



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADE MODULATÓRIA DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE
PIPERACEAE EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS FRENTE A
Staphylococcus aureus E *Escherichia coli***

JOÃO VYCTOR CALIXTO DE OLIVEIRA SANTOS

MANAUS/AM

ABRIL/2024

JOÃO VYCTOR CALIXTO DE OLIVEIRA SANTOS

**ATIVIDADE MODULATÓRIA DE ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE
PIPERACEAE EM ASSOCIAÇÃO A ANTIBIÓTICOS FRENTE A
Staphylococcus aureus E *Escherichia coli***

.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, exigida para o título de Mestre
em Biotecnologia com ênfase na Linha de
Pesquisa de Produtos Naturais.

PROFA. DRA. RITA DE CÁSSIA SARAIVA NUNOMURA
(ORIENTADORA)

PROFA. DRA. ANTONIA QUEIROZ DE SOUZA (COORIENTADORA)

MANAUS/AM 2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237a Santos, João Vyctor Calixto De Oliveira
Atividade modulatória de óleos voláteis de espécies de
piperaceae em associação a antibióticos frente a staphylococcus
aureus e escherichia coli / João Vyctor Calixto De Oliveira Santos .
2024
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita De Cássia Saraiva Nunomura
Coorientadora: Antonia Queiroz De Souza
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Piper spp. 2. resistência microbiana. 3. óleo essencial. 4.
nerolidol. I. Nunomura, Rita De Cássia Saraiva. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

Este estudo é dedicado em memória de
Alan Nunes Soares, saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pelo dom da vida e pela força que me foi dada, resiliência e persistência para conseguir continuar essa pesquisa e pela saúde física e mental, por me proteger mesmo eu sendo muito inconsequente.

Quero agradecer também à minha mãe Angelita Calixto de Oliveira e ao meu pai Geovani Pinto dos Santos que estiveram me apoiando durante todo o tempo com confiança, amor, força e dedicação que foram indispensáveis nessa jornada.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura que de boa vontade aceitou me guiar durante todo o período do mestrado e pela paciência em relação as minhas correções e pelo espaço cedido para realização da pesquisa no LAEQ Aos amigos do Richard, Ingridy, e André principalmente a minha grande amiga Brenda na qual em meio a tantas brigas sempre me deu suporte e me ajudou principalmente em consultas locais.

Quero agradecer imensamente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico por ter me concedido uma bolsa de mestrado que me proporcionou cursar minhas disciplinas e terminar minhas pesquisas, ao PPGBIOTEC por ser um excelente programa no qual eu escolhi cursar esse mestrado, a UFAM pelo espaço e por todo o apoio que a faculdade me deu diretamente e indiretamente.

Minha coorientadora. Antonia Queiroz de Souza que me ajudou em todos os testes microbiológicos dando suporte técnico e pelo espaço cedido para realização da pesquisa no LAMICRA a todos os meus amigos do LAMICRA, aproveitando também para agradecer a Philippe Defáveri Bieler pelo apoio técnico. Ao Dr Felipe Moura Araujo da Silva pelo apoio do e pelo espaço no LABCG onde realizou as análises de CG-EM ao professor Prof. Dr Sergio Nunomura no qual realizou as análises de CG-FID a Prof. Dra. Micheline Carvalho Silva que ajudou na identificação as espécies de *Piper* ao mateiro Edmilsom pela ajuda na maioria das coletas.

À minha prima que amo muito Esnandia Andreia na qual chamo carinhosamente de boneca que me recebeu muito bem em minha estadia em Manaus e me levou para diversos passeios, a república que tiver o prazer colossal de morar lúrio Amsterdam e aos amigos Fiona, Hella, Érico, Lucas, Sipko, Mario.

A banca de qualificação e defesa final que fizeram observações para o meu enriquecimento profissional e para a melhora da presente pesquisa Prof. Dr Geone, Prof. Dr Alison, Prof. Dra Maria da Paz, Prof. Dra Cecilia.

Aos meus amigos que me acompanham em minha jornada acadêmica, torcendo pelo meu sucesso mandando energia positiva e me acalmando em momentos de crises Alissom Avelino, Mateus Texeira, Charleandro, Márcio Leonardo, Juvenal, Andressa Mota, Maria Helena, Alan Nunes, Alan Kardec, Malaquias, Yan Pablo, Caio Brehme, Lucas Carvalho, Vitinho, Ajeroan, André Vitor.

Aos times no qual eu joguei no período do mestrado AMZ e Aranha basquete

E a todas as pessoas que me arrancaram um sorriso sincero me ajudaram mesmo sem eu saber, me olharam com compaixão ou sentiram um carisma que sinceramente eu acho que não tenho, foram gentis comigo mesmo quando estavam magoadas ou estressadas por quaisquer motivos, me acalmaram e não se estressaram comigo mesmo quando eu só tinha pressa e ansiedade o meu muito obrigado.

RESUMO

Na pandemia de COVID-19, houve um aumento excessivo no uso de antibióticos, resultando em graves consequências no que diz respeito à resistência dos microrganismos. Uma das alternativas da comunidade científica para combater esses microrganismos resistentes tem sido investigar possíveis protótipos de fármacos em produtos de origem natural, especialmente de espécies vegetais. Na família Piperaceae, os óleos essenciais do gênero *Piper* têm sido amplamente investigados por seus efeitos antimicrobianos, antioxidantes e inseticidas. Considerando esses fatos, este trabalho objetivou o estudo da composição química dos óleos essenciais (OE) de *Piper brachypetiolatum* e *Piper tuberculatum*, nativos da Amazônia, e sua ação antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para isso, as folhas de *P. brachypetiolatum* e *P. tuberculatum* foram submetidas à hidrodestilação em Clevenger e posteriormente analisadas por GC-MS e GC-FID. O rendimento de OE de *P. brachypetiolatum* foi de 0,85% e através da análise por GC-MS foram detectados 12 compostos, sendo os principais componentes o nerolidol (24,51%) e o hinesol (23,55%). O OE de *P. tuberculatum* apresentou rendimento de 0,17% e através da análise por GC-MS foram detectados 11 compostos, onde seu principal componente foi o β -cariofileno (53,35%). Além disso, os óleos obtidos foram submetidos a micro diluição em poços e concentração inibitória mínima realizados de acordo com CLSI (2021) para investigar seu potencial antimicrobiano. O OE de *P. brachypetiolatum* apresentou ação antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* (CBAM 324) e *Escherichia coli* (CBAM 02), com zona média de inibição de 17 e 13 mm, respectivamente. O OE de *P. tuberculatum* não apresentou ação antimicrobiana e não foi dado prosseguimento para testes subsequentes. Em contrapartida, o OE de *P. brachypetiolatum* apresentou CIM de 2 mg/mL contra *S. aureus* e *E. coli*. Nos testes de atividade modulatória, o OE foi testado associado aos antibióticos cujas cepas apresentaram resistência, tendo como resultado uma atividade conjunta, sugerindo uma ação sinérgica do óleo e dos antibióticos. Estes resultados indicam que o óleo essencial de *P. brachypetiolatum* é promissor contra cepas resistentes.

PALAVRAS-CHAVE: *Piper* spp., resistência microbiana, óleo essencial, nerolidol, CG.

ABSTRACT

During the COVID-19 pandemic, there was an excessive increase in the use of antibiotics, resulting in serious consequences regarding microbial resistance. One of the scientific community's alternatives to combat these resistant microorganisms has been to investigate potential drug prototypes in natural products, particularly from plant species. In the Piperaceae family, essential oils from the *Piper* genus have been widely investigated for their antimicrobial, antioxidant, and insecticidal effects. Considering these facts, this study aimed to investigate the chemical composition of the essential oils (EO) from *Piper brachypetiolatum* and *Piper tuberculatum*, native to the Amazon, and their antimicrobial action against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. To achieve this, the leaves of *P. brachypetiolatum* and *P. tuberculatum* were subjected to hydrodistillation in Clevenger and subsequently analyzed by GC-MS and GC-FID. The EO yield of *P. brachypetiolatum* was 0.85%, and GC-MS analysis detected 12 compounds, with the main components being nerolidol (24.51%) and hinesol (23.55%). The EO of *P. tuberculatum* had a yield of 0.17%, and 11 compounds were detected by GC-MS analysis, with its main component being β -caryophyllene (53.35%). Additionally, the obtained oils were subjected to microdilution in wells and minimum inhibitory concentration performed according to CLSI (2021) to investigate their antimicrobial potential. The EO of *P. brachypetiolatum* exhibited antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus* (CBAM 324) and *Escherichia coli* (CBAM 02), with average inhibition zones of 17 and 13 mm, respectively. The EO of *P. tuberculatum* showed no antimicrobial activity and was not further tested. On the other hand, the EO of *P. brachypetiolatum* exhibited a MIC of 2 mg/mL against *S. aureus* and *E. coli*. In the modulatory activity tests, the EO was tested in combination with antibiotics to which the strains showed resistance, resulting in a joint activity, suggesting a synergistic action of the oil and antibiotics. These results indicate that the essential oil of *P. brachypetiolatum* is promising against resistant strains.

KEYWORDS: *Piper* spp., microbial resistance, essential oil, nerolidol, GC.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	Justificativa.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1	Piperaceae.....	20
3.2	O gênero <i>Piper</i>	21
3.3	<i>Piper brachypetiolatum</i>	23
3.4	<i>Piper. tuberculatum</i>	24
3.5	Óleo essenciais	25
3.6	Técnicas analíticas de separação	26
3.6.1	Cromatografia em Fase Gasosa.....	26
3.7	Bactérias resistentes antimicrobianos.....	28
3.7.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.7.2	<i>Escherichia coli</i>	30
3.8	Atividade modulatória.....	30
3.8.1	Sinergismo	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	Objetivo geral.....	32
4.2	Objetivos específicos.....	32
5	METODOLOGIA.....	33
5.1	Coleta e preparação de material botânico	33
5.2	Material vegetal do gênero <i>Piper</i>	33
5.3	Extração dos óleos essenciais.....	35
5.4	Cálculo do rendimento dos óleos essenciais	35
5.5	Caracterização química	36
5.6	Preparação da solução-estoque ensaio antimicrobiano	37

5.7	Cepas bacterianas	38
5.8	Antibiograma.....	38
5.9	Difusão em poços	39
5.10	Determinação da concentração inibitória mínima.....	39
5.11	Teste Atividade modulatória	40
5.12	Análise estatística.....	40
6	Resultados e discussão	41
6.1	Rendimento do óleo essencial das folhas de <i>Piper</i>	41
6.2	Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de <i>P. brachypetiolatum</i>	42
6.3	Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de <i>P. tuberculatum</i>	46
6.4	Antibiograma.....	49
6.5	Difusão em poços	50
6.6	Concentração inibitória mínima	51
6.7	Testes de ação modulatória	53
7	Considerações finais	55
8	Referências	55
	Anexos.....	64

LISTA DE IMAGENS

Figura 1. Domínio fitogeográfico do gênero <i>Piper</i> .	21
Figura 2. Galho coletado de <i>Piper brachypetiolatum</i>	24
Figura 3. Galho de <i>Piper tuberculatum</i>	25
Figura 4. Partes dos componentes da instrumentação de um cromatógrafo gasoso	26
Figura 5. Exsicata <i>P. brachypetiolatum</i>	34
Figura 6. Exsicata <i>Piper tuberculatum</i>	34
Figura 7. Equipamento de extração de óleo essencial	35
Figura 8. Cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas.	36
Figura 9. Discos para a realização de antibiogramas contendo concentrações padrões de antibióticos	39
Figura 10. Substâncias de <i>P. brachypetiolatum</i> identificadas por CG-MS	45
Figura 11. Gráfico classe das substâncias do óleo essencial extraído das folhas de <i>P. brachypetiolatum</i> .	46
Figura 12. Substâncias de <i>P. brachypetiolatum</i> identificadas por CG-EM:	48
Figura 13. Gráfico classe das substâncias do óleo essencial extraído das folhas de <i>P. tuberculatum</i> .	49
Figura 14. Resultado dos testes de antibiogramas frente as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	50
Figura 15. Resultado da difusão em poços frente cepa <i>S. aureus</i>	51
Figura 16. Esquematização do teste de Concentração inibitória mínima para as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	52
Figura 17. Teste de Concentração inibitória mínima para as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	53
Figura 18. Resultado do teste de ação modularia para a cepa de <i>E. coli</i>	54
Figura 19. Resultado do teste de ação modularia para a cepa de <i>S. aureus</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes químicos de diferentes espécies de <i>Piper</i>	22
Tabela 2 – Tabela de Rendimentos dos óleos essenciais obtidos de <i>P. brachypetiolatum</i> e <i>Piper tuberculatum</i>	42
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de <i>P. brachypetiolatum</i> por (CG-EM)	43
Tabela 4 – Composição química do óleo essencial de <i>P. brachypetiolatum</i> por (CG-FID)	45
Tabela 5 – Composição química do óleo essencial de <i>P. tuberculatum</i> por (CG-EM)	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ATM	Aztreonam
AZI	Azitromicina
CAZ	Ceftazidima
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CG	Cromatografia gasosa
CG-FID	Cromatografia em fase gasosa com detector por Ionização de chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIP	Ciprofloxacina
CLI	Clindamicina
CLO	Cloranfenicol
COM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
DMSO	Dimetilsufóxido
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERI	Eritromicina
GEN	Gentamicina GEN
IR	Índice de retenção
LABMICRA	Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Amazônia

LNZ	Linezolida LNZ
MPM	Meropenem MPM
OE	Óleo essencial
OXA	Oxacilina OXA
PEN	Penicilina G
RIF	Rifampicina
S.A	<i>Staphylococcus aureus</i>
SUT	Sulfazotrim Sulfametoxazol/ Trimetoprim
TET	Tetraciclina
VAN	Vancomicina

1 INTRODUÇÃO

Na pandemia de COVID-19, em busca por tratamento, ocorreu uma prescrição excessiva de antibióticos, resultando no aumento do uso desses medicamentos sem prescrição adequada. Esse uso inadequado teve impactos expressivos na resistência bacteriana gerando consequências graves quanto à essa problemática na qual vinha em décadas em uma curva crescente se tornou ainda mais preocupante (CONFESSOR *et al.*, 2021).

O aumento da resistência bacteriana frente aos fármacos disponíveis no mercado, somado ao alto índice de contaminações bacterianas por ingestão de alimentos ou em hospitais, leva a comunidade científica a buscar novos fármacos eficientes contra as cepas bacterianas associadas a essas infecções (DURAND *et al.*, 2019).

Na busca por novos fármacos, os produtos naturais se destacam pela sua diversidade, em especial os metabólitos secundários em relação aos seus metabólitos secundários, os quais apresentam funções ecológicas e farmacológicas (GIORDANI *et al.*, 2008). As principais classes desses metabólitos são os alcaloides, terpenoides e as substâncias fenólicas, responsáveis pelo crescimento e pela proteção de vegetais, tornando-os fortes candidatos na descoberta de princípios ativos (FELIPE; BICAS, 2017; FUMAGALI *et al.*, 2008).

Por meio da fitoquímica é possível identificar substâncias químicas que fazem parte do metabolito secundário de plantas de interesse farmacológico essa identificação pode ter cunho etnofarmacológico ou quimiotaxonomico. Assim, a identificação de substâncias naturais apresenta importância na inovação biotecnológica, principalmente no Brasil, onde se encontra a maior floresta tropical do mundo, a Floresta Amazônica (STEHMANN; SOBRAL, 2017; SIMÕES *et al.*, 2017; MIRANDA, 2020).

Em uma visão biotecnológica da flora amazônica gênero *Piper*, se destaca em estudos fitoquímicos, das quais foram isoladas várias classes de metabólitos secundários, alguns com ação biológica e de interesse farmacológico, tais como: amidas, propenilfenóis, esteroides, kavalactonas, chalconas, lignanas, neolignanas, terpenos, diidrochalconas, flavonas e flavononas (PARMAR *et al.*, 1997).

Dentre as espécies do gênero *Piper* com potencial biológico distribuídas na Floresta Amazônica, destacam-se as espécies *Piper erectipillum*, *P. bartlingianum*, *P. alatabaccum*, *P. baccans* e *P. humillimum*. A espécie *P. aduncum* é facilmente encontrada nas florestas brasileiras, sendo que a Amazônia abriga boa parte da distribuição da família dentre todas os biomas, ocorrendo atualmente cerca de 2.600 espécies, distribuídas em cinco gêneros, com representação geográfica em regiões tropicais (GUIMARÃES, 2004; GARCIA, 2005).

As espécies *Piper brachypetiolatum* Yunck e *Piper tuberculatum* Jacq. se destacam por apresentarem uma grande quantidade de sesquiterpenos em seus óleos essenciais. Parte desses sesquiterpenos atuam na fisiologia vegetal como fitoalexinas e estão presentes principalmente na composição dos óleos essenciais, atuando como "antibióticos" produzidos pelas plantas e agentes contra herbívoros (ARAÚJO, *et al* 2021; THOLL, 2006). Considerando que muitos sesquiterpenos podem apresentar atividade antimicrobiana, este trabalho visou obter os óleos essenciais de *P. brachypetiolatum* e *P. tuberculatum* e seus efeitos modulatórios quando em combinação com antimicrobianos utilizados na prática clínica.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos feitos sobre a genética envolvida na resistência bacteriana revelaram que a resistência é um processo natural. No entanto, esse fenômeno, acelerado pelo uso inadequado dos antibióticos, tem provocado uma pressão seletiva que permite a seleção de bactérias naturalmente resistentes (MOREHEAD; SCARBROUGH, 2018). Devido à resistência dos microrganismos aos antibióticos, há uma necessidade de pesquisas para descobertas de novos fármacos, onde os óleos voláteis possuem um potencial muito grande devido a seus metabólitos secundários, que podem apresentar propriedades antimicrobianas (CAUMO *et al.*, 2010).

A floresta Amazônica possui uma grande diversidade de plantas medicinais que podem ser fonte de variadas propriedades farmacológicas. Tais substâncias são utilizadas pela população para uma série de enfermidades, como problemas estomacais, micoses, problemas cardíacos e até mesmo como tônicos (MIRANDA, 2020). Algumas espécies da família Piperaceae são utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças venéreas, problemas intestinais, epilepsia e como contraceptivo (SAMAIN, *et al* 2010). Esta família se caracteriza quimicamente por substâncias promissoras como alcaloides, flavonoides, arilpropanoides, terpenoides e constituintes fenólicos e tem ampla ocorrência na Floresta Amazônica (Macedo, *et al.*, 2017; SALEHI, 2019)

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais esta correlacionada com a presença de elementos constituintes como hidrocarbonetos monoterpênicos e ésteres terpênicos. Estes componentes, mediante suas concentrações variáveis nos óleos essenciais, apresentam propriedades antimicrobianas distintas, cuja eficácia está intrinsecamente vinculada à permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana. Tal interação promove a lise celular, sendo que, em virtude dessas características particulares, os óleos essenciais podem exercer efeitos inibitórios ou não sobre o crescimento microbiano, (SANTURIO, 2011; MORO *et al.*, 2015)

Estudos sobre a ação conjunta de óleos essenciais combinados com agentes antimicrobianos indicados para infecções mostram um resultado promissor, onde há um sinergismo com as drogas (BETONI *et al.*, 2006). Considerando o potencial dos óleos essenciais da família Piperaceae como antimicrobianos e o possível sinergismo com antibióticos do mercado, este trabalho buscou realizar a caracterização química e verificar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de duas espécies da família Piperaceae em

conjunto com antibióticos comerciais, tendo em vista que a as espécies utilizadas são utilizadas de forma empírica pela população.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Piperaceae

A família Piperaceae atualmente inclui cerca de 3.700 espécies, distribuídas em cinco gêneros, com representação geográfica em regiões tropicais. No Brasil, os representantes da família destacam-se devido à sua diversidade, apresentando cerca de 500 espécies, sendo a maioria distribuída na Mata Atlântica, seguida pela Amazônia (JARAMILLO *et al.*, 2004; WANKE *et al.*, 2006; FLORA DO BRASIL, 2022).

Na Floresta Amazônica, a maioria das parcelas dos exemplares estudados da Família Piperaceae do gênero *Piper* relatados são registrados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, destacando as espécies *P. erectipillum*, *P. bartlingianum*, *P. alatabaccum*, *P. baccans* e *P. humillimum*. Além dessas, podem ser encontradas espécies como *P. amapaense*, *P. brachypetiolatum*, *P. consanguineum*, *P. demeraranum*, *P. froesii*, *P. negroense* e *P. pseudoglabrescens* (GARCIA, 2005).

As espécies da família Piperaceae variam de árvores de pequeno porte, arbustos, trepadeiras e ervas terrestres. Apresentam folhas simples, dispostas alternada ou opostamente, ocorrendo em formatos arredondados, ovais, oblongos, elípticos, cordados e raramente sagitados. A inflorescência, na maioria das espécies, é classificada como terminal, possuindo pequenas flores que se tornam espigas variadas em tamanho e formato de acordo com a espécie. No entanto, também podem se apresentar como opostas às folhas ou axilares. Quanto à reprodução, ocorre de forma dioica, e hermafrodita (TEBBS, 1989, TEBBS 1990).

Estudos utilizando *Piper callosum* destacaram que seu óleo essencial foi efetivo na inibição do crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* de maneira moderada. Esses efeitos estão relacionados aos altos teores de safrol encontrados em seu óleo essencial ou pelo efeito sinérgico entre seus componentes majoritários (QUEIROZ, 2021).

Os extratos e o óleo essencial de *P. aduncum*, estudados *in vitro* e *in vivo*, apresentaram elevado potencial inceticida devido a seus OE serem ricos em metabólitos secundários bioativos, como o dilapiol (MORAIS *et al.*, 2023).

A espécie *P. aduncum* tem se mostrado uma planta bastante promissora, necessitando de estudos mais aprofundados sobre seus mecanismos de ação que possam

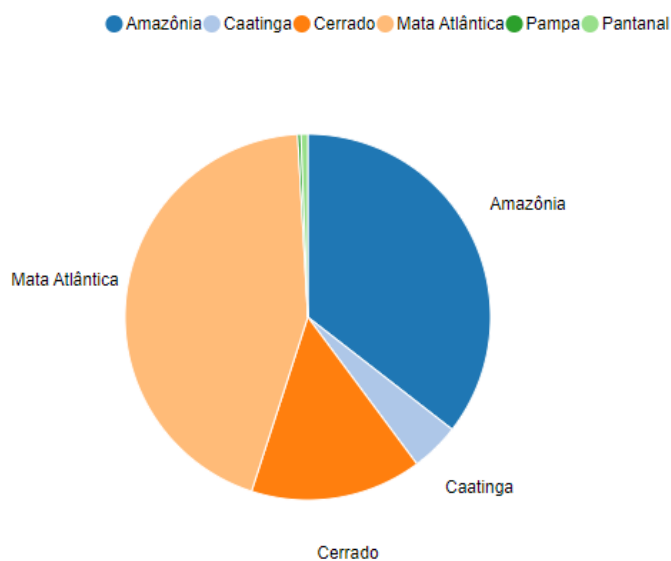
resultar em excelentes atividades biológicas contra diversos alvos, conforme descrito na literatura (QUEIROZ, 2021 MORAIS *et al.*, 2023).

A família Piperaceae também é extensivamente explorada quanto ao potencial inseticida e larvicida, com várias espécies apresentando tais atividades, incluindo *Piper dilatatum*, *Piper hostmannianum*, *Piper umbellatum* e *Piper alatabaccum* (SANTANA, 2012; DE ALBUQUERQUE, 2020; OLIVEIRA, 2021).

3.2 O gênero *Piper*

O gênero *Piper* abrange plantas de uma variedade, incluindo ervas, subarbustos, arbustos, arvoretas, lianas e epífitas, com representantes rupícolas ou terrestres, distribuídos principalmente na Mata Atlântica e Floresta Amazônica. (Figura 1) A maioria dos representantes é aromática, possuindo glândulas visíveis ou translúcidas. Suas folhas podem ser alternas, opostas ou verticiladas, simples, inteiras, variando em forma, consistência, tamanho e padrão de nervura, com nervuras secundárias atingindo a porção mediana, abaixo ou até o ápice (GUIMARÃES *et al.*, 2004).

Figura 1. Domínio fitogeográfico do gênero *Piper*.



Fonte: REFLORA (2023)

As espécies do gênero *Piper* são bastante diversificadas sendo utilizadas em medicina e ornamentação. No entanto, a principal característica do gênero é sua diversidade morfológica e fisiológica, que o torna apto a fornecer metabólitos secundários

de interesse farmacológico como se pode visualizar na (tabela 1). Isso destaca a importância deste gênero pertencente à família Piperaceae (CELESTINO *et al.*, 2016).

Tabela 1. Componentes químicos de diferentes espécies de *Piper*.

Espécies de <i>piper</i>	Perfil Químico
<i>P. nigrum</i>	sabineno, limoneno, cariofileno, pineno, pineno, (<i>E</i>)-cariofileno, óxido de cariofileno, sabineno, limoneno.
<i>P. aduncum</i>	β -pineno, (<i>E</i>)-cariofileno, santolitríeno, limoneno.
<i>P. marginatum</i>	iso-elemicina, apiol, guaíeno, (<i>E</i>)-cariofileno.
<i>P. hispidinervum</i>	safrol, α -pineno, δ -3-careno, α -terpinoleno.
<i>P. bellidifolium</i>	(<i>E</i>)-nerolidol, aromadendreno, α -copaeno, hinesol, longifoleno, acoradieno.
<i>P. acutilimbum</i>	γ -eudesmol, germacreno, α -muurolol, β -longipineno, 1- <i>epi</i> -cubenol.
<i>P. consanguineum</i>	γ -eudesmol, γ -cadineno, (<i>E</i>)-nerolidol, α -muurolol.
<i>P. durilignum</i>	limoneno, β -cariofileno, (<i>E</i>)-nerolidol, <i>epi</i> - α -cadinol, linalol.
<i>P. xylosteroides</i>	Terpineno.
<i>P. arboreum</i>	biciclogermacreno, β -eudesmol, óxido cariofileno.
<i>P. dilatatum</i>	β -ocimeno, β -cariofileno.
<i>P. vicosanum</i>	d limoneno, 1,8 cineol.
<i>P. crassinervium</i>	α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, linalool.
<i>P. cernuum</i>	β -cariofileno, β -dihidroagarofurano, elemol, 10- <i>epi</i> -eudesmol.
<i>P. mikanianum</i>	safrol.

<i>P. goesii</i>	(E)-cariofileno, germacreno, α -farneseno
<i>P. hispidum</i>	γ -cadineno, campheno, α -guaieno, γ -elemeno
<i>P. hoffmannseggianum</i>	β -cariofileno, 10- <i>epi</i> - γ -eudesmol, hinesol.
<i>P. mollicomum</i>	(E)-nerolidol, farnesol.
<i>P. gaudichaudianum</i>	α -humuleno, β -cariofileno
<i>P. carniconectivum</i>	óxido cariofileno, spatulenol, β -pineno.
<i>P. dactylostigma</i>	α -cadinol.
<i>P. plurinervosum</i>	α -cadinol
<i>P. cavalcantei</i>	safrole, metileugenol.
<i>P. vitaceum</i>	limoneno, <i>p</i> -cimeno, nerolidol

Fonte: (MACHADO *et al.*, 1994; VON POSER *et al.*, 1994; TORQUILHO *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2001; ESTRELA *et al.*, 2006; ALMEIDA., 2007; FACUNDO *et al.*, 2008; SANTOS, *et al.*, 2012; BAY-HURTADO, 2016 LUZ *et al.*, 2020; DE MELO, 2021; ARAUJO *et al.*, 2021)

Os estudos de metabólitos secundários das plantas estão em constante crescimento, sendo esses compostos importantes devido aos diversos papéis que desempenham na adaptação das plantas a diferentes ambientes, além de apresentarem funções farmacológicas de interesse humano (FUMAGALI *et al.*, 2008).

Estudos sobre a composição química do óleo essencial de *Piper malacophyllum* identificaram 28 compostos de natureza terpênica, sendo a cânfora o constituinte majoritário, conforme evidenciado nos trabalhos de Bay-Hurtado *et al.* (2016). Já o óleo essencial de *Piper marginatum* apresentou fenilpropanoides, sesquiterpenos e monoterpenos como os principais componentes químicos, ressaltando a riqueza de variedades de compostos nos óleos essenciais desse gênero conforme Santos *et al.* (2012).

3.3 *Piper brachypetiolatum*

A espécie *P. brachypetiolatum* caracteriza-se como um arbusto compacto e densamente coberto por tricomas crespos, medindo 0,3 mm de comprimento, torcido. O pecíolo apresenta uma densa cobertura crespo-pubescente, enquanto a lâmina foliar exibe uma base assimétrica, com o lado mais curto terminando em uma ponta aguda e o lado mais longo agudo ou obtuso. A face adaxial da folha pode ser glabra ou apresentar tricomas esparsos ao longo da nervura mediana e em direção às margens, enquanto a face

abaxial é caracterizada por uma cobertura crespo-pubescente nas nervuras. O número de nervuras secundárias varia de 5 a 8, e o pedúnculo é densamente coberto por tricomas crespo-pubescentes, suportando uma espiga de 2 cm de comprimento (Figura 2) (FLORA DO BRASIL, 2022).

Em análise de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas dos óleos das folhas de *Piper brachypetiolatum* revelaram uma predominância de sesquiterpenos, porém até o presente momento esse é o único estudo sobre a composição química dessa *Piper*. Quanto à ação antioxidante, o estudo indica que a espécie *Piper brachypetiolatum* possui compostos bioativos antioxidantes, mostrando um potencial promissor para futuras pesquisas utilizando bioensaios (ARAÚJO *et al.*, 2021).

Figura 2. Galho coletado de *Piper brachypetiolatum*



Fonte: Autor 2023

3.4 *Piper. tuberculatum*

A *Piper tuberculatum* exibe um hábito arbustivo, atingindo uma altura de 2-2,5 metros, com ramos pubérulos. Suas folhas apresentam bainha alada, pecíolo pubérulo de 0,5-1 cm de comprimento e lâmina oblongo-elíptica ou ovado-elíptica, medindo de 8 a 12,5 cm de comprimento por 4-6 cm de largura. A base é assimétrica, o ápice agudo, conferindo-lhes um aspecto brilhante, enquanto a face adaxial é glabra, e a face abaxial exibe pubescência nas nervuras. (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

As nervuras ascendentes, dispostas em 8-10 pares, são penínérveas e estendem-se até o ápice da lâmina. As espigas são eretas, apresentando um comprimento de 4-7 cm,

com pedúnculo medindo de 1 a 1,5 cm de comprimento. As bractéolas triangular exibem uma margem franjada. Quanto à estrutura reprodutiva, os estames são quatro. O fruto é uma drupa do tipo tetragonal, ovada e lateralmente comprimida, caracterizando-se pela ausência de pubescência e pela presença de três estigmas sésseis (Figura 3) (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Popularmente conhecida como pimenta d'ardo, pimenta longa ou, no Nordeste brasileiro, como pimenta de macaco, esta espécie encontra-se disseminada por todo o continente americano e nas Antilhas. No Brasil, ela é encontrada nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso, no nordeste brasileiro em algumas localidades essa *Piper* é utilizada na medicina popular como sedativo e antiofídico sendo comprovado ação antifúngicas de suas amidas. Estudo com o óleo essencial de *Piper tuberculatum* apontaram β -pineno, α -pineno e ocimeno como componentes majoritários (VASQUES et al., 2002; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; NAVICKIENE et al., 2006; CASTRO, 2007; FACUNDO et al., 2008)

Figura 3.Galho de *Piper tuberculatum*



Fonte: Autor (2022)

3.5 Óleo essenciais

Os óleos essenciais consistem em um conjunto de substâncias voláteis extraídas de diversas partes de plantas, como caules, cascas, folhas, raízes, frutos, flores e seiva.

Esses óleos, resultantes do metabolismo secundário das plantas, são compostos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, metabólitos que possuem características organolépticas (BIZZO; HOVEL; REZENDE, 2009).

A maioria dos óleos essenciais são compostos por substâncias classificadas monoterpenos, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, sendo que cada terpeno é constituído por duas ou mais unidades de isoprenila, formadas por sua vez por cinco carbonos (DE MORAIS, 2009 A; SANTURIO, 2011).

A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos. No entanto, a interação entre a planta e o ambiente, ou a planta e micro-organismos, bem como a interação com insetos, pode gerar alterações na produção dos metabólitos secundários dando aos mesmos características de interesse biológico (DE MORAIS, 2009 B).

3.6 Técnicas analíticas de separação

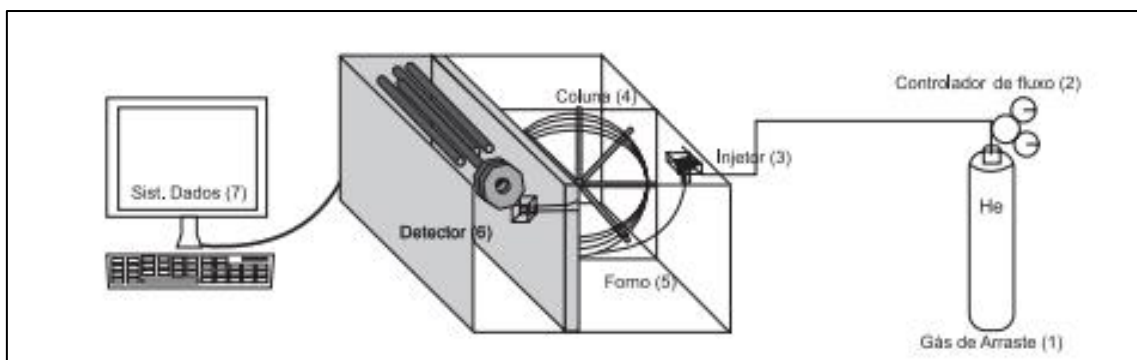
A cromatografia se destaca como um método de separação, sendo eficaz tanto na separação quanto na identificação de misturas. Quando associada a detectores e outras técnicas, como espectrofotometria e espectrometria de massas, essa técnica torna-se ainda mais potente e versátil, ampliando sua aplicabilidade para diversas misturas, incluindo os óleos voláteis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Existem uma variedade de técnicas cromatográficas, tendo em vista que a cromatografia é o processo na qual moléculas presentes em uma mistura complexa são separadas, sendo os principais critérios de classificação os diferentes mecanismos de separação e os tipos de fases utilizadas, que podem ser planar, líquida ou gasosa, dependendo da fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

3.6.1 Cromatografia em Fase Gasosa

A cromatografia gasosa é uma técnica que oferece alta capacidade de separação, sendo complementada por detectores, hardware e software adequados para sua aplicação em diferentes áreas (Figura 4), aplicada para análise de diversos tipos de amostras voláteis, seja petróleo e derivados, aromas naturais, óleos essenciais, alimentos e amostras ambientais (SKOOG; HOLLER; NIEMAN 2008).

Figura 4. Partes dos componentes da instrumentação de um cromatógrafo gasoso



(SKOOG, 2008).

Entre os métodos de análise química de produtos naturais, a cromatografia se destaca por efetuar a separação, identificação e quantificação de compostos químicos, sozinha ou juntamente com outras técnicas ou detectores, apresentando duas fases uma estacionária e uma móvel onde os componentes da amostra são distribuídos entre as duas e retidos na fase estacionária. A fase móvel na cromatografia gasosa é um gás de arraste, podendo ser o hélio, nitrogênio, hidrogênio ou argônio, a escolha de um gás de arraste não depende da amostra injetada, porém a escolha dele está diretamente ligada ao detector utilizado na análise, pelo fato de que alguns detectores possuem mais afinidades com determinados gases. (SKOOG, HOLLER; NIEMAN 2008; COLLINS, BRAGA, 1988).

Os reguladores de pressão e medidores de vazão estão acoplados diretamente nos cilindros de gás, onde no momento da análise deve haver uma vazão constante no qual todo o processo de cromatografia depende do controle e manutenção do fluxo de gás (SKOOG; HOLLER; NIEMAN 2008).

O sistema de injeção pode ser configurado para operação automática ou manual. No entanto, as práticas mais prevalentes envolvem a introdução da amostra através de uma micro-seringa equipada com uma agulha hipodérmica. Nesse procedimento, a amostra é inserida em um bloco metálico aquecido posicionado imediatamente na entrada da coluna (SKOOG; HOLLER; NIEMAN 2009).

Apesar da coluna cromatográfica ser responsável pela separação dos compostos das amostras, o dispositivo que indica e quantifica os componentes separados pela coluna é o detector, havendo uma série de detectores distintos na cromatografia gasosa, porém podemos separá-los por seletividade, alguns detectores respondem a qualquer substância e outros apenas a estruturas com determinado componente químico (AUGUSTO, 2000).

Um dos detectores mais utilizados na cromatografia gasosa é o *Flame Ionization Detector* (detector por ionização de chama), FID, que funciona graças à formação de íons durante a queima de uma substância orgânica que permite que a chama se torna uma condutora de eletricidade. Dentro do equipamento o gás de arraste, H₂, sai da coluna e se mistura com O₂ produzindo a queima. A chama resultante fica contida entre dois eletrodos, polarizados por uma voltagem constante. (AUGUSTO, 2000).

Ao eluir um composto orgânico, ele é incinerado e são formados íons na chama, onde passam a conduzir corrente elétrica. A corrente elétrica resultante, da ordem de PA, é amplificada e constitui o sinal cromatográfico, a grande maioria dos compostos orgânicos pode ser detectada pelo FID sendo este incapaz de identificar as substâncias não inflamáveis como (CCl₄, H₂O) (AUGUSTO, 2000).

Constituintes químicos presentes nos óleos essenciais de plantas são separados utilizando cromatografia gasosa, no qual de acordo como o método utilizado temos uma boa separação, bem como identificação da maioria das substâncias voláteis de óleos essenciais (VALENTIM DE AMORIM, 2019).

3.7 Bactérias resistentes antimicrobianos

A resistência aos beta-lactâmicos é preocupante, pois esses antibióticos são as principais referências no combate a bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Eles agem penetrando na célula bacteriana e interferindo na síntese de peptidoglicano da parede celular (DURAND *et al.*, 2019).

Os antibióticos são drogas capazes de interagir com bactérias causadoras de infecções. As primeiras substâncias descobertas eram produzidas por fungos e bactérias, mas essas drogas também podem ser sintetizadas em laboratórios farmacêuticos. Independentemente de sua origem, a função dos antibióticos é impedir ou dificultar a manutenção de um certo grupo de células vivas (OMS, 2012).

A atividade antimicrobiana de um fármaco está relacionada aos agentes bacteriostáticos e bactericidas. Os agentes bacteriostáticos são responsáveis pela inibição das atividades enzimáticas essenciais no metabolismo de bactérias e fungos, resultando em uma alteração celular, inibindo o desenvolvimento e a multiplicação. No entanto, esses agentes não causam ação letal imediata. Exemplos incluem clindamicina, cloranfenicol, tetraciclina e azitromicina. Por outro lado, os agentes bactericidas

produzem um rápido extermínio celular de bactérias, fungos, vírus e esporos, como exemplificado por Brandão (2012).

A ação de um antibacteriano pode ocorrer inibindo funções essenciais da célula, atingindo com uma molécula alvo e provocando a morte celular, inibindo a síntese da parede celular, síntese proteica, síntese de ácidos nucleicos e inibindo a síntese de metabólitos essenciais para o microrganismo (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2017).

No entanto, muitos microrganismos têm apresentado resistência a diversos antibióticos. Estudos sobre a genética envolvida na resistência bacteriana revelaram que essa resistência é considerada um processo natural, existindo mesmo sem intervenção humana. No entanto, esse fenômeno tem sido acelerado pelo uso inadequado de antibióticos em humanos, animais e na agricultura. Esse uso provoca uma pressão seletiva que permite a seleção de bactérias naturalmente resistentes (MOREHEAD; SCARBROUGH, 2018).

A resistência pode ser intrínseca, se a bactéria possuir características estruturais ou enzimáticas que levam à resistência a um determinado antibiótico, ou, na maioria das vezes, adquirida. A resistência adquirida refere-se a quatro grandes grupos: a alteração da permeabilidade ou do local de ação do antibiótico, bombas de efluxo e o mecanismo enzimático da degradação ou inativação do antibiótico (COSTA *et al.*, 2013).

A resistência natural é uma característica intrínseca de um microrganismo, ocorrendo sem exposição prévia ao antibiótico. O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies ajuda a escolher as estratégias de tratamento empírico (SANTURIO B *et al.*, 2011).

3.7.1 *Staphylococcus aureus*

O patógeno *Staphylococcus aureus* pertence ao grupo dos cocos, ou seja, bactérias de forma esférica, que se organizam em cachos de uva. São caracterizados pela coloração amarelada de suas colônias e são anaeróbicos facultativos, o que significa que são capazes de realizar suas atividades metabólicas tanto em ambientes com presença de oxigênio quanto na ausência deste gás (TORTORA BERDELL; CHRISTINE 2017).

As cepas de *S. aureus* crescem comparativamente bem sob condições de pressão osmótica elevada e baixa umidade, o que parcialmente explica por que podem prosperar

e sobreviver em secreções nasais, na pele, em alimentos e em feridas cirúrgicas (TORTORABERDELL; CHRISTINE., 2017).

A emergência de multirresistência do *S. aureus* a antibióticos em todo o mundo tem preocupado profissionais de saúde humana e animal. Os casos de mastite ocasionados por *S. aureus* assumem relevância para a saúde pública, uma vez que a ingestão de leite e/ou derivados contaminados pode desencadear a transferência de genes de resistência para seres humanos. Dentre as resistências a antimicrobianos em estafilococos, a mais preocupante em termos de saúde pública é a resistência à meticilina. Cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são frequentemente identificadas como causadoras de infecções hospitalares, inclusive em unidades de terapia intensiva (UTI) (INTRAKAMHA *et al.*, 2012).

3.7.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria que habita o intestino grosso dos vertebrados, desempenhando um papel benéfico ao auxiliar na produção de vitaminas e participar da digestão. No entanto, atualmente, ela é responsável por cerca de 30% dos casos de diarreia em países em desenvolvimento (TORTORABERDELL; CHRISTINE, 2017).

A espécie bacteriana *E. coli* é um dos habitantes mais comuns do trato intestinal humano. Sua presença na água e nos alimentos é uma indicação de contaminação fecal. Além disso, é um patógeno comum que pode causar infecções do trato urinário e produzir enterotoxinas responsáveis por provocar a diarreia (TORTORABERDELL; CHRISTINE, 2017).

Em trabalhos realizados por Montañez-Valverde *et al.* (2015), cepas de *E. coli* demonstraram uma forte resistência a medicamentos como a ciprofloxacina, o que preocupa a comunidade médica, uma vez que esse medicamento é referência no tratamento de infecções por *E. coli*. Pesquisas conduzidas por Diniz e Santos (2017) corroboram esses resultados, apresentando também os genes que estão envolvidos nessa resistência à ciprofloxacina.

3.8 Atividade modulatória

Atividade modulatória na farmacologia é a mudança de ação de algum fármaco quando administrado associado a outra substância, existem duas categorias distintas de atividades modulatórias ou de modulação no tratamento de doenças infecciosas. Quando

a substância empregada na combinação atua de maneira positiva, aumentando a atividade do antibiótico, caracteriza-se como um efeito sinérgico. Em contrapartida, quando há uma redução ou inativação da ação dos antibióticos diante da presença da substância, observa-se o efeito antagônico (CANTON, ONOFRE, 2010).

Agentes de modulação de resistência bacteriana são compostos que amplificam a eficácia de antibióticos contra cepas bacterianas resistentes. Essas combinações múltiplas de drogas são empregadas no enfrentamento da disseminação de bactérias patogênicas que desenvolveram resistência aos antibióticos. Diversas combinações antibióticas são avaliadas *in vitro* e subsequentemente aplicadas em ambientes clínicos (COUTINHO; SIQUEIRA; LIMA, 2008).

São frequentes casos de combinação, como a de penicilina com gentamicina, que não apenas são empregadas rotineiramente, mas também se estendem para a interação entre antibióticos e produtos naturais de origem vegetal. Essas combinações alteram a resposta dos antibióticos, resultando tanto no aumento da atividade antibiótica quanto na reversão da resistência bacteriana. (COUTINHO; SIQUEIRA; LIMA, 2008)

3.8.1 Sinergismo

De acordo com Wagner e Ulrich-Merzenich (2013), interações aditivas manifestam-se quando o efeito resultante da combinação de duas ou mais substâncias é equivalente à soma simples dos efeitos individuais dessas substâncias, quando isoladas. Por outro lado, interações sinérgicas são observadas quando o efeito gerado pela combinação de substâncias é superior ao que seria esperado com base na contribuição individual de seus componentes.

É importante destacar que determinadas substâncias de origem natural podem agir sinergicamente com fármacos já empregados clinicamente. Essa sinergia possibilita a redução das doses necessárias para alcançar o efeito desejado, resultando na minimização dos potenciais efeitos adversos associados ao tratamento. (CANTON, ONOFRE, 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a ação antimicrobiana e presença de atividade modulatória do óleo essencial de espécies de Piperaceae *Piper brachypetiolatum* e *Piper tuberculatum* quando em combinação a antibióticos convencionais utilizados no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar o potencial antibacteriano de óleos voláteis de espécies do gênero *Piper* sp.;
- Investigar o perfil fitoquímico dos óleos voláteis de *Piper brachypetiolatum* e *Piper tuberculatum*;
- Comparar o perfil antibacteriano e o perfil fitoquímico dos óleos voláteis de *P. tuberculatum* e *P. brachypetiolatum* com outras espécies do gênero *Piper* sp.
- Verificar o rendimento dos óleos voláteis de *P. tuberculatum* e *P. brachypetiolatum* e comparar com outras espécies do gênero *Piper* sp.
- Verificar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de *P. tuberculatum* e *P. brachypetiolatum*.
- Verificar o potencial de modulação dos óleos essenciais de *P. tuberculatum* e *P. brachypetiolatum* quando associado a antibióticos.

5 METODOLOGIA

5.1 Coleta e preparação de material botânico

O material botânico de *P. brachypetiolatum* (folhas e galhos) foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke ao decorrer do ramal do plantio do Pau-Rosa, (latitude 2°92'68"S e longitude 59°97'77"W) com a primeira coleta realizada no dia 19 de novembro de 2022 a segunda no dia 26 de fevereiro de 2023 uma terceira coleta foi realizada no dia 18 de outubro de 2023 período de seca.

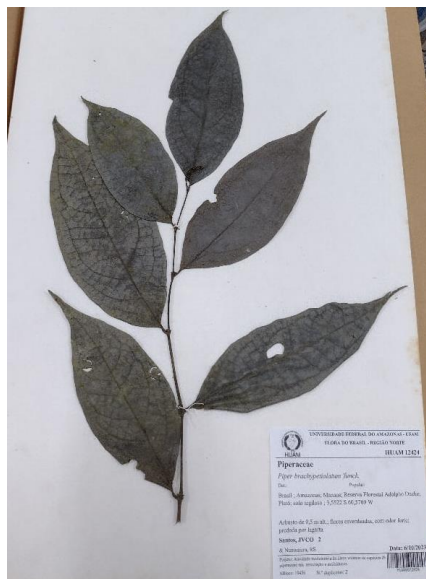
O material botânico de *Piper tuberculatum* (folhas e galhos) foi coletado no Museu da Amazônia (MUSA), localizado na cidade de Manaus – AM (latitude 3°00'75'Se longitude 59°03'97'O) com a primeira coleta realizada no dia 25 de novembro de 2022 e segunda no dia 28 de fevereiro de 2023.

Os exemplares de *P. brachypetiolatum* e *P. tuberculatum* foram coletados com o auxílio de uma tesoura de poda, e armazenadas em sacos plásticos de 100 litros e levadas até o laboratório de químicas da central analítica da UFAM, foi feita uma triagem do material separando galhos folhas e frutos, analisando também a saúde da planta e a presença de fungos e parasitas.

5.2 Material vegetal do gênero Piper

As amostras de *P. brachypetiolatum* e *Piper tuberculatum* foram identificadas pela Profa. Dra. Micheline Carvalho Silva do departamento de Botânica da Universidade de Brasília e no Herbário da Universidade Federal do Amazonas. As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Amazonas com os respectivos registros HUAM n°12424 e HUAM n° 12425 (figuras 5 6)

Figura 5..Exsicata *P. brachypetiolatum*



Fonte: Autor (2023)

Figura 6.Exsicata *Piper tuberculatum*



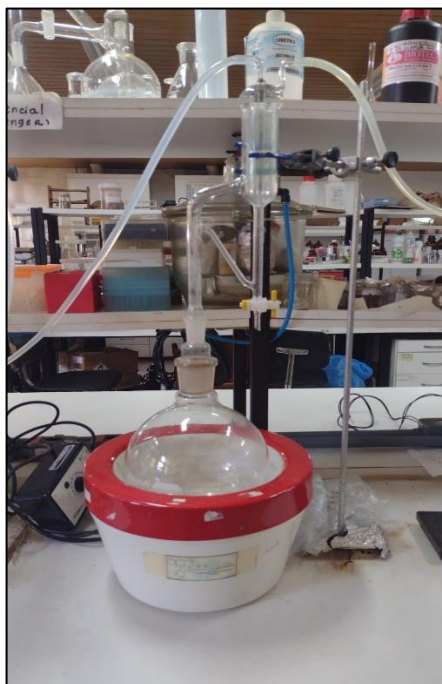
Fonte: Autor (2023)

A secagem do material vegetal ocorreu em estufa com circulação de ar por 24 horas em uma temperatura de 30°C. Após secagem, o material foi separado, sendo selecionadas somente as folhas das espécies para o presente estudo, onde foram trituradas no moinho de facas e armazenadas em sacos plásticos.

5.3 Extração dos óleos essenciais

Na extração do óleo essencial das folhas de *P. brachypetiolatum*, foram utilizados 341,39 g de material seco em estufa e triturado em um moinho de facas. Posteriormente o material triturado foi transferido para um balão de fundo redondo de 4 L e submerso em água destilada, em um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um dedo frio, ligado a uma manta térmica aquecida a uma temperatura de 120° C. As extrações foram feitas por 4 horas e foram realizadas em triplicata. (Figura 7).

Figura 7. Equipamento de extração de óleo essencial



Fonte: Autor 2023

Para *Piper tuberculatum* foram utilizados 294,36g de folhas secas em estufa e triturado em um moinho de facas, e posteriormente transferidas para um balão de fundo redondo 4 L, acrescida de água destilada de modo que toda a amostra ficasse coberta pela água. O balão foi acoplado a um aparelho de Clevenger modificado, ligado a uma manta térmica aquecida a uma temperatura de 120° C, As extrações foram feitas por 4 horas e foram realizadas em triplicata.

5.4 Cálculo do rendimento dos óleos essenciais

Os rendimentos dos óleos obtidos foram calculados pela fórmula rendimento igual a massa do óleo obtido dividido sobre a massa fresca total multiplicado por 100 essa formula foi utilizada na pesquisa de BRAGA. (2002). De acordo com a equação.

$$R(\text{rendimento}) = \frac{M1(\text{massa do óleo})}{M2(\text{massa biológica})} \times 100$$

5.5 Caracterização química

A análise da composição química dos compostos voláteis presentes no óleo essencial das espécies de *Piper* foi realizada pela técnica de (CG-EM) (Figura 8) e cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama (CC-FID).

Figura 8. Cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas.



Fonte: Autor 2023

As análises qualitativas do perfil químico dos óleos essenciais foram realizadas por CG-EM no Laboratório de Cromatografia Gasosa (LABCG), na Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), da UFAM, utilizando um equipamento Thermo Scientific GC-MS modelo TRACE GC ULTRA/ISQ (Figura 7), usando detector seletivo e coluna capilar apolar TR-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Thermo Scientific).

As amostras foram analisadas de acordo com a programação de Silva (2013), onde as amostras foram preparadas dissolvendo-se 1,0 mg de óleo essencial em 1,0 mL de hexano grau HPLC, sendo injetado 1,0 µL de solução, utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min, injetor automático a 250 °C, modo split na razão 1:25, detector MS a 280 °C, forno de 40 °C/4 min, a uma taxa de 4 °C/min a 240 °C, depois de 10 °C/min a 280 °C e a 280 °C/2 min, o espectrômetro de massas se iniciou com um *solvent delay* de 4 min, com intervalo de varredura de 40,0 a 400,0 u, seguindo uma taxa de varredura de 0,5 s/scan.

A aquisição e o processamento dos dados foram realizados por meio do software XCalibur v. 2.2. A identificação dos constituintes químicos voláteis foi baseada na comparação dos espectros obtidos e auxiliados com as bibliotecas internas do equipamento, NIST e a comparação do índice de retenção (IR) calculado com dados de IR da literatura. (ADAMS, 2007). O IR foi obtido utilizando-se a série n-alcanos (C₈-C₃₀) da Supelco e a equação Van Den Dool e Kratz (1963).

As análises dos perfis químicos dos óleos essenciais por CG-FID foram realizadas no Laboratório de princípios ativos da Amazônia (LAPAAM), do INPA, utilizando equipamento Agilent CG-FID 6890

Para permitir a identificação de duas colunas pelo CG-FID, as análises foram realizadas em um equipamento Agilent, modelo G-1860 Plus, com sistema de coluna dupla com duas colunas, um HP-5 (apolar) e um Innowax-20 (polar), ambos com as mesmas dimensões (30 m x 0,32 mm x 0,32 µm). A temperatura do forno foi programada de 60 °C a 240 °C aumentando 3 °C/min usando hidrogênio como transportador de gás a 4 mL/min. A temperatura de injeção foi definida para 250 °C com proporção dividida de 1:2.

Os detectores de ionização de chamas foram fixados a 280 °C com taxas de fluxo de hidrogênio, ar sintético e nitrogênio a 30, 300 e 30 mL/min, respectivamente. Um amostrador líquido automático realizou cada conjunto de injeção a 1 µL e um software HP Chemstation controlou o sistema. Os índices de retenção (IR) foram obtidos utilizando-se a série n-alcanos (C₈-C₃₀) da Supelco e a equação Van Den Dool e Kratz, (1963). A identificação de cada composto foi feita por comparação do IR obtido, em ambas as colunas, com as encontradas na literatura (ADAMS, 2007; DAVIES, 1990).

5.6 Preparação da solução-estoque ensaio antimicrobiano

Os óleos essenciais foram previamente preparados dissolvendo 2 mg óleo essencial em 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) grau HPLC. Esta solução inicialmente diluída em água destilada esterilizada para uma concentração de 2 mg/mL Na avaliação da atividade do óleo essencial das espécies de piperáceas, o óleo foi solubilizado em água destilada estéril.

5.7 Cepas bacterianas

As cepas bacterianas testadas foram do acervo de bactérias do Laboratório de Microbiologia da Central Analítica da UFAM, da coleção de Bactérias da Amazônia CBAM da quais foram selecionadas cepas de *Staphylococcus aureus* (CBAM 324) e *Escherichia coli* (CBAM 02), e utilizadas para os testes microbiológicos deste trabalho.

As cepas bacterianas selecionadas foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35 °C por (24 h), posteriormente foram realizados testes para avaliar a pureza análise ocular das colônias, ágar seletivos e catalase e o seu perfil quanto os antibióticos testados.

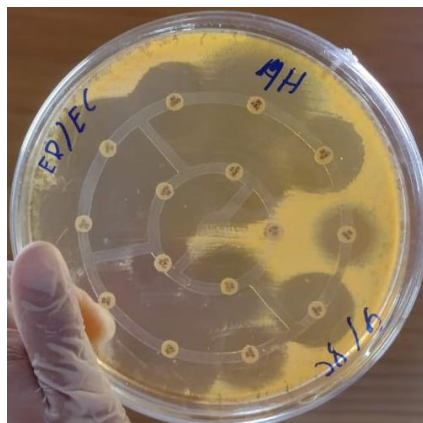
5.8 Antibiograma

Os antimicrobianos utilizados nesse ensaio para bactéria Gram-negativas *E.coli* foram amicacina ami (30 mg) amoxicilina/ácido clavulânico amc (30 mg) (20/10) ampicilina amp (10 mg) aztreonam atm (30 mg) cefazolina cfz (30 mg) cefepime cpm (30 mg) cefoxitina cfo (30 mg) ceftazidima caz (30 mg) ceftriaxona cro (30 mg) ciprofloxacina cip (05 mg) cloranfenicol clo 30 mg gentamicina gen (10 mg) meropenem mpm (10 mg) sulfazotrim sulfametoxazol/ trimetoprim sut (25 mg) tetraciclina tet (30 mg) (Figura 9).

Os antimicrobianos utilizados nesse ensaio para bactéria Gram-positivas *S. aureus* foram ampicilina AMP (10 mg), azitromicina AZI (15 mg), cefoxitina CFO (30 mg), ciprofloxacina CIP (05 mg), clindamicina CLI (02 mg), cloranfenicol CLO (30 mg), eritromicina ERI (15 mg), gentamicina GEN (10 mg), linezolida LNZ (30 mg), oxacilina OXA (01 mg), penicilina G PEN (10 mg), rifampicina RIF (05 mg), sulfazotrim sulfametoxazol/ Trimetoprim SUT (25 mg), tetraciclina TET (30 mg), vancomicina VAN (30 mg).

Os testes de sensibilidade por disco-difusão foram realizados segundo o CLSI (2019). Primeiro, foram preparadas as placas com o meio de cultura ágar Mueller Hinton (AMH); após sua solidificação e a semeadura das cepas bacterinas os discos com os antibióticos citado foram dispostos com uma pinça estéreo sobre o ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas e posteriormente foi realizada a leitura do halo de inibição a fim de saber se as cepas possuíam alguma resistência aos antimicrobianos avaliados.

Figura 9. Discos para a realização de antibiogramas contendo concentrações padrões de antibióticos



Fonte: Autor 2023

5.9 Difusão em poços

Os testes de sensibilidade ao óleo por difusão em poços foram realizados segundo o CLSI (2019). Primeiro, foram preparadas as placas de petri com 49x13mm de diâmetro com o meio de cultura ágar Mueller Hinton (AMH); após sua solidificação 0,1 mL da suspensão microbiana foi distribuída na superfície do meio e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Foram feitos os poços com a base de uma ponteira de 1000 µL preenchidos contendo 50 µL da solução-estoque descrita no item 5.6.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas e posteriormente foi realizada a leitura do halo de inibição. O procedimento foi realizado em triplicata.

Para este processo foi utilizado como parâmetro para avaliação da atividade antimicrobiana os padrões de sensibilidade adotados por Carovic–Stanko *et al.* (2010), os quais classificaram a atividade de diferentes óleos essenciais de acordo com o tamanho do halo de inibição.

5.10 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da MIC foi feita por ensaio de microdiluição em caldo empregando microplacas de fundo chato com 96 poços. Para cada amostra foi feita uma diluição seriada onde as primeiras colunas das placas continham 100 µL do meio BHI e 100 µL do inóculo bacteriano. Em seguida, 100 µL de óleo essencial previamente diluído

na concentração de 2mg/ml foram adicionados ao primeiro poço de cada coluna dos quais foram então transferidos 100 µL desse poço para o poço da coluna seguinte e assim sucessivamente. Após 24 horas em estufa bacteriana as placas foram observadas e com o auxílio de um revelador (trifenil tetrazólio), e de acordo com a turbidez dos poços avermelhada foi observada a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais segundo o CLSI (2019).

5.11 Teste Atividade modulatória

De acordo com os dados dos testes de antibiogramas, foram selecionados os antibióticos para os quais as cepas testadas apresentaram resistência. Nesses testes, foram preparadas as placas com o meio de cultura ágar Mueller Hinton (AMH); após sua solidificação 0,1 mL da suspensão microbiana, foi distribuída na superfície do meio e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Enquanto isso, foram preparados os discos contendo 50 µL do óleo essencial em sua concentração inibitória mínima e impregnados com antibióticos utilizados frente às cepas testadas para os quais elas apresentam resis Ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas e posteriormente foi realizada a leitura do halo de inibição segundo o CLSI (2019). Após a leitura foi comparado o efeito do óleo juntamente com o antibiótico frente às cepas. O procedimento foi realizado em triplicata.

5.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste T Student utilizando o programa estatístico Biostat 5.3. Onde os resultados considerados estatisticamente significativos apenas quando o valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Rendimento do óleo essencial das folhas de *Piper*

Obteve-se um rendimento de 0,85% para o óleo essencial das folhas de *P. brachypetiolatum*, coletados em período chuvoso conforme apresentado na (Tabela 2). O rendimento obtido para o OE das folhas de *P. brachypetiolatum* foi superior ao obtido no estudo de Araujo *et al.*, (2021), onde foi registrado um rendimento 74% menor em relação à presente pesquisa.

O estudo de Araujo *et al.*, (2021) foi o primeiro relato do perfil químico do OE das folhas de *P. brachypetiolatum*, onde foram realizadas extrações utilizando um Clevenger modificado e folhas frescas, diferentemente do presente trabalho, no qual foi empregado um Clevenger modificado acoplado a um dedo frio e o material biológico foi seco em estufa e triturado.

De acordo com o cálculo de rendimento do OE, obteve-se um rendimento de 0,17% para *Piper tuberculatum* coletadas no período chuvoso conforme a Tabela 2. No estudo conduzido por Oliveira (2020), o perfil químico dos óleos essenciais de *P. tuberculatum*, o rendimento do OE foi registrado como 0,16%, situando-se apenas 0,01% abaixo dos resultados obtidos na presente pesquisa. Vale ressaltar que, nos estudos de Oliveira (2006), as folhas foram coletadas durante o período chuvoso e o material biológico utilizado para a extração foi fresco, empregando o aparelho de Clevenger.

Tabela 2 – Tabela de Rendimentos dos óleos essenciais obtidos de *P. brachypetiolatum* e *Piper tuberculatum*

Período	Espécies de <i>Piper</i>	Rendimento (%)
Chuvoso	<i>P. brachypetiolatum</i>	0,85
Seca	<i>P. brachypetiolatum</i>	2,62
Chuvoso	<i>P. tuberculatum</i>	0,17

A fim de uma análise sazonal para *P. brachypetiolatum*, foi realizada uma coleta de material durante o período do verão amazônico, conforme a Tabela 2. Essa coleta ocorreu no dia 18 de outubro de 2023, onde o rendimento obtido foi de 2,62%, significativamente superior à primeira coleta realizada. O resultado corrobora com a

observação de Castro (2001), no qual relata o melhor rendimento de OE no verão e uma queda significativa no inverno. Essa melhora se deve à concentração de solutos nas plantas durante o período de seca.

6.2 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *P. brachypetiolatum*

Na análise do OE das folhas de *P. brachypetiolatum* por CG-EM, foi possível identificar 12 substâncias diferentes, conforme apresentado na (Tabela 3). Os componentes majoritários foram nerolidol e hinesol, com as áreas percentuais de 24,51% e 23,55%, respectivamente. Em seguida, foram identificadas as substâncias limoneno (10,42%), acetato de butila (10,05%), óxido de cariofileno (4,53%), cariofileno (2,56%), bisaboleno (1,97%), acetato de bornila (1,91%), copaeno (1,91%), muuroleno (1,80%), curcumeno (1,40%), selineno (0,44%) (Figura 10), o cromatograma (anexo1) espectros de cada substância identificada em comparação com Adams (2007) na ordem da Tabela 3 (anexos 2/25).

Tabela 3– Composição química do óleo essencial de *P. brachypetiolatum* por (CG-EM).

Número	Substâncias	IR ^{calc}	IR ^{lit}	% ^a	Classe química	Identificação
1	Acetato de n-butila	813	811	10,05	Éster	EM, IR
2	Limoneno	1026	1029	10,42	Monoterpeno	EM, IR
3	Acetato de bornila	1284	1285	1,91	Monoterpeno oxigenado	EM, IR
4	α -Copaeno	1349	1376	1,91	Sesquiterpeno	EM, IR
5	β -Cariofileno	1417	1419	2,56	Sesquiterpeno	EM, IR
6	Muuroleno	1475	1479	1,80	Sesquiterpeno	EM, IR
7	Curcumeno	1481	1482	1,40	Sesquiterpeno	EM, IR
8	α -Selineno	1483	1492	0,44	Sesquiterpeno	EM, IR
9	β -Bisaboleno	1507	1505	1,97	Sesquiterpeno	EM, IR
10	E-Nerolidol	1563	1563	24,51	Sesquiterpeno oxigenado	EM, IR

11	Óxido de Cariofileno	1579	1583	4,53	Sesquiterpeno oxigenado	EM, IR
12	Hinesol	1579	1641	23,55	Sesquiterpeno oxigenado	EM, IR
Total				85,05		

IR^{calc} Índice de retenção calculado em coluna apolar calibrada com n-alcanos, IR^{lit} Índice de retenção da literatura %^a - Porcentagem de área, EM Espectro de massas, IR- Índice de retenção.

O OE das folhas de *P. brachypetiolatum* extraído nesta pesquisa tiveram como componentes majoritários nerolidol apresentando uma área de 24,51% e hinesol como segundo componente majoritário, com uma área de 23,55%. Diferentemente dos resultados de Araujo *et al.*, (2021) nos quais apresentaram como componentes majoritários nerolidol ($44,23 \pm 2,23\%$) e óxido de cariofileno ($10,08 \pm 0,74\%$). Os mesmos componentes foram identificados na presente pesquisa, corroborando com a literatura, porém em concentrações diferentes. Já o óxido de cariofileno identificado na presente pesquisa exibiu uma área menor, apenas 4,53%.

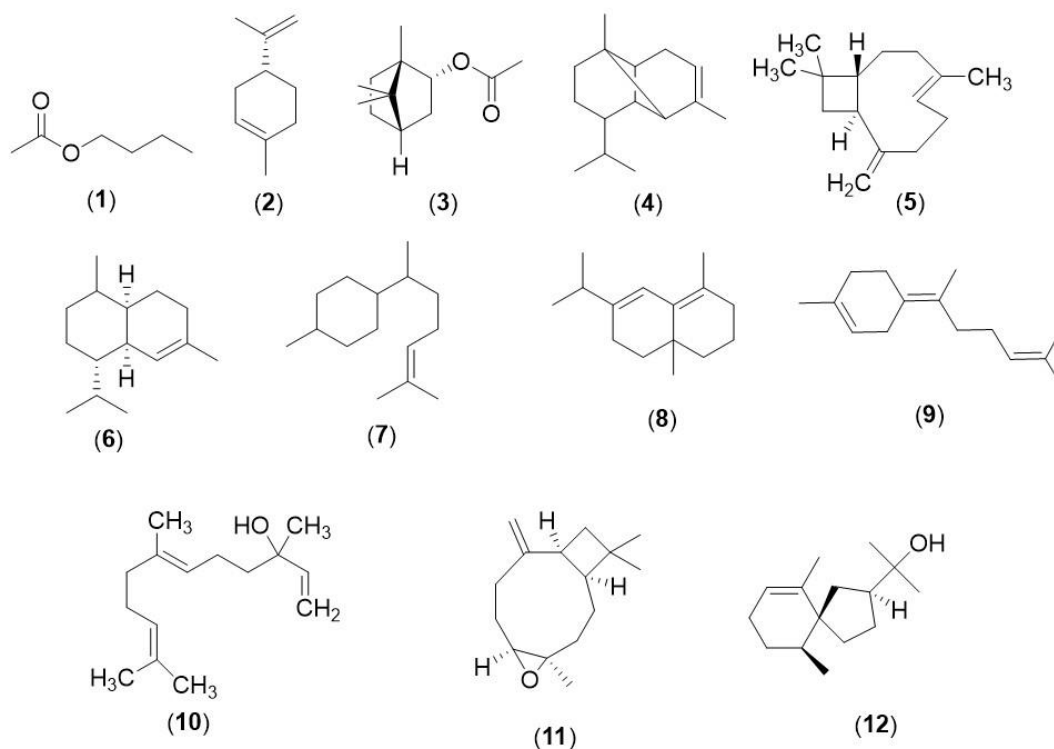
Os resultados das análises utilizando CG-FID (Tabela 4) confirmaram a presença dos mesmos constituintes identificados na primeira análise, utilizando o cálculo de índice de retenção para sua identificação.

Tabela 4– Composição química do óleo essencial de *P. brachypetiolatum* por (CG-FID).

Número	Substâncias	IR ^{calc apolar}	%a apolar	IR ^{calc polar}	Classe química	Identificação
1	Acetato de n-butila	813	9,17	1173	Ester	MS, IR
2	Limoneno	1025	2,44	1343	Monoterpeno	MS, IR
3	Acetato de bornila	1337	2,14	1636	Monoterpeno oxigenado	MS, IR
4	α -Copaeno	1346	2,23	1762	Sesquiterpeno	MS, IR
5	β -Cariofileno	1419	4,97	1789	Sesquiterpeno	MS, IR
6	Muuroleno	1474	3,39	1834	Sesquiterpeno	MS, IR
7	Curcumeno	1478	3,07	1846	Sesquiterpeno	MS, IR
8	α -Selineno	1480	2,82	1907	Sesquiterpeno	MS, IR
9	β -Bisaboleno	1500	2,44	1945	Sesquiterpeno	MS, IR
10	E-Nerolidol	1560	33,97	1976	Sesquiterpeno oxigenado	MS, IR
11	Óxido de Cariofileno	1575	2,12	1997	Sesquiterpeno oxigenado	MS, IR
12	Hinesol	1646	24,92	2050	Sesquiterpeno oxigenado	MS, IR
Total			93,68%			

IR^{calc apolar} Índice de retenção calculado em coluna apolar calibrada com n-alcanos, IR^{calc polar} Índice de retenção calculado em coluna polar calibrada com n-alcanos

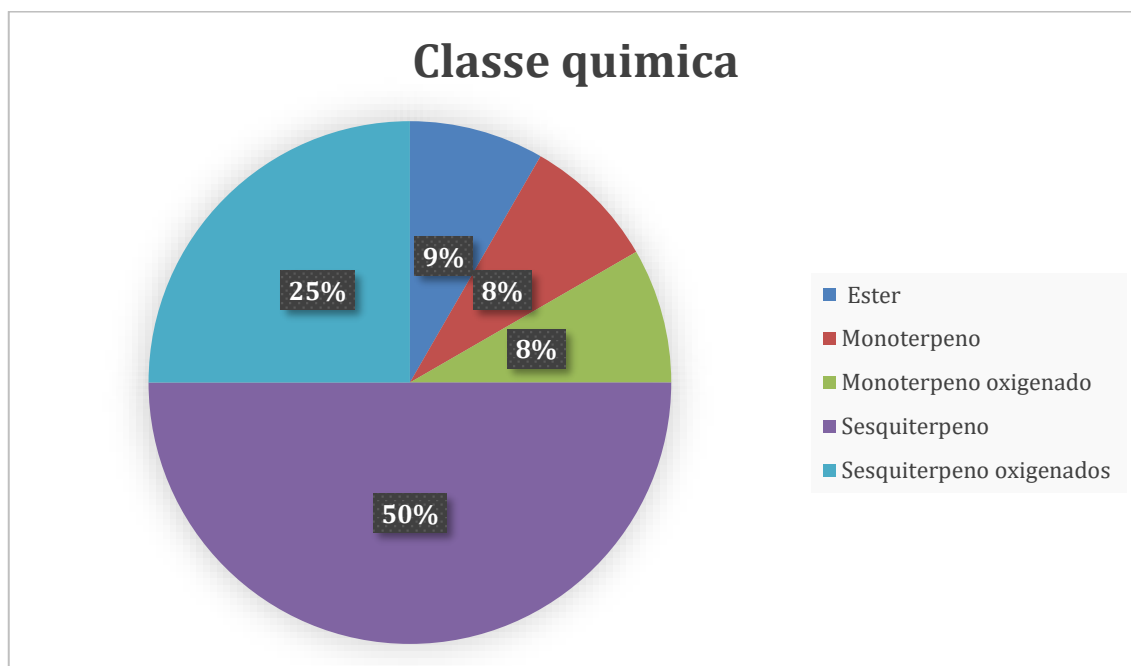
Figura 10. Substâncias de *P. brachypetiolatum* identificadas por CG-EM



Fonte: (NIST, 2023) Adaptado.

Como pode ser observado no gráfico da (Figura 11), em consonância com os resultados dos trabalhos de Araujo *et al.*, (2021), a presente pesquisa também constatou a predominância de sesquiterpenos, tais como copaeno, cariofileno, muuroleno, selineno e bisaboleno, na composição química do óleo essencial extraído das folhas de *P. brachypetiolatum*. Além disso, observa-se a presença de dois monoterpenos, um monoterpeno oxigenado, seis sesquiterpenos e três sesquiterpenos oxigenados.

Figura 11. Classes predominantes das substâncias do óleo essencial extraído das folhas de *P. brachypetiolatum*.



6.3 Identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *P. tuberculatum*

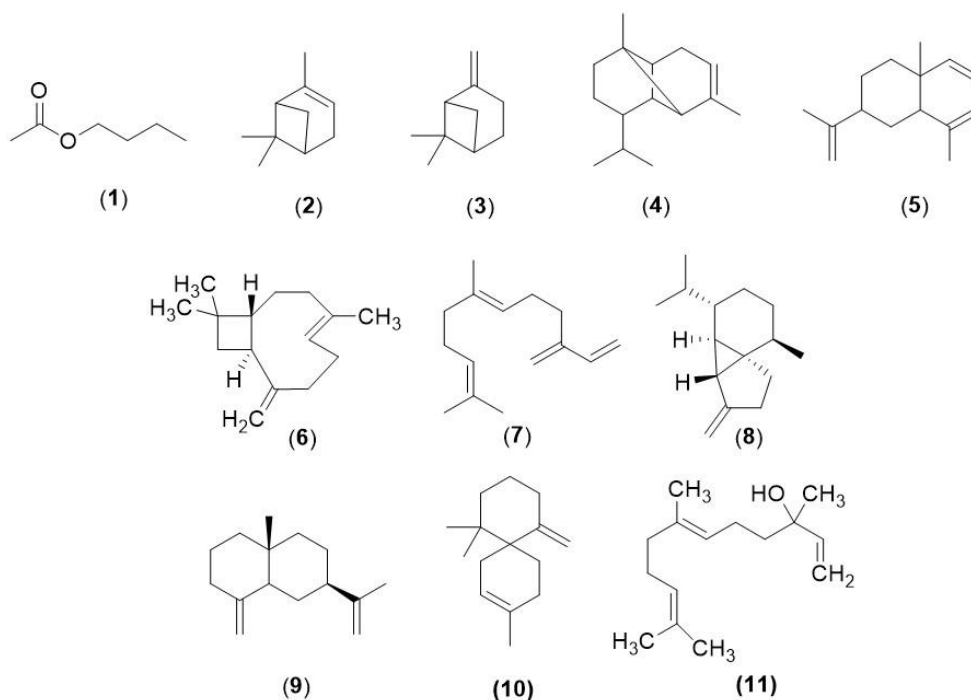
Pela análise do OE das folhas de *P. tuberculatum* por CG-EM, foi possível identificar 11 substâncias diferentes, conforme apresentado na Tabela 5. O componente majoritário foi o β -cariofileno, com a área percentual de 53,35%. Foram identificadas as substâncias acetato de butila (5,97), α -pineno (1,74), β -pineno (6,79), α -copaeno (1,35), b-elemeneno (5,15), β -farneseno (5,01), β -cubebeno (5,45), β -selineno (4,9), β -chamigreno (4,6), nerolidol (3,35) (Figura 12). Os cromatogramas encontram-se no anexo 29, e espectro de cada substância identificada em comparação com Adams (2007) de acordo com a ordem da Tabela 5 nos anexos do 30 a 53.

Tabela 5 – Composição química do óleo essencial de *P. tuberculatum* por CG-EM.

Número	Substâncias	IR ^{calc}	IR ^{lit}	% ^a	Classe química	Identificação
1	Acetato de butila	811	811	5,97	Ester	EM, IR
2	α -Pinoeno	939	939	1,74	Terpeno	MS, IR
3	β -Pinoeno	979	979	6,79	Terpeno	MS, IR
4	α -Copaeno	1432	1432	1,35	Sesquiterpeno	MS, IR
5	β -Elemeno	1390	1390	5,15	Sesquiterpeno	MS, IR
6	β -Cariofileno	1466	1466	53,35	Sesquiterpeno	MS, IR
7	β -Farneseno	1442	1442	5,01	Sesquiterpeno	MS, IR
8	β -Cubebeno	1388	1388	5,45	Sesquiterpeno	MS, IR
9	β -Selineno	1490	1490	4,9	Sesquiterpeno	MS, IR
10	β - Chamigreno	1477	1477	4,6	Sesquiterpeno	MS, IR
11	Nerolidol	1563	1563	3,35	Sesquiterpeno oxigenado	MS, IR
Total				97,66		

IR^{calc} Índice de retenção calculado em coluna apolar calibrada com n-alcanos, IR^{lit} Índice de retenção da literatura %^a - Porcentagem de área, EM Espectro de massas, IR- Índice de retenção.

Figura 12. Substâncias de *P. bachypetiolatum* identificadas por CG-EM:

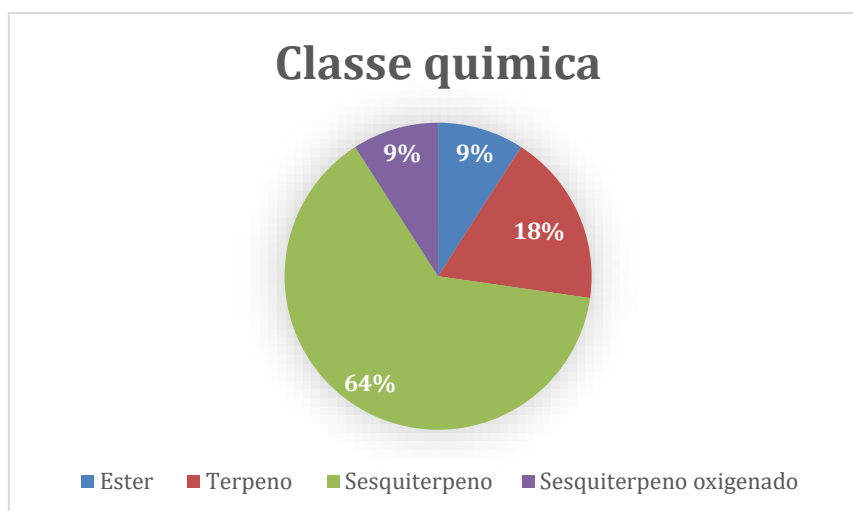


Fonte: (NIST, 2023) Adaptado

Nos estudos de Facundo (2008), o β -cariofileno foi identificado como o componente principal do (OE) de *P. tuberculatum*, com uma proporção de 32,1%, utilizando frutos e galhos como material biológico para a extração. Já o trabalho de Sobreira (2021), apesar de identificar os componentes cariofileno e nerolidol, não fornece informações sobre as proporções percentuais das áreas na composição do óleo essencial.

Das substâncias identificadas no (OE) de *P. tuberculatum* por CG-EM, houve uma predominância de sesquiterpenos apresentando apenas um sesquiterpeno oxigenado e diferentemente da *P. brachypetiolatum*, podemos identificar dois terpenos como pode-se observar na Figura 13.

Figura 13. Classe química predominante das substâncias do óleo essencial extraído das folhas de *P. tuberculatum*.



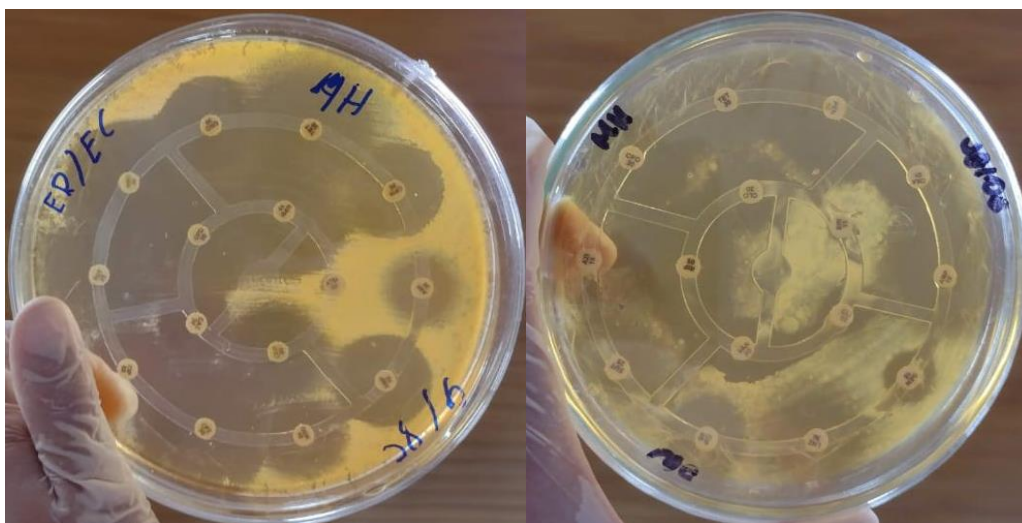
6.4 Antibiograma

Inicialmente, foi realizado o teste de antibiograma das cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*, utilizando antibióticos padrões relacionados, a cepa de *E. coli* avaliada apresentou resistência ao Aztreonam (30 mg), sendo suscetível à série de antibióticos listados no item 5.8.

A cepa de *S. aureus* apresentou resistência aos antibióticos Eritromicina (15 mg), Azitromicina (15 mg), Gentamicina (10 mg), mostrando uma semi-resistência à Clindamicina (2 mg), (Figura 14) e suscetível aos antibióticos relacionadas no item 5.8.

A resistência aos betas lactâmicos é preocupante, pois eles são as principais referências contra cepas bacterianas como *S. aureus* e *E. coli* agindo através da penetração na célula bacteriana, interferindo na síntese de peptidoglicano da parede celular (DURAND *et al.*, 2019).

Figura 14. Resultado dos testes de antibiogramas frente as cepas de *E. coli* e *S. aureus*



Fonte: Autor 2023

6.5 Difusão em poços

Os testes de difusão em poços do OE de *P. brachypetiolatum* apresentaram ação antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, com um halo de inibição médio de 17 mm, e contra a cepa de *E. coli*, com um halo de inibição médio de 13 mm. (Figura 15)

Ambas as cepas estudadas na presente pesquisa tiveram resistência a concentração testada do OE de *P. tuberculatum* e em detrimento a esse resultado negativo do OE nos testes de difusão em poços frente a estas cepas, não foram realizados os testes posteriores. Contudo, nos estudos conduzidos por Dos Santos (2017), foi observado que o OE de *P. tuberculatum* apresentou uma atividade significativa quando associado a antibióticos na concentração descrita no item 5.6. A combinação com amicacina resultou em efeito antagônico contra *E. coli* e *S. aureus*, atingindo taxas de 60% e 37%, respectivamente.

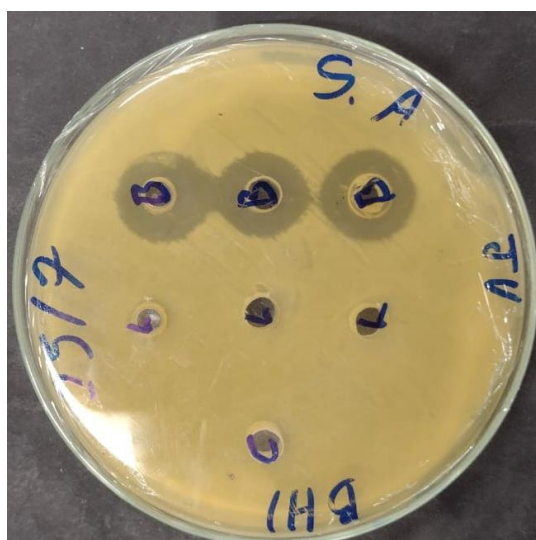
O teste t de Student foi aplicado em todos os testes, utilizando níveis de significância de 0,05. Portanto, um p-valor < 0,05 indica diferença significativa. Para os testes utilizando a cepa de *S. aureus*, a estatística manteve a média em todas as triplicatas.

Devido à complexa composição dos OE, é desafiador atribuir uma única substância a uma ação biológica específica. Dessa forma, não se deve descartar a possibilidade de a atividade biológica em questão ser resultado da interação conjunta de vários componentes presentes. No entanto, alguns compostos encontrados em OE de diversas plantas podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana. Por exemplo,

estudos anteriores com o OE de *Piper cernuum*, que contém o componente β -cariofileno em comum com o OE de *P. brachypetiolatum*, demonstraram atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, embora não tenha apresentado a mesma eficácia contra cepas de *E. coli* (GASPARETTO, *et al.*, 2017).

Nos estudos de Chan *et al.* 2016, o nerolidol, substância majoritária na presente pesquisa, é apontado como um dos principais mediadores de atividades biológicas em plantas, com ênfase na ação antibacteriana. Além disso, estudos indicam que o cariofileno e o bisaboleno, também identificados no OE de *P. brachypetiolatum*, são considerados responsáveis pela ação antimicrobiana biológicas do óleo de copaíba (PIERI; MUSSI; MOREIRA. 2016)

Figura 15. Resultado da difusão em poços frente cepa *S. aureus*



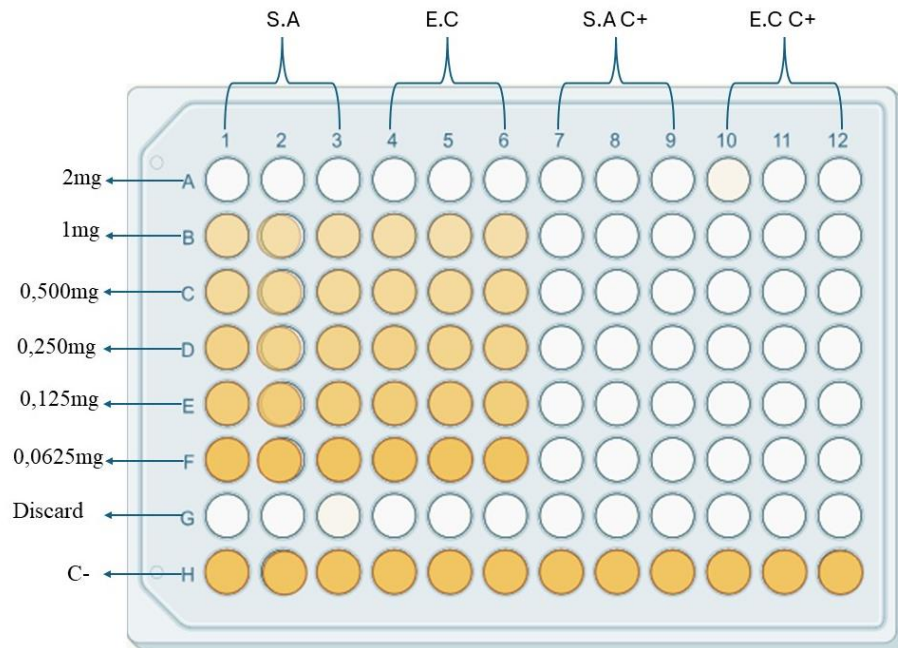
Fonte: Autor 2023

6.6 Concentração inibitória mínima

Os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *P. brachypetiolatum* apresentaram uma CIM de 2 mg/mL para ambas as cepas descritas no item 6.6, conforme evidenciado na (Figura 16, 17). Observando a imagem, pode-se interpretar os dados das colunas 7 a 9, onde o controle positivo para *S. aureus* mostra que a cepa foi suscetível à tetraciclina 300 mg. Nos poços 10 a 12, observa-se que a cepa de *E. coli* também foi suscetível ao mesmo antibiótico.

Ao analisar a linha H, nos poços correspondentes a ambas as cepas testadas percebe-se as cepas cresceram normalmente quando livres do OE de *P. brachypetiolatum* e do antibiótico utilizado no teste, confirmando assim nosso controle negativo, onde as cepas testadas cresceram normalmente.

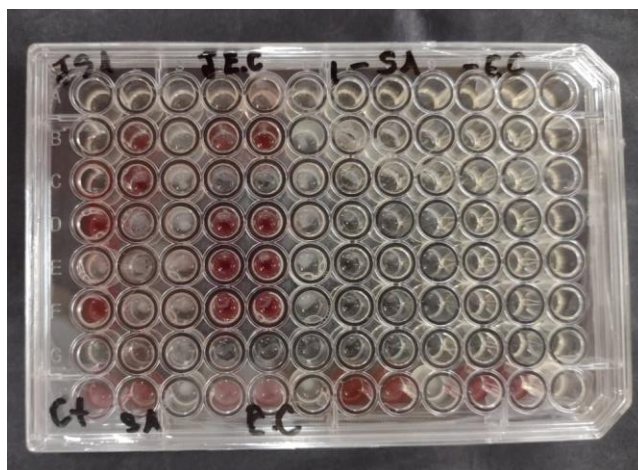
Figura 16. Esquematização do teste de concentração inibitória mínima para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*



(C+) - controle positivo (c -) -controle negativo S.A- *S. aureus* E.C- *E. coli*.

Fonte: Autor 2023

Figura 17. Teste de concentração inibitória mínima para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*



Fonte: Autor 2023

6.7 Testes de ação modulatória

Nos resultados da ação moduladora, foi confirmada a ação sinérgica do óleo essencial de *P. brachypetiolatum* em conjunto com os antibióticos, nos quais as cepas apresentaram resistência nos testes anteriores. A cepa de *E. coli*, ao ser testada com os óleos juntamente com discos contendo Aztreonam (30 mg), apresentou um halo de 30 mm, evidenciando, assim, uma ação sinérgica (Figura 18).

Figura 18. Resultado do teste de ação modularia para a cepa de *E. coli*

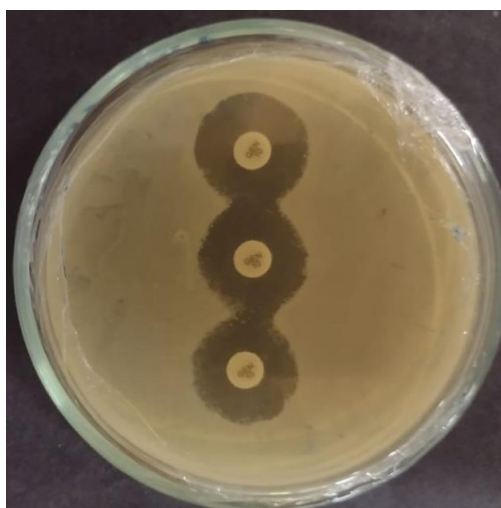


Fonte: Autor 2023

Frente às cepas de *S. aureus*, os testes também afirmaram um efeito sinérgico entre os antibióticos testados e o óleo essencial de *P. brachypetiolatum*. O halo de inibição do OE somado com os antibióticos revelou resistência a eritromicina (15 mg) e azitromicina (15 mg) (Figura 19), resultando em um halo de inibição zero, indicando uma resistência persistente da cepa mesmo em ação conjunta.

No entanto, em relação ao antibiótico gentamicina (10 mg), observou-se um halo de 19 mm, constatando assim a ação sinérgica do OE das folhas de *P. brachypetiolatum*.

Figura 19. Resultado do teste de ação modularia para a cepa de *S. aureus*



Fonte: Autor 2023

Estes resultados sugerem que compostos de origem natural podem atuar sinergicamente com medicamentos já utilizados clinicamente. Esta sinergia permite

reduzir as doses necessárias para atingir o efeito desejado, minimizando potenciais efeitos adversos associados ao tratamento. (TAMMA; COSGROVE; MARAGAKIS, 2012)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Perante a análise química do óleo de *P. brachypetiolatum*, o presente trabalho apresentou um resultado promissor. Durante um breve levantamento bibliográfico, foi possível identificar o potencial de alguns compostos dessa espécie, sugerindo que este óleo pode ser efetivo frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*. O OE de *P. brachypetiolatum* apresentou um bom resultado frente às cepas testadas, mostrando seu potencial antimicrobiano contra *S. aureus* e *E. coli* enquanto, OE de *P. tuberculatum* não apresentou nenhum efeito frente às cepas testadas. Os testes de ação modulatória comprovaram uma ação sinérgica entre O OE de *P. brachypetiolatum* juntamente com os antibióticos nos quais as cepas apresentaram resistência. Estes resultados apontam para o OE da espécie de *P. brachypetiolatum* como promissor contra cepas resistentes de bactérias, mais investigações devem ser realizadas para confirmar esta espécie como potencialmente antimicrobiana.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALMEIDA, J. G. L. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste: *Andira surinamensis* e *Piper divaricatum***. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2007.
- ARAÚJO, C. A., DA CAMARA, C. A., DE MORAES, M. M., de Vasconcelos, G. J., Pereira, M. R., Zartman, C. E. Chemical composition of essential oils from four *Piper* species, differentiation using multivariate analysis and antioxidant activity. **Natural Product Research**, v. 36, n. 1, p. 436-439, 2021.
- AUGUSTO, F. Cromatografia a gás: curso em diapositivos. **Revista Chemkeys**, n. 7, p. 1-10, 2000.
- BAY-HURTADO, F. Atividade antioxidante e caracterização do óleo essencial das raízes de *Piper marginatum* Jacq. **Ciência e Natura**, v. 38, n. 3, p. 1504-1511, 2016.

- BETONI, J. E. C., MANTOVANI, R. P., BARBOSA, L. N., DI STASI, L. C., & FERNANDES JUNIOR, A.. Synergism between plants extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 387-390, 2006.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.
- BRAGA, DE PINA Nazareno. Influência da secagem no rendimento e na composição do óleo essencial das folhas de *Eucalyptus citriodora*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2002.
- BRANDÃO, W. T. **Microbiologia**. Paraná: Zilceano Fonseca, 2012.
- CANTON, Marilde; ONOFRE, Sideney Becker. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 348-354, 2010.
- CAROVIĆ-STANKO, K., ORLIĆ, S., POLITEO, O., STRIKIĆ, F., KOLAK, I., MILOS, M., & SATOVIC, Z Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food chemistry**, v. 119, n. 1, p. 196-201, 2010.
- CASTRO M. J. P. **Potencial inseticida de extratos de *Piper tuberculatum* JACQ. (Piperaceae) sobre a fase larval de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2007. 56 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Piauí, 2007.
- CASTRO, D. M. Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) **NE Br ex Britt. & Wilson (Verbenaceae)**. 2001. 132 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Botucatu, 2001.
- CAUMO, K. S., DUARTE, M., CARGNIN, S. T., RIBEIRO, V. B., TASCA, T., & MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato: revista de divulgação de educação, ciência e tecnologia**, v. 11, n. 16, p. 89-188, 2010.
- CELESTINO, C. O., VARÃO, C. A. R., VELUDO, H. H., BRAGA, A. G., & LIMA, R. A. Ação inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Jacq.). **South Journal of Basic**

Education, Technical and Technological, v.3, n.2, p.03-09, 2016 Chan, W. K., Tan, L. T. H., Chan, K. G., Lee, L. H., & Goh, B. H. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**, 21(5), 529. (2016)

CLSI guidelines. Clinical and Laboratory Standards Institute Standards Development Policies and Process April 2019

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. *In: Introdução a métodos cromatográficos*. p. 13-29, 1988.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COSTA, G. M. D., BARROS, R. A., CUSTÓDIO, D. A. D. C., PEREIRA, U. D. P., FIGUEIREDO, D. J., & SILVA, N. D. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 297-302, 2013.

COUTINHO, H. D. M. SIQUEIRA, LIMA I. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 670-675, 2008.

DAVIES, N.W., Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A* 503: 1190

CONFESSOR, M. V. A.; QUEIROGA, M. E. O., RIBEIRO, M. G. L., ROMÃO, P. J. A.; DE BRITO, T. V. B.; ARAÚJO, V. T. S.; Alexandrino Júnior, J. S.; Dantas, M. I. L., Maia, L. B.; Cantalice, I. F.; Farias, L. C. Q. in *Medicina: Aspectos epidemiológicos, clínicos e estratégicos de tratamento*. Ed. Atena, Ponta Grossa, 2021, vol. 3, p. 388-416.

DE ALBUQUERQUE, J. S. ATIVIDADE LARVICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper Dilatatum* e *Piper Hostmannianum* (PIPERACEAE) PARA O CONTROLE DE *Aedes Aegypti* (culicidae) em laboratório. **De Ciência em foco**, v. 4, n. 1, p. 22-28, 2020.

DE MELO, A. M., SILVA, E. O., MARQUES, D. I. D., QUIRINO, M. R., & DE SOUSA, S. . Extração, identificação e estudo do potencial antimicrobiano do óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), biomonitorado por *Artemia salina* Leach. **Holos**, v. 1, p. 1-16, 2021.

DE MORAIS, L. A. Óleos Essenciais no Controle Fitossanitário. **Embrapa Meio Ambiente**, p. 151, 30 jun, 2009 A.

DE MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 3299-3302, 2009 b.

DE OLIVEIRA, J. C., DIAS, I. J., DA CAMARA, C. A., & SCHWARTZ, M. O. Volatile constituents of the leaf oils of *Piper aduncum* L. from different regions of Pernambuco (Northeast of Brazil). **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 5, p. 557-559, 2006.

DINIZ, A. M. M.; SANTOS, R. M. C. *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina em pacientes internados em hospital universitário de Manaus, 2015. **Revista de Epidemiologia e Controle de infecção**, v. 7, n. 1, p. 20-24, 2017.

DOS SANTOS SALES, V., DO NASCIMENTO, E. P., MONTEIRO, Á. B., DA COSTA, M. H. N., DE ARAÚJO DELMONDES, G., SOARES, T. R. C., ... & DE FIGUÊIREDO, D. N. Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 1, 2017.

DOS SANTOS, P. R. D., DE LIMA MOREIRA, D., GUIMARÃES, E. F., & KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 547-551, 2001.

DURAND, A. G.; RAOULT, D., DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 4, p. 371-382, 2019.

ESTRELA, J. L. V., FAZOLIN, M., CATANI, V., ALÉCIO, M. R., & LIMA, M. S. D. . Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 217-222, 2006.

FACUNDO, V. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. Essential oil of *Piper carniconnectivum* C.CD. Leaves and stems. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 3, p.296-297, 2006.

FACUNDO, V. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* HBK. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 743-748, 2008.

FELIPE, L. O.; BICAS J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

Flora do Brasil 2022 em construção. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>. Acesso em: 06 mar. 2022.

FUMAGALI, E. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 627-641, 2008.

GARCIA, A. R. M. DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA DE ARBUSTOS DO GÊNERO *PIPER* (PIPERACEAE), NA RESERVA FLORESTAL ADOLPHO DUCKE –manaus, Amazonas – Brasil. Dissertação (Mestrado) - INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2005.

GASPARETTO, A., CRUZ, A. B., WAGNER, T. M., BONOMINI, T. J., CORREA, R., & MALHEIROS, A. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 256-263, 2017.

GIORDANI, R. B., PAGLIOSA, L. B., HENRIQUES, A. T., ZUANAZZI, J. A. S., & DUTILH, J. H. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química nova**, v. 31, p. 2042-2046, 2008.

GRO, J. R. K.; LÄUBLI, T. High oven temperature on-column injection in capillary gas chromatography: I. Sample introduction. **Journal of Chromatography**, v. 357, p. 345-355, 1986.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, p. 21-46, 2004.

INTRAKAMHAENG, M., KOMUTARIN, T., PIMPUKDEE, K., & AENGWANICH, W. Incidence of enterotoxin-producing mrsa in bovine mastitis cases, bulk milk tanks and processing plants in Thailand. **J. Anim. Vet. Adv.**, v.11, n.5, p.655-661, 2012.

JARAMILLO, M. Alejandra; CALLEJAS, Ricardo. A reappraisal of *Trianaeopiper* Trelease: convergence of dwarf habit in some *Piper* species of the Chocó. *Taxon*, v. 53, n. 2, p. 269-278, 2004.

- LUZ, A. I. R., DA SILVA, J. D., ZOGHBI, M. D. G. B., ANDRADE, E. H. D. A., DA SILVA, M. H. L., & MAIA, J. G. S. Volatile constituents of Brazilian Piperaceae. Part 4. Essential oil composition of *Piper dactylostigmum*, *P. plurinervosum* and *P. vitaceum*. **Journal of Essential**, 2006.
- Macedo, L. A., Carvalho Costa dos Santos, T., Leda Valverde, A., de Lima Moreira, D., & Rocha Alves Vasconcelos, T. **An overview of neolignans of the genus Piper L.: isolation methods and biological activities**. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 17(8), 693-720. (2017).
- Machado, S. M., Militão, J. S., Facundo, V. A., Ribeiro, A., Morais, S. M., & Machado, M. I. Leaf oils of two Brazilian *Piper* species: *Piper arboreum* Aublet var. *latifolium* (C.DC) Yuncker and *Piper hispidum* Sw. **Journal of Essential Oil Research**, v.6, n. 6, p. 643-644, 1994.
- MIRANDA, I. P. A. **Atlas do Pólen de Plantas Medicinais**. 1. ed. Belo Horizonte – MG, 2020.
- MONTAÑEZ-VALVERDE, R. A., MONTENEGRO-IDROGO, J. J., ARENAS-SIGNIFICACIÓN, F. R., & VÁSQUEZ-ALVA, R. . Infección urinaria alta comunitaria por *E. coli* resistente a ciprofloxacino: características asociadas en pacientes de un hospital nacional en Perú. *In: Anales de la Facultad de Medicina*. UNMSM. Facultad de Medicina, 2015.
- MORAIS, V. P., CABRAL, F. V., FERNANDES, C. C., & MIRANDA, M. L. DBrief Review on *Piper aduncum* L., its Bioactive Metabolites and its Potential to Develop Bioproducts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 66, 2023.
- MOREHEAD, M. S.; SCARBROUGH, C. Emergence of global antibiotic resistance. **Primary care: clinics in office practice**, v. 45, n. 3, p. 467-484, 2018.
- MOREHEAD, M.; SCARBROUGH, C. Emergence of global antibiotic resistance. **Prim Care**, v. 45, n. 3, p. 467-484, 2018.
- MORO, A., LIBRÁN, C. M., BERRUGA, M. I., CARMONA, M., & ZALACAIN, A. airy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95, n. 7, p. 1507-1513 2015.

NAVICKIENE, Hosana M. Deboni H. M. D., Morandim, A. D. A., Alécio, A. C., Regasini, L. O., Bergamo, D. C. B., Telascra, M. Kato, M. J.. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, p. 467-470, 2006.

OLIVEIRA, A. K. M. EFEITO LARVICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Piper um bellatum* SOBRE O MOSQUITO *Aedes aegypti*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 1, p. 84-101, 2021.

OLIVEIRA, M. R. **Atividades acaricida e alelopática de óleos essenciais de *Piper tuberculatum* Jacq. e *Piper marginatum* L.** 2022. 59 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos), Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2022.

OMS. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana** - Sumário. Organização Mundial de Saúde, p. 1-16, 2012.

Parmar, R. V. S., Jain, S. C., Bisht, K. S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., ... & Boll, P. PHYTOCHEMISTRY OF THE GENUS PIPER. *Phytochemistry*, Great Britain, v. 46, p. 673, 4 nov. 1997.

PIERI, F. A., Mussi, M. C., Moreira, M. A. S., 2016. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira Plantas Medicinais**. 11, 465-472

QUEIROZ, C. C. B. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum* Ruiz & Pav (Piperácea). **Farmácia - Bacharelado - Itacoatiara**, 2021.

SALEHI, B., Zakaria, Z. A., Gyawali, R., Ibrahim, S. A., Rajkovic, J., Shinwari, Z. K., Setzer, W. N. Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.

SAMAIN, M. S., VRIJDAGHS, A., HESSE, M., GOETGHEBEUR, P., JIMÉNEZ RODRÍGUEZ, F., STOLL, A., ... & WANKE, S. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany**, v. 105, p. 677-688, 2010.

SANTANA, H. T. Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* TREL & YUNCK, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti*. **PGBIOEXP/MESTRADO**, Porto Alegre, p. 77, 10 set. 2012.

SANTOS, T. G., REBELO, R. A., DALMARCO, E. M., GUEDES, A., GASPER, A. L. D., CRUZ, A. B., NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, p.477-481, 2012.

SANTURIO, D. F. Antimicrobial activity of spice essential oils against *Escherichia coli* strains isolated from poultry and cattle. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011 b.

SANTURIO, D. F., COSTA, M. M. D., MABONI, G., CAVALHEIRO, C. P., SÁ, M. F. D., DAL POZZO, M., ... & FRIES, L. L. M. . Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011 A.

SILVA, T. B., MENEZES, L. R. A., SAMPAIO, M. F. C., MEIRA, C. S., GUIMARÃES, E. T., SOARES, M. B. P., ... & COSTA, E. V. Chemical 47 composition and anti-Trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, n. 8, p. 403-406, 2013.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento** [recurso eletrônico]. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., & PETROVICK, P. R. **Farmacognosia dos produtos natural ao medicamento**. Porto alegre: [s. n.], cap. introdução á análise fotoquímica, p. 69-82, 2017.

SKOOG, D. A. D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Madrid: McGraw-Hill, 2001.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Bookman, 2009.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: Simões, C. M. O. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017

TAMMA, P. D., COSGROVE, S. E., MARAGAKIS, L. L. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 25, p. 450-470 **2012**.

TEBBS, M. C. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. **Bulletin of the Natural History (Botany)**, v. 19, p. 117-158, 1989.

TEBBS, M. C. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 2. The taxonomy of *Piper* section *Churumayu*. **Bulletin of the Natural History (Botany)**, 1990.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 3, p. 297-304, 2006.

TORQUILHO, H. S., PINTO, A. C., GODOY, R. L. D. O., & GUIMARÃES, E. F. Essential oil of *Piper cernum* Vell. var. *cernum* Yuncker from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 4, p. 443-444, 2000.

TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CHRISTINE, L. C. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VALENTIM DE AMORIM, A. F. **Química Métodos Cromatográficos**. 1. ed. Fortaleza, 2019.

VAN DEN DOOL, H. A. N. D.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography** v.11:463-471, 1963.

Vasques, S.R., Navickiene, H.M., Kato, M.J., Bolzani, V.S., Meda, C.I., Young, M.C., Furlan, M., Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 59, 521–527. 2002.

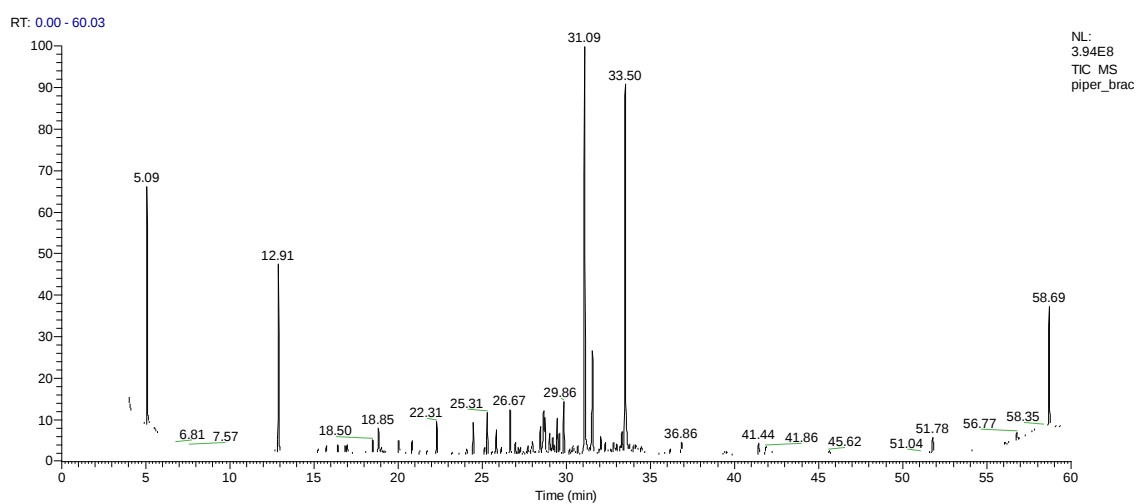
VON POSER, G. L., RÖRIG, L. R., HENRIQUES, A. T., LAMATY, G., MENUT, C., & BESSIERE, J. M. Aromatic plants from Brazil. III. The chemical composition of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. mikanianum* (Kunth) Steudel essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, n. 4, p. 337-40, 1994.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 97, 2013.

WANKE, S., SAMAIN, M. S., VANDERSCHAEVE, L., MATHIEU, G., GOETGHEBEUR, P., NEINHUIS, C. WANKE, S. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). Plant Biology, v. 8, n. 01, p. 93-102, 2006.

ANEXOS

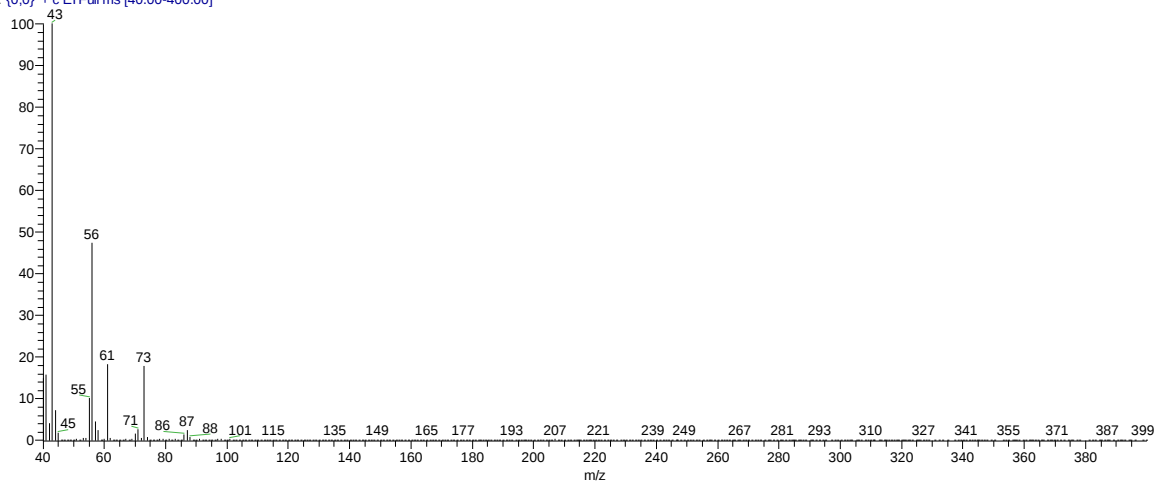
anexo 1



anexo 2

Espectro das substâncias identificadas comparada ao espectro das mesmas no Adams

piper_brac #130 RT: 5.08 AV: 1 NL: 8.23E7
T: [0.0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



anexo 3

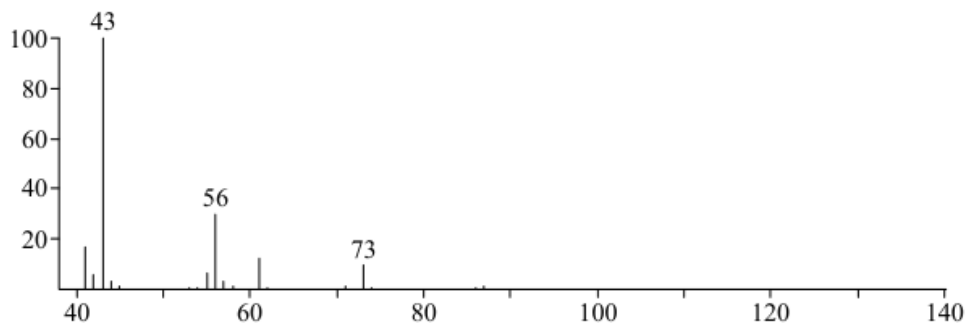
RT: 3.31 AI: 807 KI: 811 **Butyl acetate**

CAS#: 123-86-4 MF: C₆H₁₂O₂ FW: 116 MSD LIB#: 23

CN: acetic acid, butyl ester

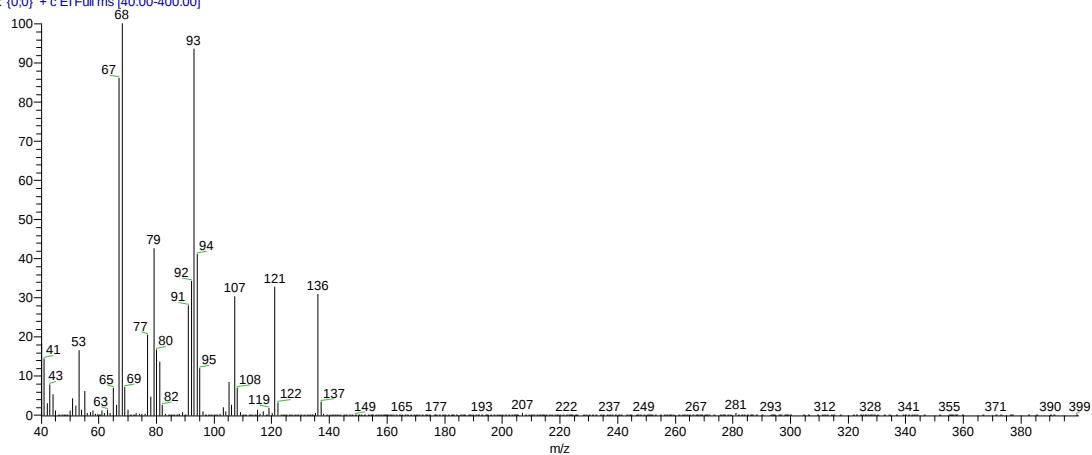
Synonyms: butyl ethanoate

Source: alcohols mix ex E. von Rudloff; 53.06% *Michelia figo* (flower),
p. 17, in: Aromatic Plants & Essential Constituents, Peace Book Co., Hong Kong(1993);
22.24% *Artabotrys hexapetalus* (flower); 9.08% *Mandragora officinarum*



anexo 4

piper_brac #1060 RT: 12.90 AV: 1 NL: 2.27E7
T: {0;0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



anexo 5

RT: 8.69 AI: 1024 KI: 1029 **Limonene**

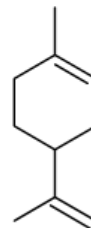
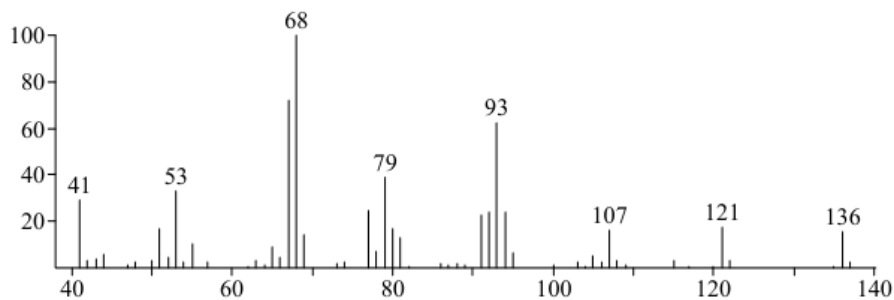
CAS#: 138-86-3 MF: C₁₀H₁₆ FW: 136 MSD LIB#: 164

CN: methyl-4-(1-methylethenyl)cyclohexene <1->

Synonyms: cajeputene; cinene; kautschin; nesol; p-mentha-1,8-diene; dipentene

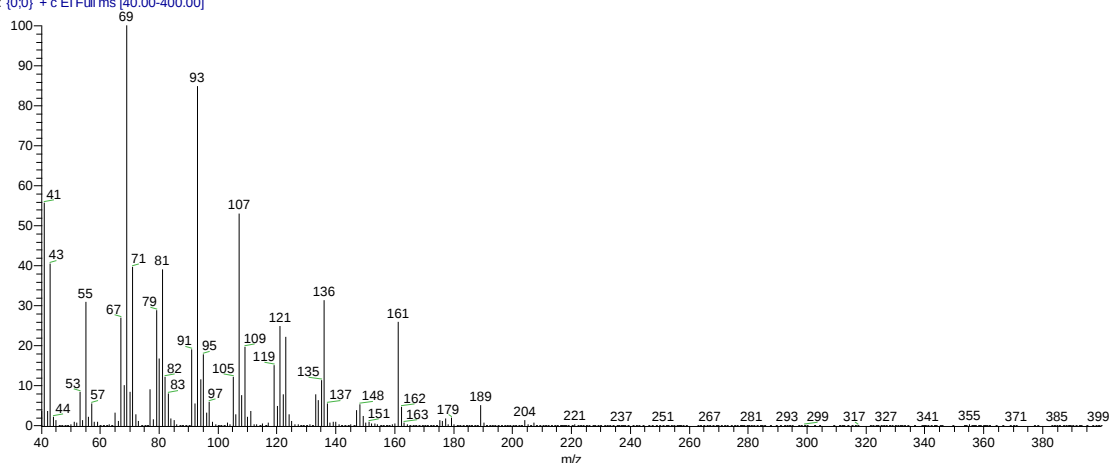
Source: distillation of sweet anis leaves. Calif., RP Adams #5452; 96.49% *Citrus sinensis*,

Zhiwu, Xuebao, 30:623(1988); 96.41% *Citrus aurantium*; 95.00% *Citrus deliciosa*



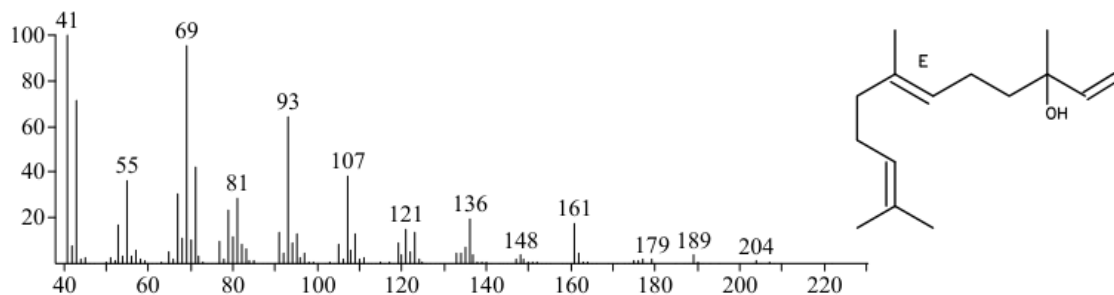
anexo 6

piper_brac #3226 RT: 31.09 AV: 1 NL: 4.20E7
T: {0;0} + c EI Full ms [40.00-400.00]

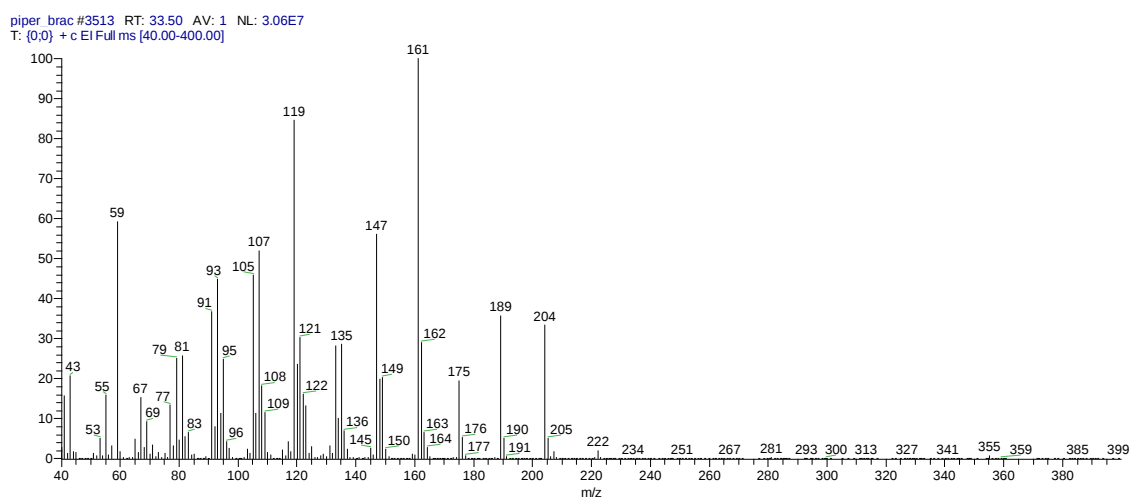


anexo 7

RT: 31.32 AI: 1561 KI: 1563 **Nerolidol** <(E)->
 CAS#: 40716-66-3 MF: C₁₅H₂₆O FW: 222 MSD LIB#: 1141
 CN: 1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-
 Synonyms: none
 Source: ref. cpd. ex Robert Doss, USDA; 85.00% *Myrocarpus frondosus*,
 p. 891, in: Flav. & Frag.: A World Persp., Lawrence, etal., Elsevier, Amsterdam(1986);
 81.50% *Zanthoxylum gardneri*; 58.00% *Cymbidium goeringii* (flower headspace)

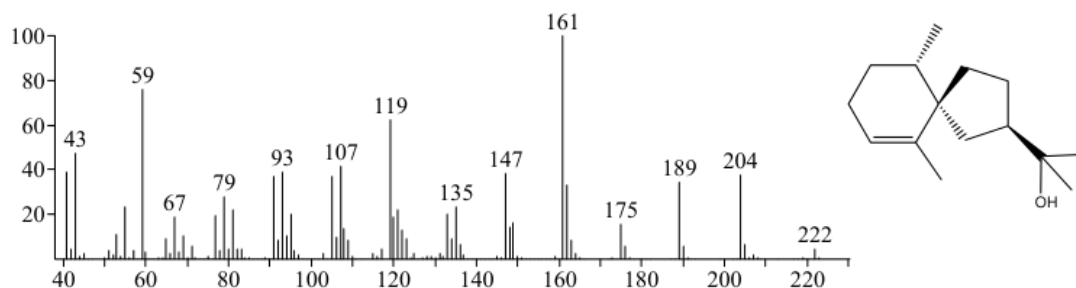


anexo 8



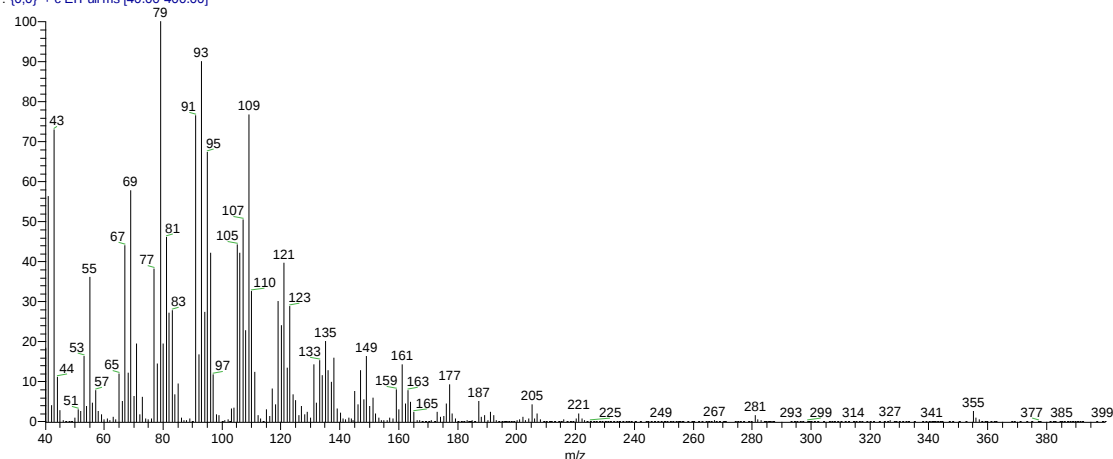
anexo 9

RT: 34.45 AI: 1640 KI: **1641** **Hinesol**
 CAS#: 23811-08-7 MF: C₁₅H₂₆O FW: 222 MSD LIB#: 818
 CN: spiro(4.5)dec-6-ene-2-methanol,α,α,6,10-tetramethyl-,(2R-(2α,5α,(S*)))-
 Synonyms: none
 Source: Alfred Bader Chem. ex E. von Rudloff; 10.00% *Atractylodes lancea*,
 Parfum. Kosmet. 63:237(1982); 1.90% *Phoebe porosa*



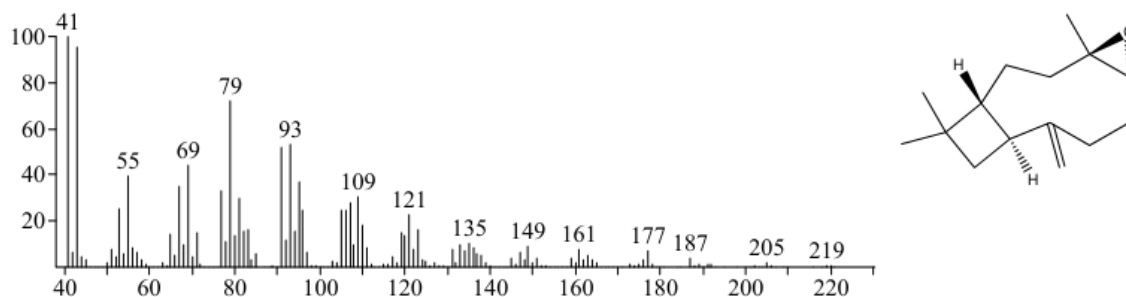
anexo 10

piper_brac #3281 RT: 31.56 AV: 1 NL: 5.55E6
 T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



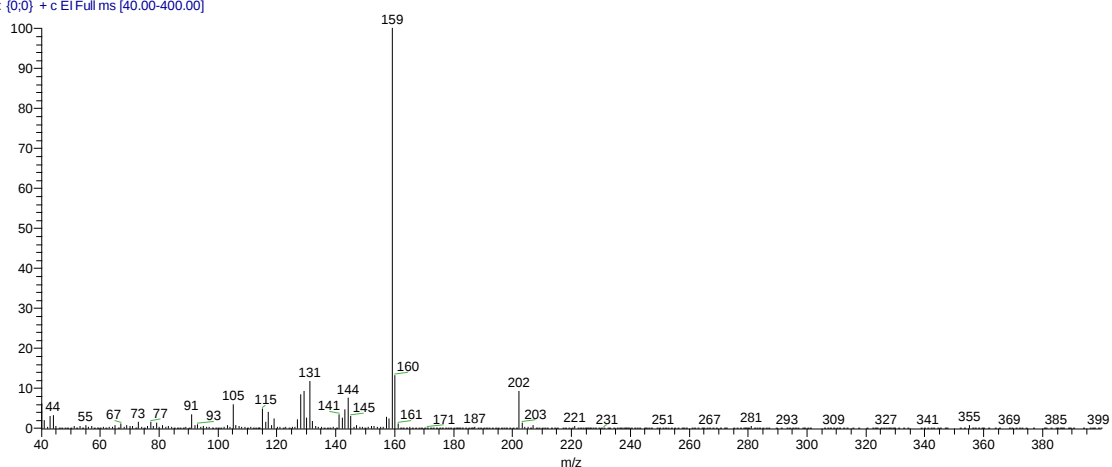
anexo 11

RT: 32.16 AI: 1582 KI: **1583** **Caryophyllene oxide**
 CAS#: 1139-30-6 MF: C₁₅H₂₄O FW: 220 MSD LIB#: 834
 CN: 5-oxatricyclo(8.2.0.0^{4,6})dodecane, 4,12,12-trimethyl-9-methylene-, (1R-(1R*,4R*,6R*,10S*))-
 Synonyms: β-caryophyllene epoxide; epoxycaryophyllene, hectene epoxide
 Source: *Hymenaea* oil ex Jean Langenheim; 21.40% *Artemisia velotiorum*,
 FFJ 10:25(1995); 19.35% *Nepeta cataria*; 18.20% *Artemisia campestris*



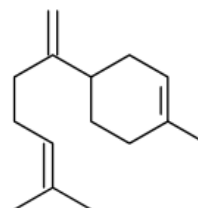
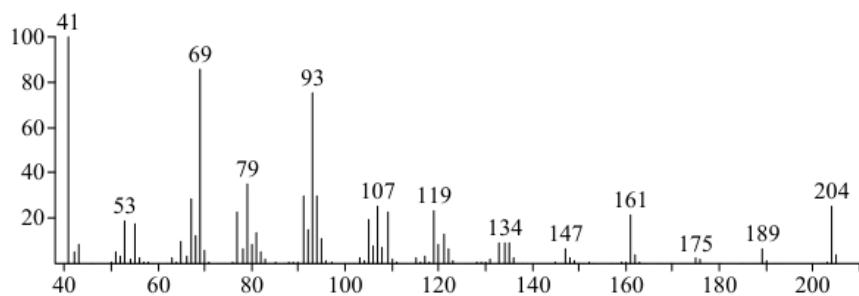
anexo 12

piper_brac #3077 RT: 29.84 AV: 1 NL: 1.70E7
T: {0:0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



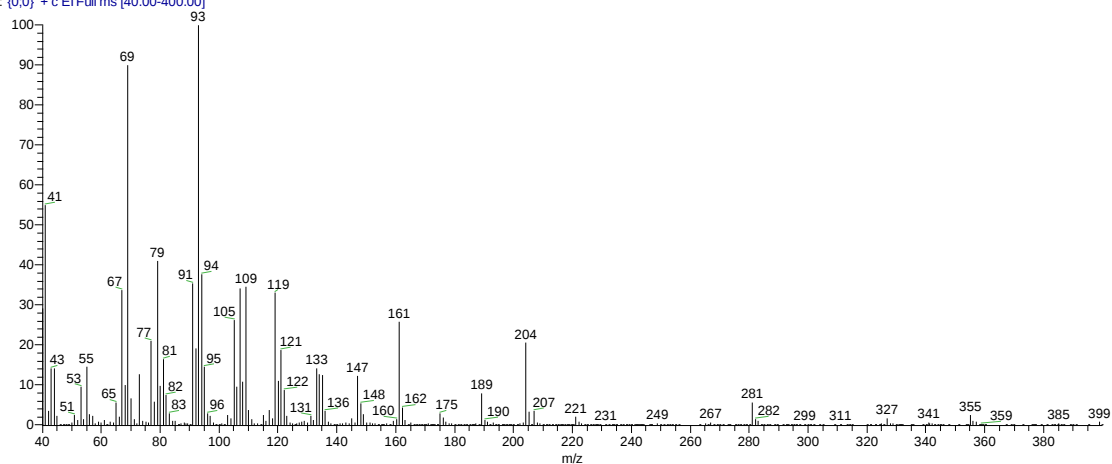
anexo 13

RT: 29.04 AI: 1505 KI: 1505 **Bisabolene <β->**
CAS#: 495-61-4 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 466
CN: cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)
Synonyms: none
Source: *Copaiba* resin ex P. White, Brazil; Lemon oil; *Juniperus* species;
60.40% *Zingiber officinale*, Phytochem 23:353(1984); 52.46% *Pimpinella anisum*;
27.67% *Lavandula multifida*



anexo 14

piper_brac #3032 RT: 29.46 AV: 1 NL: 3.94E6
T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



anexo 15

RT: 28.49 AI: 1492 KI: 1492 **Selinene <δ->**

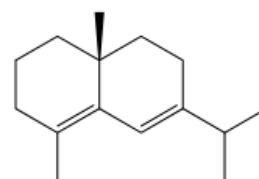
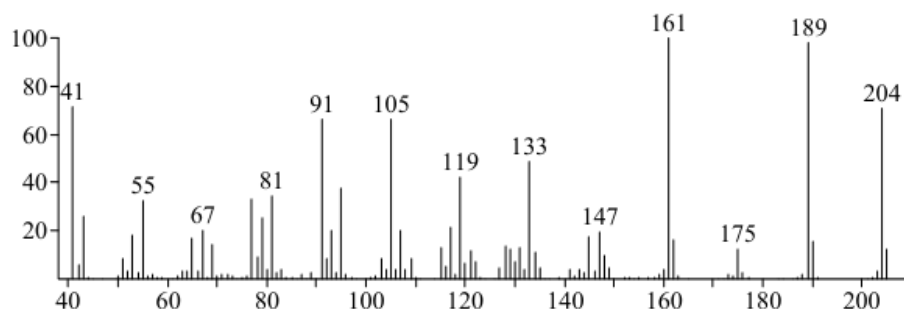
CAS#: 28624-28-4 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 594

CN: naphthalene, 2,3,4,4a,5,6-hexahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-

Synonyms: eudesma-4,6-diene

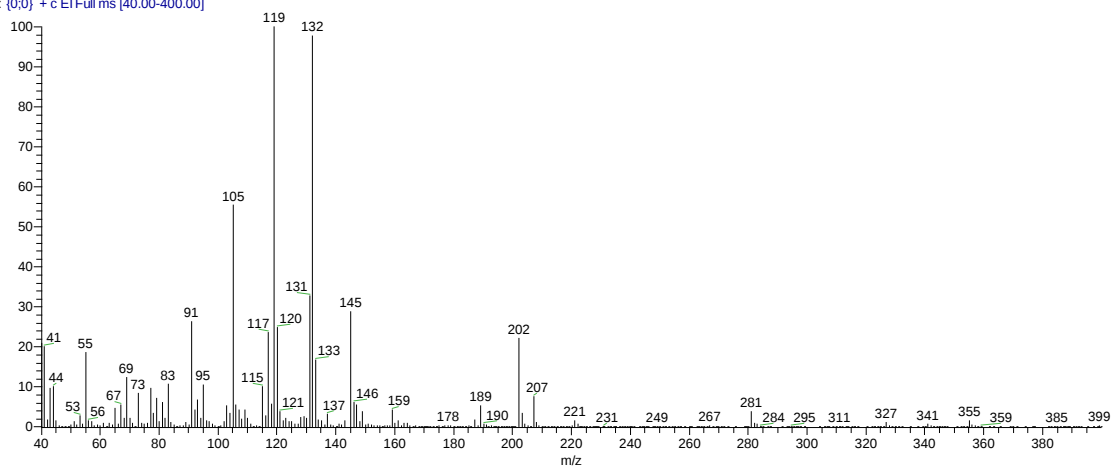
Source: ref. cpd. ex Ian Southwell; 18.28% *Psidium guajava*, FFJ 9:135(1994);

3.69% *Psiadia lithospermifolia*; 3.67% *Alpinia conchigera*



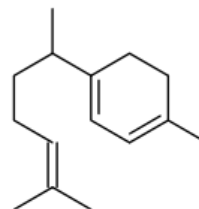
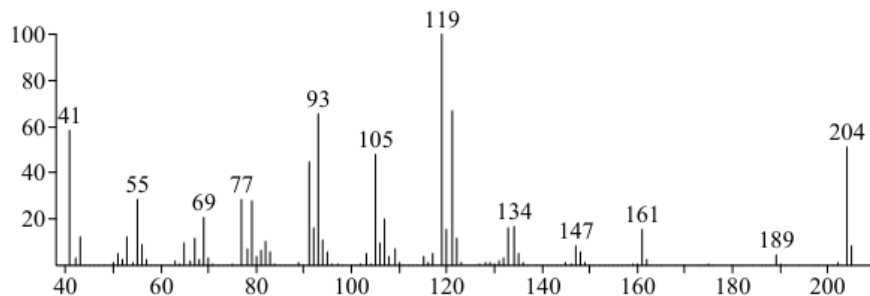
anexo 16

piper_brac #2938 RT: 28.67 AV: 1 NL: 5.70E6
T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



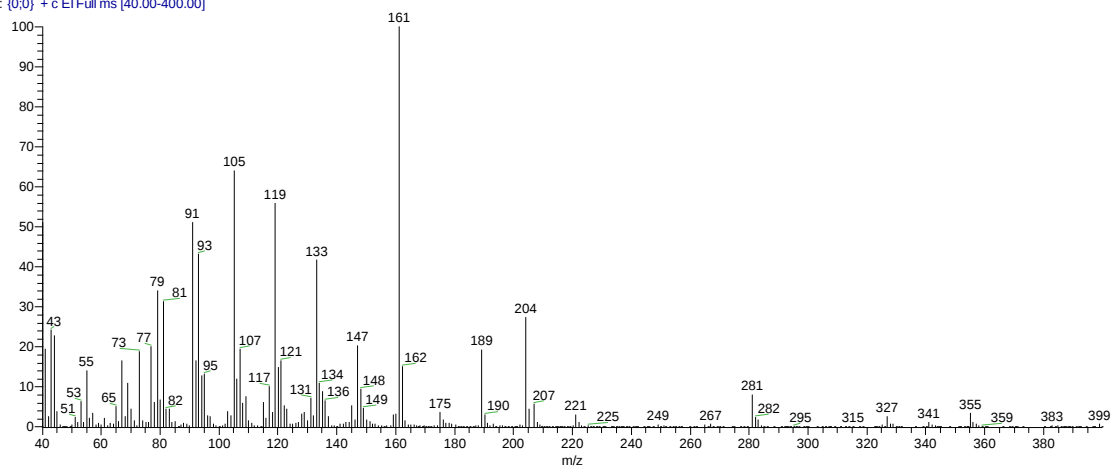
anexo 17

RT: 28.04 AI: 1481 KI: 1482 **Curcumene** <γ>
CAS#: 28976-68-3 MF: C15 H24 FW: 204 MSD LIB#: 768
CN: 1,3-cyclohexadiene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-
Synonyms: none
Source: *Helichrysum* oil ex P. Weyerstahl; 10.40% *Helichrysum italicum*,
p. 177, in: Progress in Essential Oil Research (Proc. Intern. Symp. on Ess. Oils),
E.-J. Brunke Ed., Gruyter Publ., Berlin(1986); 6.40% *Populus deltoides*;
1.81% *Santolina chamaecyparissus*



anexo 18

piper_brac #2911 RT: 28.45 AV: 1 NL: 2.36E6
T: [0:0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



anexo 19

RT: 27.96 AI: 1479 KI: 1480 **Curcumene** <ar->

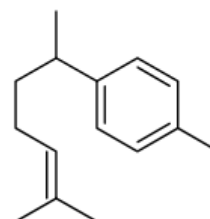
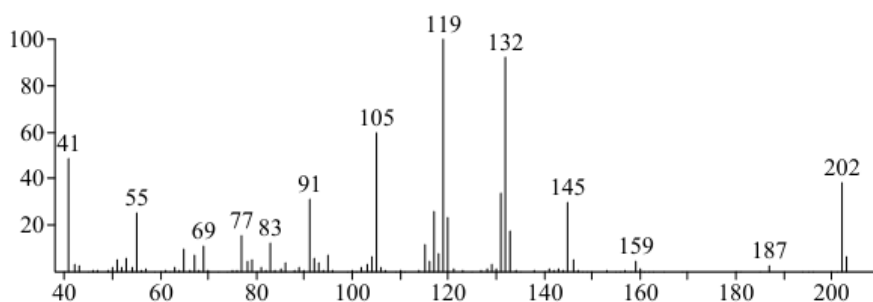
CAS#: 644-30-4 MF: C15 H22 FW: 202 MSD LIB#: 1379

CN: benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-

Synonyms: α -curcumene

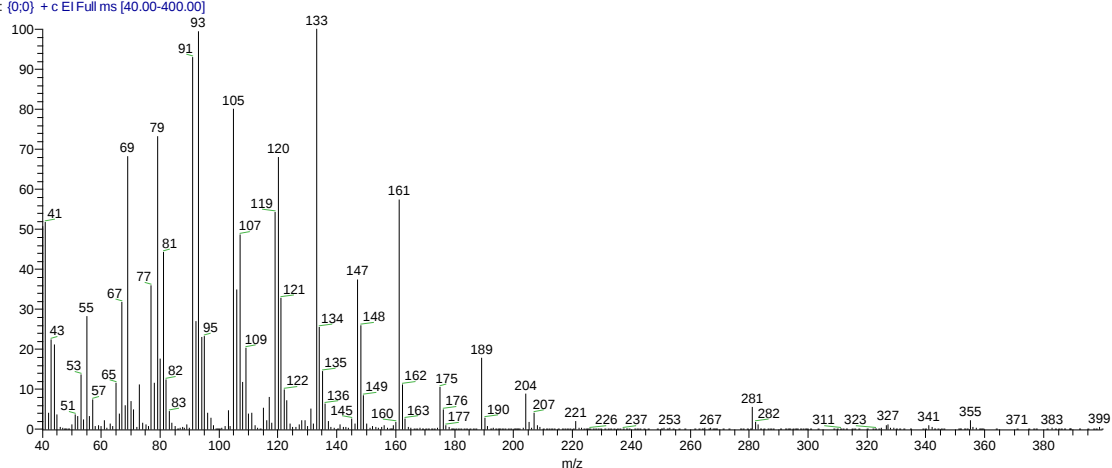
Source: Sandalwood oil ex Brian Lawrence; 41.40% *Curcuma xanthorrhiza*, FFJ 7:19(1992);

27.84% *Curcuma angustifolia*; 27.10% *Zingiber officinale*



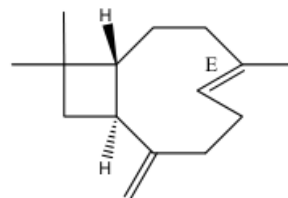
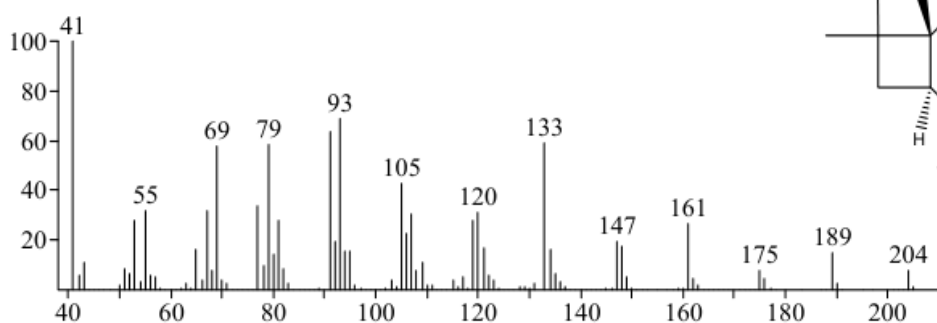
anexo 20

piper_brac #2699 RT: 26.67 AV: 1 NL: 2.94E6
T: [0:0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



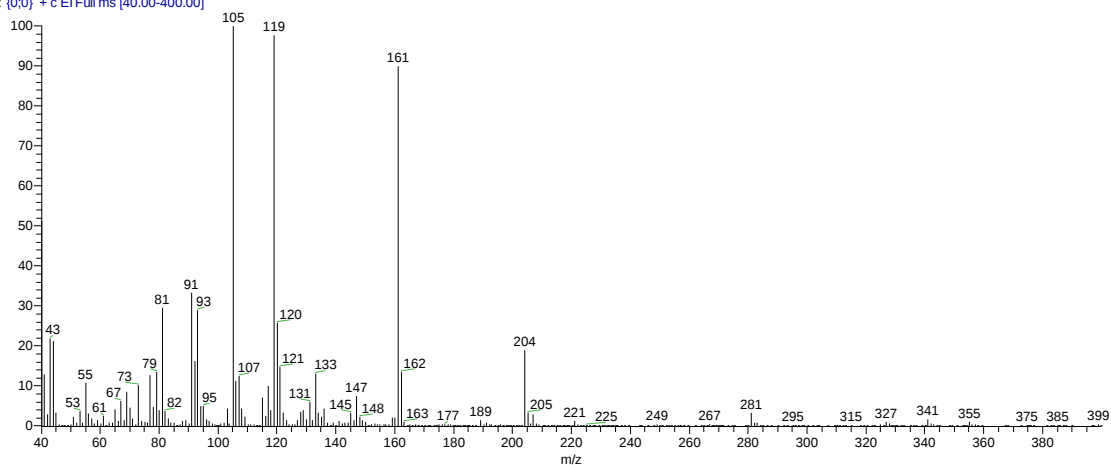
anexo 21

RT: 25.36 AI: 1417 KI: 1419 **Caryophyllene <(E)->**
 CAS#: 87-44-5 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 830
 CN: trimethyl-8-methylenebicyclo(7.2.0)undec-4-ene <4,11,11->
 Synonyms: β -caryophyllene, emmanuelene
 Source: *Hymenaea* oil ex Jean Langenheim



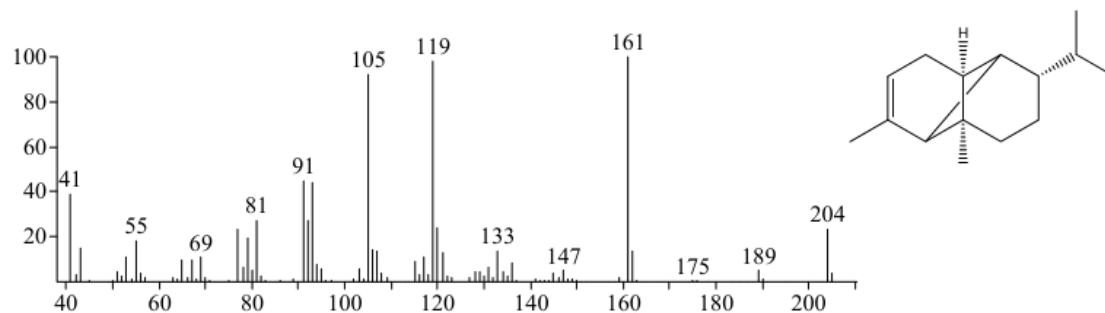
anexo 22

piper_brac #2436 RT: 24.46 AV: 1 NL: 3.28E6
 T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



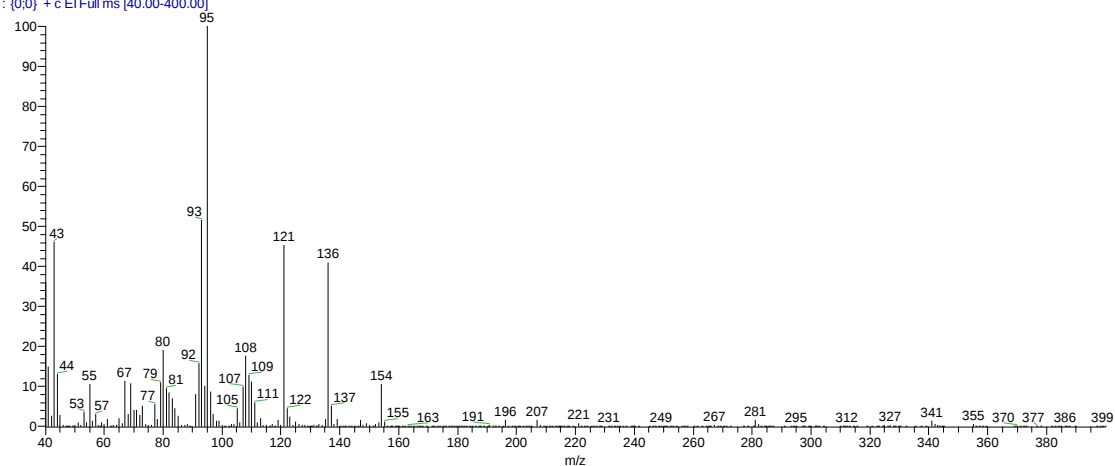
anexo 23

RT: 23.49 AI: 1374 KI: **1376** **Copaene <α>**
 CAS#: 3856-25-5 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 828
 CN: tricyclo(4.4.0.0^{2,7})dec-3-ene, 1,3-dimethyl-8-(1-methylethyl)-, stereoisomer
 Synonyms: aglaiene
 Source: *Hymenaea* oil ex Jean Langenheim; 20.73% *Copaifera officinalis*,
 Journal of High Resolution Chromatography 18:54(1995); 15.60% *Cedrela odorata*;
 15.50% *Dacryodes igaganga* (fruit)



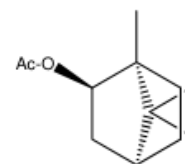
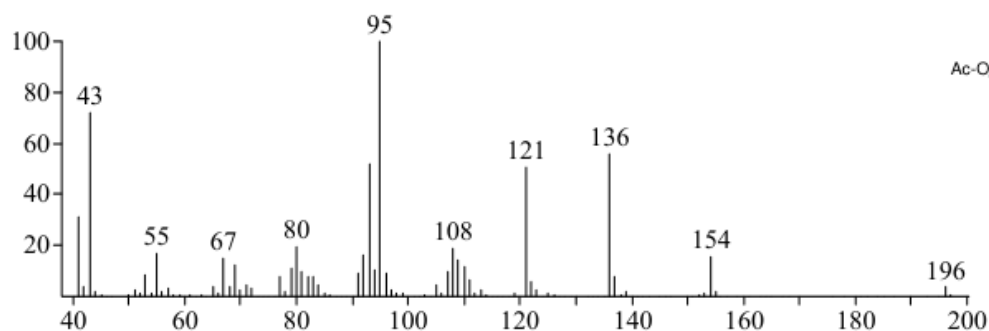
anexo 24

piper_brac #2180 RT: 22.31 AV: 1 NL: 5.66E6
 T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



anexo 25

RT: 19.49 AI: 1284 KI: 1285 **Bornyl acetate**
 CAS#: 76-49-3 MF: C₁₂H₂₀O₂ FW: 196 MSD LIB#: 314
 CN: trimethylbicyclo(2.2.1)heptan-2-ol <1,7,7-> acetate
 Synonyms: none
 Source: Aldrich Chem. ex T. Phillips, *Juniperus* leaf oils; 76.00% *Abies fragesii*,
 p. 4, in: Aromatic Plants and Essential Constituents, Peace Book Co., Hong Kong(1993);
 66.57% *Amomum villosum*; 59.00% *Juniperus rigida*



anexo 26



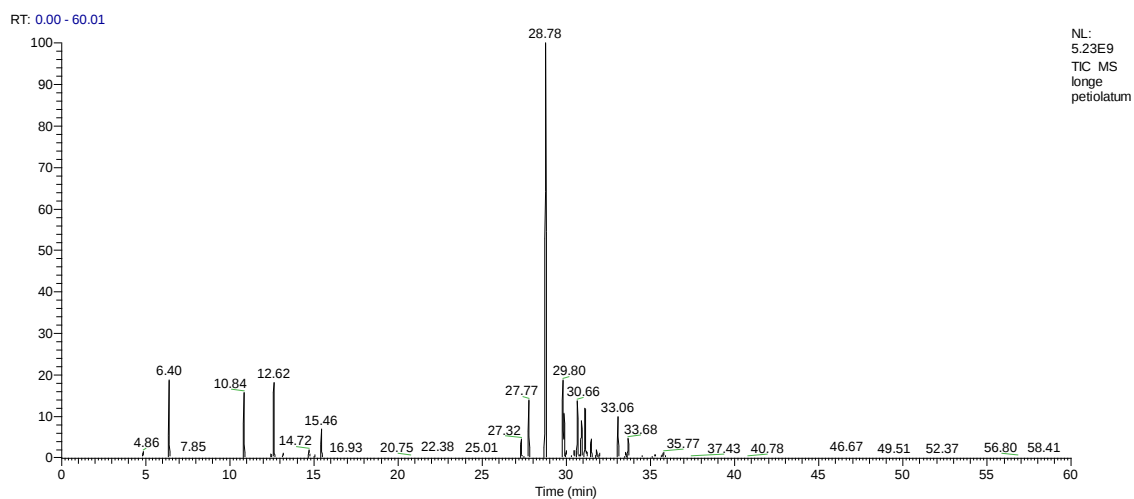
anexo 27



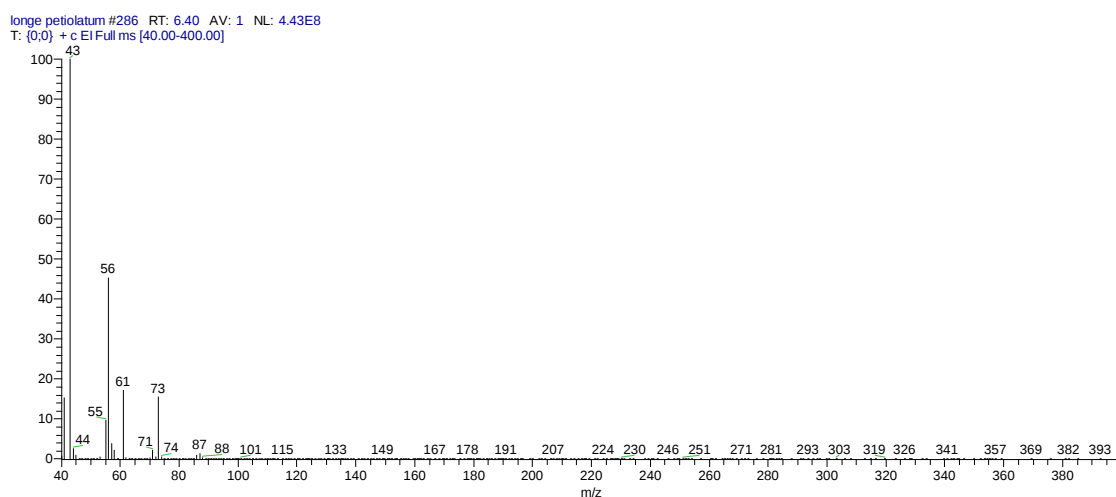
anexo 28



anexo 29

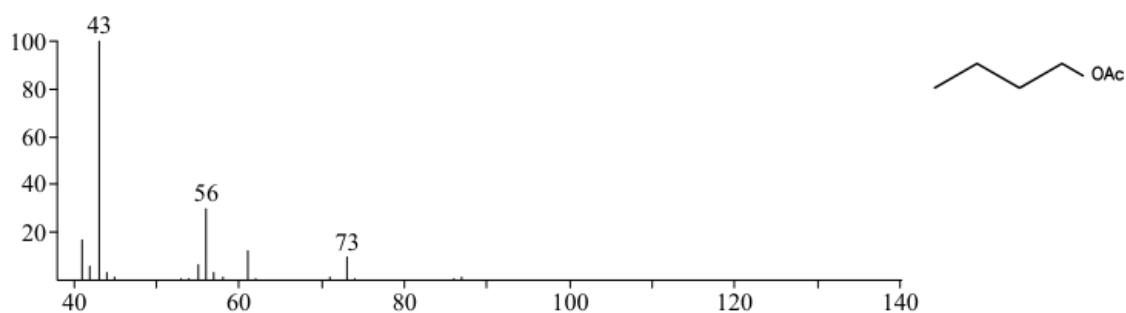


anexo 30



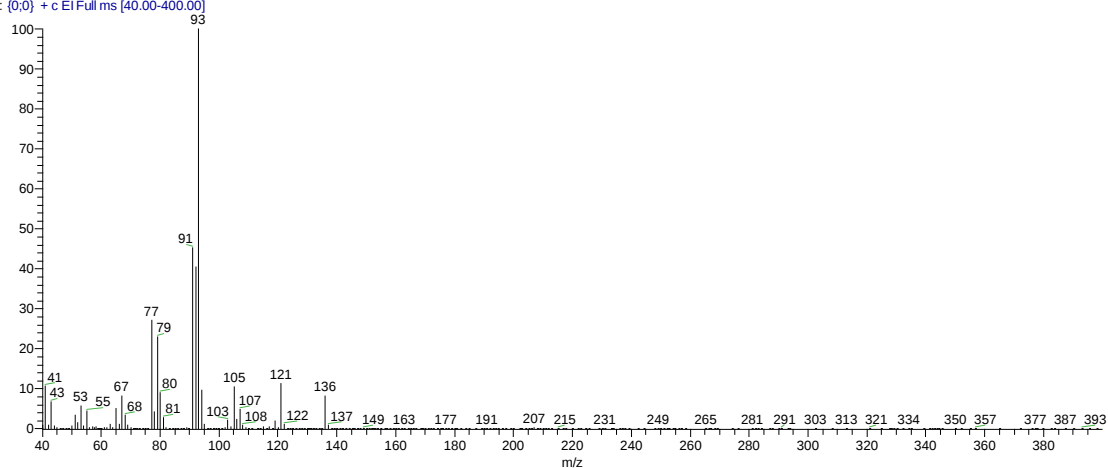
anexo 31

RT: 3.31 AI: 807 KI: 811 **Butyl acetate**
 CAS#: 123-86-4 MF: C₆H₁₂O₂ FW: 116 MSD LIB#: 23
 CN: acetic acid, butyl ester
 Synonyms: butyl ethanoate
 Source: alcohols mix ex E. von Rudloff; 53.06% *Michelia figo* (flower),
 p. 17, in: Aromatic Plants & Essential Constituents, Peace Book Co., Hong Kong(1993);
 22.24% *Artabotrys hexapetalus* (flower); 9.08% *Mandragora officinarum*



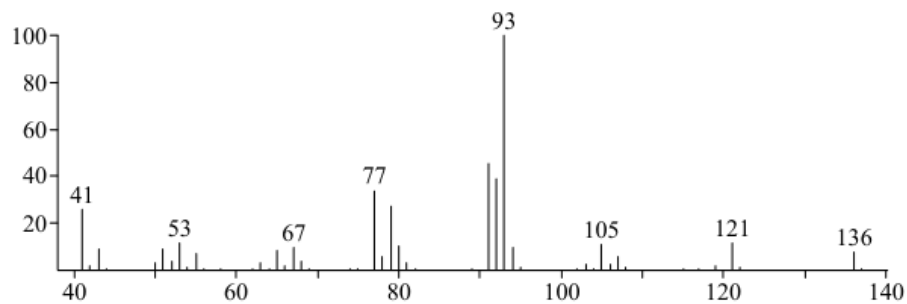
anexo 32

longe petiolatum #814 RT: 10.84 AV: 1 NL: 1.80E8
 T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



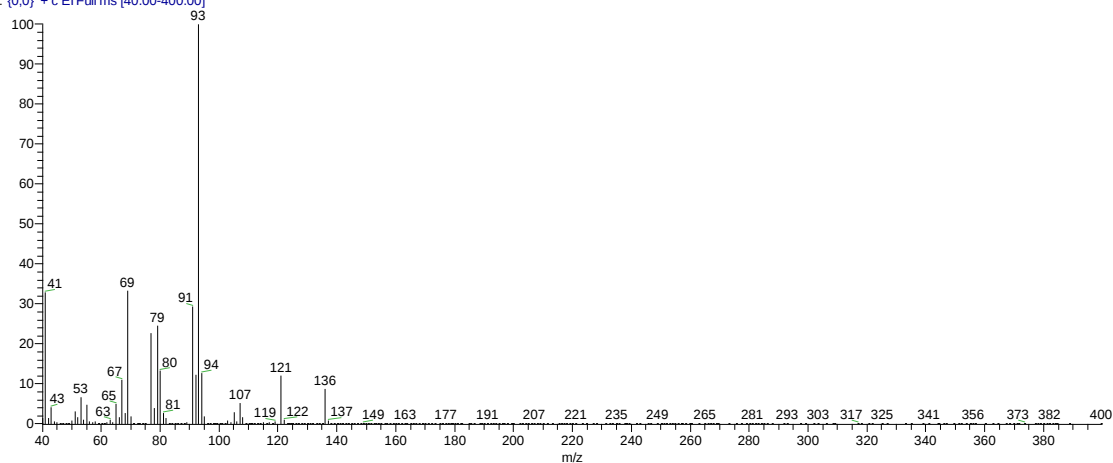
anexo 33

RT: 5.85 AI: 932 KI: 939 **Pinene <α>**
 CAS#: 80-56-8 MF: C₁₀H₁₆ FW: 136 MSD LIB#: 912
 CN: bicyclo(3.1.1)hept-3-ene, 2,6,6-trimethyl-
 Synonyms: 2-pinene
 Source: *Juniperus lucayana* leaf oil, RP Adams #2863; 88.13% *Pinus kesiya*,
 The Chemical Composition of *Pinus kesiya* oil from Yunnan, J-L Lo, in: Flav. & Frag.:
 A World Perspective, Lawrence, et al., (eds.), Proc. 10th Intl. Cong. Ess. Oils., Wash. DC(1996);
 87.40% *Sequoiadendron giganteum*; 78.61% *Pistacia lentiscus*



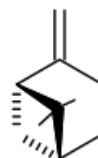
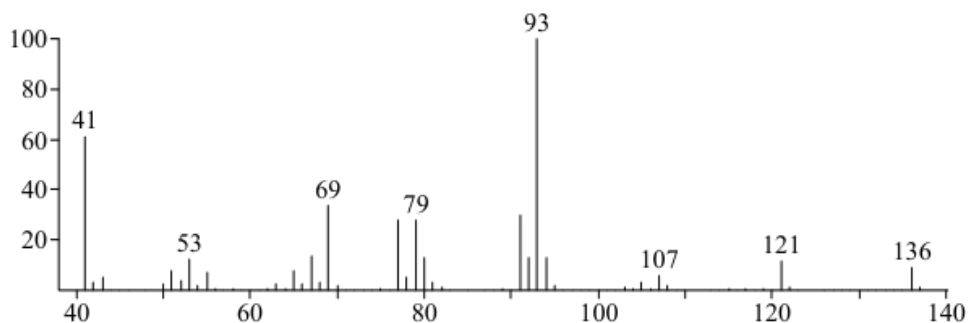
anexo 34

longe petiolatum #1027 RT: 12.62 AV: 1 NL: 2.32E8
 T: (0;0) + c EI Full ms [40.00-400.00]



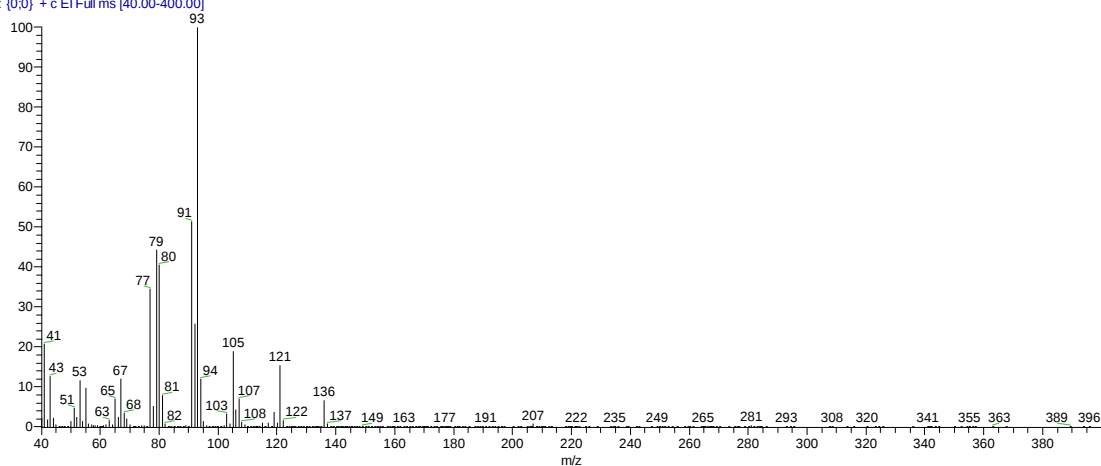
anexo 35

RT: 7.04 AI: 974 KI: 979 **Pinene** <β->
 CAS#: 127-91-3 MF: C10 H16 FW: 136 MSD LIB#: 305
 CN: bicyclo(3.1.1)heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-
 Synonyms: nopinene; terebenthene; pseudopinene
 Source: distillation of black pepper, RP Adams #5448; 59.90% *Ferula galbaniflua*,
 J. Food Sci. 27:455(1962); 58.52% *Amomum villosum*; 55.10% *Myristica fragrans*



anexo 36

longe petiolatum #1362 RT: 15.44 AV: 1 NL: 5.75E7
 T: {0;0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



anexo 37

RT: 8.96 AI: 1032 KI: 1037 **Ocimene <(Z)-β->**

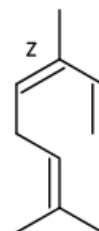
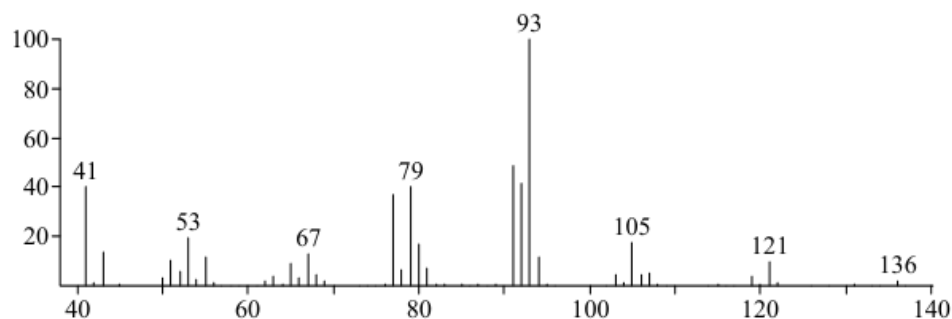
CAS#: 3338-55-4 MF: C₁₀H₁₆ FW: 136 MSD LIB#: 165

CN: 1,3,6-octatriene, 3,7-dimethyl-, (3Z)-

Synonyms: cis-ocimene

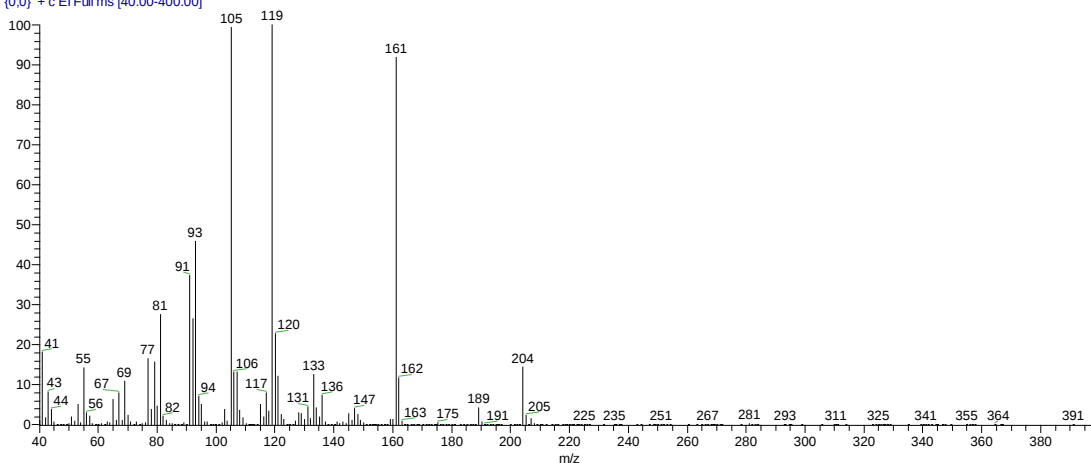
Source: distillation of sweet anis leaves, Calif., RP Adams #5452; 42.30% *Tagetes minuta*,

Perf. Flav. 10:73(1985); 40.20% *Tithonia diversifolia*; 32.23% *Cloranthus spicatus*



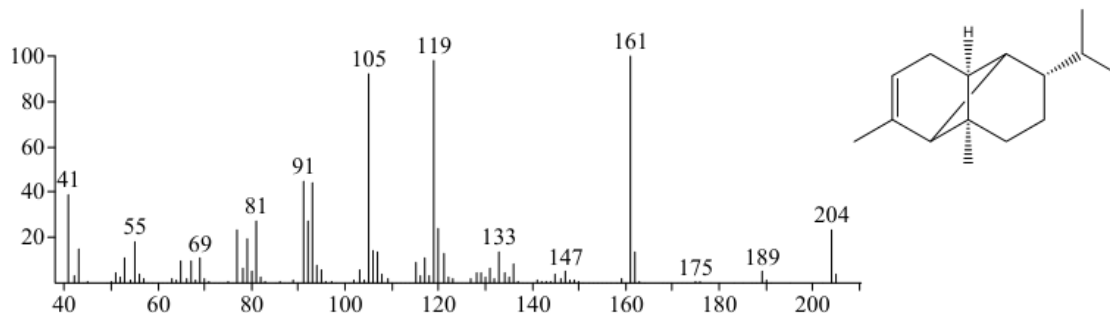
anexo 38

longe petiolatum #2775 RT: 27.31 AV: 1 NL: 2.85E7
T: [0,0] + c EI Full ms [40.00-400.00]

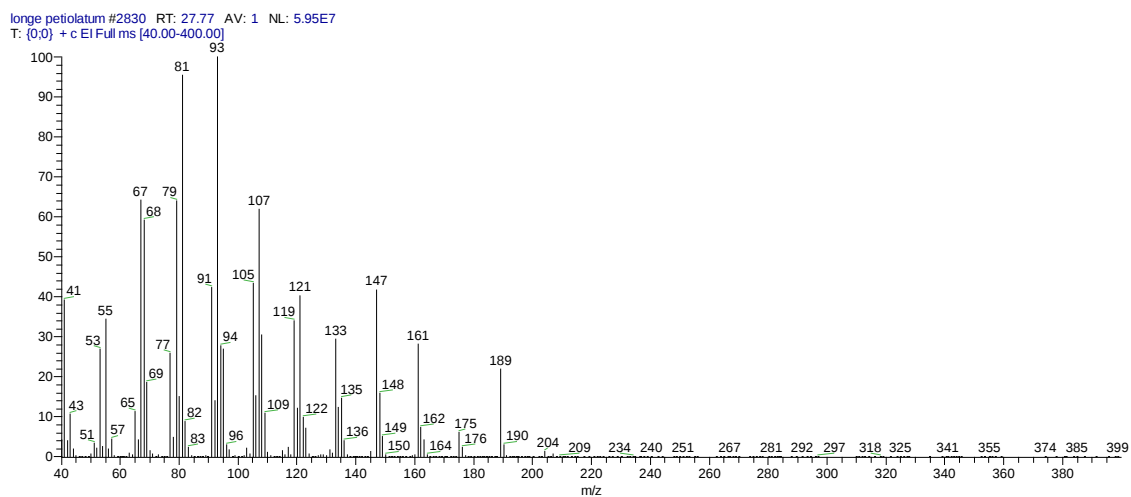


anexo 39

RT: 23.49 AI: 1374 KI: 1376 **Copaene <a->**
 CAS#: 3856-25-5 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 828
 CN: tricyclo(4.4.0.0^{2,7})dec-3-ene, 1,3-dimethyl-8-(1-methylethyl)-, stereoisomer
 Synonyms: aglaiene
 Source: *Hymenaea* oil ex Jean Langenheim; 20.73% *Copaifera officinalis*,
 Journal of High Resolution Chromatography 18:54(1995); 15.60% *Cedrela odorata*;
 15.50% *Dacryodes igaganga* (fruit)

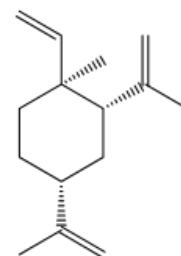
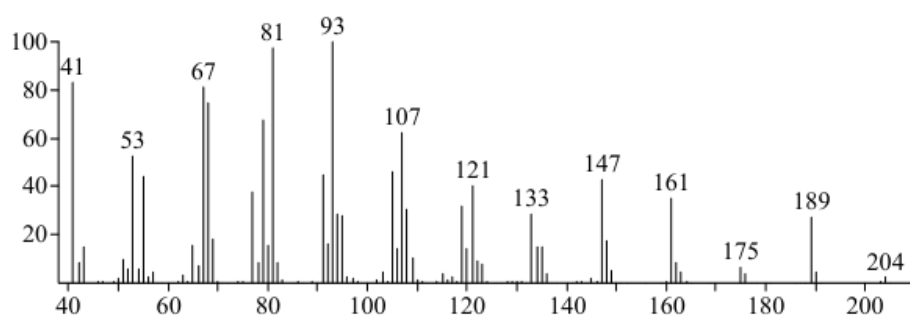


anexo 40



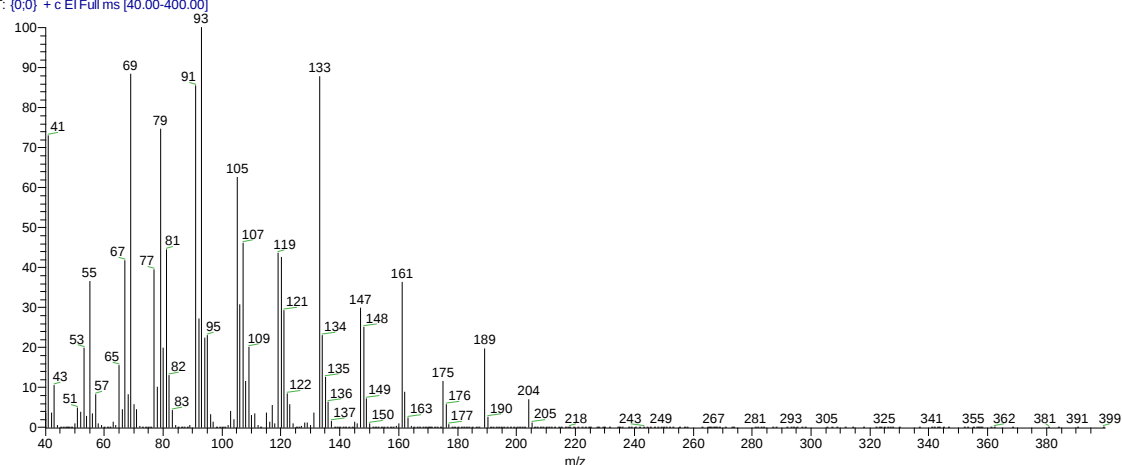
anexo 41

RT: 24.15 AI: 1389 KI: 1390 **Elemene <β>**
 CAS#: 515-13-9 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 309
 CN: cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, (1S-(1α,2β,4β))-
 Synonyms: none
 Source: Black pepper distillation; 23.11 *Ocimum micranthum*, p. 177,
 in: Flav .& Frag.: A World Persp., Lawrence, etal. (eds.), Proc. 10th Int. Cong. Ess. Oils,
 Elsevier, Amsterdam(1988); 22.09% *Protium heptaphyllum*; 18.00% *Atractylodes lancea*



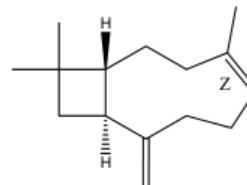
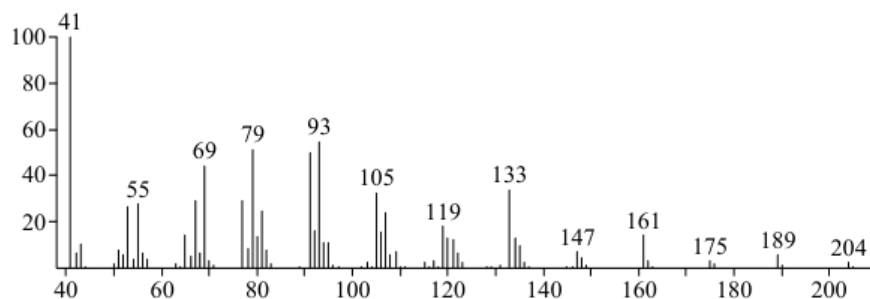
anexo 42

longe petiolatum #2950 RT: 28.78 AV: 1 NL: 3.62E8
 T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



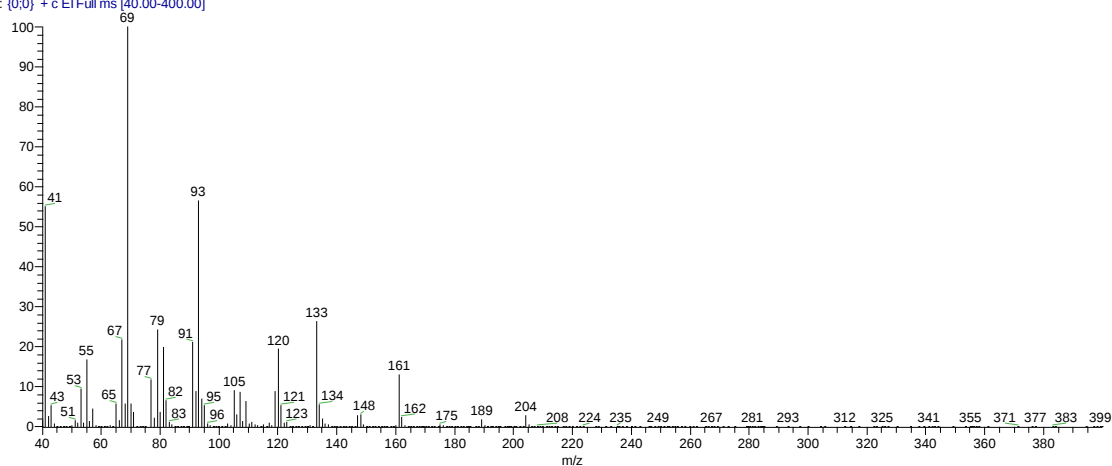
anexo 44

RT: 24.95 AI: 1408 KI: 1408 **Caryophyllene <(Z)->**
 CAS#: 118-65-0 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 386
 CN: bicyclo(7.2.0)undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-,(1R-(1R*,4Z,9S*))-
 Synonyms: isocaryophyllene; caryophyllene, iso-
 Source: Fluka Chem.; 13.67% *Jasmine sambac*, p. 83, in: Aromatic Plants & Essential
 Constituents, Peace Book Co., Hong Kong(1993); 6.61% *Neocinnamomum delavayi*;
 3.98% *Acronychia oligophlebia*



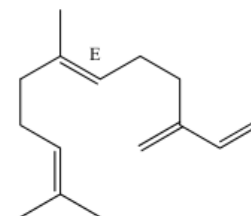
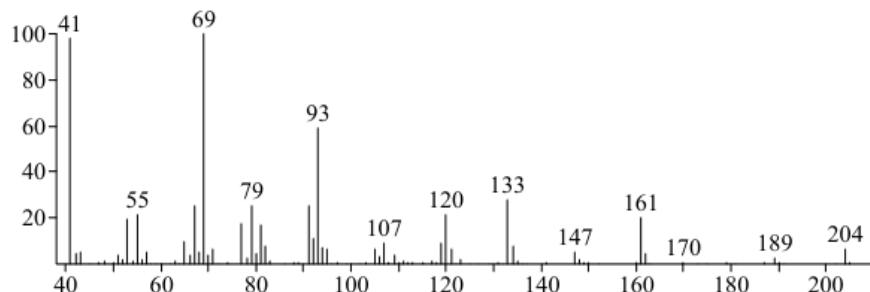
anexo 45

longe petiolatum #3070 RT: 29.79 AV: 1 NL: 1.67E8
 T: [0,0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



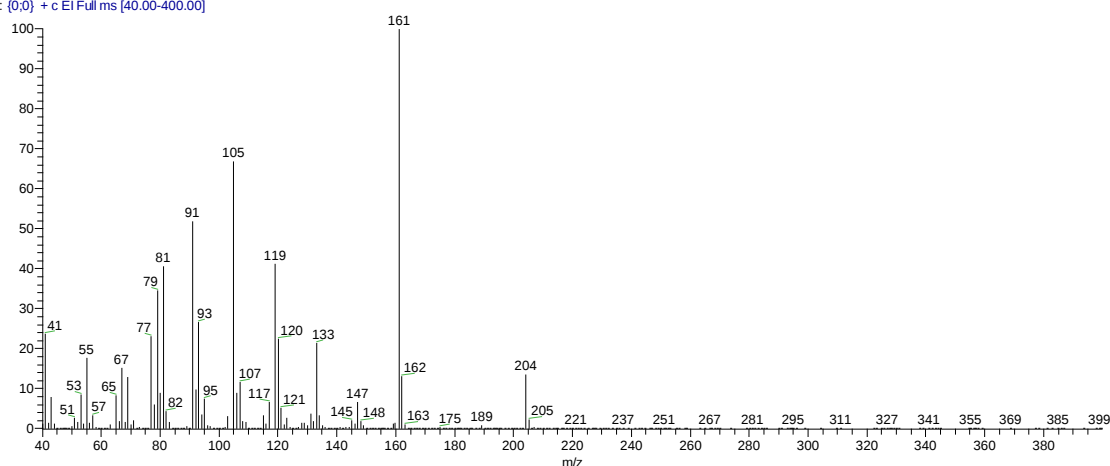
anexo 46

RT: 26.92 AI: 1454 KI: 1456 **Farnesene <(E)-β->**
 CAS#: 18794-84-8 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 360
 CN: 1,6,10-dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)-
 Synonyms: trans-β-farnesene
 Source: Carrot root oil ex D. Senalik; 79.21% *Chaerophyllum coloratum* (fruit),
 JEOR 7:529(1995); 68.46% *Chaerophyllum coloratum* (umbel);
 25.68% *Chamomilla recutita*



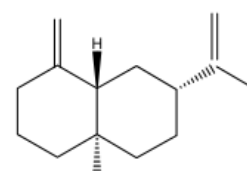
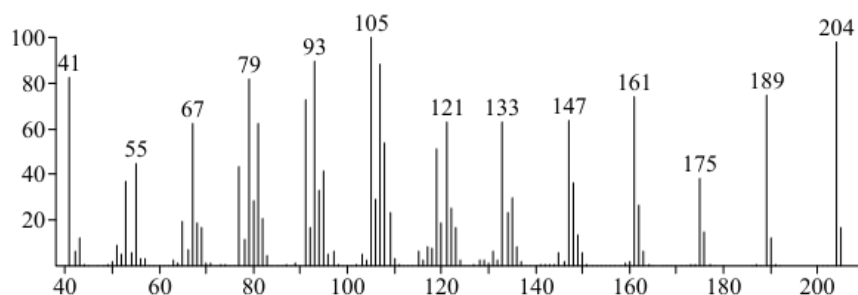
anexo 147

longe petiolatum #3174 RT: 30.66 AV: 1 NL: 1.03E8
 T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



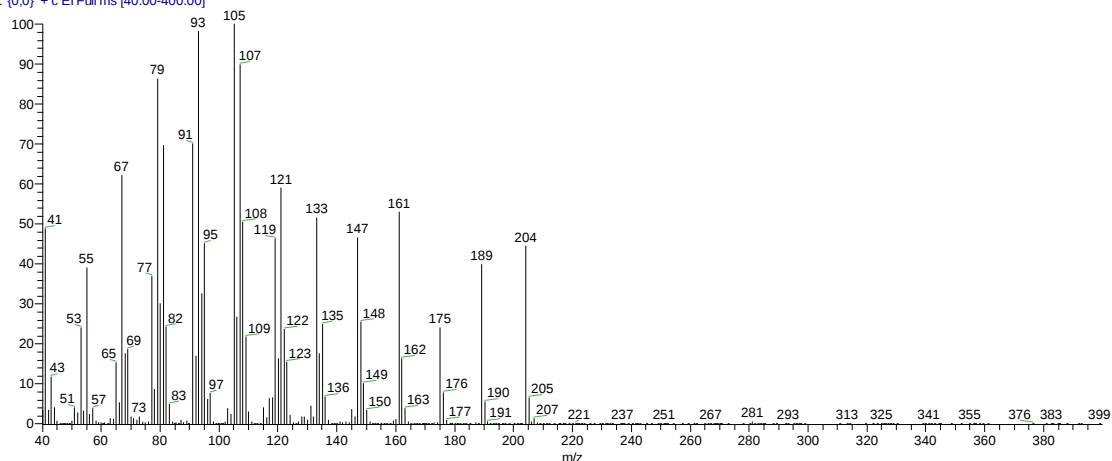
anexo 48

RT: 28.37 AI: 1489 KI: 1490 **Selinene <β->**
 CAS#: 17066-67-0 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 420
 CN: naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, (4aR-(4aa,7α,8αβ))-
 Synonyms: eudesma-4(14),11-diene; selina-4(14),11-diene; β-eudesmene
 Source: distillation of celery leaves, RP Adams #5942; 30.50% *Apium graveolens*,
 Pakistan J. Sci. Ind. Res. 19:243(1976); 17.39% *Coleus aromaticus*; 16.20% *Ferula asafoetida*



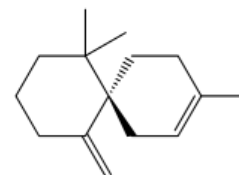
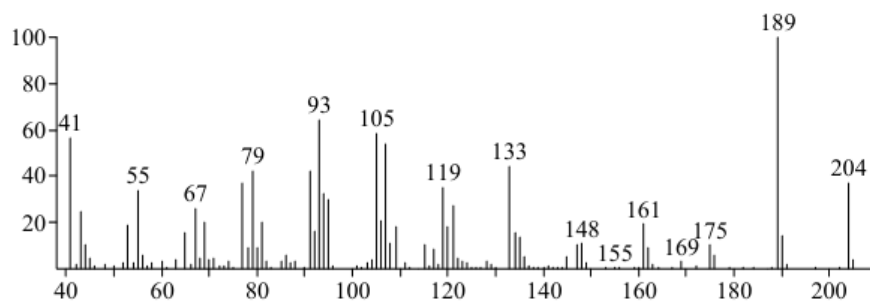
anexo 49

longe petiolatum #3203 RT: 30.90 AV: 1 NL: 2.69E7
T: [0;0] + c EI Full ms [40.00-400.00]



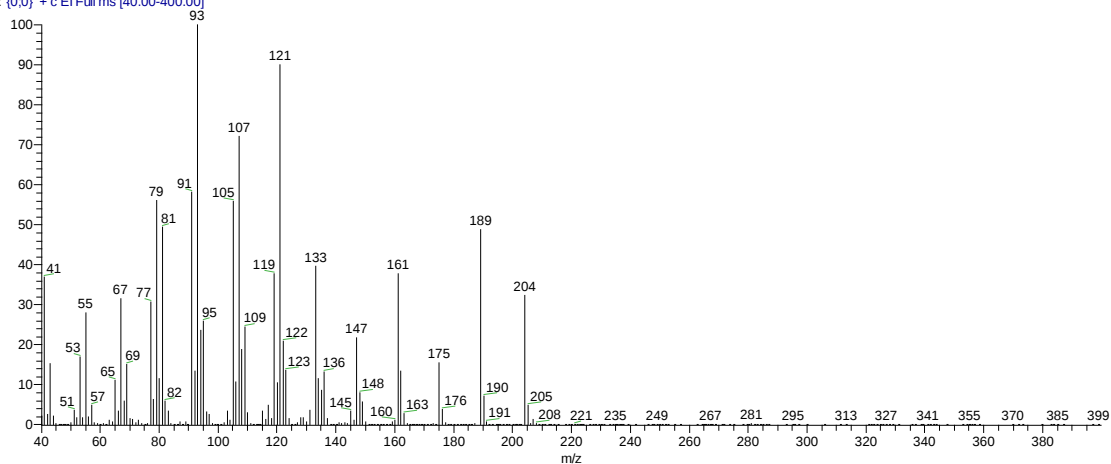
anexo 50

RT: 27.82 AI: 1476 KI: 1477 **Chamigrene <β>**
CAS#: 18431-82-8 MF: C₁₅H₂₄ FW: 204 MSD LIB#: 943
CN: spiro(5.5)undec-2-ene, 3,7,7-trimethyl-11-methylene-, (R)-
Synonyms: none
Source: *Juniperus recurva* wood oil J. Oda, Ag. Biol. Chem. 41:201(1977);
3.60% *Zingiber zerumbet* (stem), JEOR 7:153(1995); 2.90% *Piper hancei*;
2.84% *Ocimum gratissimum*



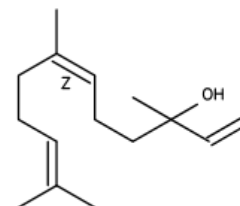
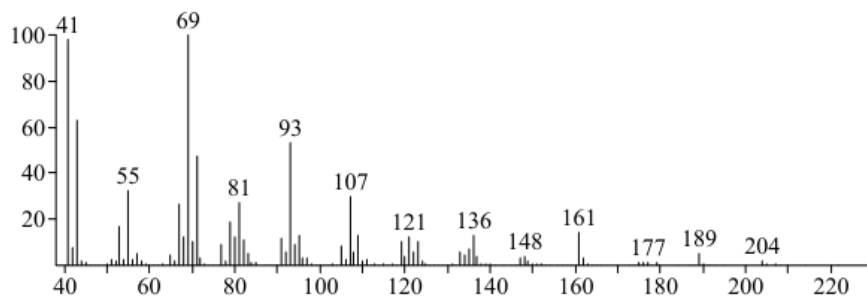
anexo 51

longe petiolatum #3228 RT: 31.11 AV: 1 NL: 4.96E7
T: {0:0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



anexo 52

RT: 30.09 AI: 1531 KI: 1532 **Nerolidol <(Z)->**
CAS#: 142-50-7 MF: C₁₅H₂₆O FW: 222 MSD LIB#: 1140
CN: 1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (Z)-
Synonyms: peruvial
Source: Sigma Chem. ex Robert Doss, USDA; 36.30% *Zingiber zerumbet*,
FFJ 3:37(1988); 5.70 *Achillea millefolium*; 5.50% *Psidium guineense* (leaf)



anexo 53

longe petiolatum #3460 RT: 33.06 AV: 1 NL: 6.69E7
T: {0:0} + c EI Full ms [40.00-400.00]

