



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIMICROBIANO INTRÍNSECO E
COMBINADO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. E
Piper diospyrifolium Kunth**

JOARA NÁLYDA PEREIRA CARNEIRO

CRATO – CE

2019

JOARA NÁLYDA PEREIRA CARNEIRO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIMICROBIANO INTRÍNSECO E
COMBINADO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. E
Piper diospyrifolium Kunth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri-URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais
Braga

CRATO – CE

2019

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

Carneiro, Joara Nályda Pereira.

C289c Composição química e efeito antimicrobiano intrínseco e combinado dos óleos essenciais de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. e *Piper diospyrifolium* Kunth/ Joara Nályda Pereira Carneiro. – Crato- CE, 2019

93p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA; Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga

1. Identificação química, 2. *Staphylococcus aureus*, 3. *Escherichia coli*, 4. *Candida* spp, 5. Resistência; I. Título.

CDD: 615.32

JOARA NÁLYDA PEREIRA CARNEIRO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTIMICROBIANO INTRÍNSECO E
COMBINADO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. E
Piper diospyrifolium Kunth**

Dissertação submetida à coordenação ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Defesa apresentada em: 26/07/2019

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga – URCA
(Orientadora da Dissertação)

Prof.^a Dra. Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues – URCA/UNILEÃO
(Avaliador Interno)

Prof.^a Dra. Débora Lima Sales - UNINASSAU
(Avaliador Externo)

*Aos meus pais, Lúcia Pereira Pinho
Silva e Cícero Carneiro da Silva, pelos
ensinamentos e apoio.*

*Ao meu noivo Antonio Esmael Silva de
Oliveira, pela paciência e
companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me enche com seu amor, me guia e me ilumina. És a minha base!

Aos meus pais, Lúcia Pereira Pinho e Cícero Carneiro da Silva, por serem guerreiros e se esforçarem para mudar a realidade dos filhos. Por me orientarem e mostrarem que posso ir além do que imagino. Pelo apoio, por sempre me lembrarem que a felicidade está no nosso cotidiano, nas nossas ações, no nosso amor para com o próximo. Amo vocês.

A minha tia-madrinha Maria de Fátima Pereira Silva, e meu padrinho Francisco de Fátima Silva (*in memoriam*) por acreditarem em mim, por ajudarem na minha educação, por me fazerem ver que sou forte, mesmo quando acho que não sou.

Ao meu irmão Jonathas Natanael Pereira Carneiro, por aguentar meus momentos de raiva, e me auxiliar nos estudos.

Ao meu sobrinho Enzo Israel, por alegrar meus dias com sua inocência e amor.

Ao meu noivo Antonio Esmael Silva de Oliveira, por ser paciente e não desistir de nós. Por sempre estar presente, pelo incentivo, aconselhamento, companheirismo, carinho, amor. Enfim, por fazer parte de mim.

A minha orientadora Maria Flaviana Bezerra Morais Braga, por ser essa pessoa meiga, gentil, que considero uma mãe. Obrigada por me receber de braços abertos, pelos ensinamentos e orientações.

Ao Professor Henrique Douglas Melo Coutinho, por ser essa pessoa cativante, sempre disposta a ensinar e ajudar.

Aos colegas que compartilham a vivência no LMAC, Taís, Rosilaine, Carolaine, Luciene, Camila, Audilene e em especial a Thassya e Rafael, companheiros de todos os momentos. Obrigado pelas brincadeiras e descontrações!

Aos amigos do LMBM, Raquel, Jacqueline, Socorro, Fábila, Debora, Cristina, Saulo, Yedda, Thiago, Janaina e Linkoln.

Aos colegas que compartilharam comigo o aprendizado durante as disciplinas, em especial a Beatriz, Gerson, Rakel e Ana Cristina.

Aos professores que compõem o Programa de Bioprospecção.

À FUNCAP e a URCA pelo suporte e apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível o cumprimento de mais esta etapa.

*“Nunca é tarde demais para ser aquilo que você
sempre desejou ser.”*

Mary Ann Evans

RESUMO

A incidência de infecções graves causadas por micro-organismos resistentes vem aumentando mundialmente. O uso de algumas plantas na medicina surge como uma possível alternativa para tentar conter essas infecções. As espécies *Piper mikanianum* e *Piper diospyrifolium* conhecidas como pariparoba e João-Borandi respectivamente, são utilizadas na medicina popular de várias localidades do mundo. Considerando o uso popular, a disponibilidade e acessibilidade, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas destas espécies de *Piper*, bem como identificar seus constituintes químicos. Os óleos foram cedidos pelo professor Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná – UFPR e a análise química foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). O rendimento para o óleo de *P. mikanianum* (OEPM) foi de 0,96% e para *P. diospyrifolium* (OEPD) foi de 0,49%. A concentração inibitória mínima e a ação conjunta dos óleos aos fármacos gentamicina, eritromicina, norfloxacin e fluconazol contra bactérias e fungos foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo. Os dados obtidos nos ensaios antimicrobianos foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 6.0, para fungos a leitura espectrofotométrica compôs a curva de viabilidade celular e a concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC₅₀). Testes de concentração fungicida mínima e a ação sobre a morfologia fúngica também foram realizados. Os resultados da composição química dos óleos tiveram compostos terpênicos e fenilpropanoides como mais importantes, conhecidos por suas atividades antimicrobianas, antiprotozoárias, antidiabéticas e anti-inflamatórias. Para *P. mikanianum*, surgiu como composto majoritário o safrol (82%) e para *P. diospyrifolium*, o Z-Carpacin (24,3%). A avaliação intrínseca *in vitro* dos óleos não revelou importância clínica, entretanto, a ação conjunta a droga gentamicina foi sinérgica contra cepa multirresistente de *Escherichia coli* (20 µg/mL) para OEPM, e para *E. coli* e *Staphylococcus aureus* quando associado a OEPD (25,39 e 6,34 µg/mL respectivamente). Em associação ao fluconazol OEPM mostrou sinergismo contra a estirpe de *Candida albicans* padrão (IC₅₀: 69,97 µg/mL) e OEPD obteve efeito sinérgico *C. albicans* padrão (IC₅₀: 94,12 µg/mL) e *Candida tropicalis* isolado (IC₅₀: 103,7 µg/mL). Efeito antagônico ou não significativo foi visto diante das drogas eritromicina e norfloxacin. Foi observado efeito fungistático (OEPM – para todas as estirpes; OEPD – CA INCQS 40006, CT INCQS 40042) e fungicida (OEPD - CA URM 4127, CT URM 4262) para os óleos, tanto intrínseca quanto associado. O óleo de *P. mikanianum* inibiu completamente a formação filamentosa em todas as cepas do teste e o de *P. diospyrifolium* quando interagiu com as cepas de *C. albicans*. Portanto, os óleos essenciais tiveram ação efetiva no combate à virulência fúngica sendo importantes descobertas para o tratamento de infecções fúngicas invasivas em pacientes de risco, para o uso na antibióticoterapia combinada e na confecção de novos fármacos.

Palavras chaves: Identificação química. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. *Candida* spp. Resistência. Anti-dimorfismo fúngico.

ABSTRACT

The incidence of serious infections caused by resistant microorganisms is increasing worldwide. The use of some plants in medicine emerges as a possible alternative to try to contain these infections. The species *Piper mikanianum* and *Piper diospyrifolium* known as pariparoba and john borandi respectively, are used in folk medicine from various locations around the world. Considering the popular use, availability and accessibility, the objective was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils of the leaves of these *Piper* species, as well as to identify their chemical constituents. The oils were supplied by Professor Luiz Everson da Silva of the Federal University of Paraná - UFPR and the chemical analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The yield for *P. mikanianum* oil (PMEO) was 0.96% and for *P. diospyrifolium* (PDEO) 0.49%. The minimum inhibitory concentration and the joint action of the oils on gentamicin, erythromycin, norfloxacin and fluconazole drugs against bacteria and fungi were determined by the broth microdilution method. Data obtained from antimicrobial assays were analyzed using the GraphPad Prisma 6.0 statistical program, for fungi the spectrophotometric reading composed the cell viability curve and the concentration capable of inhibiting 50% of the fungal population (IC_{50}). Tests of minimum fungicidal concentration and action on fungal morphology were also performed. The results of the chemical composition of the oils had the most important terpenic and phenylpropanoid compounds, known for their antimicrobial, antiprotozoal, antidiabetic and anti-inflammatory activities. For *P. mikanianum*, safrol (82%) was the major compound and for *P. diospyrifolium*, Z-Carpacin (24.3%). In vitro intrinsic evaluation of the oils did not reveal clinical importance, however, the joint action with gentamicin drug was synergistic against multiresistant *Escherichia coli* strain (20 $\mu\text{g/mL}$) for PMEO, and for *E. coli* and *Staphylococcus aureus* when associated with PDEO (25, 39 and 6.34 $\mu\text{g/mL}$ respectively). In association with fluconazole PMEO showed synergism against the standard *Candida albicans* strain (IC_{50} : 69.97 $\mu\text{g/mL}$) and PDEO had synergistic effect *C. albicans* standard (IC_{50} : 94.12 $\mu\text{g/mL}$) and *Candida tropicalis* alone (IC_{50} : 103.7 $\mu\text{g/mL}$). Antagonistic or non-significant effect was seen with erythromycin and norfloxacin. A fungistatic (PMEO - for all strains; PDEO - CA INCQS 40006, CT INCQS 40042) and fungicidal (PDEO - CA URM 4127, CT URM 4262) effect were observed for both intrinsic and associated oils. The *P. mikanianum* oil completely inhibited filament formation in all test strains and *P. diospyrifolium* when interacting with *C. albicans* strains. Therefore, essential oils had an effective action against fungal virulence and were important discoveries for the treatment of invasive fungal infections in at-risk patients, for use in combined antibiotic therapy and in the manufacture of new drugs.

Key words: Chemical identification. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. *Candida* spp. Resistance. Antifungal dimorphism.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura:

- Figura 1:** *P. mikanianum* (Kunth) Steud.....22
- Figura 2:** *Piper diospyrifolium* Kunth.....23

Manuscrito 1:

Composição química e efeito antimicrobiano intrínseco e combinado do óleo essencial de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud.

- Figura 1:** Ação moduladora do Óleo essencial de *Piper mikanianum* associado aos antibióticos norfloxacina, gentamicina e eritromicina.....43
- Figura 2:** Ação antifúngica do fluconazol sozinho e associado ao óleo essencial de *Piper mikanianum* contra *Candida albicans*.....45
- Figura 3:** Ação antifúngica do fluconazol sozinho e associado ao óleo essencial de *Piper mikanianum* contra estirpes padrão e isolado de *Candida tropicalis*.....46
- Figura 4:** Efeito antifúngico do fluconazol e do óleo essencial de *Piper mikanianum* sobre o polimorfismo de *Candida albicans*.....48
- Figura 5:** Efeito antifúngico do fluconazol e do óleo essencial de *Piper mikanianum* sobre o polimorfismo de *Candida tropicalis*.....49
- Figura 6:** Imagens da ação antifúngica do óleo essencial de *Piper mikanianum* e do fluconazol sobre a micromorfologia fúngica.....50

Manuscrito 2:

Piper diospyrifolium Kunth.: Análise química e antimicrobiana (intrínseca e combinada) do óleo essencial

- Figura 1:** Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial de *Piper diospyrifolium*.....70
- Figura 2:** Ação moduladora do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* (OEPD) associado aos antibióticos das classes aminoglicosídeos, macrolídeos e fluoroquinolonas.....71
- Figura 3:** Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEPD (óleo essencial de *Piper diospyrifolium*) contra estirpes de *Candida albicans* (CA).....72

Figura 4: Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEPD (óleo essencial de *Piper diospyrifolium*) contra estirpes de *Candida tropicalis* (CT).....73

Figura 5: Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* (OEPD) sobre o crescimento micelial de *Candida* spp.....75

Figura 6: Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* (OEPD) sobre o crescimento micelial de *Candida tropicalis* (CT).....76

Figura 7: Demonstração do efeito progressivo do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* na inibição da transição morfológica de *Candida* spp.....77

LISTA DE TABELAS

Manuscrito 1:

Composição química e efeito antimicrobiano intrínseco e combinado do óleo essencial de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud.

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de *Piper mikanianum*.....42

Tabela 2: Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC₅₀) (µg/mL) do óleo essencial de *Piper mikanianum* frente a diferentes estirpes de *Candida*47

Manuscrito 2:

***Piper diospyrifolium* Kunth.: Análise química e antimicrobiana (intrínseca e combinada) do óleo essencial**

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de *P. diospyrifolium*.....69

Tabela 2: Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC₅₀) (µg/mL) do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* frente a diferentes estirpes de *Candida*.....74

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

® Marca registrada

µg Micrograma

µg/mL Micrograma por mililitro

UFC/mL Unidades formadoras de colônias por mililitro

ASD *Ágar Sabouraud Dextrose*

ATCC *American Type Culture Collection*

BHI *Brain Heart Infusion Broth*

CFM Concentração Fungicida Mínima

CIM Concentração Inibitória Mínima

CSD *Caldo Sabouraud Dextrose*

DMSO Dimetilsulfóxido

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HIA *Heart Infusion Ágar*

IC₅₀ Concentração capaz de inibir 50% das células

INCQS Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LMAC Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri

LMBM Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

EM Espectrometria de Massas

PDA *Potato Dextrose Ágar*

URCA Universidade Regional do Cariri

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	Produtos Naturais.....	19
3.1.1	Metabólitos secundários de plantas.....	19
3.1.1.2	Óleos essenciais.....	20
3.2	Bioma Mata Atlântica.....	20
3.2.1	A família Piperaceae e o gênero <i>Piper</i>	21
3.2.1.1	Espécies <i>Piper mikanianum</i> e <i>Piper diospyrifolium</i>	22
3.3	Micro-organismos: patogenicidade, virulência e resistência.....	24
3.3.1	Bactérias.....	25
3.3.2	Fungos.....	25
3.4	Fármacos antimicrobianos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Coleta do material vegetal e extração dos óleos essenciais.....	29
4.2	Identificação dos compostos químicos dos óleos essenciais.....	29
4.3	Cepas microbianas.....	30
4.4	Preparo dos inóculos.....	30
4.5	Preparo dos óleos essenciais.....	31
4.6	Preparo dos fármacos.....	31
4.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	31
4.8	Efeito modulador dos compostos na atividade de fármacos de uso clínico.....	32
4.9	Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM.....	32
4.10	Avaliação do efeito sobre a virulência fúngica.....	32
4.11	Análise estatística.....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1	Manuscrito 1.....	34
5.2	Manuscrito 2.....	62

6	CONCLUSÃO GERAL.....	87
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	88

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins terapêuticos é uma tradição secular em diversas culturas do mundo. Esta prática é disseminada por sucessivas gerações e o cultivo dessas ervas constitui uma alternativa para os cuidados primários da saúde (FERREIRA, BATISTA E PASA, 2015; BARRETO *et al.*, 2010).

A família Piperaceae é composta por 14 gêneros e mais 1.900 espécies (ARROYO-ACEVEDO *et al.*, 2015). Inclui plantas herbáceas, arbustos e árvores sendo estas últimas menos frequente. O gênero *Piper*, o maior e mais representado, ocorre em toda a região tropical e subtropical do mundo (BERNUCI *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2014). No Brasil as espécies nativas *P. mikanianum* (Kunth) Steud. e *P. diospyrifolium* Kunth, pertencem a Mata Atlântica e são comumente encontradas nas regiões Sul e Sudeste do país, onde são utilizadas na medicina popular (GUIMARÃES *et al.*, 2015; GUIMARÃES & MONTEIRO, 2006).

Várias espécies de *Piper* apresentam potencial medicinal com variadas propriedades biológicas incluindo ação no sistema nervoso central (LOPES *et al.*, 2012), larvicida (DA SILVA *et al.*, 2016), acaricida (FERRAZ *et al.*, 2010), antibacteriana (DOGNINI *et al.*, 2012; SALLEH *et al.*, 2011) e antifúngica (NAVICKIENE *et al.*, 2006). Sendo assim, os componentes químicos presentes nestas espécies mostram potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (BARDELLI, KIRIZAWA E SOUSA, 2008; BERNUCI *et al.*, 2016).

Um dos desafios da medicina moderna é o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. O surgimento de doenças emergentes, o aumento das infecções microbianas e o desenvolvimento da resistência a antibióticoterapia é uma preocupação crescente (TORTORA, FUNKE E CASE, 2017; FLORINDO, 2019).

O uso do óleo essencial, como agente antimicrobiano é uma alternativa relevante para conter a resistência microbiana e coloca a pesquisa de plantas medicinais num importante patamar científico, abrindo perspectivas para investigações etnofarmacológicas, fitoquímicas, microbiológicas entre outras (TINTINO *et al.*, 2013; MATIAS, 2011). Assim, não só o óleo, mas diversos produtos naturais são avaliados diante do seu potencial antimicrobiano intrínseco e associado a drogas comerciais (MATIAS, 2011).

O reino vegetal é uma fonte rica em metabólitos secundários com distintas funções ecológicas. Muitos destes metabólitos são validados quanto a sua eficácia biológica e a

segurança do uso dos seus compostos bioativos no desenvolvimento de novos produtos agroindustriais e farmacêuticos (SIMÕES *et al.*, 2017).

Devido a importância dos metabólitos secundários o estudo sobre a composição química de espécies torna-se cada vez mais aprofundado. A pesquisa fitoquímica mostra ao pesquisador o conhecimento dos constituintes químicos de espécies vegetais. Os óleos essenciais ou voláteis possuem variados constituintes como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros que se apresentam em concentrações variadas (SIMÕES *et al.*, 2017; MATOS, 2009).

Em meio ao cenário enfrentado pela indústria farmacêutica, neste trabalho é abordado o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Piper mikianum* e *Piper diospyrifolium*, em busca de entender seu possível efeito por meio da identificação dos constituintes químicos.

Os dados obtidos foram apresentados em capítulos, que trazem dois artigos abordando a composição química, a ação antimicrobiana intrínseca e combinada, contra fungos e bactérias, e a verificação do efeito exercido sobre o pleomorfismo de *Candida* spp.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar o perfil químico e a ação antimicrobiana do óleo essencial das folhas das espécies *Piper mikanianum* e *Piper diospyrifolium* sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e leveduras de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais de *Piper mikanianum* e *Piper diospyrifolium*;
- Avaliar a atividade antibacteriana intrínseca do óleo essencial através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC₅₀);
- Verificar o efeito modulador dos óleos essenciais associados aos fármacos das classes dos aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas e azóis;
- Analisar o tipo de efeito exercido pelo óleo por meio da Concentração Fungicida Mínima (CFM);
- Averiguar a atuação dos óleos e do antifúngico comercial sobre o um dos mecanismos de virulência do gênero *Candida*, o pleomorfismo celular.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produtos naturais

Historicamente, medicamentos derivados de produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, são amplamente utilizados para prevenir e tratar patologias. A diversidade estrutural e atividade biológica dos produtos naturais os tornam valiosas fontes para a descoberta de novas drogas (LI *et al.*, 2019).

A natureza, de forma geral, produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. As plantas medicinais são ricas em metabólitos secundários, utilizados na forma de fragrâncias, sabores, nutrientes, repelentes e corantes (SAVITHRAMMA, RAO E SUHRULATHA, 2011; KALLSCHEUER *et al.*, 2019; PYNE, NARCROSS E MARTIN, 2019). Devido a importância dos metabólitos secundários o estudo sobre a composição química de espécies vem se tornando cada vez mais crescente e aprofundado (MATOS, 2009; SIMÕES *et al.*, 2017).

3.1.1 Metabólitos secundários de plantas

Os componentes orgânicos produzidos pelos vegetais são divididos em dois grupos: o metabolismo primário, composto de macromoléculas essenciais à sobrevivência do vegetal (crescimento) com função estrutural e de armazenamento de energia, e o metabolismo secundário, que atuam na defesa da planta contra fatores externos (SIMÕES *et al.*, 2017; REZENDE *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários podem ser sintetizados por diferentes rotas biossintéticas, originando as seguintes classes básicas: policetídeos, terpenoides, alcaloides e fenilpropanoides (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os alcaloides se originam dos aminoácidos ornitina, arginina, lisina, entre outros e são reconhecidos pelo seu espectro de atividades biológicas como por exemplo: a morfina, a cafeína e a nicotina (CARVALHO & NETO, 2016). Os compostos fenólicos (fenilpropanoides, fenóis, flavonoides e taninos) são formados pela via biossintética do ácido chiquímico. Abundante nos vegetais, os flavonoides pertencem a classe dos polifenóis. Os taninos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e vegetais. Os policetídeos são formados a partir da combinação de vários grupos acetato. Suas subclasses variam conforme a diferenciação da molécula iniciadora da cadeia carbônica (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os terpenóides, por sua vez, são originados do difosfato de isopentenila (IPP), que é um isopreno. Sua classificação se origina a partir do número de carbonos presente na molécula: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (mais de 40 carbonos). Estas moléculas são componentes principais dos óleos essenciais (CARVALHO & NETO, 2016; SIMÕES *et al.*, 2017).

3.1.1.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais são metabólitos secundários voláteis, produzidos por plantas aromáticas e geralmente podem ser reconhecidos pelo seu odor característico (MARTINELLI *et al.*, 2017). Eles estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa, repelindo ou atraindo insetos e também contra micro-organismos (BERAN *et al.*, 2019; CARVALHO & NETO, 2016). São compostos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (REZENDE *et al.*, 2016).

As folhas, flores, caules ou raízes são matérias-primas para produção de óleos essenciais e o seu estágio de desenvolvimento é um dos fatores determina a composição das essências naturais. São compostos com reconhecidas propriedades medicinais antimicrobianas e antioxidantes, porém dependendo da dose administrada, o efeito deixa de ser terapêutico e passa a ser tóxico (FIGUEIREDO, PEDRO E BARROSO 2014; REZENDE *et al.*, 2016).

Várias técnicas são empregadas para extração dos óleos essenciais: hidro-destilação, extração de solvente, extração de micro-ondas, etc. A composição e a quantidade do óleo essencial extraído podem variar conforme os diferentes métodos de extração (MARTINELLI *et al.*, 2017).

3.2 Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é uma das florestas mais ricas em diversidade de vida no planeta (BRASIL, 2019). As espécies *P. mikianum* e *P. diospyrifolium* fazem parte deste bioma.

O bioma abrange cerca de 15% do território brasileiro, em 17 estados, dos quais está incluso Santa Catarina e Paraná, locais de incidência maior das duas espécies. Abriga 72% da população brasileira e três dos maiores centros urbanos do continente sul americano. Possui o clima definido por temperaturas altas com umidade abundante, e chega a receber 2000 mm de

precipitação ao longo do ano (LIPORACCI, 2014; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2017).

Estima-se que existam na Mata cerca de 20 mil espécies vegetais, incluindo espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, e mais de 2 mil espécies de animais. É composta por formações florestais nativas e ecossistemas associados (manguezais, restingas, campos de altitude, brejos e encaves). Possibilita atividades essenciais para a população que abriga, como o abastecimento de água, a agricultura, a pesca, a geração de energia elétrica, o turismo e o lazer (BRASIL, 2019).

3.2.1 A família Piperaceae e o gênero *Piper*

A família Piperaceae Giseke pertence ao grupo das Angiospermas, possui forma de vida em arbusto, árvore, erva, liana/volúvel/trepadeira e subarbusto. No Brasil é representada por quatro gêneros *Manekia* Trel., *Ottonia* Spreng., *Peperomia* Ruiz; Pav., e *Piper* L. (GUIMARÃES *et al.*, 2015). A família Piperaceae tem importância ornamental, alimentícia, medicinal e industrial, sendo utilizada na obtenção de fármacos, temperos, corantes, cosméticos, bebidas medicinais, inseticidas etc. O produto mais clássico, largamente comercializado em mercados internacionais de especiarias, é a pimenta do reino produzida a partir da espécie *Piper nigrum* L. (RUSCHEL, 2004; BEZERRA *et al.*, 2008).

Espécies de *Piper* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreia (PIERONI, 2017), distúrbios gastrointestinais, dor de estômago (SŌUKAND *et al.*, 2017), doenças na garganta, tosse (ESAKKIMUTHU *et al.*, 2018), infecções ginecológicas, urológicas e flatulências (ALQETHAMI, HAWKINS E TEIXIDOR-TONEU, 2017; SALEHI *et al.*, 2019).

Piper L. possui também importância ecológica, como por exemplo, as espécies *Piper arboreum* e *Piper amalago* que servem de alimento para determinadas espécies de morcegos (BIZERRIL e RAW, 1997; FLEMING, 1985). As folhas de *Piper xylosteoides* e *Piper mikanianum* são fundamentais para reprodução de borboletas (RUSCHEL, 2004), sua polinização segundo Figueiredo e Sazima (2000) ocorre por meio do vento e de certos insetos como abelhas e moscas.

O gênero *Piper* caracteriza-se por possuir folhas com considerável variação de formas. As partes vegetativas, quando amassadas, têm odor picante-aromático e quando

mascadas, tem um sabor picante, devido à presença de óleos voláteis e oleoresinas (RUSCHEL, 2004).

3.2.1.1 Espécies *Piper mikanianum* e *Piper diospyrifolium*

As espécies *Piper mikanianum* e *Piper diospyrifolium* são nativas do Brasil, com forma de vida arbustiva, pertencem a Mata Atlântica, sendo comuns nas regiões Sul e Sudeste do país (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Piper mikanianum (Kunth) Steud., conhecida popularmente como pariparoba (DUARTE; SIEBENROCK, 2010), esta representada na figura 1. É caracterizada por possuir 0,3-1,5 m de altura, caules eretos, folhas com pecíolo pubescente, base simétrica, ápice agudo ou abruptamente acuminado, nervuras no total de 4-5 em cada lado, geralmente subopostas, margem foliar revoluta ou plana. Inflorescências em espigas opostas a folha, possuem entre 2,8–5,5–11,6 mm de comprimento, eretas ou suavemente curvas. As flores com brácteas arredondado-triangulares, franjadas com 3 estames e 3 estigmas sésseis. Habita locais úmidos e sombreados, matas de planície, paredão rochoso, topo de morro, inclusive pode ser cultivada em jardins (RUSCHEL, 2004).

Figura 1: *Piper mikanianum* (Kunth) Steud



Foto: Prof.º Dr. Luiz Everson

Piper diospyrifolium Kunth (Figura 2), conhecida por João-Borandi (GUIMARÃES & MONTEIRO, 2006), possui caule com crescimento ereto, pecíolo foliar com bainha alongada ou alada, a superfície é lisa com forma elíptica, lanceolada ou oblonga, ápice agudo, nervuras dispostas até o ápice, classificada em eucamptódroma. Há a presença de tricomas somente nas folhas. Sua inflorescência é do tipo espiga com orientação ereta. A flor possui brácteas em forma triangular e seus frutos são oblongos ou achatados com ápice côncavo (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Figura 2: *Piper diospyrifolium* Kunth.



Foto: Luiz Everson da Silva

A espécie *P. diospyrifolium* teve atividade antimicrobiana comprovada contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (BERNUCI *et al.*, 2016) e contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (VIEIRA *et al.*, 2011). *Piper mikanianum* não possui relatos de atividade contra fungos e bactérias. Sendo assim, há a necessidade de realizar estudos com estas espécies, aprofundando o conhecimento sobre as mesmas.

3.3 Micro-organismos: patogenicidade, virulência e resistência

Os micro-organismos patogênicos utilizam de diferentes fatores estratégicos para invadir, infectar e causar danos ao hospedeiro. Estruturas especializadas de ligação, fatores de crescimento, enzimas e toxinas são aspectos importantes para o acesso ao corpo humano, causando-lhe danos aos tecidos e desenvolvendo a doença. Esta característica é individual de cada micro-organismo, diferindo consideravelmente entre os patógenos (MADIGAN *et al.*, 2016).

Mecanismos como a capacidade de evadir das defesas do hospedeiro, adesão, formação de biofilme e a produção de enzimas hidrolíticas contribuem para o aumento da virulência nos micro-organismos (MADIGAN *et al.*, 2016, SARDI *et al.*, 2013, SILVA, 2016).

Associado à virulência, a resistência adquirida a fármacos comerciais, devido o uso inadequado de medicamentos, é preocupante, pois este fator contribui para o aumento dos índices de morbidade e mortalidade e dos custos no tratamento das infecções (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012; COUTINHO *et al.*, 2015).

As resistências adquiridas são classificadas em quatro grupos: o bloqueio da entrada da droga na célula, que reduz a entrada do fármaco na célula, destruição ou inativação da droga por enzimas, o mecanismo pelo qual enzimas produzidas por micro-organismos impossibilitam a ação do fármaco por inativar o local que os mesmos se ligam a célula, alteração nos sítios-alvo da droga, que é caracterizado por diminuir a afinidade do fármaco ao seu alvo de ação e efluxo rápido da droga, onde ocorre o transporte ativo dos antimicrobianos do meio intracelular para o meio extracelular, por meio de bombas de efluxos (FRANCO *et al.*, 2015).

Várias medidas preventivas surgem para tentar amenizar este problema, entre elas, a conscientização do uso adequado das drogas, a procura por novos antimicrobianos, em especial a partir de espécies vegetais (como por exemplo os óleos essenciais) podem representar uma nova alternativa de combate à resistência microbiana (COSTA; JÚNIOR, 2017; SARTO E JUNIOR, 2018).

3.3.1 Bactérias

As espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são bactérias patogênicas humanas de grande importância para a saúde pública, principalmente devido as suas cepas serem resistentes a vários agentes antimicrobianos (BOSS, OVERESCH, BAUMGARTNER, 2016).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos com parede celular Gram-positiva e aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. As células geralmente crescem formando agregados semelhantes a cachos de uvas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). São anaeróbios facultativos e colonizam a microbiota natural de humanos (pele, trato respiratório, gastrintestinal e urogenital) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

A espécie *Staphylococcus aureus* possui pigmentação amarela, e é mais comumente associada a patologias como furúnculos, acne, pneumonia, osteomielite, meningite, intoxicações alimentares, infecções em feridas cirúrgicas e hospitalares (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). É a espécie de maior interesse médico devido a sua capacidade de desenvolver rapidamente resistência aos antibióticos (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015).

A espécie *Escherichia coli* é uma bactéria de parede celular Gram-negativa com forma de bastão (bacilo), que habita normalmente o intestino grosso dos vertebrados. Sua presença, na microbiota natural dos animais, é benéfica, pois auxilia na digestão de alimentos que não seriam digeridos sem a sua presença. É o organismo mais conhecido da microbiologia, sendo utilizada como importante ferramenta para as pesquisas biológicas básicas, devido o conhecimento que se tem sobre a bioquímica e a genética da espécie (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Escherichia coli é o patógeno responsável por causar infecções no trato urinário, diarreia (produção de enterotoxinas), doença de origem alimentar grave, meningites e sepses. É facilmente transmitida por água e alimentos contaminados com fezes humanas ou de animais (CESTARI *et al.*, 2016).

3.3.2 Fungos

O gênero *Candida* spp é representado por leveduras que fazem parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis, porém, quando há uma ruptura no equilíbrio da microbiota ou o

sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a tornar-se patogênicas (BARBEDO; SGARBI, 2010)

A candidíase ou candidose é infecção ocasionada por fungos do gênero *Candida* (TRABULSI E ALTERTHUM, 2015). Frequentemente é ocasionada por *Candida albicans* e pode ocorrer como infecções de pele e mucosas, com pequenas alterações locais, e infecções sistêmicas que invadem os tecidos, podendo chegar a comprometer vísceras. Dita oportunista devido ao fato de que o fungo é capaz de crescer sobre os tecidos quando os antibióticos suprimem a microbiota bacteriana normal ou há mudanças no pH normal das mucosas resultando no crescimento exagerado do micro-organismo e desenvolvendo a doença (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Ocorrem com frequência em pacientes com AIDS e portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Entre os integrantes desse gênero, a *Candida albicans* apresenta maior relevância sendo responsável por mais de 50% das infecções cutâneas e sistêmicas fúngicas em humanos (SILVA-DIAS, 2015).

Candida albicans é um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática; ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos. Possuem a habilidade de mudar sua forma quando o ambiente não tem todos os nutrientes necessários, ou não é propício para seu desenvolvimento. Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, sendo considerado um organismo pleomórfico (BARBEDO; SGARBI, 2010; BROOKS *et al.*, 2014; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

Propriedades ligadas às células de *C. albicans*, comumente denominadas fatores de virulência, lhes conferem a capacidade de produzir doença. Entre os atributos podemos citar a formação de tubo germinativo com conseqüente desenvolvimento da forma filamentosa (hifas e pseudohifa), que contribui para a resistência a fagocitose por parte das células do hospedeiro (SHARMA *et al.*, 2019; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

A espécie *Candida tropicalis* se destaca como agente causador de candidemia, pois é a mais diagnosticada em isolados clínicos tornando-se responsável por diferentes tipos de infecções, onde os tratos gastrointestinais e urinários são importantes portas de entrada (MUÑOZ *et al.*, 2010). Não está associada à microbiota normal do humano e a sua detecção está diretamente associada à infecção (BARBEDO; SGARBI, 2010).

3.4 Fármacos antimicrobianos

O termo antibiótico engloba uma ampla variedade de agentes farmacêuticos que incluem agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários (LEEKHA; TERRIL; EDSON, 2011). São agentes produzidos a partir de micro-organismos destinados a matar ou controlar o crescimento de outros micro-organismos no hospedeiro (*in vivo*) (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os aminoglicosídeos, são assim chamados, por conterem aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas. É a classe a qual a Gentamicina faz parte, fármaco especialmente útil no tratamento de infecções por *Pseudomonas* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Seu alvo de ação é a subunidade ribossomal 30S, desta maneira, os medicamentos desta classe inibem a síntese proteica bacteriana. São de amplo espectro frequentemente usados para tratar infecções causadas por Gram-negativas (MADIGAN *et al.*, 2016). No entanto, seu uso é limitado, os aminoglicosídeos podem afetar a audição ao causar danos permanentes ao nervo auditivo, e danos renais (nefrotoxicidade). As injúrias renais são induzidas pelo acúmulo do fármaco nas células nefróticas, ocasionando necrose das células do túbulo proximal (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; CASANOVA *et al.*, 2017).

Os macrolídeos, são a classe caracterizada por conter anéis lactona ligados a açúcares. A eritromicina é o seu principal representante, e é produzida pela bactéria *Streptomyces erythreus*. É uma droga de amplo espectro que tem como alvo a subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo parcialmente a síntese proteica. A inibição parcial da síntese proteica leva à tradução preferencial de algumas proteínas e restringe a tradução de outras, resultando em um desequilíbrio no proteoma. A eritromicina é a droga de escolha no tratamento de infecções por *Legionella*, pneumonias por micoplasma, entre outras (MADIGAN *et al.*, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

A norfloxacin, por sua vez, é da classe de antibacterianos sintéticos chamados fluoroquinolonas. Atuam perturbando o metabolismo microbiano, interferindo no DNA-girase bacteriano, impedindo o superenovelamento do DNA (MADIGAN *et al.*, 2016). São efetivas no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, administradas na terapia de infecções geniturinárias, gastrointestinais, respiratórias, articulares e oculares superficiais, e é notável o rápido desenvolvimento da resistência de cepas bacterianas (CHIERENTIN & SALGADO, 2016).

As drogas antifúngicas são de difícil descoberta devido a semelhança celular de fungos e humanos. Por serem eucariotos, os sítios de alvo do fungo são semelhantes aos da célula do hospedeiro, tornando o medicamento tóxico e comprometendo o desenvolvimento de novos fármacos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O fenômeno da resistência fungica se torna preocupante pois a variedade de drogas antifúngicas é limitada quando comparado ao arsenal de drogas disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas (SILVA, 2016).

O Fluconazol é um antibiótico da classe dos azóis, que se caracterizam por serem menos tóxicos e mais solúveis em água (o que faz com que sejam mais eficientes em infecções sistêmicas). Os azóis surgiram em uma tentativa de substituição da droga anfotericina B, por ser bastante tóxica ao hospedeiro, atacando principalmente os rins (nefrotóxica) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Essa classe possui atividade de amplo espectro e atuam inibindo a enzima fúngica lanosina-14 α -desmetilase, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, afetando diretamente a fluidez da membrana e nas enzimas ligadas a ela. O fluconazol alcança grandes concentrações no líquido cefalorraquidiano, podendo ser administrado em casos de meningite fúngica e utilizado em infecções de candidemia, candidíase bucal, vulvovaginal entre outros (SILVA, 2016; VIEIRA *et al.*, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal e extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná – UFPR – Brasil, onde foram extraídos e submetidos a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), para posterior quantificação e identificação dos seus constituintes.

Inicialmente, os materiais vegetais das duas espécies foram coletados no litoral do Paraná (*Piper diospyrifolium* – S 25° 13.644', W 48° 34.985' e altitude 6m) e no município de Atalanta, Santa Catarina, Brasil (*Piper mikanianum* - S 25° 29.830', W 49° 00.919' e altitude 640m). Foram coletados aproximadamente 10 exemplares que se destinaram a produção do óleo e da exsicata. As exsicatas foram transportadas ao Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), onde foram herborizadas (HFIE) sob o número MBM 396413 para *P. diospyrifolium* e MBM 396408 para *P. mikanianum* (LAWRENCE, 1951; IBGE, 2012).

Para a obtenção dos óleos essenciais as folhas das plantas foram selecionadas e secas em aparelho secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40°C por 24 horas. Posteriormente, foram pesadas 50 g das folhas de cada espécie e em 1 L de água destilada foram submetidas a hidrodestilação em aparelho graduado do tipo Clevenger durante 4,5 horas. O processo se deu em 3 repetições com base no método de Wasicky (1963). Após a extração, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração aonde permaneceram até o momento da análise.

Na determinação do teor de óleo essencial em base seca, foi aferido a massa total de cada óleo essencial produzido em relação a quantidade de massa seca de material botânico utilizada na extração.

4.2 Identificação dos compostos químicos dos óleos essenciais

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Uma solução do óleo de cada espécie e diclorometano a 1% foi injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N, a temperatura de 250 °C. Foi utilizada a coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x

0,25 mm x 0,25 µm) com o gás hélio como carreador (1,0 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240°C a uma taxa de 3°C min⁻¹. O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras s⁻¹ e faixa de massas de 40 a 450 uma. A linha de transferência foi mantida a 260°C, a fonte de íons a 230°C e o analisador (quadrupolo) a 150°C. Para a quantificação, a amostra foi injetada em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280°C, sob as mesmas condições analíticas, exceto pelo gás de arraste, utilizado o hidrogênio, a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

4.3 Cepas microbianas

As bactérias padrões utilizadas nos testes foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba, os fungos foram obtidos da Coleção de Culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz e do acervo da Micoteca da Universidade Federal de Recife (URM – University Recife Mycology) cultivados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) e no Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri (LMAC) da Universidade Regional do Cariri (URCA), respectivamente. Foram utilizadas linhagens padrão e resistentes das bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus aureus* 10, e dos fungos: *Candida albicans* INCQS 40006, *Candida albicans* URM 4127, *Candida tropicalis* INCQS 40042 e *Candida tropicalis* URM 4262.

4.4 Preparo dos inóculos

As culturas de bactérias e fungos foram semeadas em placas de Petri contendo seus respectivos meios de cultura: HIA (*Heart Infusion Ágar*) para bactérias e ASD (*Sabouraud Dextrose Ágar*) para fungos, e colocadas na estufa a 37°C para crescimento por 24 horas. Após esse período, foi retirado uma alçada de cada cultura microbiana e diluído em tubos de ensaio contendo 4 mL de Soro Fisiológico (SF) a 0,9%. A concentração do inóculo foi padronizado com a turvação da escala 0,5 de McFarland (1 x 10⁸ UFC/mL) (NCCLS, 2003).

4.5 Preparo dos óleos essenciais

Para obter as soluções matriciais do produto natural foram pesados 10 mg e 50 mg dos óleos essenciais e colocados em tubos *ependorfs* individualizados, posteriormente diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida essas primeiras soluções foram diluídas novamente em água destilada estéril (para que a concentração de DMSO não exerça atividade sobre as células testadas), atingindo as concentrações de 1.024 µg/mL para testes com bactérias e de 4.096 µg/mL para testes com fungos (STOPPA *et al.*, 2009).

4.6 Preparo dos fármacos

As drogas de referência utilizadas no teste foram norfloxacina, gentamicina, eritromicina, na concentração inicial de 1.024 µg/mL e o fluconazol na concentração de 4.096 µg/mL. Todos os fármacos foram diluídos em água destilada e estéril.

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os *ependorfs* do teste foram preparados contendo 1350 µL de BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) a 10% e CSD duplamente concentrado (*Sabouraud Dextrose Broth*) + 150 µL do inóculo (correspondente a 10% da solução total) para as linhagens de bactérias e fungos respectivamente. Após 100 µL da solução final dos *ependorfs* foi adicionado em cada poço da placa de microdiluição, e em seguida foi realizada a diluição seriada, com a solução de 100 µL dos produtos naturais, por coluna, variando nas concentrações de 512 µg/mL no primeiro poço a 0,5 µg/mL no último poço quando bactérias, e de 2.048 µg/mL a 2 µg/mL em fungos. As microdiluições foram realizados em triplicata e quadruplicata, respectivamente. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37 °C. A leitura das placas bacterianas foi feita utilizando-se a adição de 20 µL de resazurina em cada poço e observação ocular após 1 hora (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Quanto as placas de fungos foram realizadas leituras espectrofotométricas no aparelho de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 630 nm e os resultados foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular e IC₅₀. Controles de diluições (com cloreto de sódio a 0,9% ao em vez do inóculo), de esterilidade do meio e de crescimento foram realizados (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

4.8 Efeito modulador dos compostos na atividade de fármacos de uso clínico

Para verificar a ação conjunta dos produtos naturais aos fármacos comerciais foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008), no qual os óleos são utilizados em concentração sub-inibitória (CIM/8 – bactérias e CFM/16 – fungos). Nos tubos *ependorf* continham a substância natural + o meio BHI 10 % e CSD duplamente concentrado + 150 μL da suspensão microbiana (correspondente a 10% da solução). Foram preparados controles de crescimento e de diluição. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 μL desta solução em cada poço. Em seguida, feita a microdiluição seriada com 100 μL do fármaco. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em bactérias com o uso da resazurina e em fungos por meio do aparelho espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 630 nm. Se houve ação positiva do óleo em conjunto do fármaco o efeito é dito sinérgico, em caso contrário é dito antagônico.

4.9 Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM

Nesse teste foi observado somente a viabilidade fúngica. A partir do teste da CIM, foi adicionado uma haste esterilizada em cada poço da placa de microdiluição, homogeneizada e subcultivada em placa de *Petri* contendo ASD (*Sabouraud Dextrose Ágar*) e um guia das concentrações testadas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a leitura foi realizada observando o crescimento ou supressão das colônias de *Candida* (ERNST *et al.*, 1999, com modificações).

4.10 Avaliação do efeito sobre a virulência fúngica

Para verificar a ação do produto natural sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis. Dentro de cada câmara úmida, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos três mL de meio PDA (Potato Dextrose Ágar), empobrecido, contendo o óleo em concentração definida a partir da CFM (CFM/2, CFM/4 e CFM/8). Das placas de *Petri* previamente inoculadas, foram retiradas alçadas do inóculo e feito duas estrias paralelas, sobre o meio PDA já solidificado, sendo em seguida, sobre as quais depositada uma lamínula estéril. As câmaras foram incubadas e após 24 h (37°C) foram visualizadas em microscópio óptico (AXIO IMAGER M2-3525001980 –

ZEISS - Alemanha) utilizando objetiva de 20 X. Foi verificado a emissão ou inibição de filamentos. Realizou-se a captura de imagens. Controles de crescimento e do antifúngico foram realizados. Posteriormente as fotos foram analisadas realizando as medições de hifas e utilizando o Software para identificar a quantidade de inibição das substâncias.

4.11 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 6.0. Foi aplicado na amostra uma ANOVA de duas vias. Em bactérias o teste ANOVA utilizou 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 $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ são considerado significativo e $p > 0,05$ não significativo). Para fungos os dados obtidos da leitura espectrofotométrica foram verificados quanto a sua distribuição normal e em seguida analisados por ANOVA, comparando os valores de cada concentração do produto natural, com o teste post hoc de Bonferroni. Os valores de IC_{50} foram obtidos por regressão não linear para a finalidade de interpolação de valores a partir de curvas padrão.

Para avaliação da virulência foi realizada a medição da área total da estria, e das áreas onde houve crescimento de hifas. Em seguida foram realizadas medições de todos os filamentos de hifas encontrados em cinco áreas escolhidas aleatoriamente em cada estria, de cada concentração. Foi feita a média do comprimento dos filamentos de hifas e analisados por ANOVA seguida de correção de Bonferroni para múltiplas comparações, comparando os valores de acordo com a concentração do produto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa serão apresentados nas subseções a seguir (5.1 e 5.2). Neste primeiro estudo consta a análise do óleo essencial da espécie *P. mikanianum*. O artigo foi intitulado: **Composição química e efeito antimicrobiano intrínseco e combinado do óleo essencial de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud.** e encontra-se submetido ao periódico South African Journal of Botany, com Qualis B2 em Biodiversidade e fator de impacto de 1,504.

No segundo estudo é abordado a análise do óleo essencial de *P. diospyrifolium*. O artigo foi intitulado: ***Piper diospyrifolium* Kunth.: Análise química e antimicrobiana (intrínseca e combinada) do óleo essencial** e encontra-se submetido ao periódico Microbial Pathogenesis com Qualis B2 em Biodiversidade e fator de impacto 2,581.

Os manuscritos estão formatados conforme as normas das revistas as quais foram submetidos.

5.1 Manuscrito 1

Composição química e efeito antimicrobiano intrínseco e combinado do óleo essencial das folhas de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud.

Joara Nályda Pereira Carneiro^{a*}; Rafael Pereira da Cruz^a; Fábria Ferreira Campina^a; Maria do Socorro Costa^a; Antonia Thassya Lucas dos Santos^a; Débora Lima Sales^a; Camila Fonseca Bezerra^a; Luiz Everson da Silva^b; Wanderlei do Amaral^b; Ricardo Andrade Rebelo^c; Ieda Maria Begnini^c; Henrique Douglas Melo Coutinho^a; Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga^a.

a: Universidade Regional do Cariri - URCA. Cel Antônio Luis, 1161. CEP: 63105-000, Pimenta, Crato - CE, Brazil;

b: Universidade Federal do Paraná - UFPR. XV de Novembro, 1299. CEP: 80.060-000, Centro, Curitiba - PR, Brazil.

c: Universidade Regional de Blumenau - FURB. Antônio da Veiga, 140. CEP: 89030-903 - Itoupava Seca - Blumenau - SC, Brazil.

*Corresponding author.

E-mail addresses: nalyda_05@hotmail.com

Resumo

Infecções graves causadas por microrganismos resistentes têm aumentado em incidência, e o uso de plantas, como *Piper mikanianum*, na medicina popular é uma alternativa para conter essas infecções. Assim, objetivamos identificar seus constituintes químicos e avaliar a atividade antimicrobiana (fungos e bactérias) do óleo essencial de *Piper mikanianum* (OEPM). Os compostos do óleo essencial foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/EM). O rendimento do óleo foi de 0,96%. A concentração inibitória mínima e a ação combinada do produto natural com as drogas das classes dos aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas e azóis foram determinadas por microdiluição em caldo. Dados obtidos dos ensaios antimicrobianos foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 6.0, para fungos a leitura espectrofotométrica compôs a curva de viabilidade celular e a IC₅₀. A concentração mínima de fungicida (CFM) e a ação dos óleos na morfologia fúngica também foram investigadas. O resultado da composição química do óleo revelou compostos terpênicos e fenilpropanoides, ambos conhecidos por suas atividades antimicrobianas, antiprotzoárias, antidiabéticas e anti-inflamatórias. O composto majoritário de *P. mikanianum* foi o safrol (82%). A avaliação intrínseca *in vitro* não revelou importância clínica, entretanto, a ação conjunta a droga gentamicina foi sinérgica contra cepa *Escherichia coli* (20 µg/mL). Em associação ao fluconazol OEPM mostrou sinergismo contra a estirpe de *Candida albicans* padrão (IC₅₀: 69,97 µg/mL) em comparação ao valor obtido pelo fluconazol sozinho (IC₅₀: 91,9 µg/mL). Efeito antagonico ou não significativo foi visto diante das drogas eritromicina e norfloxacin. Foi observado efeito fungistático para todas as estirpes do teste tanto intrínseco quanto associado. *P. mikanianum* inibiu completamente a formação filamentosa em todas as cepas do teste. Portanto, os resultados evidenciaram a espécie como fonte de compostos ativos que podem inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, além de potencialmente se tornar uma alternativa para o controle da virulência de *C. albicans*.

Palavras chaves: Análise química; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*, *Candida* spp; efeito inibidor; anti-dimorfismo fúngico.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins terapêuticos é uma tradição secular em diversas culturas do mundo, tendo se mostrado eficaz para tratar muitas infecções (BARRETO *et al.*, 2010). Uma das formas utilizadas para obtenção dos benefícios medicinais dos vegetais é a partir do óleo essencial, também chamado de óleo volátil.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, em geral odoríferas e líquidas, obtidas de matérias-primas vegetais (SIMÕES *et al.*, 2017). São provenientes do metabolismo secundário de plantas aromáticas e geralmente podem ser reconhecidos pelo seu odor característico (MARTINELLI *et al.*, 2017). Os óleos essenciais estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os constantes ataques a saúde humana por micro-organismos resistentes a agentes terapêuticos têm contribuído para a busca de novos compostos que neutralizem esta resistência e o uso popular de extratos vegetais na saúde serviu de base para diversas investigações científicas (NASCIMENTO *et al.*, 2007). Neste contexto, o uso popular de extratos vegetais para a promoção da saúde serviu de base para diversas investigações científicas (BAGAVAN *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2005; CARRASCO *et al.*, 2012).

A incidência de infecções fúngicas e bacterianas tem aumentado, não somente devido ao uso indiscriminado dos fármacos comerciais, que lamentavelmente contribui para o aparecimento da resistência microbiana, mas também ao aumento do número de casos de doenças imunodepressoras, nas quais bactérias patogênicas evoluem rapidamente e fungos passam de comensais a patógenos oportunistas (SILVEIRA *et al.*, 2006; PUPULIN *et al.*, 2009).

O gênero *Piper* é distribuído nas regiões tropical e subtropical do mundo (DA SILVA *et al.*, 2014) e apresenta potencial medicinal, com diversas propriedades biológicas incluindo ação no sistema nervoso central (LOPES *et al.*, 2012), larvicida (DA SILVA *et al.*, 2016), acaricida (FERRAZ *et al.*, 2010), antibacteriana (DOGNINI *et al.*, 2012; SALLEH *et al.*, 2011) e antifúngica (NAVICKIENE *et al.*, 2006). O produto natural proveniente destas espécies mostra-se como uma alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos (BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008; BERNUCI *et al.*, 2016).

Espécies do gênero *Piper* são amplamente usadas de várias maneiras na medicina tradicional de vários países (DA SILVA *et al.*, 2014). Zuchiwschi *et al.* (2010), em estudos

etnobotânicos, realizados no estado de Santa Catarina, com as espécies *P. amalago* var. *medium* ou jaguarandi e *P. gaudichaudianum* identificou seu uso para gripe, dor de garganta e tumores e *P. mikanianum* com usos diversos: gripe, dor de garganta, como cicatrizante e para infecções no útero. Por outro lado, Ricardo *et al.* (2017) com base na literatura, observou a utilização da *Piper anisum* como aromático, sialagogo e odontálgico, a *P. peltatum* L., *P. umbellatum* e *P. mikanianum*, também conhecidas aguaxima, caapeba e periparoba são utilizadas no tratamento de reumatismo, úlceras, suas raízes para problemas de estômago, como sudorífico, e para febres intermitentes. O óleo essencial de *P. mikanianum* foi extraído pela primeira vez por Abreu *et al.* (2002) das folhas frescas de material vegetal coletado em Santa Catarina. Sua caracterização revelou elevadas concentrações do arilpropanoide safrol. Apesar de relativamente disseminado, a *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. é pouco abordada cientificamente, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos estudos que avaliem sua eficácia medicinal e segurança quanto ao seu uso.

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud., seja individualmente e combinado a fármacos comerciais frente a linhagens padrões e resistentes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e leveduras de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, bem como investigar a sua composição química.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do material botânico e extração do óleo essencial

O material vegetal foi coletado no município de Atalanta, Santa Catarina, Brasil (S 25° 29.830', W 49° 00.919' e altitude 640m). Foram coletados mais de 10 exemplares que se destinaram a produção do óleo e da exsicata. A exsicata foi transportada ao Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), onde foi herborizada (HFIE) sob o número MBM 396408 (Lawrence, 1951; IBGE, 2012).

Para a confecção do óleo essencial as folhas da planta foram selecionadas e secas em aparelho secador elétrico modelo FANEM - Mod. 320 SE com circulação de ar a 40°C por 24 horas. Posteriormente foram pesadas 50 g das folhas e em 1 L de água destilada foram submetidas a hidrodestilação em aparelho graduado do tipo Clevenger durante 4,5 horas. O processo ocorreu com base no método de Wasicky (1963). Após a extração, a amostra foi acondicionada em freezer aonde permaneceram até o momento da análise.

Na determinação do teor de óleo essencial em base seca, foi aferido a massa total de óleo essencial produzido em relação a quantidade de massa seca de material botânico utilizada na extração.

2.2 Identificação dos constituintes químicos

A identificação dos constituintes químicos foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Uma solução do óleo e diclorometano a 1% foi injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N, a temperatura de 250 °C. Foi utilizada a coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com o gás hélio como carreador (1,0 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O detector de massas foi operado no modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras s⁻¹ e faixa de massas de 40 a 450 uma. A linha de transferência foi mantida a 260 °C, a fonte de íons a 230 °C e o analisador (quadrupolo) a 150 °C. Para a quantificação, a amostra foi injetada em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280 °C, sob as mesmas condições analíticas, exceto pelo gás de arraste, utilizado o hidrogênio, a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

2.3 Cepas microbianas

As bactérias padrões utilizadas nos testes foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba, os fungos foram obtidos da Coleção de Culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz e do acervo da Micoteca da Universidade Federal de Recife (URM – University Recife Mycology) cultivados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) e no Laboratório de Micologia Aplicada do Cariri (LMAC) da Universidade Regional do Cariri (URCA), respectivamente. Foram utilizadas linhagens padrão e resistentes das bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* 06, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus aureus* 10, e dos fungos: *Candida albicans* INCQS 40006, *Candida albicans* URM 4127, *Candida tropicalis* INCQS 40042 e *Candida tropicalis* URM 4262.

2.4 Preparo dos inóculos

As culturas de bactérias e fungos foram semeadas em Placas de Petri contendo seus respectivos meios de cultura: HIA (Heart Infusion Ágar) para bactérias e ASD (Sabouraud Dextrose Ágar) para fungos, e colocadas na estufa a 37 °C para crescimento por 24 horas. Após esse período, foi retirado uma alçada de cada cultura microbiana e diluído em tubos de ensaio contendo 4 mL de Soro Fisiológico (SF) a 0,9%. A concentração do inóculo foi padronizado com a turvação da escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) (NCCLS, 2003).

2.5 Preparo das substâncias

Para obter as soluções matriciais do produto natural foram pesados 10 mg e 5 mg do óleo essencial e colocados em tubos *ependorfs* individualizados, posteriormente diluídos em 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Em seguida essas primeiras soluções foram diluídas novamente em água destilada estéril (para que a concentração de DMSO não exerça atividade sobre as células testadas), atingindo as concentrações de 1.024 µg/mL para testes com bactérias e de 4.096 µg/mL para testes com fungos (STOPPA *et al.*, 2009).

2.6 Preparo dos fármacos

As drogas de referência utilizadas no teste foram norfloxacina, gentamicina, eritromicina, na concentração inicial de 1.024 µg/mL e o Fluconazol na concentração de 4.096 µg/mL. Todos os fármacos foram diluídos em água destilada e estéril.

2.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os *ependorfs* do teste foram preparados contendo 1350 µl de BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) a 10% e CSD duplamente concentrado (*Sabouraud Dextrose Broth*) + 150 µL do inóculo (correspondente a 10% da solução total) para as linhagens de bactérias e fungos respectivamente. Após 100 µl da solução final dos *ependorfs* foi adicionado em cada poço da placa de microdiluição, e em seguida foi realizada a diluição seriada, com a solução de 100 µL do óleo, por coluna, variando nas concentrações de 512 µg/mL no primeiro poço a 0,5 µg/mL no último poço quando bactérias, e de 2.048 µg/mL a 2 µg/mL em fungos. As

microdiluições foram realizados em triplicata e quadruplicata, respectivamente. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37 °C. A leitura das placas bacterianas foi feita utilizando-se a adição de 20 µL de resazurina em cada poço e observação ocular após 1 hora (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Quanto as placas de fungos foram realizadas leituras espectrofotométrica no aparelho de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 630 nm e os resultados foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular e IC₅₀. Controles de diluições (com cloreto de sódio a 0,9% ao em vez do inoculo), de esterilidade do meio e de crescimento foram realizados (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

2.8 Efeito modulador dos compostos na atividade de fármacos de uso clínico

Para verificar a ação conjunta do produto natural aos fármacos comerciais foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008), no qual o produto e utilizado em concentração sub-inibitoria (CIM/8 – bactérias e CFM/16 – fungos). Nos tubos *ependorf* continham a substância natural + o meio BHI 10 % e CSD duplamente concentrado + 150 µL da suspensão microbiana (correspondente a 10% da solução). Foram preparados controles de crescimento e de diluição. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em seguida, feita a microdiluição seriada com 100 µL do fármaco. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em bactérias com o uso da resazurina e em fungos por meio do aparelho espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 630 nm. Se houve ação positiva do óleo em conjunto do fármaco o efeito é dito sinérgico, em caso contrário é dito antagônico.

2.9 Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM

Nesse teste foi observado somente a viabilidade fúngica. A partir do teste da CIM, foi adicionado uma haste esterilizada em cada poço da placa de microdiluição, homogeneizada e subcultivada em placa de *Petri* contendo ASD (*Sabouraud Dextrose Ágar*) e um guia das concentrações testadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a leitura foi realizada observando o crescimento ou supressão das colônias de *Candida* (ERNST *et al.*, 1999, com modificações).

2.10 Avaliação do efeito sobre a virulência fúngica

Para verificar a ação do produto natural sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas, foram montadas câmaras úmidas estéreis. Dentro de cada câmara úmida, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos três mL de meio PDA (Potato Dextrose Ágar), empobrecido, contendo o óleo em concentração definida a partir da CFM (CFM/2 - 2048 µg/mL, CFM/4 - 1024 µg/mL e CFM/8 - 512 µg/mL). Das placas de *Petri* previamente inoculadas, foram retiradas alçadas do inóculo e feito duas estrias paralelas, sobre o meio já solidificado, sendo em seguida, sobre as quais depositada uma lamínula estéril. As câmaras foram incubadas e após 24 h (37 °C) foram visualizadas em microscópio óptico (AXIO IMAGER M2-3525001980 – ZEISS - Alemanha) utilizando objetiva de 20 X. Foi verificado a emissão ou inibição de filamentos. Realizou-se a captura de imagens. Controles de crescimento e do antifúngico foram realizados. Posteriormente as fotos foram analisadas realizando as medições de hifas e utilizando o Software para identificar a porcentagem de inibição das substancias.

2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 6.0. Foi aplicado na amostra uma ANOVA de duas vias. Em bactérias o teste ANOVA utilizou 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 $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ são considerado significativo e $p > 0,05$ não significativo). Para fungos os dados obtidos da leitura espectrofotométrica foram verificados quanto a sua distribuição normal e em seguida analisados por ANOVA, comparando os valores de cada concentração do produto natural, com o teste post hoc de Bonferroni. Os valores de IC_{50} foram obtidos por regressão não linear para a finalidade de interpolação de valores a partir de curvas padrão.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação dos constituintes químicos

O rendimento de extração do óleo essencial foi de 0,96%. A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação do seu espectro de massa e de seu índice de retenção linear com os dados da biblioteca do aparelho e da literatura (WILEY, 1994; NIST, 2016, ADAMS, 2007). Os constituintes, seus índices de retenção e porcentagem estão dispostos na Tabela 1. Nela estão presentes 19 compostos dos quais o majoritário é o arilpropanoide safrol com 82% da composição total, seguido do linalol (2,2%), limoneno (1,8%), β -cariofileno (1,7%), α -pineno (1,4%), biciclogermacreno (1,2%) e o Z-nerolidol (1,3%).

Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de *Piper mikanianum*.

No	Componente	IR _{Cal}	IR _{Lit}	%
1	α-Pineno	939	932	1.4
2	Canfeno	957	946	0.2
3	β -Pineno	985	974	0.3
4	Mirceno	987	988	0.3
5	α -Felandreno	1008	1002	0.2
6	Limoneno	1031	1024	1.8
7	Linalol	1099	1095	2.2
8	Cânfora	1139	1141	0.7
9	Safrol	1285	1285	82
10	Δ -Elemeno	1341	1335	0.3
11	α -Copaeno	1378	1374	0.3
12	β -Elemeno	1387	1389	0.4
13	β-Cariofileno	1418	1417	1.7
14	Germacreno D	1480	1484	0.9
15	Valenceno	1492	1496	0.7
16	Biciclogermacreno	1501	1500	1.2
17	Δ -Cadineno	1522	1522	0.5
18	Z-Nerolidol	1543	1531	1.3
19	Espatulenol	1576	1577	0.5
Total identificado				96.90

IR_{Cal}: Índice de Retenção Calculado; IR_{Lit}: Índice de Retenção na literatura

3.2 Atividade antibacteriana

A Concentração Inibitória Mínima, CIM bacteriana, teve como resultado ≥ 1.024 $\mu\text{g/mL}$ em todas as estirpes testadas, ou seja, o óleo não conseguiu sozinho inibir o crescimento do micro-organismo na maior concentração testada.

O efeito modulador de antibióticos realizado apenas com as estirpes multirresistentes teve para *S. aureus* resultado antagônico quando comparado ao controle dos antibióticos norfloxacina e gentamicina. Sendo estatisticamente significativo o efeito da droga norfloxacina cujo a CIM subiu de 50 $\mu\text{g/mL}$ para 240 $\mu\text{g/mL}$ quando associada ao produto. Para *E. coli* o resultado antagônico surgiu somente para o norfloxacina, não sendo significativo, para ambas as cepas, o efeito diante da droga eritromicina.

A ação conjunta de OEPM a droga gentamicina, teve resultado sinérgico diante da cepa de *E. coli*, quando comparado ao efeito observado na CIM de ambos separados, reduzindo a concentração de ação do antibiótico (Figura 1).

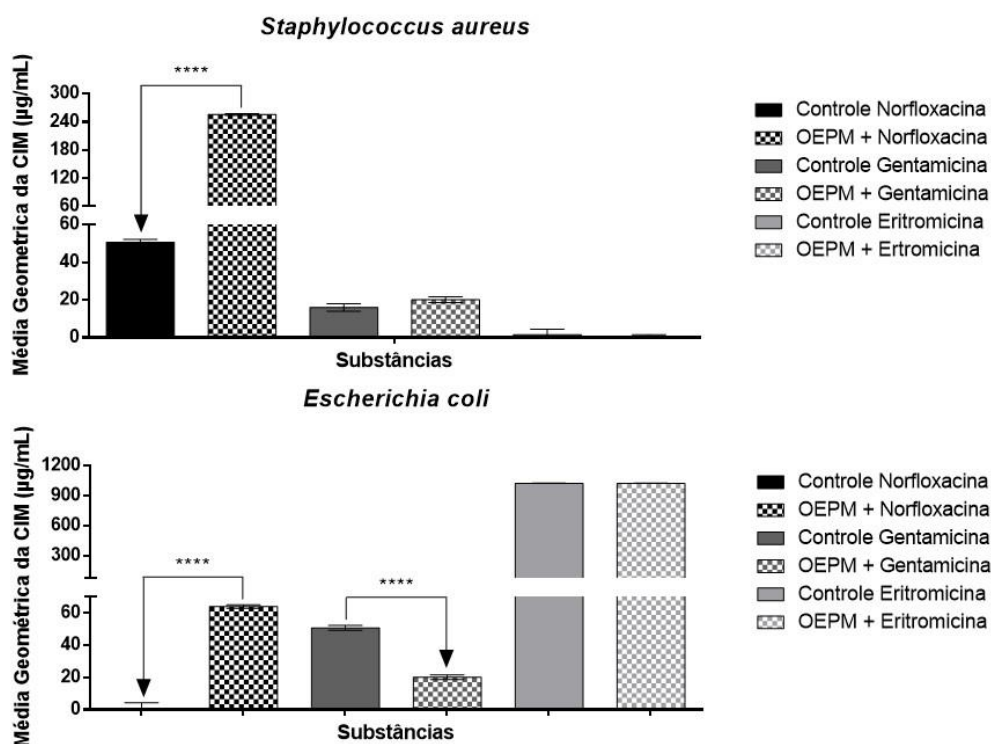


Figura 1: Ação moduladora do Óleo essencial de *Piper mikanianum* associado aos antibióticos norfloxacina, gentamicina e eritromicina. OEPM: óleo essencial de *P. mikanianum*.

3.3 Atividade antifúngica

3.3.1 Viabilidade celular das células fungicas diante de *Piper mikanianum* isolado e associado ao antifúngico Fluconazol, e a concentração capaz de inibir 50% das células fúngicas (IC₅₀).

A viabilidade celular de *C. albicans* e *C. tropicalis* está representada em gráficos na Figura 2 e 3. A ação intrínseca do óleo, a CIM, apresentou efeito inibitório na concentração de 2048 µg/mL para todas as cepas testadas. Este efeito é considerado pouco significativo clinicamente devido à alta concentração de efeito em teste *in vitro* (HOUGHTON *et al.*, 2007).

A avaliação do potencial modulador do óleo sobre a atividade antifúngica do fluconazol contra as diferentes estirpes do gênero *Candida* revelou que a combinação desta droga com o OEPM em concentrações sub-inibitórias (CFM/16: 256 µg/mL) provoca a inibição do crescimento dos micro-organismos em curva de viabilidade semelhante à do fármaco sozinho conforme é visto nas Figuras 2 e 3.

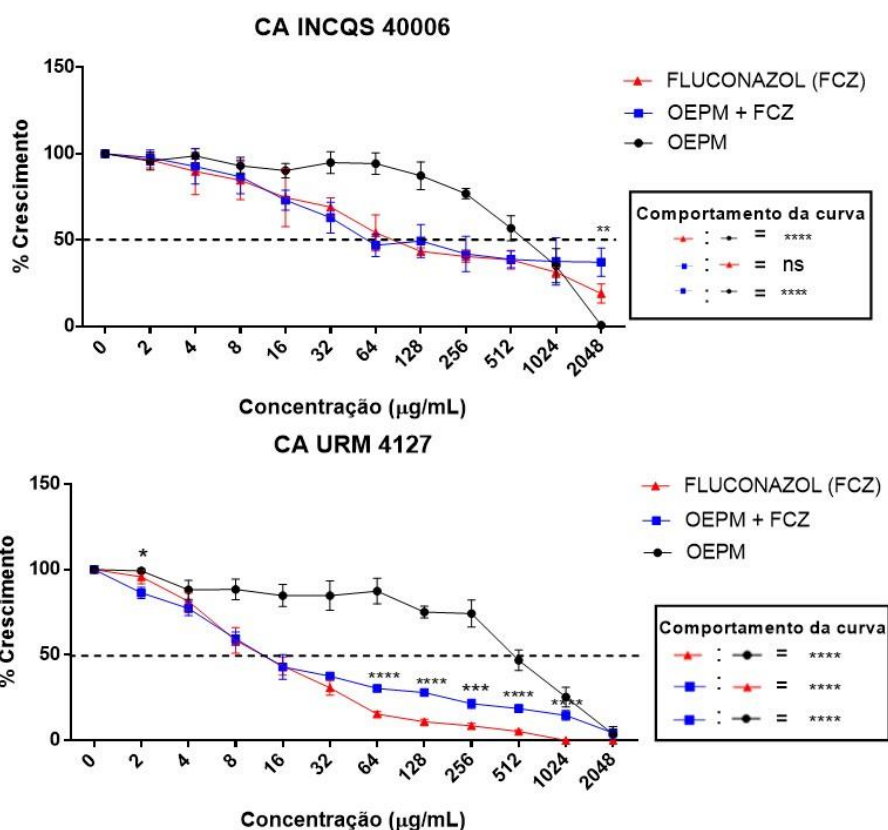


Figura 2: Ação antifúngica do fluconazol sozinho e associado ao óleo essencial de *Piper mikanianum* contra *Candida albicans*. FCZ: Fluconazol; OEPM: óleo essencial de *P. mikanianum*; CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: University Recife Mycology

Para a estirpe isolada de *Candida tropicalis* (CT URM 4262) a junção dos produtos teve melhor efeito com valor de IC₅₀ de 115,092 µg/mL, quando comparado ao valor da IC₅₀ de 126,81 µg/mL do fluconazol. A cepa padrão (CT INCQS 40042), apresentou um potente efeito sinérgico com IC₅₀ de 54.50 µg/mL comparada a 1314,13 µg/mL do fluconazol, inibindo o crescimento fúngico à medida que houve o aumento da concentração, conforme é possível certificar na Tabela 2.

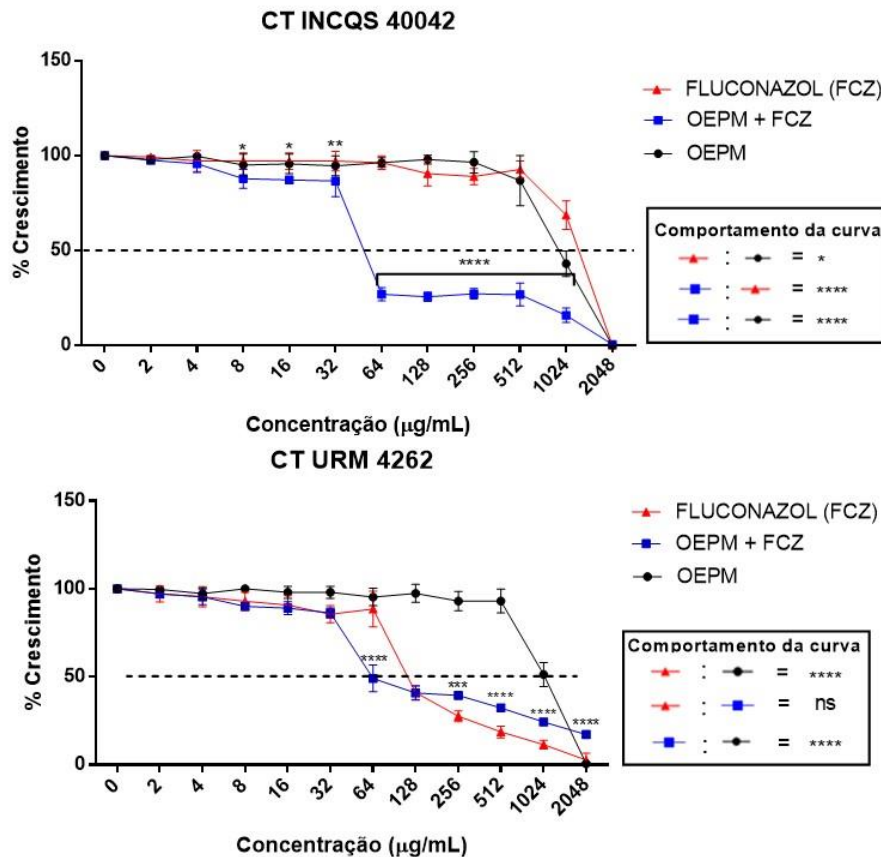


Figura 3: Ação antifúngica do fluconazol sozinho e associado ao óleo essencial de *Piper mikanianum* contra estirpes padrão e isolado de *Candida tropicalis*. FCZ: Fluconazol; OEPM: óleo essencial de *P. mikanianum*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: University Recife Mycology

As concentrações que variaram de 64 µg/mL a 2048 µg/mL, em todas as estirpes, se destacaram, por inibirem o crescimento populacional do micro-organismo a valores abaixo de 50 %, chegando a inibição total do crescimento na concentração mais alta.

Analisando os valores de IC₅₀ (Tabela 2), eles mostram que a combinação do óleo com o antifúngico apresentou concentração inibitória menor quando comparado a ação individual de cada um. Para a linhagem CT INCQS 40042, vale destacar, que é o melhor efeito de ação combinada.

Tabela 2: Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC₅₀) (µg/mL) do óleo essencial de *Piper mikanianum* frente a diferentes estirpes de *Candida*

	CA INCQS 40006	CA URM 4127	CT INCQS 40042	CT URM 4262
OEPM	851.21	509.74	1023.02	1004.96
OEPM + FCZ	69.97	12.82	54.50	115.092
FLUCONAZOL	91.974	11.98	1314.13	126.81

OEPM: óleo essencial de *P. mikanianum*; FCZ: Fluconazol; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde;; URM: University Recife Mycology.

3.3.2 Concentração Fungicida Mínima: efeito fungicida ou fungistático

A CFM foi considerada a concentração que causou a ausência de crescimento de colônias. O óleo teve efeito fungistático, onde sua ação inibiu apenas o crescimento do micro-organismo, com valores de CFM ≥ 4096 µg/mL para todas as linhagens. O mesmo resultado foi visto quando o produto natural foi associado ao fluconazol não sendo verificada potencialização direcionada para obtenção de efeito fungicida.

3.3.3 Ação do óleo de *Piper mikanianum* sobre um fator de virulência fúngica.

Os resultados nos mostram que OEPM teve ação eficaz diante das cepas de *C. albicans* tanto padrão quanto isolado (Figura 4) inibindo totalmente a formação filamentosa.

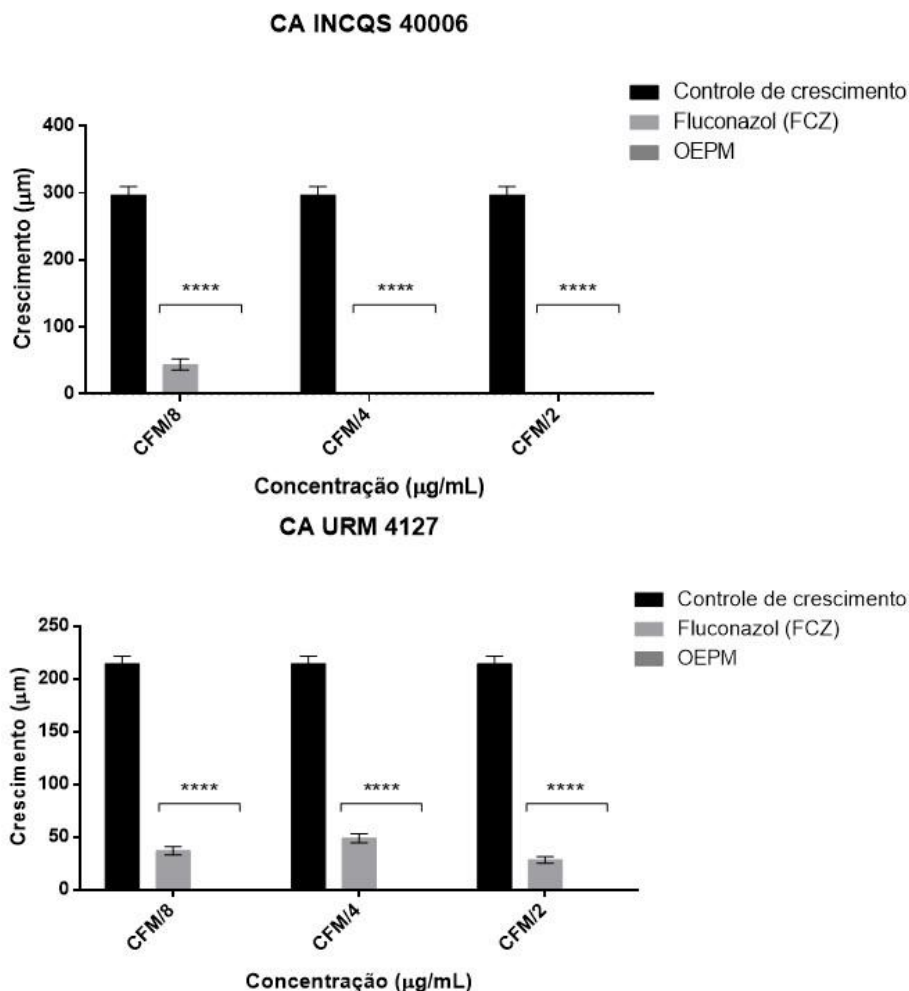


Figura 4: Efeito antifúngico do fluconazol e do óleo essencial de *Piper mikanianum* sobre o polimorfismo de *Candida albicans*. OEPM: óleo essencial de *P. mikanianum*; FCZ: Fluconazol; CA: *Candida albicans*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade de Recife; CFM/2: 2048 µg/mL; CFM/4 - 1024 µg/mL; CFM/8 - 512 µg/mL.

Para as cepas de *C. tropicalis* (Figura 5) a ação do óleo foi melhor nas maiores concentrações (CFM/2 e CFM/4) quando comparado ao crescimento total de 100% das estrias, sendo que na menor concentração, há apenas uma redução significativa da quantidade de hifas (CFM/8).

O óleo teve ação melhor que o fluconazol nas estirpes de *C. albicans*, para *C. tropicalis*, o OEPM, na menor concentração, não conseguiu ser melhor que o antifúngico. Na cepa CT INCQS 40042 o número de hifas e suas medidas foram maiores que a droga e o controle de crescimento da linhagem, nos indicando que houve um estímulo da virulência.

O fluconazol também teve ação inibitória que variou de 3,16% a 51,5%, quando comparado ao controle de crescimento (100%). Nas concentrações de CFM/2 e CFM/4 da estirpe CA INCQS 40006 a droga chegou a inibir totalmente a transição morfológica.

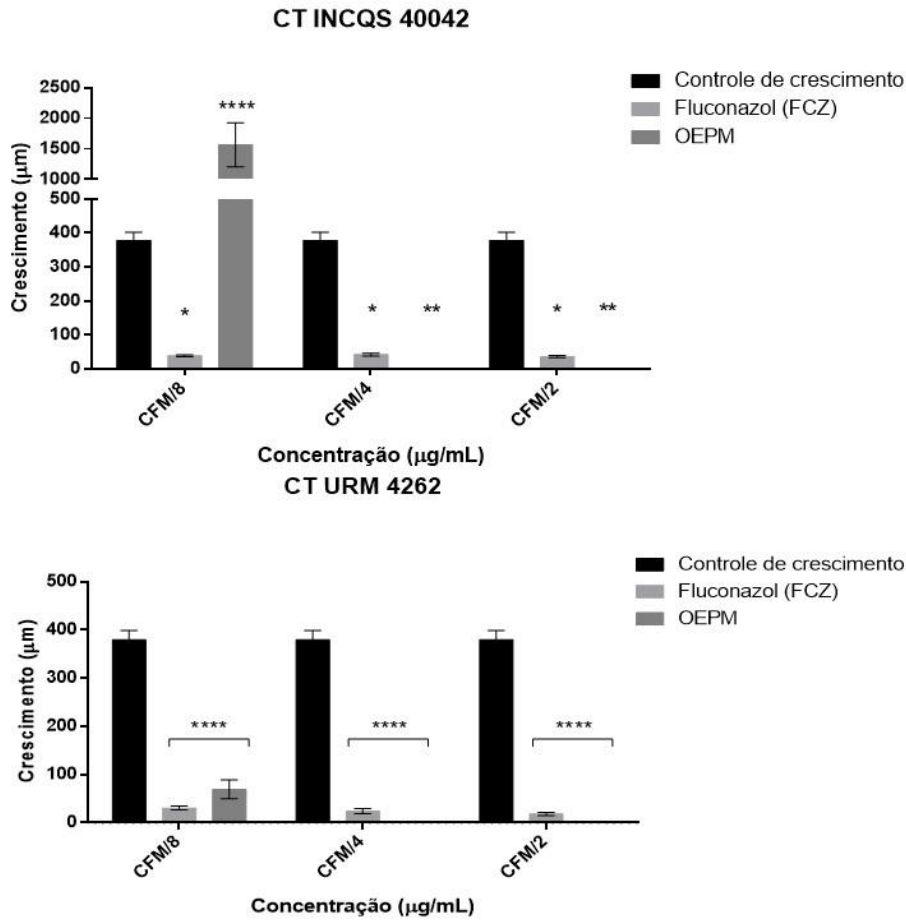


Figura 5: Efeito antifúngico do fluconazol e do óleo essencial de *Piper mikanianum* sobre o polimorfismo de *Candida tropicalis*. OEPM: óleo essencial de *P. mikanianum*; FCZ: Fluconazol; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: University Recife Mycology; CFM/2: 2048 µg/mL; CFM/4 - 1024 µg/mL; CFM/8 - 512 µg/mL.

Na Figura 6 observa-se imagens do efeito antifúngico, a 6a há a visualização do controle de crescimento com as projeções filamentosas indicadas por seta. É possível certificar a partir da mesma, que o meio de cultura estava nas condições ideais para a formação polimorfismo de *Candida* spp. Ao lado (Figura 6b), há uma demonstração da redução da formação de hifas e posteriormente a inibição total (Figura 6c).

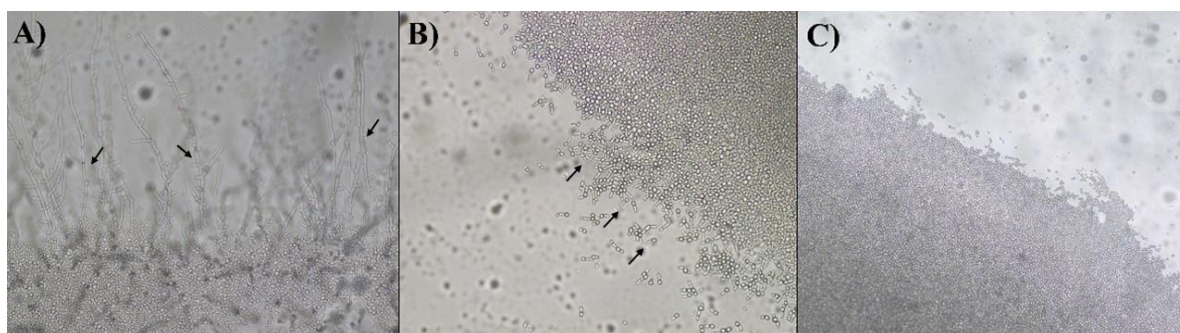


Figura 6: Imagens da ação antifúngica do óleo essencial de *Piper mikanianum* e do fluconazol sobre a micromorfologia fúngica. A) Controle de crescimento da CA INCQS 40006; B) Controle do fluconazol sobre a CT URM 4262, na concentração de CFM/8. Há uma redução em quantidade e tamanho dos filamentos; C) Ação do OEPM, para a linhagem de CA INCQS 40006, na concentração de CFM/2. Ocorreu inibição total da formação do micélio. CFM: Concentração Fungicida Mínima; OEPM: óleo essencial de *P. mikanianum*; FCZ: Fluconazol; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: University Recife Mycology. Escala: 50 μ m.

4 DISCUSSÃO

O rendimento obtido foi superior ao relatado por Abreu *et al.*, (2002) e Cledes *et al.*, (2015), 0,65% e 0,66-0,84%, respectivamente. No entanto, ambos empregaram material vegetal fresco.

Os resultados da composição química (Tabela 1) são bastante similares aos obtidos por Abreu *et al.* (2002), tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Porém, este resultado contrasta com aqueles obtidos com a espécie em outras regiões do sul do país. O óleo essencial proveniente das folhas coletadas nas proximidades de Curitiba, Paraná, embora rico em arilpropanoides, não apresentou o safrol em sua composição, mas sim o dilapiol, o *Z*-isoelemicina e o *E*-asarona, tendo como constituinte majoritário a cetona sesquiterpênica b-*vetivona* (LEAL *et al.*, 2005). Por sua vez, as folhas dos espécimes coletados no município de Picada Café, no Rio Grande do Sul, apresentaram óleo rico nos arilpropanoides apiol (65%), e em menor quantidade, dilapiol e miristicina (FERRAZ *et al.*, 2010). O material coletado no município de Sapiranga, no mesmo estado, apresentou como majoritários os seguintes terpenoides: limoneno (14,8%), biciclogermacreno (14,3%) e b-cariofileno (10,5%) (POSER *et al.*, 1994). Os fatores como a área de coleta, clima, solo e diferentes épocas anuais podem determinar a distinta variedade química presente na espécie (MACÊDO *et al.*, 2018).

O safrol é encontrado amplamente no reino vegetal, em espécies pertencentes às famílias Aristolochiaceae, Lauraceae e Piperaceae, esta última com vários representantes (BARBOSA *et al.*, 2012; SAUTER *et al.*, 2012; SALLEH *et al.*, 2011). É matéria prima

importante na composição de aromatizantes e inseticidas. A partir dele, é sintetizado o butóxido de piperonila (PBO) principal ingrediente de inseticidas piretróides (BARBOSA *et al.*, 2012) e outros produtos (ROSA, REBELO; NASCIMENTO, 2003). A sua atividade antimicrobiana é conhecida (BARBOSA *et al.*, 2012), bem como seu potencial hepatotoxicidade em humanos, o que impede o seu uso como aditivo em alimentos (SCHÄFFER *et al.*, 2013).

A ação antimicrobiana do safrol foi observada em diversas espécies de plantas, alguns exemplos são citados a seguir: o óleo de *Illicium griffithii* possui em sua composição o safrol e demonstrou forte atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. e *Saccharomyces cerevisiae* (SARASWATHY *et al.*, 2018). O safrol isolado teve pouca ação diante das cepas de *E. coli* e *Proteus vulgaris* porém, forte atividade contra *Propionibacterium acnes*, bactéria causadora de acne (KUBO, HIMEJIMA, MURO, 1991). Madrid *et al.* (2015) realizaram experimentos com óleo essencial da casca (safrol - 96%) e das folhas (safrol - 24%) de *Laureliopsis philippianna*, e o safrol isolado, contra cepas dos fungos *Saprolegnia parasítica* e *Saprolegnia australis*. Os três compostos, tiveram forte atividade antifúngica. Da espécie *Ocotea puchury-major* foi extraído o óleo essencial e sua composição química revelou o safrol como componente majoritário (34%). Na avaliação antimicrobiana a propriedade antifúngica foi marcada, inibindo o crescimento das cepas *Rhodotorula* spp., *Candida* spp. A atividade antibacteriana foi moderada para bactérias Gram positivas (*Streptococcus agalactiae* e *S. aureus*) e ausente para bactérias Gram negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) (LEPORATTI *et al.*, 2013). Simic *et al.* (2004) realizou experimento com a espécie *Sassafras albidum* que possui safrol em 82% da constituição do seu óleo. A atividade antifúngica contra as estirpes de *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium ochrochloron*, *P. funiculosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. fulvium*, *Trichoderma viride*, *Fusarium tricinctum*, *F. sporotrichoides*, *Phoma macdonaldii*, *Phomopsis helianthi* e *Mucor mucedo*, revelou uma moderada atividade do óleo.

No resultado da atividade antibacteriana intrínseca, resultados diferentes do estudo, foram vistos por Barbosa *et al.* (2012), que utilizando de espécie diferente, realizou estudo com óleo essencial de folhas e frutos de *Piper divaricatum*, também rico em safrol (98%), com cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* Ser. *Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* obtendo resultados de inibição sobre todas as estirpes. Khayyat *et al.* (2011) utilizaram o safrol isolado

em atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *S. aureus* obtendo ação intrínseca sob a cepa de *E. coli*. Segundo o autor, a explicação para a ação da substância isolada ter ocorrido somente sobre a bactéria Gram negativa, naturalmente mais resistente, seria devido sua parede ser menos espessa em comparação com a parede das Gram-positivas.

Perigo *et al.* (2016) por sua vez, trabalhando com onze diferentes espécies do gênero *Piper*, com compostos químicos semelhantes ao OEPM, visualizou a ação das mesmas sobre cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis* e *P. aeruginosa*. Acredita-se que a composição da membrana celular bacteriana é o principal fator de ação dos óleos de *Piper*. O efeito antibacteriano dos óleos vegetais é dependente da ruptura organizacional dos lipídios nas membranas das bactérias, ocasionando o vazamento do conteúdo celular. Os ácidos mais espessos, chamados teicoicos, presentes na parede celular das bactérias Gram positivas, as tornam mais resistentes aos óleos essenciais (SOLÓRZANO-SANTOS E MIRANDA-NOVALES, 2012).

Salleh *et al.* (2011) e Salleh *et al.* (2014) realizaram estudos com outras espécies do gênero *Piper*. *Piper caninum* foi testado diante das cepas de *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida* e *E. coli*. Partes da planta inteira de *Piper abbreviatum*, *P. erecticaule* e *P. lanatum* foram submetidas a extração dos óleos e estes testados contra *B. cereus*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P. putida* e *Klebsiella pneumoniae*. *Piper stylosum* e *Piper ribesoides* foram avaliados diante das cepas de *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *K. pneumonia*. Os resultados foram promissores diante das bactérias *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *S. aureus*. Os óleos foram extraídos das folhas e hastes das plantas, sendo o segundo o que apresentou maior atividade para *P. caninum*, *P. stylosum* e *P. ribesoides*. Os principais componentes dos óleos das hastes das plantas foram o safrol e o β -cariofileno, e é atribuído aos mesmos, a ação antibacteriana intrínseca. Vale ressaltar que o OEPM também possui uma quantidade significativa destes componentes, porém a ação antimicrobiana pode não estar ligada somente a estes componentes e sim a mistura de compostos que o óleo essencial tem (HOUGHTON *et al.*, 2007).

O uso dos óleos essenciais associados a fármacos de uso clínico, podem modificar a ação da droga, intensificando ou inibindo o efeito terapêutico. Em outras palavras, a associação tem como resultado um efeito sinérgico ou antagônico (OLIVEIRA *et al.* 2006; ALMEIDA *et al.* 2013)

Quando é descoberto o efeito sinérgico, o óleo surge como uma alternativa a confecção de um novo fármaco e como potente agente que irá driblar a resistência microbiana (COUTINHO *et al.*, 2008). Desta maneira, a ação conjunta de OEPM a droga gentamicina, teve resultado sinérgico diante da cepa de *E. coli*, reduzindo significativamente a concentração de ação do antibiótico (Figura 1). A gentamicina é um aminoglicosídeo que interfere nas etapas iniciais da síntese proteica pela alteração na conformação da porção 30S do ribossomo 70S do procariótico. Essa interferência leva à leitura inadequada do código genético disponível no mRNA (TORTORA *et al.*, 2012). Um dos mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos é a redução do transporte intracelular (ELDIRDIRI *et al.*, 2017). Provavelmente o óleo tenha atuado na membrana e parede celular, contribuindo para a entrada da droga no citoplasma e a sua efetiva ação nos ribossomos bacterianos (CASTRO e LIMA, 2010).

Os resultados de CIM com os fungos corroboram com os encontrados por Salleh *et al* (2014), já mencionado nesta discussão. Além de realizarem estudo com bactérias, utilizaram das mesmas espécies para estudo com fungos. Espécies diferentes de *P. mikanianum* (*P. stylosum*, *P. ribesoides* e *P. caninum*) foram coletadas e os óleos essenciais extraídos das folhas e hastes das plantas. Os óleos ricos em β -cariofileno tiveram ação antifúngica moderada a fraca diante das cepas de *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus niger* (SALLEH *et al.*, 2011; SALLEH *et al.*, 2014). As concentrações utilizadas pelos autores foram menores que as realizadas neste estudo e ambas as espécies possuem composição com componentes semelhantes aos de *P. mikanianum*.

O gênero *Piper* é bastante relatado na literatura a respeito das suas propriedades antimicrobianas. Apesar de neste trabalho a ação intrínseca ser clinicamente irrelevante resultados diferentes foram encontrados por Rath *et al*, (2015) que utilizando o óleo das folhas da espécie *Piper betle*, em concentrações baixas, obtiveram valores de CIM que variaram significativamente de 31,25 a 125 $\mu\text{g/mL}$ sobre cepas fúngicas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida glabrata*, e *Candida parapsilosis*, mostrando o efeito antifúngico da planta. Curvelo *et al.* (2014), por sua vez, utilizaram o óleo das folhas e inflorescências de *Piper clausenianum*, que teve ação sobre isolados de *C. albicans*. Segundo o próprio autor, a presença do composto Linalol é um indicativo da ação antifúngica desta planta, tal ação também foi vista pelos autores Hsu *et al.* (2013) e Khan *et al.* (2010) que trabalharam com o composto isolado.

O uso da terapia combinada, seja ela entre drogas ou com produtos naturais, é vantajosa, pois pode alcançar respostas clínicas satisfatórias. A diminuição das concentrações dos medicamentos que leva a redução da toxicidade, o maior potencial de ação das drogas e a contenção do desenvolvimento de organismos resistentes são os benefícios associados a esta ação (CURVELO *et al.*, 2014; MUKHERJEE *et al.*, 2005). Os resultados da modulação nos mostram o potencial do óleo de *P. mikanianum* sobre cepas de *Candida*, fungos estes, que estão cada vez mais acometendo infecções fúngicas graves.

Na análise de ação sobre a morfologia fúngica, o OEPM teve ação eficaz diante das cepas de *C. albicans*, e para as estirpes de *C. tropicalis*, a ação do óleo inibiu formação de micélio nas maiores concentrações do teste. Estes resultados são semelhantes a os vistos por Curvelo *et al.* 2014, que utilizando o óleo das folhas e inflorescências da espécie *P. claussonianum* obteve ação intrínseca na transição morfológica de cepas de *C. albicans*, conseguindo inibir a porcentagem de tubos germinativos até 97%. Segundo o autor, a ação antifúngica se deve ao composto Linalol, conhecido na literatura por seu potencial antimicrobiano (PARK *et al.*, 2012; CURVELO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2010) e também está presente no OEPM.

Quando ocorre a ruptura do equilíbrio biológico, devido a fatores predisponentes, *Candida* spp. transita da forma leveduriforme para a filamentosa invadindo os tecidos do hospedeiro a que se encontra. A formação de tubos germinativos é o início das projeções para o crescimento das hifas e pseudohifas resultando no surgimento do micélio. O micélio está relacionado com o aumento da virulência das espécies pois favorece maior aderência das mesmas, dificultando a fagocitose pelo sistema imune. A capacidade de transição morfológica é chamada de polimorfismo e atribui ao fungo maior patogenicidade e resistência a antifúngicos, dificultando a erradicação do processo infeccioso (SANTANA *et al.*, 2010; GOW *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2003; VEDIYAPPAN *et al.*, 2013). Daí a importância de intensificar estudos nesta área, na busca de descobrir novos compostos que contenham esse fator de virulência do gênero. O OEPM, teve forte ação antifúngica inibindo as alterações morfológicas em *Candida* spp, isso indica que ele possui potente atividade farmacológica sobre a biologia fúngica e pode surgir como alternativa para tratamento de infecções fúngicas graves (Freitas *et al.*, 2017).

5 CONCLUSÃO

O potencial antimicrobiano do óleo essencial de *P. mikanianum* foi promissor na inibição do pleomorfismo fúngico apesar do óleo sozinho ter tido resultados clinicamente irrelevantes na inibição do crescimento das cepas fúngicas. Efeito sinérgico foi visto na interação do óleo com as drogas gentamicina e fluconazol. A composição química de OEPM, apresentou compostos arilpropanoide e terpenos, substâncias bioativas, e pode possivelmente ser atribuída a eles a ação antimicrobiana vista nos ensaios. Este é o primeiro trabalho que relata a atividade biológica combinada desta espécie e seu potente efeito é promissor para a terapia combinada e para a inibição de um dos fatores de virulência de *Candida* spp, no entanto, são necessários estudos mais específicos para entender o mecanismo de ação e avaliar a toxicidade do óleo essencial.

REFERÊNCIAS

- Abreu, A. M., Sevegnani, L., Machicado, A. R., Zimmermann, D.; Rebelo, R. A. (2002). *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil - A new source of safrole. J. of Essential Oil Res., 14(5), 361-363. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699884>
- Adams, R.P (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream.
- Almeida, L. F. D., Paula, J. F., Almeida-Marques, R. V. D., Cavalcanti, Y. W., and Hebling, J (2017). Atividade Inibitória de Óleos Essenciais Vegetais Frente à *Candida glabrata*, Resistente a Fluconazol. Rev. Brasileira de Ciências da Saúde, v. 21, n. 2, p. 133-138. <https://doi.org/10.22478/ufpb.2317-6032.2017v21n2.24660>
- Bagavan, A.; Rahuman, A. A.; Kaushik, N. K.; Sahal, D (2011). In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. Parasito. Res., v. 108, p. 15-22. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2034-4>.
- Barbosa, Q.P.S., Câmara, A.G.C., Ramos, C.S., Nascimento, D.C.O., Lima-Filho, J.V., Guimarães, E.F (2012). Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. Quím. Nova, v. 35, n. 9, p. 1806-1808. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000900019>.
- Bardelli, K. C., Kirizawa, M., Sousa, A. V. G (2008). O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. Hoehnea v. 35, n.4, p.553-561. <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062008000400007>
- Barreto, F. S., Sousa, E.O., Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M., Campos, A.R (2010). Antibacterial activity of *Lantana camara* Linn and *Lantana montevidensis* brig extracts

- from Cariri-Ceará, Brazil. *J. of Young Pharmacists*, v. 2, n. 1, p. 42. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.62211>
- Bernuci, K. Z., Iwanaga, C.C., Fernandez-Andrade, C.M.M., Lorenzetti, F.B., Torres-Santos, E.C., Faiões, V.S., Gonçalves, J.E., Amaral, W., Deschamps, C., Scodro, R.B.L., Cardoso, R.F., Baldin, V.P., Cortez, D.A.G (2016). Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of *Piper* Species. *Molecules* v.21, p.1698. <https://doi.org/10.3390/molecules21121698>
- Castro, R. D., & de Oliveira LIMA, E. (2010). Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. *Rev Odontol UNESP*, 39(3), 179-184.
- Carrasco, H.; Raimondi, M.; Svetaz, L.; Di Liberto, M.; Rodriguez, M. V.; Espinoza, L.; Madrid, A.; Zacchino, S (2012). Antifungal activity of eugenol analogues. Influence of different substituents and studies on mechanism of action. *Molecules*, v. 17, p. 1002-1024. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-26>
- Clemes, S. M.; Santos, T. G.; Rebelo, R. A.; Laps, R. R.; Pescador, R (2015). Seasonality and hydrodistillation time effects on the yield and chemical composition of leaves essential oil of *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. *Eclética Quím.*, v. 40, p. 117-125. <http://dx.doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v40.1.2015.p117-125>
- Coutinho, H. D. M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P (2008). Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemother.*, 54:328–330. <https://doi.org/10.1159/000151267>
- Curvelo, J. A. R., Marques, A.M., Barreto, A.L.S, Romanos, M.T.V., Kaplan, M.A.C., Soares, R.M.A. (2014). A novel nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum* modulates *Candida albicans* biofilm. *J. of Medi. Microbiol.*, v. 63, n. 5, p. 697-702. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.063834-0>
- Da Silva, J.K.R., Pinto, L.C., Burbano, R.M.R., Montenegro, R.C., Guimarães, E.F., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S. (2014). Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, v. 58, p. 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.006>
- Da Silva, M. F. R.; Bezerra-Silva, P.C.; Lira, C. S.; Albuquerque, B. N. L.; Neto, A. C. A.; Pontual, E. V.; Maciel, J. R.; Paiva, P. M. G.; Navarro, D. M. A. F. (2016). Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Experimental Parasitol.*, v. 165, p. 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.017>
- Dognini, J.; Meneghetti, E. K.; Teske, M. N.; Begnini, I. M.; Rebelo, R. A.; Dalmarco, E. M.; Verdi, M.; De Gasper, A. L. (2012). Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. *J. of Essential Oil Res.*, v. 24, n. 3, p. 241-244. <https://doi.org/10.1080/10412905.2012.676768>

- Eldirdiri, S., Lee, J., Jack, A., Wright, A., Findlay, A., Phillips, G. (2018). Outbreak of gentamicin-resistant, meticillin-susceptible *Staphylococcus aureus* on a neonatal unit. *J. of Hospital Infec.*, v. 98, n. 4, p. 419-424. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.006>
- Ernst, E.J.; Klepser, M.E.; Ernst, M.E.; Messer, S.A.; Pfaller, M.A., (1999). *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagnostic Microbial. and infectious disease*, 33, 75-80. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(98\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(98)00130-8)
- Ferraz, A. B. F.; Balbino, J. M.; Zini, C. A.; Ribeiro, V. L. S.; Bordignon, S. A. L.; Poser, G. Von. (2010). Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. *Parasitol. Res.*, v. 107, p. 243-248. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1878-y>
- Freitas, M. A., Santos, A. T., Machado, A. J., Silva, A. R. P., Campina, F. F., Costa, M. S., Ribeiro-Filho, J. (2017). Fern extracts potentiate fluconazole activity and inhibit morphological changes in *Candida* species. *Asian Pacific J. of Trop. Biomed.*, 7(11), 1025-1030. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.09.018>
- Gow, N.A.R., Frank, L. van de V., Broe, A.J.P., Netea, M.G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Rev. Microbiol.*, v. 10, n. 2, p. 112. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2711>
- Houghton, P. J., Howes, M.J., Lee, C.C., Steventon, G. (2007). Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J. of Ethnopharmacol.*, v. 110, n. 3, p. 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032>
- Hsu, C.C., Lai, W.L., Chuang, K.C., Lee, M.H., Tsai, Y.C. (2013). The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Medi. Mycol.*, v. 51, n.5, p. 473-482. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.743051>
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012). Manual Técnico da Vegetação Brasileira.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C.J., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L. (1996). De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. of Medi. Chemistry*, v. 39, n. 16, p. 3107-3113. <https://doi.org/10.1021/jm9509410>
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., Manzoor, N. (2010). *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res. in Microbiol.*, v. 161, n. 10, p. 816-823. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.008>
- Khayyat, S.A. and Al-Zahrani, S.H. (2014). Thermal, photosynthesis and antibacterial studies of bioactive safrole derivative as precursor for natural flavor and fragrance. *Arab. J. of Chemistry*, v. 7, n. 5, p. 800-804. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.09.014>

- Kubo, I., Himejima, M., and Muroi, H. (1991). Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed. *J. of agricul. and food chemistry*, 39 (11), 1084-1986. <https://doi.org/10.1021/jf00011a020>
- Lawrence, G. H. M. (1951). *Taxonomia das Plantas Vasculares*, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa, 296p.
- Leal, L. F.; Miguel, O. G.; Silva, R. Z.; Yunes, R. A.; Santos, A. S.; Cechinel-Filho, V. (2005). Chemical composition of *Piper mikanianum* essential oil. *J. of Essential Oil Res.*, v. 17, p. 316-317. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698916>
- Leporatti, M. L., Pintore, G., Foddai, M., Chessa, M., Piana, A., Petretto, G. L., Masia, M.D., Mangano, G., and Nicoletti, M. (2014). Chemical, biological, morphoanatomical and antimicrobial study of *Ocotea puchury-major* Mart. *Natural Product Res.*, 28(5), 294-300. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.858338>
- Lima, M. I. O., de Medeiros, A. A., Silva, K. S., Cardoso, G. N., De Oliveira Lima, E., & De Oliveira Pereira, F. (2017). Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *Journal de mycologie medicale*, 27(2), 195-202.
- Lopes, J. J.; Marx, C.; Ingrassia, R.; Picada, J. N.; Pereira, P.; Ferraz, A. B. F. (2012). Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 64, p. 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.05.012>
- Madrid, A., Godoy, P., González, S., Zaror, L., Moller, A., Werner, E., Cuellar, M., Villena, J., Montenegro, I. (2015). Chemical characterization and anti-oomycete activity of *Laureliopsis philippianna* essential oils against *Saprolegnia parasitica* and *S. australis*. *Molecules*, 20(5), 8033-8047. <https://doi.org/10.3390/molecules20058033>
- Macêdo, D. G., Souza, M. M. A., Morais-Braga, M. F. B., Coutinho, H. D. M., Santos, A. T. L., Cruz, R. P., Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Quintans-Junior, L. J.; Almeida, J. R. G. S.; Menezes, I. R. A. (2018). Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. *PeerJ*, 6, e5476.
- Martinelli, L., Rosa, J.R., Ferreira, C.S.B., Nascimento, G.M.L., Freitas, M.S., Pizato, L.C., Santos, W.O., Pires, R.F., Okura, M.H., Malpass, G.R.P., Granato, A.C. (2017). Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. *Ciência Rural*, v.47, n.5. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160899>.
- Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Machado, A. J. T., dos Santos, A. T. L., Sales, D. L., Lima, L. F., ; Coutinho, H. D. M., (2016). *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: Elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. *J. of Ethnopharmacol.*, 194, 1140-1152. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.017>

- Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Ghannoum, M.A. (2005) Combination treatment of invasive fungal infections. *Clinical Microbial. Rev.*, v. 18, n. 1, p. 163-194. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.163-194.2005>
- Nascimento, P. F., Nascimento, A. C., Rodrigues, C. S., Antonioli, A. R., Santos, P. O., Barbosa-Júnior, A. M., ; Trindade, R. C. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 17(1), 108-113. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>
- Navickiene, H. M. D.; Morandim, A. A.; Alécio, A. C.; Regasini, L. O.; Bergamo, D. C. B.; Telascra, M.; Cavalheiro, A. J.; Lopes, M. N.; Bolzani, Furlan, M.; Marques, M. O. M.; Young, M. C. M.; Kato, M. J. (2006). Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quím. Nova*, v. 29, n. 3, p. 467-470. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000300012>
- NIST Chemistry Webbook, edited by P. J. Linstrom and W. G. Mallard, <http://webbook.nist.gov> (acessado em junho de 2016).
- Oliveira, R. A. G., Lima, E.O., Vieira, W.L., Freire, K.R.L., Trajano, V.N., Lima, I.O., Souza, E.L., Toledo, M.S., Silva-Filho, R.N.(2006). Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 16, n. 1, p. 77-82.
- Park, S. N., Lim, Y. K., Freire, M. O., Cho, E., Jin, D., & Kook, J. K. (2012). Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, 18(3), 369-372.
- Perigo, C.V., Torres, R.B., Bernacci, L.C., Guimarães, E.F., Haber, L.L., Facanali, R., Vieira, M.A.R., Quecini, V., Marques, M.O.M. (2016). The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. *Industrial crops and products*, v. 94, p. 528-539. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.028>
- Poser, G. L. von; Rorig, L. R.; Henrique, A. T.; Lamaty, G.; Menut, C.; Bessiere, J. M. (1994). Aromatic plants from Brazil III. The chemical composition of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. mikanianum* (Kunth) Steudel essential oils. *J. of Essential Oil Res.*, v. 6, n. 4, p. 337-340. <https://doi.org/10.1080/10412905.1994.9698395>
- Pupulin, A.R.T.; Carvalho, P.G.; Nishi, L.; Nakamura, C.V.; Guilherme, A.L.F. (2009). Enteropatógenos relacionados à diarreia em pacientes HIV que fazem uso de terapia anti-retroviral. *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.*, 42: 551-555. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000500013>
- Rath, C. C. and Mohatrappa, S. (2015). Susceptibility characterisation of *Candida* spp. to four essential oils. *Indian J. of Med. Microbiol.*, v. 33, n. 5, p. 93. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.150903>
- Ricardo, L. M., Paula-Souza, J. D., Andrade, A., Brandão, M. G. (2017). Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr

- Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). Rev. Bras. de Farmacogn., 27(3), 388-400. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.01.002>
- Rocha, L. G.; Almeida, J. R. G. S.; Macêdo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. Phytomedicine, v. 12, p. 514-535. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.10.006>
- Rosa, F. A. F.; Rebelo, R. A. and Nascimento, M. G. (2003). Synthesis of New Indolecarboxylic Acids Related to the Plant Hormone Indoleacetic Acid IAA. J. of the Brazilian Chemi. Society, vol. 14, No. 1, p. 11-15. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532003000100003>
- Santana, D.P., Ribeiro, E.L., Menezes, A.C.S., Naves, P.L.F. (2010). Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. Rev. de Ciências Médicas e Biológicas, v. 12, n. 2, p. 229-233. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v12i2.6953>
- Sauter, I. P.; Rossa, G. V.; Lucas, A. M.; Cibulski, S. P.; Roehe, P. M.; Silva, L. A. A.; Rott, M. B.; Vargas, R. M. F.; Cassel, E.; Poser, G. L. (2012). Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervium* (Piperaceae) essential oil. Industrial Crops and Products, v. 40, p. 292-295. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.025>
- Schäffer, M.; Gröger, T.; Pütz, M.; Zimmermann, R. (2013). Forensic profiling of sassafras oils based on comprehensive two-dimensional gas chromatography. Forensic Science International, v. 229, p. 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.046>
- Salleh, W. M. N. H. W.; Ahmad, F.; Yen, K. H.; Sirat, H. M. (2011) Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. International Journal of Molecular Science, v. 12, p. 7720-7731. <https://doi.org/10.3390/ijms12117720>
- Salleh, W.M.N.H.W.; Ahmad, F. and Yen, K. H. (2014). Chemical compositions and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper abbreviatum*, *P. erecticaule* and *P. lanatum* (Piperaceae). Natural Product Communications, v. 9, n. 12, p. 1795-1798.
- Salleh, W.M.N.H.W.; Ahmad, F. and Khong, H.Y. (2014). Chemical composition of *Piper stylosum* Miq. and *Piper ribesioides* Wall. essential oils, and their antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibition activities. Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 13, n. 5.
- Saraswathy, A., Shakila, R., Lavanya, S. M., Arunmozhidevi, A. (2010). Essential oil constituents of *Illicium griffithii* and its antimicrobial activity. Pharmacogn. magazine, 6(23), 208. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.66938>
- Silveira, G.P., Nome, F., Gesser, J. C., ; Terenzi, M. M. S. H. (2006). Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Quím. Nova, v. 29, n. 4, p. 844. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000400037>
- Simić, A., Soković, M. D., Ristić, M., Grujić- Jovanović, S., Vukojević, J., ; Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacol. and

Toxicol. Evaluation of Natural Product Derivatives, 18(9), 713-717.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1516>

Simões, C. M. O., Schenkel, E.P., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (2017). Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Editora: Artmed, p. 311, Porto Alegre.

Solórzano-Santos, F. and Miranda-Novales, M.G., (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Curr. Opin. Biotechnol. 23, 136–141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>

Stoppa, M. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H. C., Cunha, W. R., Silva, M. L. A., Martins, C. H. G., ; Furtado, N. A. J. C. (2009). Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. Quím. Nova, v.32, p.498-502. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000200038>

Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. (2012). Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre. Artmed.

Vediyappan, G., Dumontet, V., Pelissier, F., d'Enfert, C. (2013). Gymnemic acids inhibit hyphal growth and virulence in *Candida albicans*. PloS one, v. 8, n. 9, p. e74189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074189>

Wasicky, R. (1963). Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. Rev. Faculdade de Farmácia e Bioquímica, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81.

Zuchiwschi, E., Fantini, A. C., Alves, A. C., and Peroni, N. (2010). Limitations of native forest species use may contribute to erosion of traditional and local ecological knowledge among family farmers. Acta Botan. Brasil., 24(1), 270-282. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062010000100029>

Wiley Registry of Mass Spectral Data (1994). 6th edn. Wiley Interscience, New York.

Yang, Y.L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. J. of Microbiol. Immunology and Infec., v. 36, n. 4, p. 223-228.

5.2 Manuscrito 2

***Piper diospyrifolium* Kunth.: Análise química e antimicrobiana (intrínseca e combinada) do óleo essencial**

Joara Nályda Pereira Carneiro^a; Rafael Pereira da Cruz^a; Josefa Carolaine Pereira da Silva^a; Janaína Esmeraldo Rocha^a; Thiago Sampaio de Freitas^a; Débora Lima Sales^a; Waltécio de Oliveira Almeida^a; Camila Fonseca Bezerra^a; Luiz Everson da Silva^b; Wanderlei do Amaral^b; Ricardo Andrade Rebelo^c; Ieda Maria Begnini^c; Henrique Douglas Melo Coutinho^a; Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga^a.

a: Universidade Regional do Cariri - URCA. Cel Antônio Luis, 1161. CEP: 63105-000, Pimenta, Crato - CE, Brazil;

b: Universidade Federal do Paraná - UFPR. XV de Novembro, 1299. CEP: 80.060-000, Centro, Curitiba - PR, Brazil.

c: Universidade Regional de Blumenau - FURB. Antônio da Veiga, 140. CEP: 89030-903 - Itoupava Seca - Blumenau - SC, Brazil.

Resumo

O uso secular de plantas na medicina popular surgiu como uma fonte para a descoberta de novos compostos capazes de curar infecções. Em meio a resistência microbiana aos fármacos comerciais, espécies como *Piper diospyrifolium* Kunth, que possuem uso na terapia popular, são alvos de estudos farmacológicos. Diante disso, experimentos antimicrobianos foram realizados com o óleo essencial da espécie *P. diospyrifolium* (OEPD) e seus constituintes foram elucidados. Os compostos do óleo foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). O método de microdiluição em caldo foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima do óleo e a ação conjunta do óleo com os fármacos gentamicina, norfloxacina, eritromicina e fluconazol. Leitura colorimétrica foi utilizada para testes com bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e leitura espectrofotométrica para fungos (*Candida albicans* e *Candida tropicalis*), e neste caso, os dados foram usados para criar a curva de viabilidade celular e calcular a IC₅₀ das células fúngicas. Testes de concentração fungicida mínima e a ação sobre a transição morfológica fúngica foram realizados por subcultivo e microcultivo, respectivamente. A análise química revelou os compostos Z-Carpacin, Pogostol e E-Cariofileno, como compostos mais abundantes. Os resultados da análise intrínseca foram considerados irrelevantes clinicamente, porém o óleo teve efeito sinérgico quando associado à gentamicina, frente às cepas multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus*, e ao fluconazol para as cepas padrão e isolado de *C. tropicalis*. Efeito fungicida foi observado para o isolado de *C. albicans*. A inibição hifal de *Candida* spp. foi verificada nas maiores concentrações testadas para todas as estirpes. O óleo essencial de *P. diospyrifolium* teve efeito promissor quando associado à fármacos comerciais e diante de um fator de virulência fúngico. Desta maneira o óleo apresentou compostos ativos que poderão auxiliar no desenvolver de novos fármacos, entretanto, novos estudos são necessários em busca de esclarecer o mecanismo de ação do mesmo, bem como identificar os constituintes ativos.

Palavras-chave: Fluconazol, virulência, *Escherichia coli*, Z-Carpacin, sinergismo, viabilidade celular

1. INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas na medicina popular tradicionalmente e tem sido uma alternativa a se explorar, especialmente como fonte de antimicrobianos naturais (MORANDIM *et al.*, 2010). Sua riqueza de compostos, chamados de metabólitos secundários, vem mostrando eficácia no combate às mais variadas infecções (PEREIRA E CARDOSO, 2012).

O aumento do número de infecções microbianas está diretamente ligado ao uso irracional de antimicrobianos, sendo uma das maiores causas do surgimento de micro-organismos multirresistentes (MORESCO *et al.*, 2017). Para pacientes com infecções, a resistência antimicrobiana aumenta a morbidade e mortalidade, enquanto há um considerável aumento de custos para as instituições de saúde (MATIAS *et al.*, 2011).

A família *Piperaceae* possui espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais nos hemisférios norte e sul, incluindo plantas herbáceas e arbustos. O gênero *Piper* é o maior e mais conhecido por sua produção de extratos vegetais, inclusive óleos essenciais, abundantes em metabólitos secundários, especificamente aqueles derivados da via do chiquimato como: neolignanas, fenilpropanóides, flavonóides entre outros (BERNUCI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016).

Espécies de *Piper* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diarreia (PIERONI, 2017), distúrbios gastrointestinais, dor de estômago (SÕUKAND *et al.*, 2017), doenças na garganta, tosse (ESAKKIMUTHU *et al.*, 2018), infecções ginecológicas, urológicas e flatulências (ALQETHAMI, HAWKINS E TEIXIDOR-TONEU, 2017; SALEHI *et al.*, 2019). A espécie em estudo, *Piper diospyrifolium*, possui atividade antibacteriana (BERNUCI *et al.*, 2016; SCODRO *et al.*, 2015), antifúngica (MORANDIM-GIANNETTI *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.*, 2011), moluscicida (RAPADO *et al.*, 2011) e leishmanicida (BERNUCI *et al.*, 2016) comprovadas, entre outras.

Diante do fenômeno de resistência, e na busca por novos agentes antimicrobianos, a comunidade científica tem voltado sua atenção ao uso de produtos naturais, em especial os oriundos de plantas com indicativo medicinal (TINTINO *et al.*, 2013). Apesar de *P. diospyrifolium* possuir uso disseminado entre as gerações, suas propriedades químicas e farmacológicas ainda não foram completamente caracterizadas (MORESCO *et al.*, 2017).

Desta maneira, o objetivo deste estudo é investigar a composição química contribuindo para a elucidação do perfil químico da espécie e validar as propriedades farmacológicas do óleo essencial de *P. diospyrifolium* Kunth e seu efeito antimicrobiano contra linhagens padrões e resistentes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e leveduras de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1 Extração e composição química do óleo essencial

O óleo essencial foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Luiz Everson da Silva da Universidade Federal do Paraná – UFPR – Brasil, onde o óleo foi extraído e submetido a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), para posterior quantificação e identificação dos seus constituintes.

Inicialmente o material vegetal foi coletado no litoral do Paraná, Brasil (S 25° 13.644', W 48° 34.985' e altitude 6m). Dos exemplares coletados uma exsicata foi produzida e conduzida ao Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), onde foi herborizada (HFIE) sob o número MBM 396413 (LAWRENCE, 1951; IBGE, 2012).

As folhas foram selecionadas e secas (secador elétrico modelo FANEM – Mod. 320 SE com circulação de ar a 40 °C por 24 horas) para a confecção do óleo essencial. Após a pesagem de 50 g das folhas o material vegetal foi submetido a hidrodestilação em 1 L de água destilada em aparelho graduado do tipo Clevenger durante 4,5 horas. O processo se deu com base no método de Wasicky (1963). Após a extração, a amostra foi acondicionada em freezer aonde permaneceram até o momento da análise.

Na determinação do teor de óleo essencial em base seca, foi aferido a massa total de óleo essencial produzido em relação a quantidade de massa seca de material botânico utilizada na extração.

Na identificação dos constituintes químicos, por CG/EM, uma solução do óleo e diclorometano a 1% foi injetada, com divisão de fluxo de 1:20 em um cromatógrafo Agilent 6890 (Palo Alto, CA) acoplado a detector seletivo de massas Agilent 5973N, a temperatura de 250 °C. Foi utilizada a coluna capilar HP-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com o gás hélio como carreador (1,0 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹. O detector de massas foi operado no

modo ionização eletrônica (70 eV), a uma taxa de 3,15 varreduras s⁻¹ e faixa de massas de 40 a 450 uma. A linha de transferência foi mantida a 260 °C, a fonte de íons a 230 °C e o analisador (quadrupolo) a 150 °C. Para a quantificação, a amostra foi injetada em cromatógrafo Agilent 7890A equipado com detector de ionização por chama (DIC), operado a 280 °C, sob as mesmas condições analíticas, com hidrogênio como gás de arraste, a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (área %).

2.2 Ensaio microbiológicos

2.2.1 Cepas microbianas e preparo de soluções

As cepas bacterianas utilizadas foram: padrões, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados clínicos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Paraíba, denominadas *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 06, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* 10. As linhagens fúngicas foram *C. albicans* INCQS 40006, *C. albicans* URM 4127, *C. tropicalis* INCQS 40042 e *C. tropicalis* URM 4262, sendo as do tipo padrão obtidos da Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS, da FIOCRUZ-INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), Rio de Janeiro e os isolados clínicos, do acervo da Micoteca da Universidade Federal de Recife (URM – University Recife Mycology).

As culturas de bactérias e fungos foram reavivadas em placas de Petri contendo seus respectivos meios de cultura: HIA (*Heart Infusion Ágar*) para bactérias e ASD (*Sabouraud Dextrose Ágar*) para fungos, e colocadas na estufa a 37 °C por 24 horas. Após esse período, uma suspensão foi feita retirando uma alçada de cada cultura microbiana e colocando em tubos de ensaio com 4 mL de Soro Fisiológico (SF) a 0,9%. A concentração do inóculo foi padronizado com a turvação da escala 0,5 de McFarland (1 x 10⁸ UFC/mL) (NCCLS, 2003).

As soluções matrizes do óleo essencial foram obtidas pesando 10 mg e 5 mg do mesmo, e diluídas em 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Posteriormente essas primeiras soluções foram diluídas novamente em água destilada estéril (para que a concentração de DMSO não exercesse atividade sobre as células testadas), atingindo as concentrações de 1.024 µg/mL para testes com bactérias e de 4.096 µg/mL para testes com fungos (STOPPA *et al.*, 2009).

As drogas de referência foram diluídas em água destilada e estéril. Os fármacos utilizados foram norfloxacina, gentamicina, eritromicina, na concentração inicial de 1.024 µg/mL e o fluconazol na concentração de 4.096 µg/mL.

2.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os *ependorfs* do teste foram preparados contendo 1350 µL de BHI (Brain Heart Infusion Broth) a 10% e CSD duplamente concentrado (Sabouraud Dextrose Broth) + 150 µL do inóculo (correspondente a 10% da solução total) para as linhagens de bactérias e fungos respectivamente. Esta solução foi distribuída em placas de microdiluição (100 µL/poço), e em seguida foi realizada a diluição seriada, com 100 µL da solução do óleo, por coluna, com concentrações variando de 512 µg/mL a 0,5 µg/mL quando bactérias, e de 2.048 µg/mL a 2 µg/mL em fungos. As microdiluições foram realizados em triplicata e quadruplicata, respectivamente. As placas foram levadas à incubadora a 37 °C/24 horas. A leitura das placas bacterianas foi realizada adicionando 20 µL de resazurina (reagente colorimétrico) em cada poço e observando visualmente após 1 hora (JAVADPOUR *et al.*, 1996). Quanto às placas de fungos foram realizadas leituras espectrofotométricas no aparelho de ELISA (Termoplate®) (λ : 630 nm) e os resultados obtidos compuseram a curva de viabilidade celular e IC₅₀. Foram realizados controles de diluições (com cloreto de sódio a 0,9% ao em vez do inóculo), de esterilidade do meio e de crescimento (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2016).

2.2.3. Efeito modulador do óleo na atividade de fármacos de uso clínico

Para verificar a ação conjunta do óleo com fármacos comerciais foi utilizado o método proposto por Coutinho *et al.* (2008), no qual o óleo é utilizado em concentração sub-inibitória (CIM/8 – bactérias e CFM/16 – fungos). Os tubos *ependorf* continham o óleo + o meio BHI (10%) e CSD duplamente concentrado + 150 µL da suspensão microbiana (correspondente a 10% da solução). Foram preparados controles de crescimento e de diluição. A placa foi preenchida no sentido numérico adicionando 100 µL desta solução em cada poço. Posteriormente foi feita a microdiluição seriada com 100 µL do fármaco. As placas foram incubadas a 37 °C/24 horas. Para o teste com bactérias somente foi utilizado as cepas multirresistentes. A leitura foi realizada conforme descrito na subseção anterior. Havendo interação do fármaco com o óleo de forma a reduzir a CIM do fármaco, o efeito é dito

sinérgico, em caso contrário é dito antagônico.

2.2.4. Determinação da Concentração Fungicida Mínima- CFM

A partir do teste da CIM, uma haste estéril foi adicionada em cada poço da placa de microdiluição, homogeneizada e subcultivada em placa de *Petri* contendo ASD (*Sabouraud Dextrose Ágar*) e um guia das concentrações testadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e a leitura foi realizada observando o crescimento ou eliminação das colônias de *Candida*, observando assim a viabilidade fúngica (ERNST *et al.*, 1999, com modificações).

2.2.5. Avaliação do efeito sobre a virulência fúngica

Com este teste é possível ver a ação do óleo sobre um dos fatores de virulência fúngica, a formação de hifas. Câmaras úmidas foram montadas e esterilizadas. Dentro de cada câmara, sobre uma lâmina de microscopia (estéril) foram vertidos três mL de meio PDA (Potato Dextrose Ágar), empobrecido, contendo o óleo em concentração definida a partir da CFM (CFM /2, CFM/4 e CFM/8). Das placas de *Petri* previamente inoculadas, foram retiradas alçadas do inóculo e feito duas estrias paralelas, sobre o meio já solidificado, sendo depositada sobre a mesma uma lamínula estéril. As câmaras foram incubadas e após 24 horas (37 °C) foram visualizadas em microscópio óptico (AXIO IMAGER M2-3525001980 – ZEISS - Alemanha) utilizando objetiva de 20 X. Foram realizadas imagens para constatar a emissão ou inibição dos filamentos das hifas. Controles de crescimento e do antifúngico foram realizados. Posteriormente as imagens foram analisadas por meio do Software Zen 2.0, no qual foi possível verificar a extensão total das estrias de inóculo e o comprimento dos filamentos de hifas, para posteriormente seguir a estatística de acordo com os resultados e concentração das amostras.

2.3. Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prisma 6.0. Foi aplicado na amostra uma ANOVA de duas vias. Em bactérias o teste ANOVA utilizou 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 $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ são considerando significativo e $p > 0,05$ não significativo). Para fungos os dados obtidos da leitura

espectrofotométrica foram verificados quanto a sua distribuição normal e em seguida analisados por ANOVA, comparando os valores de cada concentração do óleo, com o teste post hoc de Bonferroni. Os valores de IC₅₀ foram obtidos por regressão não linear para a finalidade de interpolação de valores a partir de curvas padrão.

Para avaliação da virulência foi realizada a medição da área total da estria, e das áreas onde houve crescimento de hifas. Em seguida foram realizadas medições de todas os filamentos de hifas encontrados em cinco áreas escolhidas aleatoriamente em cada estria, de cada concentração. Foi feita a média do comprimento dos filamentos de hifas e analisados por ANOVA seguida de correção de Bonferroni para múltiplas comparações de comparando os valores de acordo com a concentração do produto.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação dos constituintes químicos

O rendimento de extração do óleo essencial foi de 0,49%. A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação do seu espectro de massa e de seu índice de retenção linear com os dados da biblioteca do aparelho (WILEY, 1994; NIST, 2016, ADAMS, 2007). Os constituintes, seus índices de retenção e porcentagem estão dispostos na Tabela 1. Nela estão presentes 21 compostos entre monoterpenos e sesquiterpenos, dos quais o majoritário é o Z-carpacin (24,30%), seguido do pogostol (9,85%), E-caryophyllene (7,16%), germacrene A (6,87%), germacrene D (5,28%), α -copaene (4,45%) e o germacrene B (3,70%).

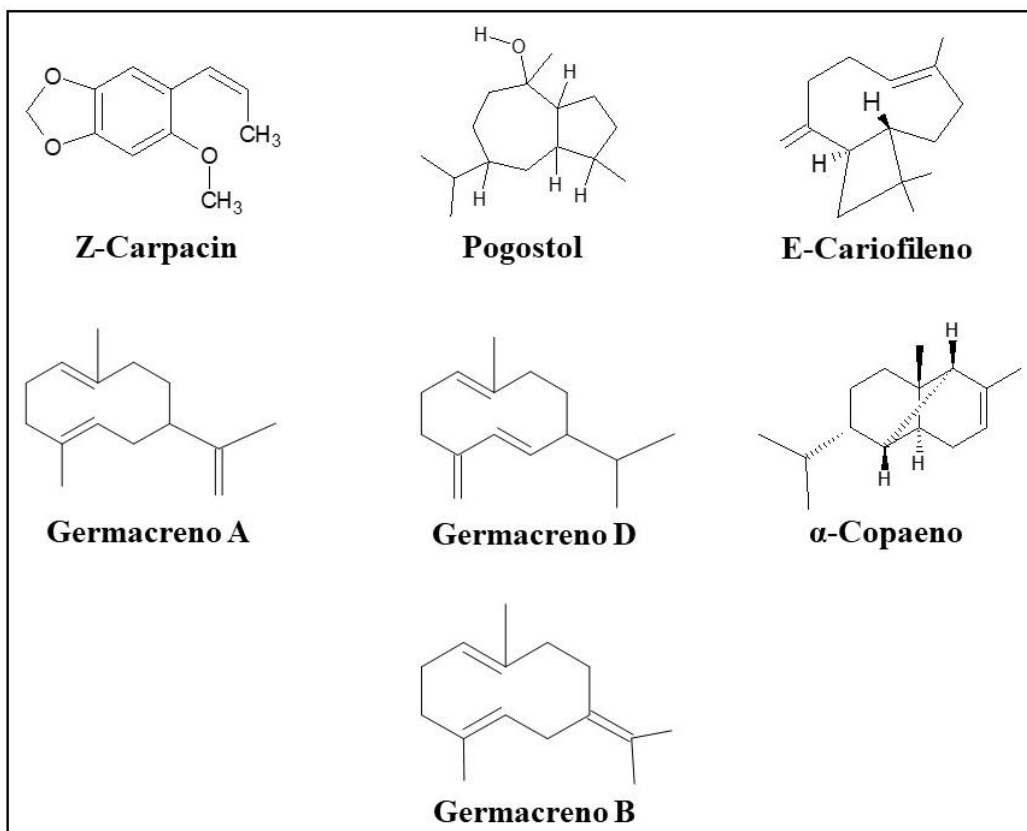
Tabela 1: Composição química do óleo essencial das folhas de *P. diospyrifolium*.

Constituinte	IR_{Cal}	%
α - Pineno	935	1,13
α-Copaeno	1381	4,45
β -Elemeno	1397	1,71
(E)-Cariofileno	1426	7,16
γ -Elemeno	1439	1,01
α -Guaieno	1444	2,94
α -Humuleno	1459	1,39
9-Epi-(E)-Cariofileno	1468	1,08
α -Amorfeno	1483	1,45
Germacreno D	1488	5,28
α -Murolene	1502	2,89
Germacreno A	1506	6,87
α -Bulneseno	1512	3,37
(Z)-Carpacin	1532	24,30
Germacreno B	1566	3,70
β -Copaen-4- α -ol	1587	1,79
Globulol	1593	1,85
Guaiol	1601	1,04
1-Epi-Cubenol	1638	2,01
α -Murolol	1652	1,92
Pogostol	1665	9,85
Total identificado		87,19

IR_{Cal}: Índice de Retenção calculado

Na figura 1 é possível observar as estruturas químicas dos constituintes mais abundantes no óleo.

Figura 1: Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial de *Piper diospyrifolium*



Fonte: Adams, 2001; Pubchem, 2018.

3.2 Atividade antibacteriana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) não apresentou resultados clinicamente relevantes diante de todas as estirpes testadas. O valor da concentração foi $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, ou seja, o óleo sozinho não teve ação inibitória no crescimento bacteriano na concentração mais alta testada.

A ação do óleo (concentração sub-inibitória) associada a antibióticos comerciais está representada na Figura 2. É possível observar a ação antagônica diante do antibiótico norfloxacina para as duas cepas multirresistentes aumentando a média da CIM da droga de $50,79 \mu\text{g/mL}$ para $101,59 \mu\text{g/mL}$ na cepa *S. aureus* e de $0,0 \mu\text{g/mL}$ para $10,7 \mu\text{g/mL}$ em *E. coli*. Para a eritromicina não houve ação significativa. A gentamicina apresentou sinergismo para ambas as cepas, a ação conjunta do óleo/fármaco obteve redução da média do fármaco de $16 \mu\text{g/mL}$ para $6,34 \mu\text{g/mL}$ na cepa de *S. aureus*, e de $59,79 \mu\text{g/mL}$ para $25,39 \mu\text{g/mL}$ na cepa de *E. coli*.

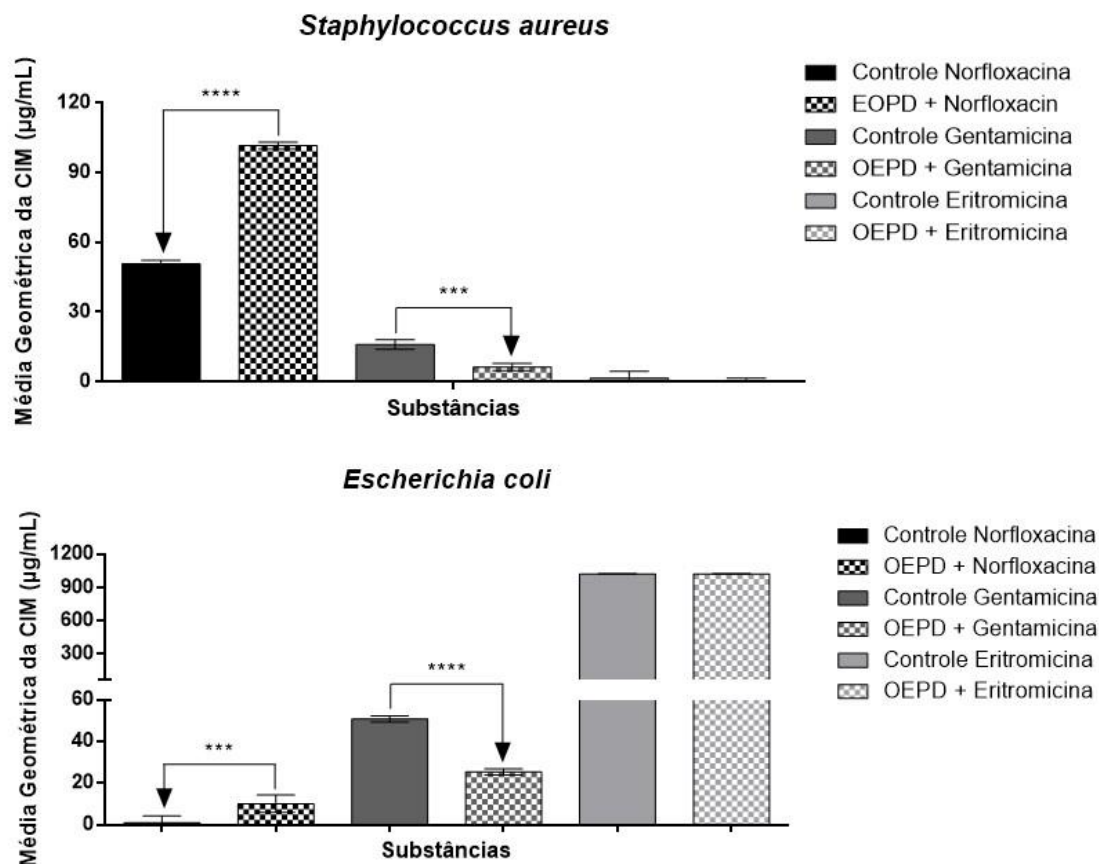


Figura 2: Ação moduladora do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* (OEPD) associado aos antibióticos das classes aminoglicosídeos, macrolídeos e fluoroquinolonas. $p < 0,0001$.

3.3 Atividade antifúngica

3.3.1 Viabilidade celular e Concentração inibitória de 50% de *Candida* spp. (IC₅₀)

A viabilidade celular de *C. albicans* e *C. tropicalis* pode ser visualizada na figura 3 e 4, onde se verifica a diminuição de micro-organismo a partir do aumento da concentração. Os gráficos mostram que a CIM, foi irrelevante clinicamente (HOUGHTON *et al.*, 2007) com efeito inibitório na concentração de 2048 µg/mL para todas as cepas testadas.

O óleo, em concentrações sub-inibitórias (CFM/16: 128 µg/mL para CA URM 4127 e 256 µg/mL para o restante), associado ao antifúngico fluconazol apresentou curva de viabilidade semelhante ao do fármaco sozinho contra a cepa CA INCQS 40006. Antagonismo foi observado frente a CA URM 4127, onde a junção das substâncias prejudicou o efeito isolado da droga diante do crescimento fúngico (Figura 3).

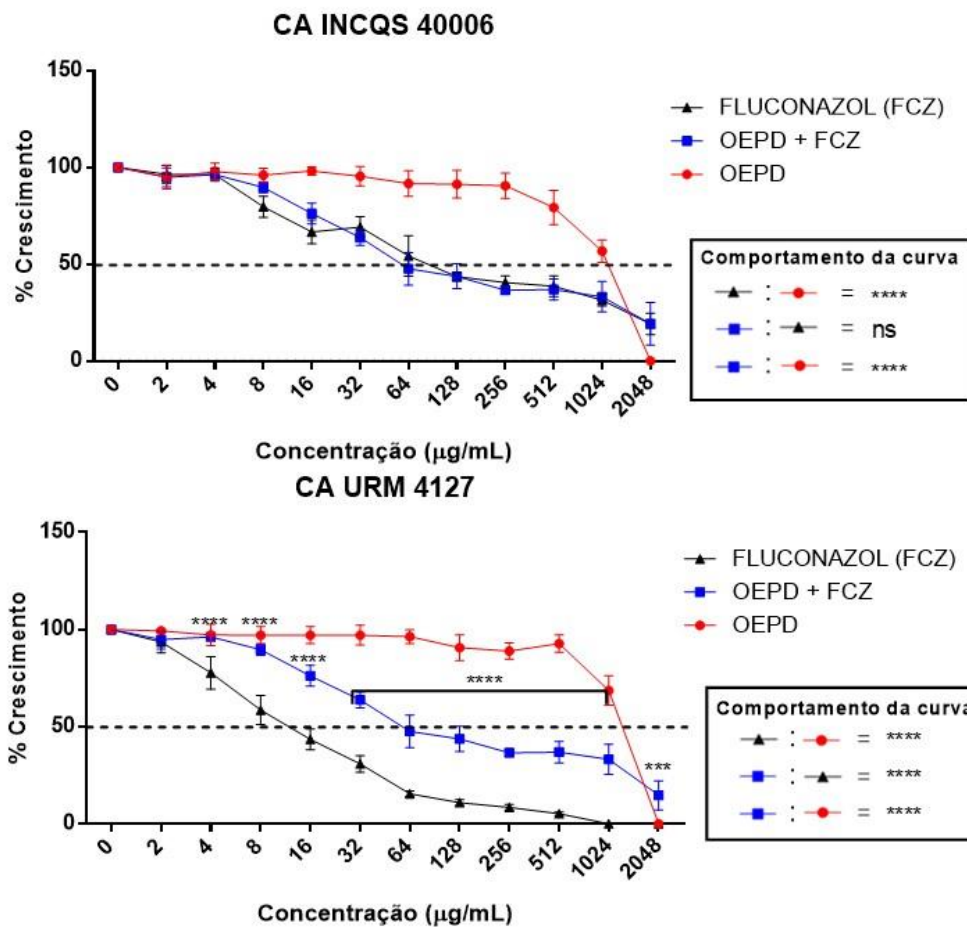


Figure 3: Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEPD (óleo essencial de *Piper diospyrifolium*) contra estirpes de *C. albicans* (CA). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Recife. p <0,0001.

Para *C. tropicalis*, a cepa padrão (CT INCQS 40042), as concentrações de 4 a 512 µg/mL mostrou efeito sinérgico, sendo melhor que a CIM do fluconazol. Comportamento semelhante pode ser visto na curva de viabilidade da cepa isolada (CT URM 4262) em que a associação foi melhor nas concentrações de 64 a 2018 µg/mL conforme é possível ver na Figura 4.

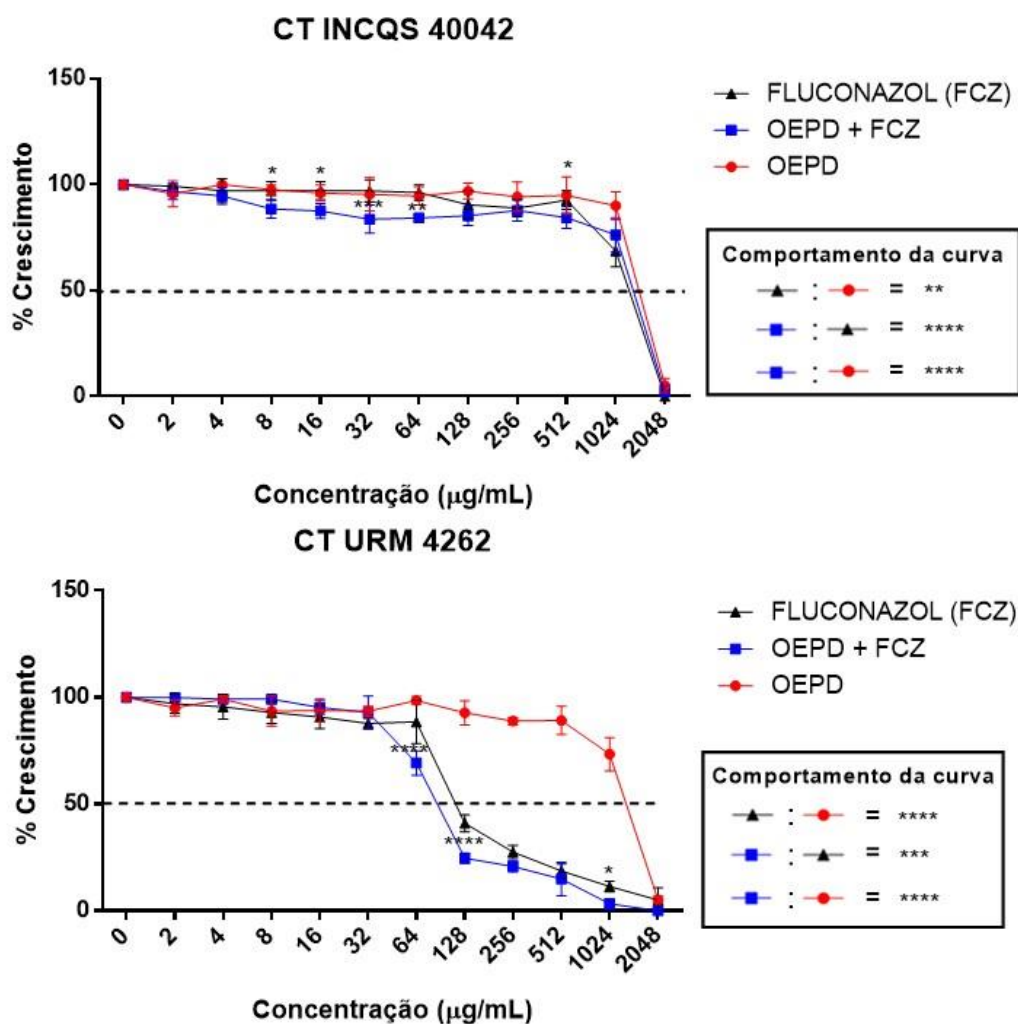


Figure 4: Ação antifúngica do fluconazol (FCZ) associado ao OEPD (óleo essencial de *Piper diospyrifolium*) contra estirpes de *C. tropicalis* (CT). INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Recife. p <0,0001.

Analisando o efeito inibitório de 50% da população fungica (tabela 3) as estirpes de destaque foram a CA INCQS 40006 e CT URM 4262, pois adicionadas ao fluconazol tiveram atividade antifúngica significativa (IC₅₀: 94,12 µg/mL para a *C. albicans* e 103,74 µg/mL para *C. tropicalis*).

Os valores de IC₅₀ (Tabela 2) contra CA URM 4127 e CT URM 4262, quando comparados aos valores do fluconazol, enfatizam a redução da ação do antifúngico quando associado ao óleo.

A ação intrínseca do óleo não teve IC₅₀ relevante, chegando a inibir 50% da população do micro-organismo somente em concentrações altas.

Tabela 2: Concentração capaz de inibir 50% da população fúngica (IC₅₀) (µg/mL) do óleo essencial de *P. diospyrifolium* frente a diferentes estirpes de *Candida*.

	CA INCQS 40006	CA URM 4127	CT INCQS 40042	CT URM 4262
OEPD	950,85	1206,93	1520,99	1260,97
FLUCONAZOL	111,95	12,18	1314,13	149,3
OEPD + FCZ	94,12	74,95	1373,46	103,74

FCZ: Fluconazol; OEPD: óleo essencial de *Piper diospyrifolium*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Recife.

3.3.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CFM foi considerada a concentração que causou a ausência (fungicida) ou a inibição (fungistático) do crescimento de colônias. O óleo teve efeito fungicida com valor de CFM de 2048 µg/mL somente para a cepa de CA URM 4127, e ação fungistática (CFM ≥ 4096 µg/mL), para as outras cepas do teste. Quando o óleo foi associado ao fluconazol, a cepa CT URM 4262 tornou-se sensível sendo observado o efeito fungicida na concentração de 2048 µg/mL. Não foi verificado o mesmo efeito para as outras estirpes do teste. Sendo assim, para CA URM 4127 foi observado um efeito antagônico quando o óleo foi associado ao fármaco.

3.3.3 Ação do óleo de *Piper diospyrifolium* contra um fator de virulência fúngica

Na análise de ação sobre a morfologia fúngica, o OEPD foi testado nas concentrações de CFM/2 – 1024 µg/mL, CFM/4 – 512 µg/mL, CFM/8 – 256 µg/mL para a cepa CA URM 4127, e as demais estirpes foram testadas nas concentrações CFM/2 – 2048 µg/mL, CFM/4 – 1024 µg/mL e CFM/8 – 512 µg/mL.

Os gráficos na figura 5 mostram que de 81,7% e 96,8% do crescimento de filamentos na borda completa das estrias (visto no controle de crescimento) o óleo reduziu totalmente a transição morfológica nas maiores concentrações (CFM/2 e CFM/4) para as linhagens padrão e isolado de *C. albicans*, respectivamente. Na menor concentração a redução foi de 25,3% para CA INCQS 40006 e de 12,2% para CA URM 4127.

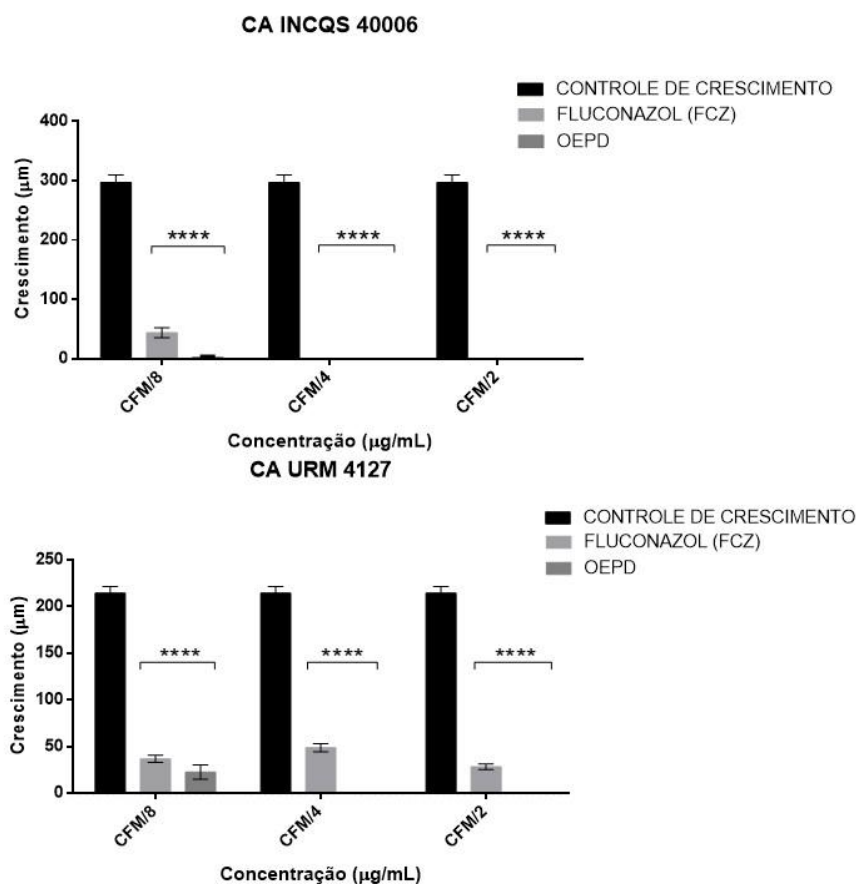


Figura 5: Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* (OEPD) sobre o crescimento micelial de *Candida albicans* (CA); INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Recife; Para CA INCQS 40006: CFM/2 – 2048 µg/mL, CFM/4 – 1024 µg/mL, CFM/8 – 512 µg/mL; Para a CA URM 4127: CFM/2 – 1024 µg/mL, CFM/4 – 512 µg/mL, CFM/8 – 256 µg/mL. $p < 0,0001$.

Para o isolado de *C. tropicalis* (Figura 6) a inibição total dos filamentos foi vista somente para a maior concentração, atingindo em CFM/4 e CFM/8 a inibição de 14,4% e 1%, respectivamente, em comparação com o total de 100% de crescimento do micélio. Em CT INCQS 40042 as porcentagens de inibição foram de: CFM/8: 0,97%; CFM/4: 1,7%; CFM/2: 13,4%, mostrando que as cepas de *C. tropicalis* são mais resistentes a ação do óleo.

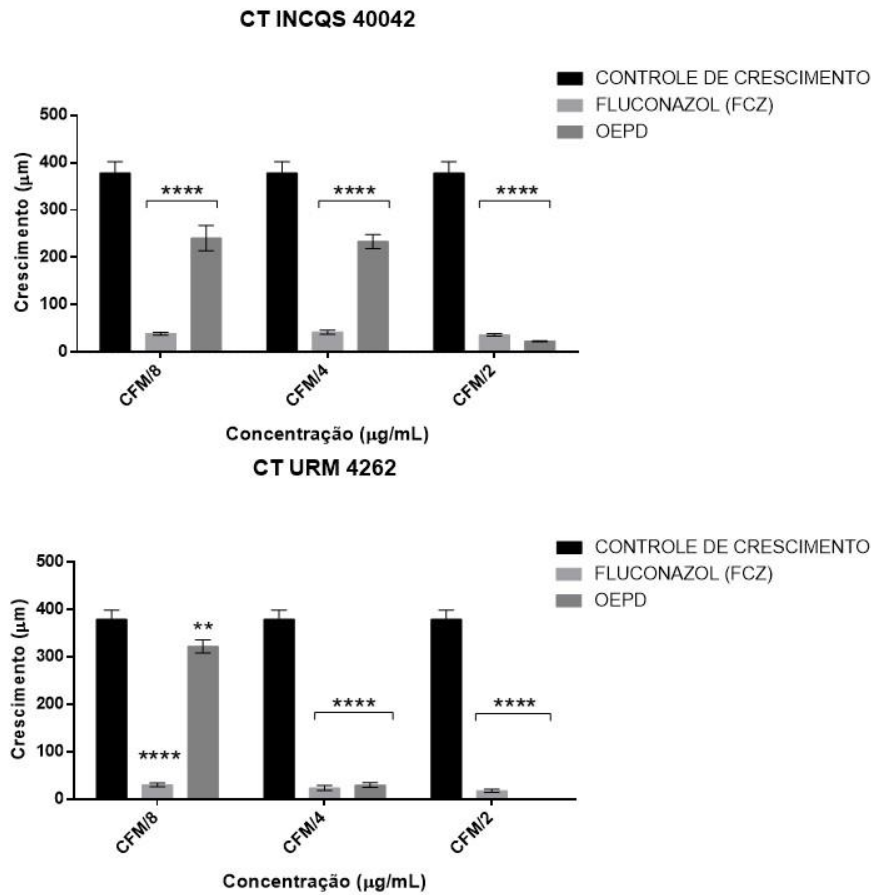


Figura 6: Efeito inibitório do antifúngico fluconazol e do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* (OEPD) sobre o crescimento micelial de *Candida tropicalis* (CT); INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; URM: Micoteca da Universidade Federal de Recife; CFM/2 – 2048 µg/mL, CFM/4 – 1024 µg/mL, CFM/8 – 512 µg/mL p <0,0001.

Os melhores resultados para o fluconazol foi contra a estirpe de CA INCQS 40006 inibindo totalmente a virulência fúngica nas maiores concentrações (CFM/2 e CFM/4), para CT INCQS 40042 inibindo 63,3% e CT URM 4262 inibindo 51,5%, ambos na concentração de CFM/2. Para CA URM 4127 o fármaco agiu melhor na concentração de CFM/8 com 57,1% de inibição em comparação ao controle de crescimento.

A figura 6 mostra o efeito progressivo do óleo sobre a morfologia fúngica. Na foto A, está retratado o controle de crescimento do isolado clínico CA URM 4127. A formação micelial é aparente, com extensas hifas apontadas pelas setas. Na foto B é demonstrado o efeito na concentração de CFM/8. Nota-se a redução significativa dos filamentos. As fotos C e D correspondem às concentrações de CFM/4 e CFM/2 e nestas não há mais a formação de micélio verificando que o fungo permanece na sua forma leveduriforme.

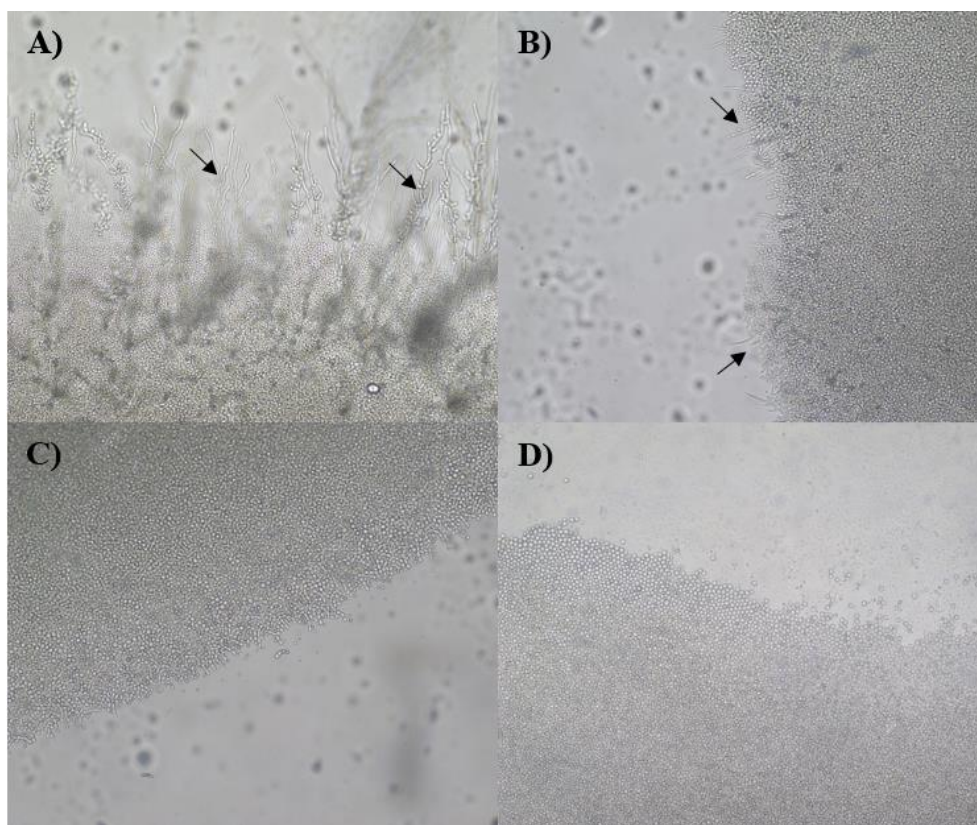


Figura 7: Demonstração do efeito progressivo do óleo essencial de *Piper diospyrifolium* na inibição da transição morfológica de *Candida* spp. As setas indicam a formação de hifas no controle de crescimento (A), e a sua redução progressiva (B, C, D) conforme houve o aumento de concentração do óleo (B-CFM/8; C-CFM/4; C-CFM/2). Escala: 50 μ m

4. DISCUSSÃO

O rendimento obtido para o óleo essencial (0,49%) é inferior ao adquirido por Morandim *et al.* (2010) (1,46%), ambos utilizaram das folhas frescas. Vale ressaltar que o autor também trabalhou com óleo essencial provindo dos frutos de *P. diospyrifolium* (1,40%). Os óleos essenciais tanto das folhas quanto dos frutos tiverem em sua composição compostos semelhantes aos presentes na Tabela 1, porém em quantidades diferentes, sendo o óleo deste estudo o que possui maior quantidade dos compostos semelhantes e por isso mais rico. Os espécimes testados por Morandim *et al.* (2010) foram coletados em São Paulo e a área de coleta, clima, solo e diferentes épocas anuais podem ser a causa da distinta variedade química presente na espécie (MACÊDO *et al.*, 2018; OZER *et al.*, 2017). Resultados divergentes também foram vistos por Vieira *et al.* (2010), cujas folhas coletadas em Maringá – PR têm como majoritário o sesquiterpeno (E)-eudesma-6,11-diene, e por Bernuci *et al.* (2016) que trabalhou com folhas coletadas em Antonina - PR com majoritário o sesquiterpeno Selin-11-en-4- α -ol.

Estudos mostram a utilização do carpacin na confecção de inseticidas devido a sua toxicidade aos ovos de insetos (KRISKIN; FOERSTER, 2016, SANINI *et al.*, 2017; RAUF *et al.*, 2007). Atividades antimicrobianas também podem ser comprovadas, não só do carpacin, mas também dos compostos pogostol e E-Cariofileno (MAR E PRIPDEEVECH, 2016; COSTA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2009; ADHAVAN *et al.*, 2017; DAS, 2016), encontrados em abundância no óleo de *P. diospyrifolium*. Alguns estudos são abordados a seguir:

Abdollahnejad *et al.* (2016) utilizou do óleo essencial de *Artemisia dracunculus*, rico em carpacin, contra estirpes bacterianas. Obteve resultados significativos, pelo método de difusão em disco, para *Streptococcus pyogenes* (12 mm) e *E. coli* (6 mm) em comparação com o controle da amicacina (10,5 mm; 24,5 mm). A ação do pogostol e do E-Cariofileno foi vista por Adhavan *et al.* (2017) trabalhando como o óleo essencial de *Pogostemon cablin* e *Pogostemon heyneanus*. A ação foi promissora com resultados de CIM que variaram de 3,2 a 25 mg/mL para cepas de *Shigella flexneri*, *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*. Nafis *et al.* (2019) avaliou o efeito antimicrobiano do óleo de *Cannabis sativa*, que possui E-Cariofileno (35%) como majoritário. Pelo método de difusão em disco, eles obtiveram o melhor efeito de inibição contra *E. coli* (11,1 mm), *Micrococcus luteus* (11 mm), *Bacillus subtilis* (13 mm), *S. aureus* (13 mm), *C. albicans* (12 mm), *C. krusei* (12,5 mm) em comparação as drogas ciprofloxacino (12 mm; 26,3 mm; 35 mm; 27,5 mm) e fluconazol (20 mm; 24 mm) respectivamente.

Os resultados antibacterianos com CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ diferiram do estudo realizado por Bernuci *et al.* (2016), que utilizou o óleo de *P. diospyrifolium*, contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* obtendo inibição do crescimento bacteriano a partir da concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antifúngica, por sua vez, também foi vista por Vieira *et al.* (2011) que avaliou a ação do óleo puro extraído das folhas da mesma planta. Os resultados vistos pelo método de difusão em disco foram promissores contra as cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentando inibição com halos que variaram de 8 mm a 15 mm de diâmetro.

A susceptibilidade de um micro-organismo ao óleo essencial depende das propriedades do óleo e das características do próprio micro-organismo. O efeito do óleo de *P. diospyrifolium* pode ser atribuído a interação do mesmo com a organização dos peptídeos anfífilos da membrana celular, desestabilizando-a e resultando em lise celular, danos estes que têm sido observados em trabalhos utilizando óleo essencial (MOLLICA *et al.*, 2017; SOLÓRZANO-SANTOS E MIRANDA-NOVALES, 2012; BOTRE *et al.*, 2010; SARTO E

ZANUSSO JUNIOR, 2014; LUCENA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018; AZEVEDO *et al.*, 2016). Também, as quantidades de compostos presentes no óleo que possuem atividade antimicrobiana que podem ter papel importante na ação efetiva do óleo (DEVI *et al.*, 2012).

O gênero *Piper* tem sido muito estudado como fonte de compostos ativos para atividade antimicrobiana, como pode ser conferido nos trabalhos citados a seguir. Salleh *et al.* (2011) utilizando o óleo essencial (folhas e hastes) da espécie *P. caninum*, comprovou sua efetiva ação contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, e moderada atividade contra os fungos *C. albicans* e *Aspergillus niger*. A espécie *Piper divaricatum* foi analisada por Barbosa *et al.* (2012), que utilizou o óleo essencial de folhas e frutos contra cepas bacterianas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica Ser. Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *S. aureus* obtendo resultados de inibição sobre todas as estirpes. Gasparetto e colaboradores (2016) descreveram atividade promissora do óleo essencial de *P. cernuum* contra as bactérias *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *B. subtilis* e os fungos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Criptococcus neoformans*. Morandim *et al.* (2010) também obteve efetiva ação em óleo dos frutos de *P. cernuum* e em óleo das folhas de *P. solmsianum* contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides*.

O teste de análise da morfologia fúngica permite ver a ação do óleo diante de um importante fator de virulência no desenvolvimento de candidíase. Espécies de *Candida* pertencem a microbiota natural de um indivíduo e em situações de desequilíbrio homeostático elas se tornam responsáveis por desenvolver várias infecções, principalmente em indivíduos com doenças imunossupressoras (MAYER, WILSON, HUBE, 2013).

Óleos essenciais são conhecidos, na literatura, por sua atividade contra os atributos de virulência de *Candida* spp. O óleo das folhas da espécie *Piper rivinoides* (4.096 µg/mL) foi avaliado contra a formação micelial de *C. albicans* e *C. tropicalis*, apresentando inibição total da emissão de filamentos (LEAL *et al.*, 2019). Macêdo *et al.* (2018), por sua vez, obteve inibição de hifas e pseudo-hifas de *C. albicans* utilizando o óleo essencial de *Psidium guajava* (8.192 µg/mL). O óleo de *Eugenia uniflora* (8.192 µg/mL) foi estudado contra a transição morfológica de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e obteve efeito na inibição de *C. albicans* e *C. tropicalis*, sendo ineficiente contra *C. krusei* (SANTOS *et al.*, 2018). Por método semelhante ao desse estudo Sousa *et al.* (2016) avaliou o efeito do óleo essencial das folhas de

Coriandrum sativum (1.024 µg/mL) na inibição dos tubos germinativos de *C. albicans*, ao qual conseguiu inibir na concentração de 512 µg/mL

É de suma importância a inibição do processo de virulência sem que haja a morte do micro-organismo comensal pois desta maneira a indução evolutiva, que contribui para a resistência microbiana do mesmo, é menor, e o equilíbrio ecológico da microbiota não é prejudicado (SHARMA *et al.*, 2019).

Diante disso, a pesquisa tem intensificado a buscar por fármacos que contenham a resistência fúngica sem ocasionar danos ao hospedeiro e o OEPP mostrou-se como alternativa para o desenvolvimento de novas drogas, para a ação associada e para conter o pleomorfismo fúngico.

5 CONCLUSÃO

A ação antimicrobiana do óleo essencial de *P. diospyrifolium* não foi promissora diante das estirpes estudadas. A ação combinada do óleo a fármacos comerciais teve ação sinérgica para bactérias embora com fungos não tenha tido resultados clinicamente relevantes. Foi observado ação inibitória contra a formação de filamentos de ambas as espécies de *Candida*, um importante fator de patogenicidade fúngico.

O óleo apresentou em sua composição a predominância de mono e sesquiterpenos, compostos conhecidos por seu efeito antimicrobiano já observado na literatura, que podem ter contribuído, em conjunto, para o efeito do mesmo.

Entretanto, mais pesquisas são necessárias para entender a ação do óleo sobre os micro-organismos e os processos metabólicos e genéticos relacionados à inibição da virulência fúngica, bem como avaliar sua toxicidade, para posteriormente a realização de testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

Abdollahnejad, F., Kobarfard, F., Kamalinejad, M., Mehrgan, H., & Babaeian, M. (2016). Yield, chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia dracunculoides* L. essential oils obtained by two different methods. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, 19(3), 574-581

- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 2007.
- Adams, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing Corporation, 2001.
- Adhavan, P., Kaur, G., Princy, A., & Murugan, R. (2017). Essential oil nanoemulsions of wild patchouli attenuate multi-drug resistant gram-positive, gram-negative and *Candida albicans*. **Industrial crops and products**, 100, 106-116.
- Alqethami, A., Hawkins, J. A., & Teixidor-Toneu, I. (2017). Medicinal plants used by women in Mecca: urban, Muslim and gendered knowledge. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, 13(1), 62.
- Azevedo, I. L., de Almeida, A. C., Martins, E. R., Nogueira, W. C. L., de Faria Filho, D. E., Oliveira, S. P., Prates, J. P. B., de Souza, C. N. (2016). Eficácia in vitro do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* Steud. Wats.) frente a bactérias entéricas de origem avícola. **Acta Veterinaria Brasilica**, 10(1), 25-31.
- Barbosa, Q. P., da Câmara, C. A., Ramos, C. S., Nascimento, D. C., Lima-Filho, J. V., & Guimarães, E. F. (2012). Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. **Química Nova**, 35(9), 1806-1808.
- Bernuci, K. Z., Iwanaga, C. C., Fernandez-Andrade, C. M. M., Lorenzetti, F. B., Torres-Santos, E. C., Faiões, V. D. S., Gonçalves, J. E.; Amaral, W.; Cardoso, R. F. (2016). Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, 21(12), 1698.
- Botre, D. A., Soares, N. D. F. F., Espitia, P. J. P., de Sousa, S., & Renhe, I. R. T. (2015). Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Ceres**, 57(3).
- Claeson, P., Rådström, P., Sköld, O., Nilsson, Å., & Höglund, S. (1992). Bactericidal effect of the sesquiterpene T- cadinol on *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, 6(2), 94-98.
- Colvard, M. D., Cordell, G. A., Villalobos, R., Sancho, G., Soejarto, D. D., Pestle, W., Echeverri, T. L., Perkowitz, K. M., Michel, J. (2006). Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. **Journal of Ethnopharmacology**, 107(1), 134-142.
- Coutinho, H.D.M.; Cordeiro, L. N.; Bringel, P. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from the population of Juazeiro do Norte - Ceará. **Revista Brasileira Ciências e Saúde**, v. 9, n. 1, p. 127-138, 2005.
- Coutinho, H. D. M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P (2008). Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemother.**, 54:328-330.
- Costa, E. V., Teixeira, S. D., Marques, F. A., Duarte, M. C., Delarmelina, C., Pinheiro, M. L. B., Trigo, J. R.; Maia, B. H. L. S. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteria* species. **Phytochemistry**, 69(9), 1895-1899.

- Costa, E. V., Pinheiro, M. L. B., Silva, J. R. D. A., Maia, B. H. L. D. N., Duarte, M. C. T., Amaral, A. C. F., Machado, G. M. C., Leon, L. L. (2009). Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, 32(1), 78-81.
- Dancer, S. J. The problem with cephalosporins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 463–478, 2001.
- Das, K. (2016). Patchouli (*Pogostemon Cablin Benth*) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 633-639).
- Devi, L. R., Rana, V. S., Devi, S. I., Verdeguer, M., & Amparo Blázquez, M. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Curcuma leucorrhiza* Roxb. **Journal of essential oil research**, 24(6), 533-538.
- Ernst, E.J.; Klepser, M.E.; Ernst, M.E.; Messer, S.A.; Pfaller, M.A., (1999). In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 33(2), 75-80.
- Esakkimuthu, S., Darvin, S. S., Mutheeswaran, S., Paulraj, M. G., Pandikumar, P., Ignacimuthu, S., & Al-Dhabi, N. A. (2018). A study on food-medicine continuum among the non-institutionally trained siddha practitioners of Tiruvallur district, Tamil Nadu, India. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, 14(1), 45.
- Gasparetto, A., Cruz, A. B., Wagner, T. M., Bonomini, T. J., Correa, R., & Malheiros, A. (2017). Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. **Industrial crops and products**, 95, 256-263.
- Houghton, P. J., Howes, M. J., Lee, C. C., & Steventon, G. (2007). Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, 110(3), 391-400.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012). **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**.
- Krinski, D., & Foerster, L. A. (2016). Toxicity of essential oils from leaves of *Piperaceae* species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 40(6), 676-687.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C.J., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L. (1996). De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **J. of Medi. Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113.
- Krinski, D., & Foerster, L. A. (2016). Toxicity of essential oils from leaves of *Piperaceae* species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Ciência e Agrotecnologia**, 40(6), 676-687.
- Lawrence, G. H. M. *Taxonomia das Plantas Vasculares*, volume I, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa 1951, 296p.
- Leal, A. L. A. B., Machado, A. J. T., Bezerra, C. F., Inácio, C. E. S., Rocha, J. E., Sales, D. L., Freitas, T. S., Almeida, W. O., Amaral, W., Silva, L. E., Ferriani, A. P., Maia, B.H.L.N.S., Morais-Braga, M.F.B., Barreto, H.M, Coutinho, H.D.M. (2019). Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). **Food and Chemical Toxicology**.

- Lucena, B. F., Tintino, S. R., Figueredo, F. G., Oliveira, C. D. M., Aguiar, J. J. S., Cardoso, E. N., Aquino, P.E.A., Andrade, J.C., Coutinho, H.D.M., Matias, E. F. (2015). Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Acta Biológica Colombiana**, 20(1).
- Macêdo, D. G., Souza, M. M. A., Morais-Braga, M. F. B., Coutinho, H. D. M., Santos, A. T. L., Cruz, R. P., Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Quintans-Junior, L. J.; Almeida, J. R. G. S.; Menezes, I. R. A. (2018). Effect of seasonality on chemical profile and antifungal activity of essential oil isolated from leaves *Psidium salutare* (Kunth) O. Berg. **PeerJ**, 6, e5476.
- Mar, A., & Pripdeevech, P. (2016). Volatile Components of Crude Extracts of *Osmanthus fragrans* Flowers and Their Antibacterial and Antifungal Activities. **Chemistry of Natural Compounds**, 52(6), 1106-1109.
- Matias, E. F., Santos, K. K., Almeida, T. S., Costa, J. G., Coutinho, H. D. M. (2010). Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, 8(3).
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, 4(2), 119-128.
- Mollica, A., Macedonio, G., Stefanucci, A., Costante, R., Carradori, S., Cataldi, V., ... & Scipioni, A. (2018). Arginine- and lysine-rich peptides: synthesis, characterization and antimicrobial activity. **Letters in Drug Design & Discovery**, 15(3), 220-226.
- Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N., Machado, A. J., Sales, D. L., Brito, D. I., Albuquerque, R. S., Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Júnior, J. T. C.; Souza, D. S. L.; Lima, E. O.; Menezes, I. R. A.; Costa, J. G. M.; Ferreira, F. S.; Coutinho, H. D. M. (2016). High-performance liquid chromatography-diode array detector, fungistatic, and anti-morphogenical analysis of extracts from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. against yeasts of the genus *Candida*. **International journal of food properties**, 19(8), 1837-1851.
- Morandim, A. D. A., Pin, A. R., Pietro, N. A., Alecio, A. C., Kato, M. J., Young, C. M., Oliveira, J. E.; Furlan, M. (2010). Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of Piper species. **African Journal of Biotechnology**, 9(37), 6135-6139.
- Morandim-Giannetti, A. D. A., Pin, A. R., Santo Pietro, N. A., de Oliveira, H. C., Mendes-Giannini, M. J. S., Alecio, A. C., Kato, M. J., Oliveira, J. E., Furlan, M. (2010). Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, 1810-1814.
- Moresco, K. S., Silveira, A. K., Zeidán-Chuliá, F., Correa, A. P. F., Oliveria, R. R., Borges, A. G., Grun, L.; Barbé-Tuana, F.; Zmonzinski, A., Brandelli, A.; Vale, M. G. R., Gelain, D. P., Bassani, V. L.; Moreira, J. C. F. (2017). Effects of *Achyrocline satureioides* inflorescence extracts against pathogenic intestinal bacteria: chemical characterization, *in vitro* tests, and *in vivo* evaluation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017.
- Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Mezrioui, N., Setzer, W., Abbad, A., & Hassani, L. (2019). Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards. **Industrial Crops and Products**, 137, 396-400.

NIST Chemistry Webbook, edited by P. J. Linstrom and W. G. Mallard, <http://webbook.nist.gov> (acessado em junho de 2016).

Ozer, M. S., Sarikurkcu, C., Ceylan, O., Akdeniz, I., & Tepe, B. (2017). A comprehensive study on chemical composition, antioxidant and enzyme inhibition activities of the essential oils of *Chenopodium botrys* collected from three different parts of Turkey. **Industrial crops and products**, 107, 326-331.

Pereira, R. J., Cardoso, M. G. (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, 3(4).

Pironi, A. (2017). Traditional uses of wild food plants, medicinal plants, and domestic remedies in Albanian, Aromanian and Macedonian villages in South-Eastern Albania. **Journal of Herbal Medicine**, 9, 81-90.

Pombo, J. C. P., Ribeiro, E. R., de Lima Pinto, R., & da Silva, B. J. M. (2018). Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 25(2), 108-117.

PubChem Periodic Table and Element pages. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 15 de junho de 2018.

Rapado, L. N., Nakano, E., Ohlweiler, F. P., Kato, M. J., Yamaguchi, L. F., Pereira, C. A. B., & Kawano, T. (2011). Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of helminthology**, 85(1), 66-72.

Rauf, A., Baloch, M. K., Abbasi, F. M., Chattha, M. R., & Mahmood, T. Z. (2007). Status, utilization and trade of Hazara areas healing plants of Pakistan. **Journal Of Food Agriculture And Environment**, 5(2), 236.

Salleh, W. M. N. H. W., Ahmad, F., Yen, K. H., & Sirat, H. M. (2011). Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. **International journal of molecular sciences**, 12(11), 7720-7731.

Sanini, C., Massarolli, A., Krinski, D., & Butnariu, A. R. (2017). Essential oil of spiked pepper, *Piper aduncum* L. (Piperaceae), for the control of caterpillar soybean looper, *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Botany**, 40(2), 399-404.

Santos, J. F. S., Rocha, J. E., Bezerra, C. F., do Nascimento Silva, M. K., de Matos, Y. M. L. S., de Freitas, T. S., Santos, A.T.L., Cruz, R.P., Machado, A.J.T., Rodrigues, T.H.S., Brito, E.S., Sales, D.L., Almeida, W.O., Costa, J.G.M, Coutinho, H.D.M, Morais-Braga, M.F.B. (2018). Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food chemistry**, 261, 233-239.

Salehi, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K., Khan, T., Sharifi-Rad, J., Ozleyen, A., Turkdonmez, E., Valussi, M., Tumer, T.B., Fidalgo, L.M., Martorell, M., Setzer, W.M. (2019). *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules**, 24(7), 1364.

Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, 62(1), 10-24.

- Sarto, M. P. M., & Junior, G. Z. (2018). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista Uningá Review**, 20(1).
- Scodro, R. B. D. L., Espelho, S. C., Pires, C. T. A., Garcia, V. A. D. S., Cardozo-Filho, L., Cortez, L. E. R., Pilau, E. J., Ferracioli, K. R. C., Siqueira, V. L. D., Cardoso, R. F., Cortez, D. A. (2015). A new benzoic acid derivative from *Piper diospyrifolium* and its anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity. **Phytochemistry Letters**, 11, 18-23.
- Sharma, J., Rosiana, S., Razzaq, I., & Shapiro, R. S. (2019). Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in Candida Pathogens. **Journal of Fungi**, 5(1), 17.
- Silva, M. F. R., Bezerra-Silva, P. C., de Lira, C. S., Albuquerque, B. N. L., Neto, A. C. A., Pontual, E. V., Maciel, J. R.; Paiva, P. M. G.; Navarro, D. M. D. A. F. (2016). Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental parasitology**, 165, 64-70.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, 23(2), 136-141.
- Sõukand, R., Hrynevich, Y., Prakofjewa, J., Valodzina, T., Vasilyeva, I., Paciupa, J., Shrubok, A., Hlunsko, A., Knureva, Y., Litvinava, Y., Vyskvarka, S., Silivonchyk, H., Paulava, A., Kõiva, M., Kalle, R. (2017). Use of cultivated plants and non-plant remedies for human and animal home-medication in Liubań district, Belarus. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, 13(1), 54.
- Sousa, J. P., Queiroz, E. O., Guerra, F. Q., Mendes, J. M., Pedrosa, Z. V., Filho, A. A. O., Pereira, F. O., Trajano, V. N., Souza, F. S., Lima, E. O. (2016). Morphological alterations and time-kill studies of the essential oil from the leaves of *Coriandrum sativum* L. on *Candida albicans*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, 15(6).
- Souza, C. D., e Felfili, J. M. (2006). Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 20(1), 135-142.
- Stoppa, M. A., Casemiro, L. A., Vinholis, A. H. C., Cunha, W. R., Silva, M. L. A., Martins, C. H. G., & Furtado, N. A. J. C. (2009). Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quím. Nova**, v.32, p.498-502.
- Tintino, S. R., da Cunha, F. A. B., dos Santos, K. K. A., de Melo Guedes, G. M., Souza, C. E. S., Matias, E. F. F., Morais-Braga, M. F. B., Andrade, J. C., Costa, J. G. M., Freitas, M. A., Coutinho, H. D. M. (2013). Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus Cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**, 11(2).
- Vieira, S. C. H., Paulo, L. F. D., Svidzinski, T. I. E., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Souza, A. D., Young, M. C. M.; Cortez, D. A. G. (2011). Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42(3), 1001-1006.
- Wasicky, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81, 1963.
- Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. **Wiley Interscience**, New York, 1994.

Zambonelli, A., d'Aulerio, A. Z., Bianchi, A., & Albasini, A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. **Journal of Phytopathology**, 144(9- 10), 491-494.

6 CONCLUSÃO GERAL

A análise química dos óleos essenciais de *P. mikanianum* e *P. diospyrifolium* revelaram compostos terpênicos e fenilpropanoides, conhecidos por suas atividades antimicrobianas, antiprotozoárias, antidiabéticas e anti-inflamatórias. O safrol foi o composto majoritário do óleo de *P. mikanianum* e é característico de espécimes coletados no mesmo local (Sul). O Z-Carpacin foi o constituinte majoritário do óleo de *P. diospyrifolium* e é alvo de estudos a respeito da sua utilização na confecção de inseticidas.

Os ensaios microbiológicos mostraram que o óleo de *P. mikanianum* não teve ação intrínseca de interesse clínico relevante, porém seu uso combinado aos fármacos gentamicina e fluconazol apresentou efeito contra cepa de *Escherichia coli* e *Candida albicans* respectivamente. O óleo de *P. diospyrifolium* também não teve ação intrínseca relevante clinicamente, mas o uso combinado apresentou efeito sinérgico com as drogas gentamicina, frente às cepas multirresistentes de *E. coli* e *S. aureus*, e com o fluconazol para as cepas padrão e isolado de *C. tropicalis*.

Diante do fator de virulência fungica, os óleos tiveram potente ação inibitória contra o pleomorfismo de *Candida* spp. A espécie *C. albicans* foi mais susceptível sofrendo efeito inibitório do óleo até nas menores concentrações.

Em meio as dificuldades que a medicina enfrenta as espécies *Piper mikanianum* e *Piper diospyrifolium* representam uma fonte de metabólitos que podem ser utilizados no desenvolvimento de novos fármacos, que visem a inibição da virulência de *Candida* spp. principalmente para conter a candidíase no grupo de pacientes com doenças imunossupressoras, os principais acometidos desta enfermidade.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ALQETHAMI, A.; HAWKINS, J. A.; TEIXIDOR-TONEU, I. Medicinal plants used by women in Mecca: urban, Muslim and gendered knowledge. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 13, n. 1, p. 62, 2017.
- ARROYO-ACEVEDO, J.; CHÁVEZ-ASMAT, R. J.; ANAMPA-GUZMÁN, A.; DONAIRES, R.; RÁEZ-GONZÁLES, J. Protective effect of *Piper aduncum* capsule on DMBA-induced breast cancer in rats. **Breast Cancer: basic and clinical research**, v. 9, p. 41-48, 2015.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.22, n.1, p. 22-38, 2010.
- BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. O gênero Piper L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n.4, p. 553-561, 2008.
- BARRETO, F. S.; SOUSA, E. O.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. Antibacterial activity of *Lantana camara* Linn and *Lantana montevidensis* Brig extracts from Cariri-Ceará, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2, n. 1, p. 42, 2010.
- BERNUCI, K. Z.; IWANAGA, C. C.; FERNANDEZ-ANDRADE, C. M. M.; LORENZETTI, F. B.; TORRES-SANTOS, E. C.; FAIÕES, V. D. S.; GONÇALVES, J. E.; DO AMARAL, W.; DESCHAMPS, C.; SCODRO, R. B.; CARDOSO, R. F.; BALDIN, V. P.; CORTEZ, D. A. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1698, 2016.
- BERAN, F.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J.; THOLL, D. Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. **New Phytologist**, v. 223, p. 52-57, 2019.
- BEZERRA, D. P.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; DE VASCONCELLOS, M. C.; SILVA, A. C. R.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; HENRIQUES, J. A. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkalamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 652, n. 2, p. 164-174, 2008.
- BIZERRIL, M. X.; RAW, A. Feeding specialization of two species of bats and the fruit quality of *Piper arboreum* in a Central Brazilian gallery forest. **Revista de Biologia Tropical**, v. 45, n. 2, p. 913-918, 1997.
- BOSS, R.; OVERESCH, G.; BAUMGARTNER, A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Enterococci*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* from raw fish and seafood imported into Switzerland. **Journal of food protection**, v. 79, n. 7, p. 1240-1246, 2016.
- BRASIL. Ministerio do Meio Ambiente – MMA. **Biomás: Mata Atlântica**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atl%C3%A2ntica_emdesenvolvimento>. Acesso em: 03 jul. 2019.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.

CARVALHO, V.; NETO, A. A. C. Espécies reativas de oxigênio em plantas. *In*: PEÑA H, M. *et al.*, (Org.). **VI Botânica no Inverno**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. 2016. p. 161-168.

CASANOVA, A. G.; VICENTE-VICENTE, L.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, M. T.; PESCADOR, M.; PRIETO, M.; MARTÍNEZ-SALGADO, C.; MORALES, A. I.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J. Key role of oxidative stress in animal models of aminoglycoside nephrotoxicity revealed by a systematic analysis of the antioxidant-to-nephroprotective correlation. **Toxicology**, v. 385, p. 10-17, 2017.

CESTARI, S. E.; SCHUROFF, P. A.; DE LIMA, N. R.; DAS NEVES BURGOS, T.; DAMBROZIO, A. M. L.; PELAYO, J. S. Caracterização genotípica de fatores de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de água para consumo humano. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 139-143, 2016.

CHENICHEL FILHO, V.; YUNES, R. Estratégia 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, 1998.

CHIERENTIN, L.; SALGADO, H. R. N. Review of properties and analytical methods for the determination of norfloxacin. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 46, n. 1, p. 22-39, 2016.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008.

COUTINHO, H. C.; FREITAS, M. A.; GONDIM, C. N.; ALBUQUERQUE, R. S.; FERREIRA, J. V.; ANDRADE, J. C. Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 1, 2015.

COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica - UNIFAP**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DA SILVA, J. K. R.; PINTO, L. C.; BURBANO, R. M. R.; MONTENEGRO, R. C.; GUIMARÃES, E. F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55-60, 2014.

DA SILVA, M. F. R.; BEZERRA-SILVA, P. C.; LIRA, C. S.; ALBUQUERQUE, B. N. L.; NETO, A. C. A.; PONTUAL, E. V.; MACIEL, J. R.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 64-70, 2016.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 6, 2014.

DOGNINI, J.; MENEGHETTI, E. K.; TESKE, M. N.; BEGNINI, I. M.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; VERDI, M.; DE GASPER, A. L. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 3, p. 241-244, 2012.

DUARTE, M. R.; SIEBENROCK, M. C. N. Caracteres anatômicos de folha e caule de *Piper mikanianum* (Kunth) Steud., Piperaceae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, p.45-51, 2010.

ERNST, E. J.; KLEPSE, M. E.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 33, n. 2, p. 75-80, 1999.

ESAKKIMUTHU, S.; DARVIN, S. S.; MUTHEESWARAN, S.; PAULRAJ, M. G.; PANDIKUMAR, P.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A. A study on food-medicine continuum among the non-institutionally trained siddha practitioners of Tiruvallur district, Tamil Nadu, India. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 14, n. 1, p. 45, 2018.

FRANCO, J. M. P. L.; MENDES, R. C.; CABRAL, F. R. F.; MENEZES, C. D. A. O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. **Semana Acadêmica Revista Científica**, v. 1, n. 72, p. 1-17, 2015.

FERRAZ, A. B. F.; BALBINO, J. M.; ZINI, C. A.; RIBEIRO, V. L. S.; BORDIGNON, S. A. L.; VON POSER, G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 243-248, 2010.

FERREIRA, A. L. S.; BATISTA, C. A. S.; PASA, M. C. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola mata cavalo em nossa senhora do livramento–MT, Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 1, 2015.

FLEMING, T. H. Coexistence of five sympatric *Piper* (Piperaceae) species in a tropical dry forest. **Ecology**, v. 66, n. 3, p. 688-700, 1985.

FLORINDO, R. H. S. **Bioprospeção de metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados à *Piper* sp. coletada no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais**. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2019.

FIGUEIREDO, A. C.; PEDRO, L. G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais- óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH**, n. 114, p. 29-33, 2014.

FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v.85, n.4, p. 455-460, 2000.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório Anual de atividades**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlantica, 2017.

GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E. S.; QUEIROZ, G. A. Piperaceae. **Flora do Brasil 2020, em construção**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12735>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**: número 1, 2. ed. Rio de Janeiro, 2012.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

KALLSCHEUER, N.; CLASSEN, T.; DREPPER, T.; MARIENHAGEN, J. Production of plant metabolites with applications in the food industry using engineered microorganisms. **Current opinion in biotechnology**, v. 56, p. 7-17, 2019.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das Plantas Vasculares**. Lisboa: Fundação Galouste Gulbenkian, 1951, v. 1, 296p.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General principles of antimicrobial therapy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 2, p. 156-167, 2011.

LI, F.; WANG, Y.; LI, D.; CHEN, Y.; DOU, Q. P. Are we seeing a resurgence in the use of natural products for new drug discovery?. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 5, p. 417-420, 2019.

LIPORACCI, H. S. N. **Plantas Medicinais e Alimentícias na Mata Atlântica e Caatinga: Uma Revisão Bibliográfica de Cunho Etnobotânico**. 2014. 329 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos, Algas e Plantas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LOPES, J. J.; MARX, C.; INGRASSIA, R.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P.; FERRAZ, A. B. F. Neurobehavioral and toxicological activities of two potentially CNS-acting medicinal plants of *Piper* genus. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, p. 9-14, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016, 987p.

MARTINELLI, L.; ROSA, J. R.; FERREIRA, C. S. B.; NASCIMENTO, G. M. L.; FREITAS, M. S.; PIZATO, L. C.; SANTOS, W. O.; PIRES, R. F.; OKURA, M. H.; MALPASS, G. R. P.; GRANATO, A. C. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight *Pepper* species. **Ciência Rural**, v.47, n.5, 2017.

MATIAS, E. F. F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC. (Erva-baleeira).** 2011. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato – CE, 2011.

MATOS F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** 3. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2009.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; CARNEIRO, J. N.; MACHADO, A. J.; SALES, D. L.; BRITO, D. I.; ALBUQUERQUE, R. S.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; JÚNIOR, J. T. C.; SOUZA, D. S. L.; LIMA, E. O.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; FERREIRA, F. S.; COUTINHO, H. D. M. High-performance liquid chromatography-diodic array detector, fungistatic, and anti-morphogenical analysis of extracts from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. against yeasts of the genus *Candida*. **International journal of food properties**, v. 19, n. 8, p. 1837-1851, 2016.

MUÑOZ, P.; GIANNELLA, M.; FANCIULLI, C.; GUINEA, J.; VALERIO, M.; ROJAS, L.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; BOUZA, E. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1538-1545, 2011.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NIST. **Chemistry Webbook.** LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. (Org.). Disponível em: <<http://webbook.nist.gov>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.** Estados Unidos: Pensilvânia, 2003. 6. ed. NCCLS document M7-A6.

PIERONI, A. Traditional uses of wild food plants, medicinal plants, and domestic remedies in Albanian, Aromanian and Macedonian villages in South-Eastern Albania. **Journal of Herbal Medicine**, v. 9, p. 81-90, 2017.

PYNE, M. E.; NARCROSS, L.; MARTIN, V. J. Engineering plant secondary metabolism in microbial systems. **Plant physiology**, v. 179, n. 3, p. 844-861, 2019.

REZENDE, F. M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; DE CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. In: PEÑA H, M. *et al.*, (Org.). **VI Botânica no Inverno.** São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. 2016. p. 93.

RUSCHEL, D. **O gênero *Piper* (Piperacea) no Rio Grande do Sul**. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F.; YEN, K. H.; SIRAT, H. M. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, n. 11, p. 7720-7731, 2011.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T. B.; FIDALGO, L.M.; MARTORELL, M.; SETZER, W.M. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. M. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARTO, M. P. M.; JUNIOR, G. Z. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, n. 1, 2018.

SHARIFZADEH, A.; KHOSRAVI, A. R.; SHOKRI, H.; TARI, P. S. Synergistic anticandidal activity of menthol in combination with itraconazole and nystatin against clinical *Candida glabrata* and *Candida krusei* isolates. **Microbial pathogenesis**, v. 107, p. 390-396, 2017.

SHARMA, J.; ROSIANA, S.; RAZZAQ, I.; SHAPIRO, R. S. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 17, 2019.

SAVITHRAMMA, N.; RAO, M. L.; SUHRULATHA, D. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 579-584, 2011.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I. M.; BRANCO, J.; MONTEIRO-SOARES, M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 205, 2015.

SILVA, D. F. **Avaliação da atividade biológica de β - citronelol sobre *Candida albicans*.**, 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017, 502p.

SÕUKAND, R.; HRYNEVICH, Y.; PRAKOFJEW, J.; VALODZINA, T.; VASILYEVA, I.; PACIUPA, J.; SHRUBOK, A.; HLUNSKO, A.; KNUREVA, Y.; LITVINAVA, Y.; VYSKVARKA, S.; SILIVONCHYK, H.; PAULAVA, A.; KÕIVA, M.; KALLE, R. Use of

cultivated plants and non-plant remedies for human and animal home-medication in Liubań district, Belarus. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 13, n. 1, p. 54, 2017.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; FURTADO, N. A. J. C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v.32, p.498-502, 2009.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia Médica**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

TINTINO, S. R.; DA CUNHA, F. A. B.; DOS SANTOS, K. K. A.; DE MELO GUEDES, G. M.; SOUZA, C. E. S.; MATIAS, E. F. F.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; ANDRADE, J. C.; COSTA, J. G. M.; FREITAS, M. A.; COUTINHO, H. D. M. Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus Cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

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

_____. _____. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VIEIRA, S. C. H.; PAULO, L. F. D.; SVIDZINSKI, T. I. E.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; SOUZA, A. D.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antifungal activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1001-1006, 2011.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de clewenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.1, n. 1, p. 77-81, 1963.

WILEY REGISTRY OF MASS SPECTRAL DATA. 6. ed. New York: Wiley Interscience, 1994.