. O antibiótico aminoglicosídeo liga-se à proteína 12S na subunidade 30s ribossômica, o que leva a um erro de leitura do código genético. A síntese proteica pode ser inibida de duas formas diferentes, por interferência sobre o complexo de iniciação ou a leitura errônea do RNAm, que leva à incorporação de diferentes aminoácidos, resultando numa proteína não funcional (BRODY; LARNER;

MINMEMAN, 1998; GOODMAN; GILMAN'S, 2008; KATZUNG, 2007; NEU; GOOTZ, 1996).

### 3.5 Resistência à aminoglicosídeos

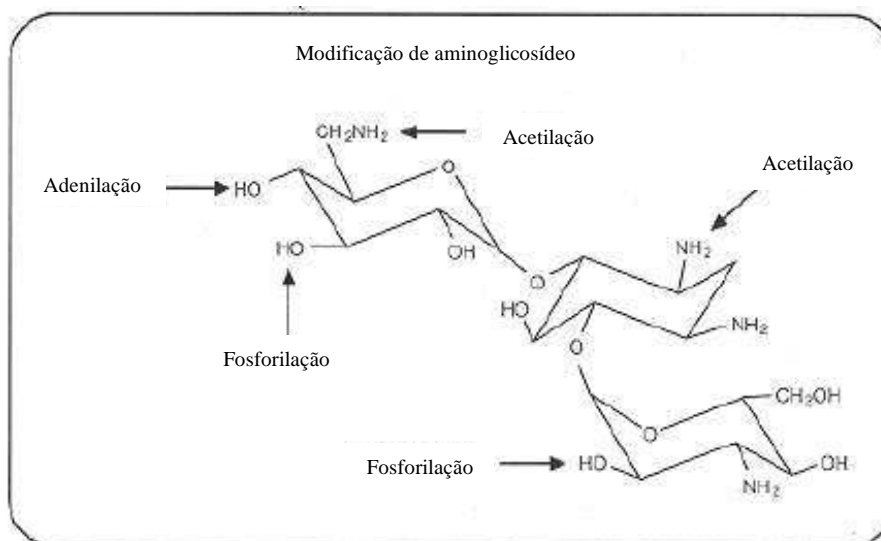
Estão descritas mais de 50 enzimas de resistência à aminoglicosídeos, estando a maioria associadas a bactérias gram-negativas. Dependendo do tipo de modificação que ocorra estas enzimas são classificadas como acetiltransferases aminoglicosídeos (AAC), adenililtransferases aminoglicosídeos (ANT) e fosfotransferases aminoglicosídeos (APH), conforme apresentado na Figura 3. A modificação ocorre no grupo amino pela enzima AAC e no grupo hidroxila pelas enzimas ANT e APH, perdendo a capacidade de ligação ao ribossomo (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; LECLERCO; GLUPCZYNSKI; TULKIENS, 1999).

**Figura 2** - Esquematização da alteração enzimática dos aminoglicosídeos.





Continuação da Figura 2



Fonte: NEU; GOOTZ (1996) (ADAPTADO).

Os *Staphylococcus* conseguem inativar esses antibióticos, por meio da ação enzimática. A enzima ANT(4')-I codificada pelo gene *ant(4')-Ia*, confere resistência à gentamicina, tobramicina e canamicina. Este gene pode ser encontrado em pequenos plasmídeos e faz parte da região *mec* do material genético do *Staphylococcus aureus*. As enzimas AAC(6') e APH(2'') são codificadas pelo gene *aac(6')-I + aph(2'')*, que se localiza no transposon 4001 (Tn4001). Assim confere resistência à gentamicina, tobramicina e canamicina. A neomicina e canamicina também podem ser inativadas pela enzima APH(3')-III, codificada pelo gene *aph(3')-IIIa*, presente no Tn5405, tanto em cromossomos como em plasmídeos (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001).

As bactérias Gram-negativas, como a *Serratia marcescens* também têm a capacidade de alterar enzimaticamente os aminoglicosídeos como a gentamicina. A enzima que participa desta reação é a AAC(3)-V, o gene que codifica esta enzima está localizado em um plasmídeo de conjugação (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001).

### 3.6 Light Emithing Diodes (LED)

O *Light Emithing Diodes* (LED) tem sido apresentado como um recurso muito promissor, ainda que pouco frequente na prática clínica, todavia já se mostra bastante eficaz na inativação bacteriana (MEYER et al., 2010).

O LED é uma categoria de luz que emite radiação numa faixa mais ampla do espectro, porém com um comprimento de onda predominante. Apresenta emissão de luz espontânea, não coerente e com certo espalhamento, tornando possível a iluminação de uma área maior, o que facilita o tratamento de lesões superficiais (MOREIRA, 2009). Diversos estudos obtiveram êxito na terapia fotodinâmica antimicrobiana, utilizando LED's (DOVIGO et al., 2010; DOVIGO et al., 2011a; DOVIGO et al., 2011b; SOARES et al., 2009). Os aparelhos de LED's apresentam vantagens como menor custo e tecnologia mais simples, quando comparados aos aparelhos de laser (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008; JORI et al., 2006). Os LED's não liberam energia suficiente para causar danos aos tecidos humano. Os seus efeitos dependem de fatores como: comprimento de onda, fluência, intensidade, tempo de irradiação, modo contínuo ou pulsado da onda e, padrões de pulso (BAROLET, 2008).

### **3.6.1 Luz de LED azul**

Como uma abordagem não antibiótica inovadora, a luz azul antimicrobiana (aBL) no espectro de 400–470 nm demonstrou suas propriedades antimicrobianas intrínsecas resultantes da presença de cromóforos fotossensibilizadores endógenos em microrganismos patogênicos. Pressupõe-se que os microrganismos sejam menos capazes de desenvolver resistência à aBL do que aos antibióticos tradicionais, devido às características multi-alvo de aBL (DAI et al., 2012). Além disso, a aBL é muito menos prejudicial para as células hospedeiras do que a irradiação ultravioleta (UV) (KLEINPENNING et al., 2010; LIEBMANN et al., 2010).

### **3.7 Terapia fotodinâmica antimicrobiana**

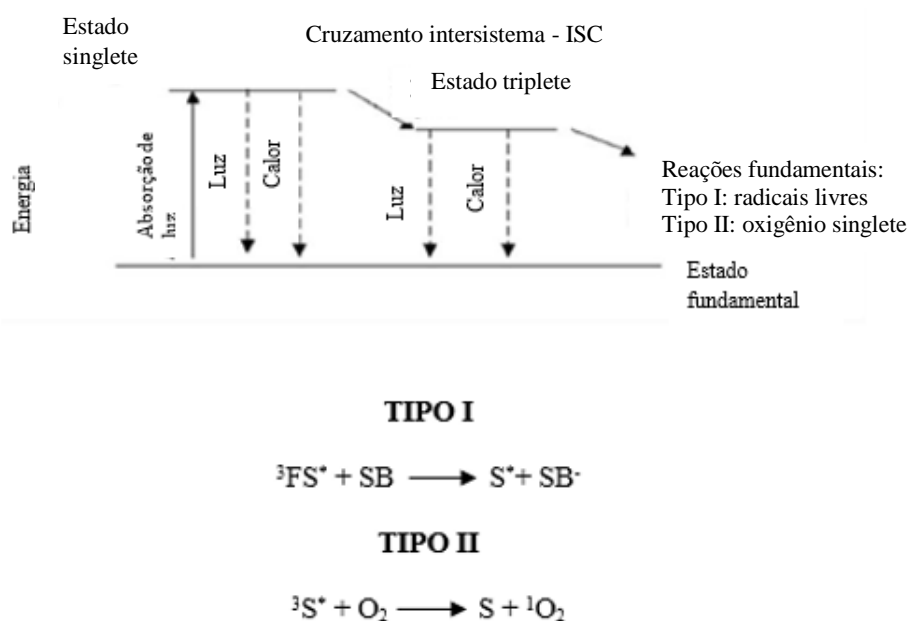
O conceito de Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*) foi introduzido em 1900 por Oscar Raab (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000), a era moderna da PDT teve início na década de 60, com estudos feitos por Lipson, Baldes e Olsen (1964), que observaram fluorescência em lesões neoplásicas induzidas por injeção de hematoporfirina em estado natural. A partir disso diversos estudos têm sido realizados na busca de compreender a eficácia e os mecanismos deste tratamento.

Weishaupt et al. (1976) postularam que o oxigênio singleto, era o agente citotóxico responsável pela destruição celular. Na TFD que as células expostas a um fotossensibilizador, após irradiação de luz, visível em comprimento de onda específico, levam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), como oxigênio singleto e superóxido que por sua vez, são tóxicos para a célula, destruindo componentes celulares como membrana, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, resultando na morte celular.

O Fotossensibilizador (FS) absorve a energia emitida pela irradiação de luz e sai do estado fundamental para o estado excitado, podendo retornar ao estado fundamental, liberando luz e calor, ou pode realizar um cruzamento intersistema, passando para um estado intermediário, denominado tripleto, que pode retornar ao estado fundamental (Figura 3). As espécies reativas de oxigênio podem ser dos tipos I e II.

Em uma reação tipo I ocorre a transferência direta de elétrons do FS para um substrato, gerando diferentes tipos de espécies reativas, posteriormente são interceptadas por produtos de oxigênio que geram oxidação, tendo como resultado a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ou radical hidroxila. Em uma reação tipo II, o FS excitado reage diretamente com o oxigênio molecular, levando a produção de oxigênio singleto. O oxigênio singleto inicia posteriormente, as reações oxidativas sobre os componentes celulares.

**Figura 3** – Diagrama de Jablonski: estados energéticos de uma molécula e as transições entre elas.



A eficácia da PDT depende de diversos fatores, dentre eles da espécie (BLISS et al., 2010; PEREIRA et al., 2011), do FS usado e sua concentração (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007; DOVIGO et al., 2011), do tempo de iluminação e do Tempo de Pré-Irradiação (TPI) (BAMECK et al., 2016), que se trata do tempo em que a substância permanece em contato com os microrganismos previamente à iluminação. Durante esse período, o FS deverá ligar-se a membrana celular ou penetrar nas células (LAMBRECHTS; AALDERS; VAN-MARLE, 2005) microbianas para que, no ato da emissão de luz essa substância seja capaz de exercer a sua função na indução da morte celular.

Trata-se de uma técnica não invasiva e localizada, cujos benefícios estimulam a sua inserção na rotina clínica devido a seletiva e a rápida inativação da viabilidade microbiana após fotoativação (PASCHOAL et al., 2013; WOOD et al., 2006). Isso demonstra mínima capacidade mutagênica sem favorecer o desenvolvimento de resistência microbiana decorrente da grande toxicidade das espécies reativas de oxigênio e em função de atingir diferentes alvos, como membrana plasmática, mitocôndria e núcleo (DOUGHERTY, 2002).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do material vegetal e identificação dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Química, da Universidade Federal do Paraná, coordenado pelo professor Luiz Everson Silva. A coleta do material vegetal para extração dos óleos essenciais foi realizada no Vale do Ribeira na Reserva Biológica BOM JESUS, sendo as amostras identificadas com o número 396412 (*Piper arboreum*), 396411 (*Piper aduncum*) e 396403 (*Piper gaudichaudianum*). A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação em aparelho graduado tipo Clevenger utilizando-se 50g de folhas secas em 1L de água destilada (WASICKY, 1963). Foram atribuídas siglas para os óleos essenciais de cada espécie, sendo OEPar, OEPar, OEPg para *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunt, respectivamente.

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

### 4.2 Aparelho de LED

O aparelho utilizado durante o procedimento experimental foi o *Light Emithing Diodes- LED*, um diodo emissor de luz, da marca NEW Estética®, o qual possui os espectros de luz vermelha, azul e amarela, permitindo também a combinação destas cores. Foi utilizada a luz azul, com um comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho, de 415nm.

### 4.3 Cepas bacterianas

As cepas utilizadas nos testes foram obtidas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão e resistentes das bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus aureus* 10.

#### 4.4 Preparo dos óleos essenciais

Foram pesadas 10 mg do óleo essencial a ser testado e colocado em *eppendorfs* individualizados, diluídos em 0,5 mL de DMSO. Essa primeira solução foi colocada em um tubo falcon e acrescentado mais 9,265 mL de água, perfazendo um total de 9,765 mL de solução com concentração de 1024 µg / mL para cada óleo essencial. Essa solução foi utilizada para os testes de CIM e modulação.

#### 4.5 Preparo dos Inóculos e antibióticos

As culturas de bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo BHI e, incubadas em estufa a 37 °C para crescimento por 24 horas. Após esse período, foi realizado um arrasto de cada cultura microbiana e diluído em tubos de ensaio contendo BHI identificados, em triplicata. Foi testada a turbidez da solução com um controle de 0,5 da escala de *McFarland*.

Os *Eppendorfs* do teste foram preparados em triplicata para cada bactéria e para cada óleo essencial, contendo 5 mL de BHI a 10% + 500 µL do inóculo (correspondente a 10% da solução total) para a CIM (NCCLS, 2003).

Os antibióticos utilizados no teste foram norfloxacin, eritromicina, amicacina e gentamicina, na concentração inicial de 1024 µg / mL.

#### 4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram adicionados 100 µL da solução final dos inóculos em cada poço da placa contendo 96 poços e, em seguida foi feita a microdiluição seriada com a solução de 100 µL de cada óleo, por coluna, variando nas concentrações de 512 µg / mL no primeiro poço a 0,5 µg / mL no último poço. As microdiluições foram realizadas em triplicata. As placas foram subdivididas em dois grupos: o primeiro foi submetido à luz de LED azul e, o segundo grupo não foi submetido às luzes de LED. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h. A determinação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se a adição de 25 µL de resazurina em cada poço e observação ocular após 20 minutos (COUTINHO et al., 2010).

#### 4.7 Modulação da atividade antibiótica

Para verificar a modulação do efeito antibacteriano dos antibióticos frente às cepas testadas, foi utilizado o método proposto por Coutinho et al. (2010). Foram preparados tubos *ependorf* contendo cada um deles as substâncias em volume correspondente a concentração sub-inibitória (CIM / 8), quantidade de BHI 10 % variável de acordo com o volume da concentração sub-inibitória e 150  $\mu$ L da suspensão bacteriana (correspondente a 10 % da solução). Para o controle foram preparados tubos *ependorf* com 1,5 mL de solução contendo 1.350  $\mu$ L de BHI (10 %) e 150  $\mu$ L de suspensão de microrganismos. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100  $\mu$ L desta solução em cada poço. Em seguida, foi feita a microdiluição seriada com 100  $\mu$ L do antibiótico. As placas foram subdivididas em dois grupos: o primeiro foi submetido à luz de LED azul e o segundo grupo não foi submetido às luzes de LED. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24h. A determinação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se a adição de 25  $\mu$ L de resazurina em cada poço e observação ocular após 20 minutos.

#### 4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico *GraphPad Prism 5.0*. Os dados foram analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando a média geométrica das triplicatas como dado central e o desvio padrão da média. Em seguida foi feito um teste de Bonferroni post hoc (onde  $p < 0,05$  foi considerado significativo).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química

As quantidades relativas dos componentes individuais foram calculadas com base na área de pico do CG, onde foram considerados como componentes majoritários aqueles que apresentaram um percentual acima de 10 %. A composição química dos óleos essenciais das espécies utilizadas neste estudo constituiu-se principalmente de sesquiterpenos. O óleo essencial de *Piper arboreum* teve um rendimento de 0,23 %. Foram identificados 15 componentes, representando 83,58 % da composição (Tabela 1), dos quais 5,57 % são monoterpenos oxigenados, 44,57 % são sesquiterpenos oxigenados, 33,43 % são sesquiterpenos não oxigenados, tendo como principais constituintes  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol 31,38 % e muuroala-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol 17,32 % (Figura 4). Este resultado diverge com o encontrado por Silva et al (2014), que identificaram biciclogermacreno (28,7 %) como componente majoritário, neste mesmo estudo também foi identificado  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol, sendo caracterizado como o segundo componente com maior concentração. Salleh et al. (2014) identificaram como composto majoritário no óleo essencial de *Piper abbreviatum* spathulenol (11,2 %), que também se encontra entre os principais constituintes de *P. arboreum* no presente estudo.

**Tabela 1** - Composição química dos óleos essenciais de *Piper arboreum* Aubl, *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth.

Compostos	OEPar		OEPad		OEPg	
	IR	%	IR	%	IR	%
<b>Monoterpenos hidrocarbonados</b>						
Germacreno A	-	-	1502	13,33	-	-
$\alpha$ -pineno	-	-	-	-	935	2,19
<b>Monoterpenos oxigenados</b>						
Khusimone	1600	2,48	-	-	-	-
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonados</b>						
(E)-Cariofileno	1426	3,61	1426	1,18	1425	3,75
$\delta$ -cadineno	1531	1,02	-	-	-	-
$\alpha$ -amorfeno	1488	2,09	-	-	-	-



Continuação da Tabela 1

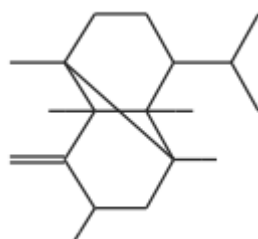
$\delta$ -selineno	1493	1,03	-	-	-	-
4,5-di-epi-Aristolocheno	-	-	-	-	1470	1,27
Allo-aromadendreno	-	-	-	-	1467	2,47
Amorpha-4,7(11)-dieno	-	-	-	-	1477	2,86
Aromadendreno	-	-	1445	1,38		
Biciclogermacreno	-	-	-	-	1504	2,57
$\delta$ -cadineno	-	-	-	-	1530	9,39
$\alpha$ -calacoreno	-	-	-	-	1551	3,5
$\beta$ -calacoreno	-	-	-	-	1572	1,98
$\delta$ -cadineno	-	-	1530	2,30	-	-
$\alpha$ -copaeno	-	-	-	-	1381	4,36
4-epi-cis- dihidroagarofurano	-	-	-	-	1508	2,99
$\beta$ -elemeno	-	-	-	-	1438	6,1
$\gamma$ -Elemeno	-	-	-	-	1397	5,24
(E,E)- $\alpha$ -Farneseno	-	-	-	-	1513	1,92
Germacreno B	1561	2,44	-	-	1566	21,53
Germacreno D	-	-	1493	3,13	1487	1,2
Heptan-2-one <6-metil-6-(3-metilfenil	1645	1,63	-	-	-	-
$\alpha$ -humuleno	-	-	14,60	3,18	1460	3,67
$\beta$ -macrocarpeno	-	-	1499	13,13	-	-
$\alpha$ -muuroleno	-	-	1506	1,09	-	-
$\delta$ -selineno	-	-			1498	1,65
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>						
$\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol	1593	31,38	1588	12,36	1587	2,06
Cedrol	-	-	1604	2,12	-	-
Óxido cariofileno	-	-			1592	1,96
cis-cadin-4-en-7-ol	-	-	1629	1,80	-	-
Eudesm-7(11)-em-4-ol	1690	1,03	-	-	-	-
7-acetoxi-elema-1,3-dien-8-ol	1792	2,06	-	-	-	-
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1683	1,5	-	-	-	-
Globulol	-	-	1594	3,43	-	-
Epóxido humuleno II	-	-	1619	2,12	-	-

Continuação da Tabela 1

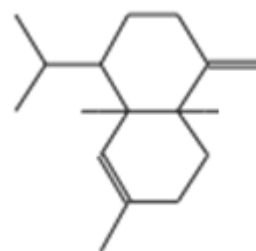
Intermedeol	1666	1,75	-	-	-	-
(E)-Nerolidol	-	-	-	-	1569	3,26
(Z)-nerolidol	-	-	1539	2,11	-	-
cis-sesquisabineno hydrate	-	-	1541	1,39	-	-
Pogostol	-	-	1650	3,15	-	-
Muurola-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol	1640	17,32	-	-	-	-
Óxido $\beta$ -Himachaleno	1619	6,16	-	-	-	-
Espatulenol	1587	8,08	-	-	-	-

IR – Índice de retenção. OEPar: Óleo essencial de *Piper arboreum* Aubl.; OEPad: Óleo essencial de *Piper aduncum* L.; OEPg: Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth.

**Figura 4** – Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* Aubl.



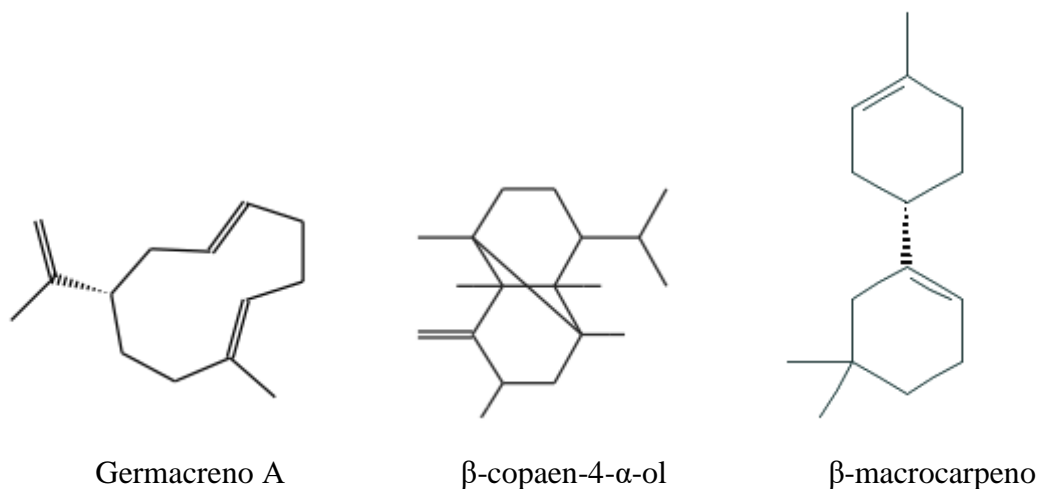
$\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol



muurola-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol

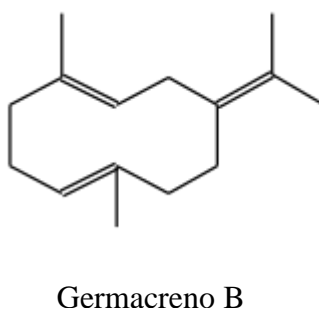
O óleo essencial de *Piper aduncum* L. teve um rendimento de 0,35 %, foram identificados 54,07 % dos constituintes, correspondendo a 16 compostos (Tabela 1), sendo 3,38 % monoterpenos hidrocarbonados, 23,66 % sesquiterpenos não oxigenados e 27,07 % sesquiterpenos oxigenados, tendo como principais constituintes germacrene A 13,33 %,  $\beta$ -macrocarpeno 13,13 % e  $\beta$ -copaen-4- $\alpha$ -ol 12,36 % (Figura 5). Estes resultados também diferem com resultados obtidos em estudos anteriores para esta espécie. Valadares et al (2018) identificou miristicina (12,4 %) como principal componente do óleo essencial de *P. aduncum*, divergindo com o resultado encontrado neste estudo.

**Figura 5** – Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* L.



A destilação do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* apresentou rendimento de 0,56 %. Foram identificados 22 componentes, representando 87,04 % da composição (Tabela 1), destes 3,96 % são monoterpenos hidrocarbonados, 67,26 % sesquiterpenos não oxigenados e 15,82 % sesquiterpenos oxigenados, tendo como principal constituinte germacreno B 21,53 % (Figura 6). Este resultado está em desacordo com estudos anteriores realizados com esta espécie. Segundo Sperotto et al. (2013) os principais compostos do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* foram (E)-nerolidol (22,06 %) e  $\alpha$ -humuleno (21,32 %). Schindler; Heinzmann (2017) analisando o efeito da sazonalidade sobre a composição química dos óleos essenciais de *P. gaudichaudianum* identificaram como principal composto o fenilpropanoide dillapiole (69,2 %).

**Figura 6** – Estrutura química do constituinte majoritário identificado no óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* Kunth.



A composição química dos óleos essenciais das espécies utilizadas neste estudo difere dos dados encontrados na literatura, conforme relatado anteriormente. Essa diferença pode ser atribuída a fatores ambientais, genéticos e bióticos. A variabilidade química pode resultar da pressão de seleção ambiental e / ou ecológica, caracterizando um ajuste químico às condições ambientais predominantes (TELASCREA et al., 2007).

## 5.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Nos testes de microdiluição foi observado que o óleo essencial de *Piper arboreum* (OEPar) apresentou CIM = 512 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* padrão, 128 µg/mL contra *S. aureus* multirresistente e  $\geq 1024$  µg/mL contra *Escherichia coli* padrão e resistente. O óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPad) apresentou CIM = 512 µg/mL contra *S. aureus* padrão, 16 µg/mL contra *S. aureus* multirresistente,  $\geq 1024$  µg/mL contra *E. coli* padrão e 813 µg/mL contra *E. coli* resistente. O óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* (OEPg) apresentou CIM = 813 µg/mL contra *S. aureus* padrão e  $\geq 1024$  µg/mL contra *S. aureus* resistente e *E. coli* padrão e resistente (Tabela 2).

**Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Piper arboreum*, *Piper aduncum* e *Piper gaudichaudianum* (µg/mL).

Óleos essenciais	Bactérias			
	<i>S. aureus</i> 6538	<i>S. aureus</i> 10	<i>E. coli</i> 25922	<i>E. coli</i> 06
<i>Piper arboreum</i>	512	128	$\geq 1024$	$\geq 1024$
<i>Piper aduncum</i>	512	16	$\geq 1024$	813
<i>Piper gaudichaudianum</i>	$\geq 1024$	813	$\geq 1024$	$\geq 1024$

Os óleos essenciais não demonstraram atividade significativa contra *E. coli*, este resultado pode ser justificado pela presença de uma membrana externa neste microrganismo, que dificulta a passagem dos componentes presentes nos óleos essenciais, bem como de outros antimicrobianos dificultando, portanto, a sua ação (HOLLEY; PATEL, 2005; OLADIMEJI; ORAFIDIYA; OKEKE, 2004). Manzote et al.

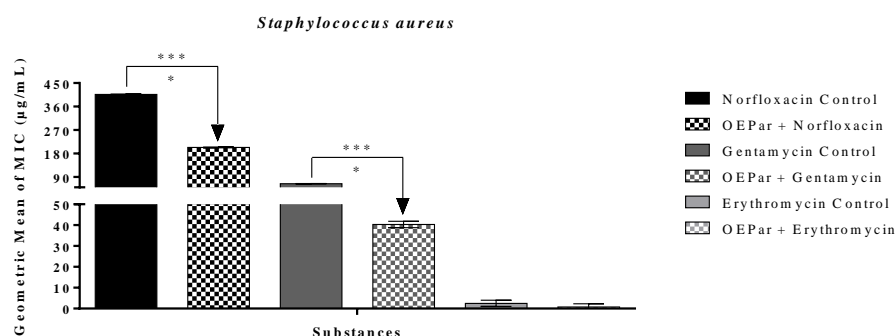
(2018) encontraram resultado semelhante analisando o óleo essencial de *P. aduncum* frente a *E. coli* e *S. aureus*, onde o óleo mostrou atividade inibitória somente contra a cepa Gram-positiva.

Foi observada atividade clinicamente relevante dos óleos essenciais de *P. arboreum* e *P. aduncum* contra *S. aureus* multirresistente, corroborando com relatos encontrados na literatura, que indicam que as bactérias Gram - positivas são mais susceptíveis aos óleos essenciais do que bactérias Gram-negativas (HANAMANTHAGOUDA et al., 2010). Este resultado diverge com estudo anterior realizado por por Salleh et al. (2014), onde não encontraram atividade clinicamente relevante do óleo essencial de *Piper abbreviatum* contra *S. aureus*. Alves Borges Leal et al., (2019) não encontraram atividade antibacteriana intrínseca do óleo essencial de *Piper rivinoides*.

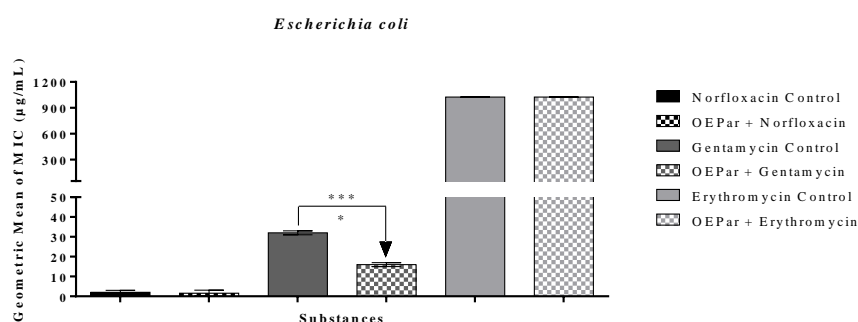
### **5.3 Modulação da atividade antibiótica**

A combinação do óleo essencial de *Piper arboreum* (Figura 7) com os antibióticos norfloxacin e gentamicina provocou diminuição da CIM contra *S. aureus*, indicando sinergismo na associação destes tratamentos, ao passo que para *E. coli* foi observado sinergismo apenas na associação com gentamicina, para norfloxacin não foi observado efeito significativo (Figura 8). As bombas de efluxo presentes na membrana plasmática de *E. coli* podem está relacionadas com este resultado, sendo estas estruturas responsáveis por expelir as substâncias antimicrobianas contribuindo, portanto, para a resistência desta cepa (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

**Figura 7:** Óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* (OEPa) em associação com antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*.

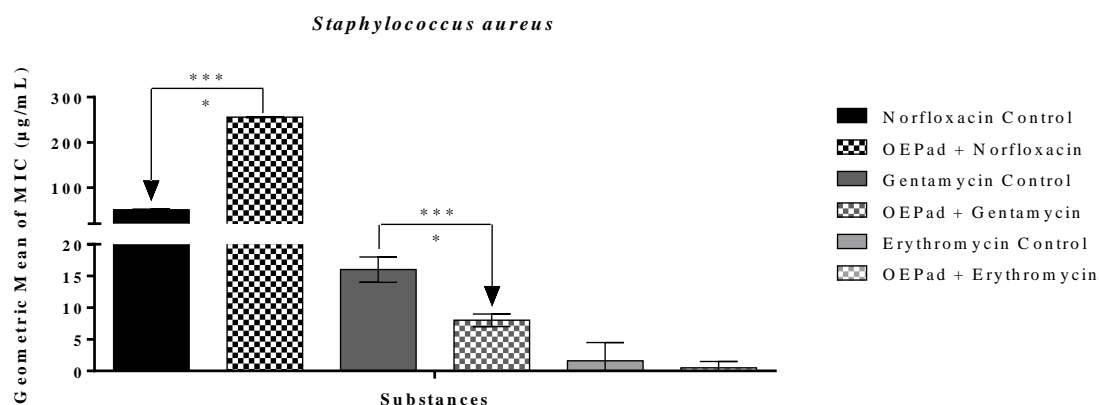


**Figura 8:** Óleo essencial das folhas de *Piper arboreum* (OEPa) em associação com antimicrobianos contra *Escherichia coli*.

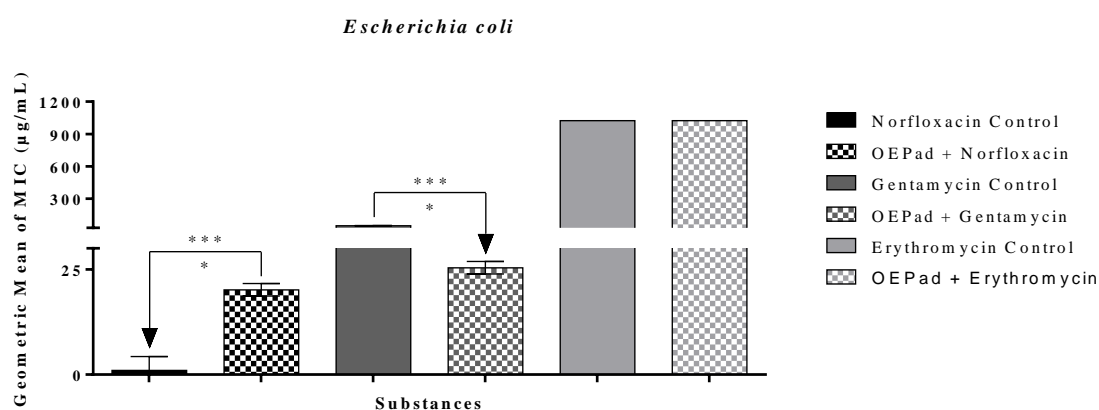


A combinação do óleo essencial de *Piper aduncum* com norfloxacina provocou aumento da CIM, gentamicina a diminuição da CIM indicando, respectivamente antagonismo e sinergismo contra *S. aureus* e *E. coli* (Figuras 9 e 10). Tal achado pode ser explicado pela ligação dos componentes em locais de ligação para o antibiótico, ou a quebra da droga causando uma diminuição no seu espectro de ação (COUTINHO et al., 2008a), tais mecanismos também podem explicar o antagonismo entre o OEPg e gentamicina contra *E. coli*. O sinergismo observado com gentamicina pode ser explicado pela eficácia dos aminoglicosídeos contra Gram-negativos e, sua capacidade de atuar em conjunto com outras drogas ou produtos naturais contra Gram-positivos (AZZOPARDI; FERGUSON, 2013).

**Figura 9:** Óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* (OEPad) em associação com antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*.

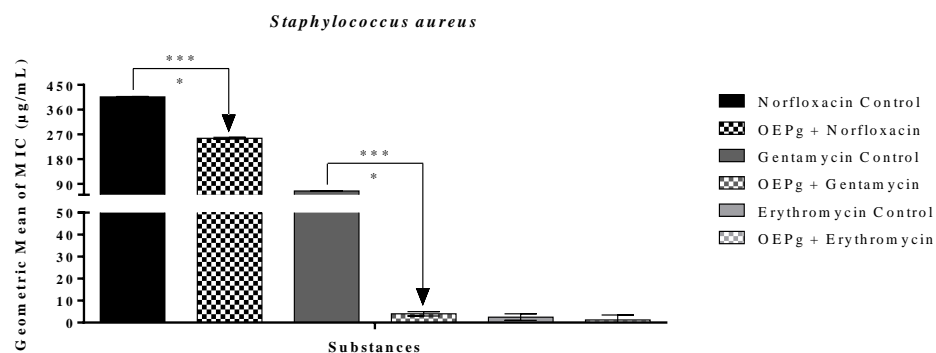


**Figura 10:** Óleo essencial das folhas de *Piper aduncum* (OEPad) em associação com antimicrobianos contra *Escherichia coli*.

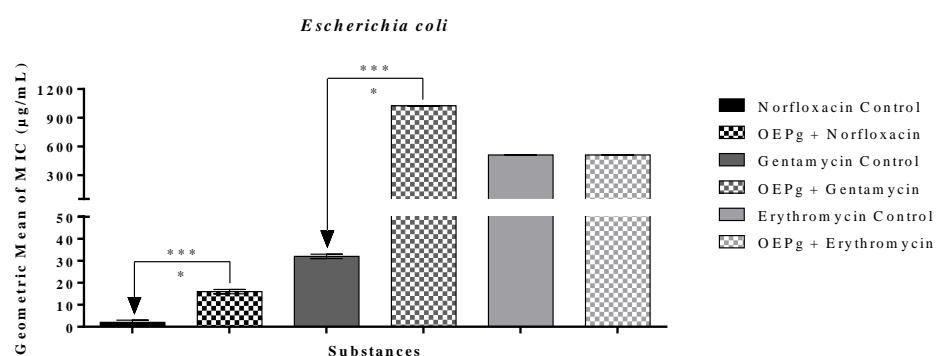


A associação do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* com as drogas norfloxacin e gentamicina apresentou efeito sinérgico frente *S. aureus* provocando a diminuição da CIM (Figura 11) e efeito antagônico frente *E. coli*, provocando o aumento da CIM (Figura 12).

**Figura 11:** Óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* (OEPg) em associação com antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*.



**Figura 12:** Óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* (OEPg) em associação com antimicrobianos contra *Escherichia coli*.



A composição da parede celular dos microrganismos Gram - positivos por apresentar-se mais espessa, com maior quantidade de peptídeoglicanos, torna-os mais susceptíveis aos antibióticos do que os microrganismos Gram – negativos (COUTINHO et al., 2008b; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). O sinergismo entre o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* e os antibióticos norfloxacina e gentamicina contra *S. aureus* pode ser devido às alterações na permeabilidade da parede e membrana celular do microrganismo, facilitando a passagem de drogas que atuam no interior da célula, como os aminoglicosídeos e norfloxacina (VAN BAMBEKE et al., 2003).

Burt (2004) avaliou a ação de óleos contra microrganismos e identificou alterações na permeabilidade da membrana celular. Os óleos essenciais possuem características capazes de prevenir a virulência, devido às classes aromáticas e seus constituintes monoterpênicos, sesquiterpênicos, fenilpropanóides e álcoois. A



combinação de um produto natural com um antibiótico convencional pode aumentar seu espectro de ação contra diversos microrganismos, especialmente bactérias. A potencialização da atividade de um antibiótico ou a inibição da resistência bacteriana classifica esses compostos como modificadores da atividade antibiótica (COUTINHO et al., 2009).

O antibiótico eritromicina não apresentou resultado significativo contra nenhuma das cepas utilizadas neste estudo. Este antibiótico interfere na síntese proteica, atuando sobre a subunidade ribossômica 50S, Alves Borges Leal et al. (2019) observaram sinergismo entre o óleo essencial de *P. rivinoides* com a eritromicina, divergindo com o resultado observado no presente estudo. As alterações na estrutura da eritromicina possivelmente, provocaram modificação no sítio ativo do antibiótico para ligação com a subunidade 50S ribossômica ou, ativação de genes responsáveis pela expressão de bombas de efluxo (COUTINHO et al., 2009).

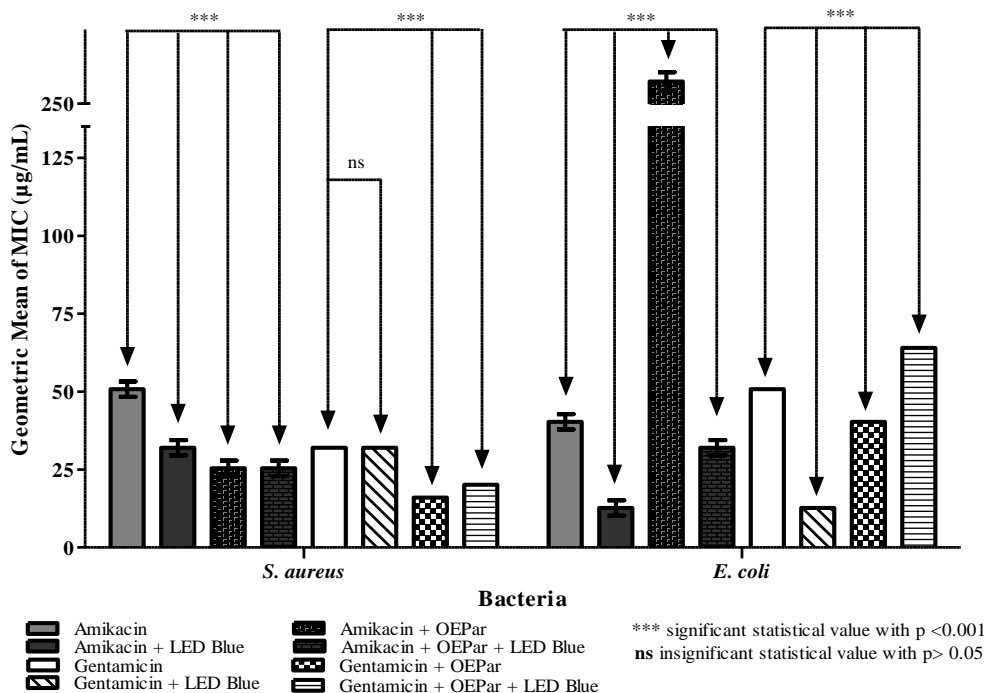
#### **5.4 Efeito da luz de LED sobre a modulação da atividade antibiótica**

Na associação dos antibacterianos com LED azul, na ausência do óleo essencial (Figuras 13, 14 e 15) foi observado efeito sinérgico para *S. aureus* utilizando amicacina, para gentamicina esta associação não apresentou resultado significativo, mostrando-se indiferente, ao passo que para *E. coli* foi observado sinergismo utilizando os dois antibióticos.

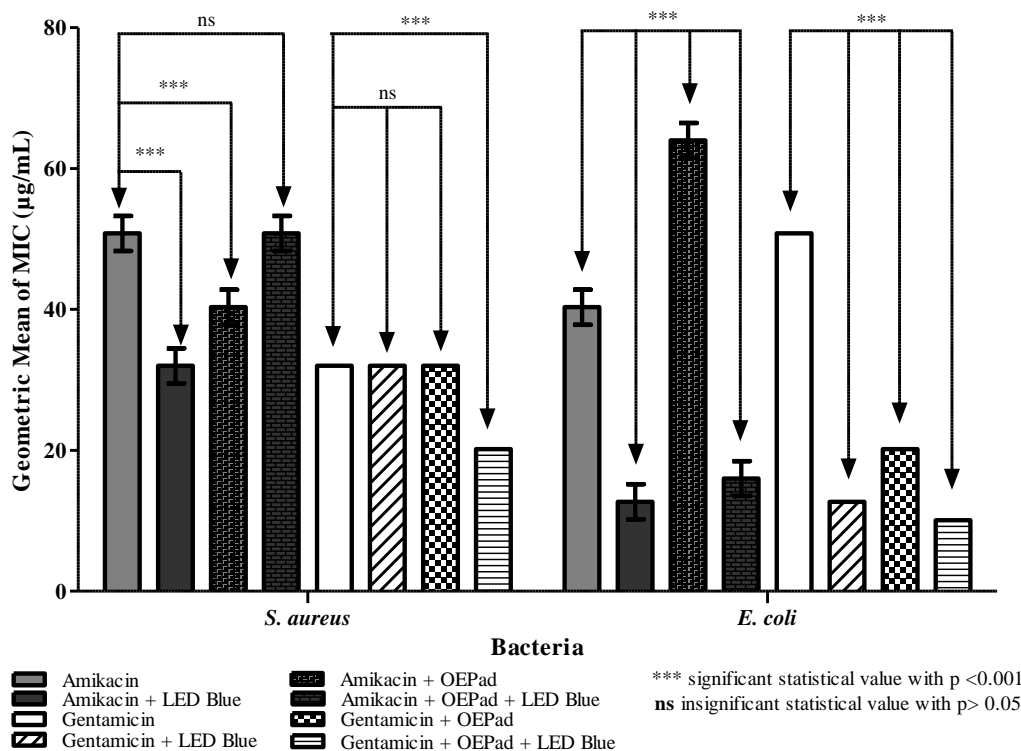
Ao analisar a associação dos antibióticos com o LED azul, na presença do óleo essencial de *Piper arboreum* (Figura 13) observou-se sinergismo com amicacina e gentamicina frente *S. aureus*, para *E. coli* a combinação mostrou efeito sinérgico com amicacina e antagônico com gentamicina.

A combinação do óleo essencial de *Piper aduncum* com o antibiótico gentamicina sob efeito da luz azul (Figura 14) provocou diminuição da CIM contra *S. aureus*. Com amicacina foi observado diminuição da CIM contra *E. coli*, entretanto contra *S. aureus* não houve resultado significativo. A combinação do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* com os antibióticos amicacina e gentamicina sob efeito da luz azul (Figura 15) provocou diminuição da CIM contra todas as cepas utilizadas neste estudo.

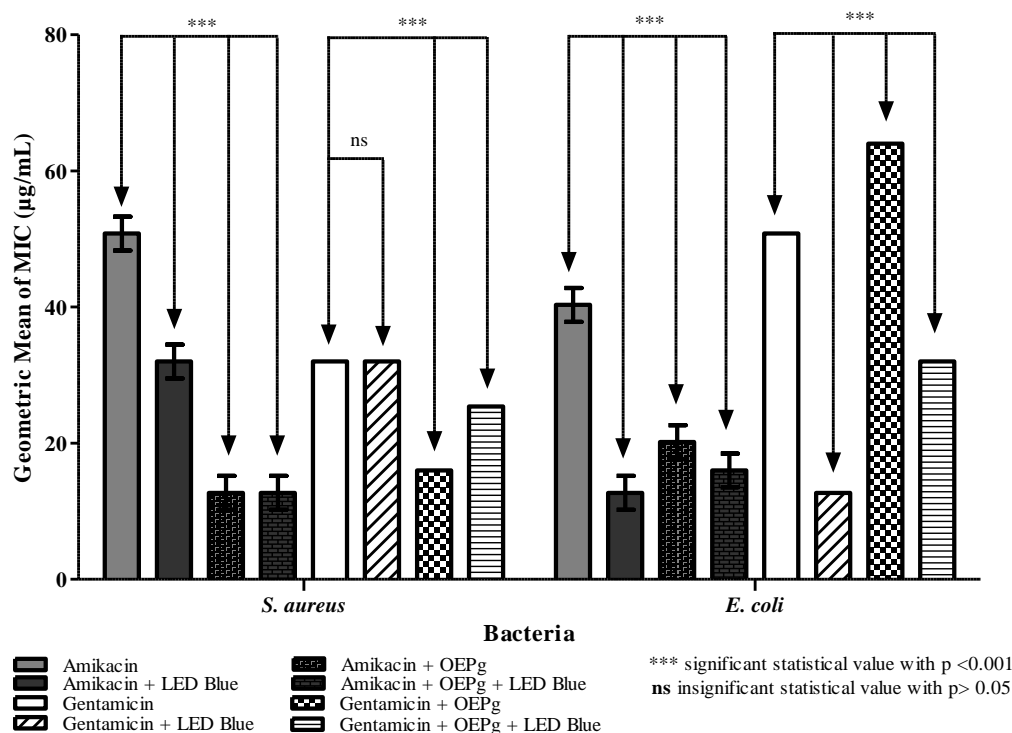
**Figura 13** - Óleo essencial de *Piper arboreum* (OEPa) em associação com antimicrobianos e LED azul contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



**Figura 14** - Óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPad) em associação com antimicrobianos e LED azul contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



**Figura 15** - Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* (OEPg) em associação com antimicrobianos e LED azul contra as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.



O mecanismo de ação da luz de LED azul antimicrobiana (aBL) não está completamente elucidado, a hipótese comum para os efeitos sinérgicos obtidos com amicacina e gentamicina é que a ação antimicrobiana se dá via indução ao estresse oxidativo. A interação entre o fotossensibilizador, que possivelmente seja os constituintes presentes nos óleos essenciais, e a luz visível emitida pelo LED, tem como resultado final a formação de radicais livres que são responsáveis por promover o estresse oxidativo, resultando na destruição celular. O fotossensibilizador absorve a energia luminosa e passa a um estado excitado singlete, este por sua vez pode passar para um estado triplete excitado, podendo participar nas reações tipo I ou II, que envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e oxigênio singlete (WAINWRIGHT, 1998), esses radicais livres podem provocar alteração na homeostase celular, modulação da síntese de DNA e RNA, modificações na permeabilidade da membrana plasmática, alcalinização do citoplasma e despolarização da membrana (PERUSSI, 2007; WAGNER, 2011).

A fototerapia surgiu como uma alternativa para reduzir o uso indiscriminado de antimicrobianos, interferindo diretamente na resistência microbiana. É uma técnica

minimamente invasiva, utilizada em diversos tipos de tratamentos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Neste estudo demonstramos que a exposição à luz de LED azul teve efeitos contra bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas. Estes resultados assemelham-se com o estudo feito por Pereira et al. (2017), que avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Eugenia jambolana* em associação com luz de LED, observaram modulação sinérgica da luz azul quando associada a antibióticos, promovendo a inativação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Foi relatado anteriormente que a luz de LED azul causou inativação de *Propionibacterium acne* induzindo a remoção da camada externa de elétrons (especialmente dos átomos de oxigênio) das moléculas que formam a membrana citoplasmática das bactérias (DAI et al., 2013). Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Yasukawa et al. (2012), depois de pré-tratadas com aBL (470 nm) as cepas de *E. coli* que expressam BsPAC tornaram-se mais susceptíveis a fosfomicina, ácido nalidíxico e estreptomicina do que as células incubadas no escuro.

Estudos mostraram a presença de cromóforos fotossensibilizadores endógenos, como porfirinas e flavinas em diversas estirpes bacterianas (DAI et al., 2013; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016) através de análise por HPLC ou espectroscopia por fluorescência. Nitzan et al. (2004) relatam que, na presença da luz azul a 405 nm a coproporfirina endógena é responsável pela maioria dos radicais livres e, uma maior quantidade de coproporfirina leva a uma maior inativação bacteriana. Bactérias Gram-positivas (*S. aureus* 3,38/UFC) tiveram um maior teor de coproporfirina em comparação com Gram-negativas (*E. coli* O157:H7 0,14 g/UFC).

Estes estudos comprovam a eficácia da luz azul frente a diversas cepas bacterianas, bem como a sua ação em diversos componentes da célula levando a produção de ERO's responsáveis, em parte pela inativação bacteriana.

O antagonismo observado entre o OEPar e OEPad com amicacina e, o OEPg com gentamicina contra *E. coli*, pode ser justificado pela ligação dos componentes em locais de ligação para o antibiótico, ou a quelação da droga causando uma diminuição no seu espectro de ação (COUTINHO et al., 2008). Entretanto, quando houve a exposição a luz de LED azul o antagonismo foi revertido revelando, portanto, o efeito potencializador da luz azul sobre os antibióticos.

Foi possível observar resultados relevantes frente *E. coli* na modulação com amicacina e gentamicina, que provocou a diminuição da MIC, indicando sinergismo, que por sua vez foi potencializado com a luz azul. Biener et al. (2017) sugeriram que a

inativação bacteriana pela luz azul é devido às mudanças marcantes induzidas no potencial transmembrana, como alteração na sua integridade ou desativando a sua bomba de íons. Essas alterações causadas na membrana plasmática bacteriana podem explicar a potencialização do efeito sinérgico observado no presente estudo para *E. coli*, onde a formação de radicais livres induzida pela luz de LED, possivelmente provocou danos na membrana externa, facilitando a passagem dos aminoglicosídeos. Dessa forma, o presente estudo mostra que a metodologia empregada pode modificar a resistência das bactérias Gram-negativas.

## 6 CONCLUSÃO

A maioria dos constituintes presentes nos óleos essenciais de *Piper auboreum*, *Piper aduncum* e *Piper gaudichaudianum* pertencem à classe dos terpenos.

Os óleos essenciais das três espécies analisadas possuem atividade clinicamente relevante frente às cepas padrão e multirresistente de *Staphylococcus aureus* e, modulam o efeito da atividade antibiótica de norfloxacina, gentamicina e amicacina.

A luz de LED azul apresentou atividade inibitória sobre o crescimento bacteriano, bem como sobre a ação de antibióticos que não são fotoativos modulando, em sua maioria, de forma sinérgica. Dessa forma a aBL apresenta grande contribuição na inativação bacteriana, sobretudo contra Gram – negativos que devido as suas características morfológicas são mais resistentes à ação dos agentes antibacterianos.

Esses achados representam resultados promissores na busca por novas terapias para infecções bacterianas resistentes a antibióticos. Por fim faz-se necessário a realização de pesquisas mais aprofundadas, como ensaios clínicos elucidando os efeitos moduladores dos óleos das espécies aqui estudadas em associação com diodos emissores de luz, para posterior aplicação clínica.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants as medicinal and poisonous in Northeast of Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- ALMEIDA, R. R. P. **Isolamento, purificação e isomerização do dilapiol, componente majoritário do óleo essencial de *P. aduncum* para comprovação de sua atividade biológica.** Dissertação (Universidade Federal do Pará - Belém), 2004.
- ALVES BORGES LEAL, A. L.; MACHADO, A. J. T.; BEZERRA, C. F.; SERRA INÁCIO, C. E.; ROCHA, J. E.; SALES, D. L.; DE FREITAS, T. S.; DE OLIVEIRA, A. W.; AMARAL, W. D.; EVERSON DA SILVA, L.; FERRIANI, A. P.; DE NORONHA SALES MAIA, B. H. L.; BEZERRA MORAIS-BRAGA, M. F.; BARRETO, H. M.; COUTINHO, H. D. M. Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, 2019.
- AZZOPARDI, A.E.L.; FERGUSON, D.W. The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection, **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 257–274, 2013.
- BARNECK, M. D.; RHODES, N. L.; DE LA PRESA, M.; ALLEN, J. P.; POURSAID, A. E.; NOURIAN, M. M.; FIRPO, M. A.; LANGELL, J. T. Violet 405-nm light: a novel therapeutic agente against common pathogenic bacteria. **Journal Surgery Research**, v. 206, p. 316–324, 2016.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos.** 42 p. monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BARREIRO, E. J. BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova** (Online), v. 32, p. 679-688, 2009.
- BAROLET, D. Ligth-emitting diodes (LED) in dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicina and Surgery**, v. 27, p. 227-238, 2008.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do Óleo de *Piper aduncum* no Controle em Pós-colheita de *Colletotricum musae* em Banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 555-557, 2004.
- BIENER, G.; MASSON-MEYERS, D. S.; BUMAH, V. V.; HUSSEY, G.; STONEMAN, M. R.; ENWEMEKA, C. S.; RAICU, V. Blue/violet laser inactivates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by altering its transmembrane potential. **Journal Photochemical Photobiology**, v. 170, p. 118–124, 2017.
- BLAIR, J. M. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v. 13, p. 42-51, 2015.

- BOTSARIS, A. S. **As fórmulas mágicas das plantas:** como utilizar a fitoterapia no tratamento de doenças simples. 2.ed., Rio de Janeiro: Record: Nova Era, 619 p., 1997.
- BRODY, T.; LARNER, J; MINMEMAN, K. P. **Human Pharmacology.** (3<sup>a</sup> ed.) Missouri: Mosby, 1998.
- BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1776, p. 86-107, 2007.
- BURT, S.; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **In Journal food Microbiology**, v. 94, p. 223 -253, 2004.
- CONSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T; ESTEPE, M.; FERREIRA, M. J. P.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V.P.; KATO, M. J. Essential Oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and 13C-NMR. **Planta Medica**, v. 67, p. 771-773, 2001.
- CONNOLLY, J. D., HILL, R.A. Triterpenes. **Natural Products**, v. 24, p. 465, 2007.
- COOK, S. The Forest of the Lacandon Maya: An **Ethnobotanical Guide**. Springer, New York, USA. 2016.
- COSTA, A. L. P. **Resistência Bacteriana aos Antibióticos: Uma Perspectiva Do Fenômeno Biológico, Suas Consequências e Estratégias De Contenção.** 63 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Disease**, v. 33, p. 467–471, 2010.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328–330, 2008a.
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. *In vitro* antistaphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670–675, 2008b.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, O. E.; FALCÃO-SILVA, V. S.; JUNIOR-SIQUEIRA, J. P. *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 1056–1059, 2009.



DAI, T.; GUPTA, A.; MURRAY, C. K.; VRAHAS, M. S.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*. **Drug Resistance**, n. 15, p. 223–236, 2012.

DAI, T.; GUPTA, A.; MURRAY, C. K.; VRAHAS, M. S.; TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M. R. Blue Light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond ?. **Drug resistance Update**, v. 15, p. 223–236, 2015.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo, p. 604, 2002.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, p. 1-12, 2008.

DOUGHERTY, T. J. An update on photodynamic therapy applications. **Journal Clinical Laser Medicine Surgery**, v. 20, p. 3-7, 2002.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, D. G.; ADRIANO, C. S.; BAGNATO, V. S. Photodynamic inactivation of four *Candida* species induced by photogemR. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 42-49, 2010.

b

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; MIMA, E. G. O.; GIAMPAOLO, E. T.; VERGANI, C. E.; BAGNATO, V. S. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Mycoses**, v. 54, p. 123-30, 2011a.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, A. P. D.; BRUNETTI, I. L.; COSTA, C. A. S.; JACOMASSI, D. P. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. **Photochemical Photobiology**., 2011b.

DUBEY, V.S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R.; An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal Biosciences**., v. 28, p. 637–646, 2003.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 11-21, 2008.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; LIMA, M.S.; ALÉCIO, M.R. Toxicidade do Óleo de *Piper aduncum* L. a Adultos de *Cerotona tingomarianus* Bechné (Coleóptera:Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.485-489, 2005.

FLUIT, A.; VISSER, M.; SCHMITZ, F. Molecular detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 837-862, 2001.

FRANZ, C. M. Essential oil research: past, present and future. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

GAD, F. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 2173-2178, 2004.

GAÍNZA, Y. A.; FANTATTO, R. R.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C.; GAÍNZA, Y. A.; FANTATTO, R. R.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: Cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 383–393, 2016.

GOGOSZ, A. M.; BOEGER, M. R. T.; NEGRELLE, R. R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, p. 405-417, 2012.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. *Piperaceae* na reserva biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 3, p. 567-587, 2005.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para descobertas e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667–679, 2010.

GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. **Piperáceas: Piper**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Santa Catarina, 104p. 2001.

GUSTAVO, B. L. **Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no hospital universitário de Brasília**. 102 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

HANAMANTHAGOUDA, M.S, KAKKALAMELI, S.B, NAIK, P.M, NAGELLA, P., SEETHARAMAREDDY, H.R., MURTHY, H.N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v. 118, p. 836-839, 2010.

JORI, G.; FABRIS, C.; SONCIN, M.; FERRO, S.; COPPELLOTTI, O.; DEI, D. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, p. 468-81, 2006.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal American Academy Dermatology**, v. 42, p. 389-413, 2000.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **Journal Dental Research**, v. 86, p. 694-707, 2007.

KLEINPENNING, M. M.; SMITS, T.; FRUNT, M. H.; VAN ERP, P. E.; VAN DE KERKHOFF, P. C.; GERRITSEN, R. M. Clinical and histological effects of blue light on normal skin. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v. 26, p. 16–21, 2010.

- KUMAR, S., VARELA, M. F. Molecular Mechanisms of bacterial Resistance to antimicrobial Agents. Microbial Pathogens and strategies for Combating Them: Science, technology and education. **Formatex**, p. 522- 534, 2013.
- LAGO, J. H. G. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. shaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.
- LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 2026-34, 2005.
- LAROCQUE, N.; VINCENT, C.; BÉLANGER, A.; BOURASSA, J.P. Effects of tansy essential oil from *Tanacetum vulgare* on biology of oblique-banded leafroller, *Choristoneura rosaceana*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, p. 1319-1330, 1999.
- LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**, volume 1, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa 1951, 296p.
- LECLERCO, M.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, p. 727-734, 1999.
- LEGGETT, J. E. Aminoglycosides. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / [edited by] John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. – Eighth edition. **Philadelphia: Elsevier**, p. 211-221, 2015.
- LIEBMANN, J.; BORN, M.; KOLB-BACHOFEN, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. **Journal Investigative Dermatology**, v. 130, p. 259–269, 2010.
- LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. Further evaluation of the hematoporphyrin derivate as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. **Chest**, v. 46, p. 676-679, 1964.
- LUIS, O. R.; COTINGUIBA, F.; SIQUEIRA, J. R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H.; FURLAN, M. Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (*Piperaceae*). **Latin American Journal Pharmacy**, v. 27, p. 900-903, 2008.
- MAIA, J. G. S.; ZOHGBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; LUZ, A. I. R.; BASTOS, C. N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, p.269-72, 1998.
- MAMOOD, S. N. H.; HIDAYATULFATHI, O.; BUDIN, S. B.; AHMAD ROHI, G. The formulation of the essential oil of *Piper aduncum* Linnaeus (Piperales: Piperaceae) increases its efficacy as an insect repellent. **Bull. Entomol. Res.**, v. 107, p. 49–57, 2017.
- MONZOTE, F. L.; SARIEGO, R. I.; MONTALVO, A. A. M.; GARRIDO, L. N.; SCULL, L. R.; ABREU, P. J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales

extraídos de plantas Cubanas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 56, p. 230–233, 2004.

MEIRELES, M. A. O. M. **Uso de Antimicrobianos e Resistência Bacteriana: Aspectos Socioeconômicos e Comportamentais e seu Impacto Clínico e Ecológico**. 47 p. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MEYER, P. F. et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**, v. 11, p. 428-432, 2010.

MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; JÚNIOR, J. F. A.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; NETO, M. A. S. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics Ecology**, v. 35, p. 670–675, 2007.

MORAIS, D. L. et al. Estudos fitoquímicos e farmacológicos de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 82, p. 29-32, 2007.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEIHARDT, F. Bacterial genetics. Em McGraw Hill (Eds.). **Sherris Medical Microbiology** - An introduction to infectious diseases (4<sup>a</sup> ed., p. 53 - 74). Nova Yorque, 2004.

NEU, H.; GOOTZ, T. Antimicrobial Chemotherapy. Em Baron S (Eds.), **Medical Microbiology**, (4<sup>a</sup> ed., Cap. 11). Galveston, 1996.

NITZAN, Y.; SALMON-DIVON, M.; SHPOREN, E.; MALIK, Z. ALA induced photodynamic effects on gram positive and negative bacteria. **Photochemical Photobiology Science**, v. 3, p. 430–435, 2004.

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, L. O.; OKEKE, I. N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke. **International Journal Aromatherapy**, v. 14, p. 162-168, 2004.

ORÚS, P. et al. Increasing Antibiotic Resistance in Preservative-Tolerant Bacterial Strains Isolated from Cosmetic Products. **International Microbiology**, v.18, p. 51-59, 2015.

PALAZZOLO, E.; LAUDICINA, V. A.; GERMANÀ, M. A. Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. **Current Organic Chemistry**, v. 17, p. 3042-3049, 2013.

PASCHOAL, M. A.; TONON, C. C.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; BAGNATO, V. S.; GIUSTI, J. S. M.; SANTOS-PINTO, L. Photodynamic potential of curcumin and blue

LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 313-9, 2013.

PEIXOTO-NEVES D.; SILVA-ALVES, K.S.; GOMES, M.D.; LIMA, F.C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P.J.; CECCATTO, V.M.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundam. Clinical Pharmacology*, v. 24, p. 341-350, 2010.

PEREIRA, N. L.F., et al. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 174, p. 144-149, 2017.

PÉRES, V. F.; MOURA, D. J.; SPEROTTO, A. R. M.; DAMASCENO, F. C., CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A.; SAFFI, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2389–2395, 2009.

PERUSSI, J. R. Inativa o Fotodin mica de microrganismos. **Quimica Nova**, v. 30, p. 988–994, 2007.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G. D.; BOLZANI, V. D. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (*Piperaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 199-203, 2009a.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; MORANDIM, A. A.; KATO, M. J.; SCORZONI, L.; MENDES-GIANNINI, M. J. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (*Piperaceae*) against opportunistic yeasts. **African Journal Biotechnology**, v. 8, p. 2866-2870, 2009b.

RODRIGUEZ, E. J.; SAUCEDO-HERNÁNDEZ, Y.; VANDER HEYDEN, Y.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; RAMIS-RAMOS, G.; LERMA-GARCÍA, M. J.; MONTEAGUDO, U.; BRAVO, L.; MEDINILLA, M.; DE ARMAS, Y. Chemical analysis and antioxidant activity of the essential oils of three Piperaceae species growing in the central region of Cuba. **Nat. Prod. Commun**, v. 8, p. 1325–1328, 2013.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F.; YEN, K. H. Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Piper abbreviatum*, *P. erecticaule* and *P. lanatum* (*Piperaceae*). **Natural Product Communications**; v. 9, p. 1795-1798, 2014.

SÁENZ, Y.; BRIÑAS, L.; DOMÍNGUEZ, E.; RUIZ, J.; ZARAZAGA, M.; VILA, J.; TORRES, C.. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 3996–4000, 2004.

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

- SCHINDLER, B.; HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: Seasonal Characterization of the Essential Oil Chemical Composition of Leaves and Reproductive Organs. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 60, 2017.
- SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de Antibióticos em Leite. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, p. 30-44, 2012.
- SILVA, J. A., et al. Antioxidant activity of *Piper arboreum*, *Piper dilatatum*, and *Piper divaricatum*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 16, 2014.
- SMITH, R. Global public goods and health. **Journal Health Economics**, v. 81, p. 322–326, 2014.
- SOARES, B. M.; SILVA, D. L.; SOUSA, G. R.; AMORIM, J. C. F.; RESENDE, M. A.; PINOTTI, M. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. **Journal Photochemical Photobiology**, v. 94, p. 65-70, 2009.
- SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Insecticidal activity of *Piper* essential oils from the Amazon against the fire ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 510–517, 2012.
- SRINIVASAN, K. Black Pepper and its pungent principle piperine: A review of diverse physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 735-748, 2007.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, p. 281-301, 2000.
- TELASCREA, M.; ARAÚJO, C. C.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; MORAES, P. L. R.; CAVALHEIRO, A. J. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 222-232, 2007.
- THOMAS, J. C, SEBY, S.; ABRAMS, A. J.; CARTEE, J.; LUCKING, S.; VIDYAPRAKASH, E.; VIDYAPRAKASH, E.; SCHMERER, M.; PHAM, C. D.; HONG, J.; TORRONE, E.; SANCTA, S. C.; SHAFER, W. M.; BERNSTEIN, K.; KERSH, E. N.; GERNERT, K. M. Evidence of recent genomic evolution in gonococcal strains with decreased susceptibility to cephalosporins or azithromycin in the United States. **Journal Infection Disease**, p. 2014–2016, 2019.
- VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p. 181-187, 2002.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals, **Phytomedicine**, v. 16, p. 97–110, 2009.
- WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, p. 34–37, 2011.

WAINWRIGTH, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal Antimicrobial Chemoter.**, v. 42, p. 13-28, 1998.

WANG, Y.; WU, X.; CHEN, J.; AMIN, R.; LU, M.; BHAYANA, B.; ZHAO, J.; MURRAY, C. K.; HAMBLIN, M. R.; HOOPER, D. C.; DAI, T. Antimicrobial blue light inactivation of gram-negative pathogens in biofilms: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal Infection Disease**, v. 213, 1380–1387, 2017.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica**, v. 1, p. 77-81, 1963.

WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 680-4, 2006.

VAN BAMBEKE, F.; GLUPCZYNSKI, Y.; PLESIAT, P.; PECHERE, J. C.; TULKENS, P. M: Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1055–1065, 2003.

VALADARES, A. C. F.; ALVES, C. C. F.; ALVES, J. M.; DE DEUS, I. P. B.; OLIVEIRA-FILHO, J. G.; SANTOS, T. C. L.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; MIRANDA, M. L. D. Essential oils from *Piper aduncum* inflorescences and leaves: chemical composition and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 2691–2699, 2018.

VILLAMIZAR, L. H.; DAS GRAÇAS, C. M.; DE ANDRADE, J.; TEIXEIRA, M. L.; SOARES, M. J. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4 °C. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 131–139, 2017.

ZHANG, Y.; ZHU, Y.; CHEN, J.; WANG, Y.; SHERWOOD, M. E.; MURRAY, C. K.; VRAHAS, M. S.; HOOPER, D. C.; HAMBLIN, M. R.; DAI, T. Antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Virulence**, v 7, p. 536–545, 2017.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – Comprovante de submissão – ARTIGO 1

Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blues LED lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against MDR

Journal of  
**Photochemistry and Photobiology**

Henrique Douglas Coutinho | My Journals | Log Out | Help **EVISE\***

Home Reports

The OmniScience taxonomy service will be taken off-line for system maintenance on Monday 1 July 2019, between 13:00 and 15:00 BST. During this period, EVISE will work as usual, however, browsing taxonomy trees and selecting taxonomy topics will not be possible.

My Reviewer Tasks My Author Tasks

**Start New Submission** Click here to view your submissions with a final decision



**My Submissions with Journal (1)**


<b>EFFECT OF THE ESSENTIAL OILS FROM <i>Piper</i> sp. AND BLUE LED LIGHTS IN THE ENHANCEMENT OF THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF DRUGS AGAINST MDR BACTERIAL STRAINS</b>	JPHOTOBIOL_2019_374_R1 Editor: Antonio Pinheiro
Current status: Under Review (21/May/2019) <a href="#">View Editor/Reviewer comments</a>	Article Type: Full length article Initial submission : 30/Mar/2019



## ANEXO 2 – Comprovante de submissão – ARTIGO 2







**GC-MS characterization and avaluation of antibacterial bioactivities of the essential oils from *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. and *Piper gaudichaudianum* Kunth**

Food and Chemical Toxicology Contact us  Help 

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out Username: hdouglas@zipmail.com.br  
Switch To: Author  Go to: [My EES Hub](#) Version: EES 2019.5

**Submissions Being Processed for Author Henrique Coutinho**

Page: 1 of 1 (2 total submissions) Display  results per page.

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
<a href="#">Action Links</a>	FCT-D-19-01438	GC-MS characterization and evaluation of antibacterial bioactivities of the essential oils from <i>Piper arboreum</i> Aubl., <i>Piper aduncum</i> L. e <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth	Jun 15, 2019	Jun 23, 2019	Under Review
<a href="#">Action Links</a>	FCT-D-19-01391	Effect of the complexation of the citronellol with $\beta$ -cyclodextrin on the antibacterial effect against MDR strains and FTIR characterization	Jun 11, 2019	Jun 23, 2019	Under Review

Page: 1 of 1 (2 total submissions) Display  results per page.

[<< Author Main Menu](#)