

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA

CÉSAR CASTELO BRANCO DE QUEIROZ

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Piper callosum* Ruiz & Pav.
(Piperaceae)

ITACOATIARA

2021

CÉSAR CASTELO BRANCO DE QUEIROZ

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Piper callosum* Ruiz & Pav.
(Piperaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado com o objetivo de aprovação no curso de Bacharel em Farmácia, no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET).

RENATA TAKEARA HATTORI

ITACOATIARA

2021

Ficha Catalográfica

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

Q3c Queiroz, César Castelo Branco de
Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum* Ruiz & Pav. (Piperaceae) / César Castelo Branco de Queiroz . 2021
47 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Renata Takeara Hattori
TCC de Graduação (Farmácia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Piper callosum*. 2. Piperaceae. 3. Óleos essenciais. 4. Extrato. 5. Atividade antimicrobiana. I. Hattori, Renata Takeara. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



TERMO DE APROVAÇÃO TCC

O Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia, elaborado pelo discente César Castelo Branco de Queiroz, foi julgado aprovado por todos os membros da Banca Examinadora, para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia e aprovado, em sua forma final, pelo Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia.

Itacoatiara, 17 de junho de 2021.

Renata Takeara Hattori
Orientador(a) do TCC

Apresentado à Banca Examinadora integrada pelos seguintes professores:

Presidente:

Renata Takeara Hattori

Membros:

Geone Maia Correa

Prof. Dr. Geone Maia Correa

Maiara de Souza Nunes Ávila

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por todas maravilhas que ele me proporciona a cada dia.

À minha mãe por todo o incentivo para que eu buscasse trilhar um caminho de honestidade e sucesso.

À minha esposa e meus filhos, que nunca mediram esforços para colaborar comigo, dos quais em muitas vezes me ausentei para que pudesse cumprir com minhas obrigações acadêmicas.

À minha orientadora por todo o suporte acadêmico, desde as aulas ministradas, da oportunidade de participar de projetos de iniciação científica, até o total apoio neste Trabalho de Conclusão de Curso

À equipe do laboratório de Produtos Naturais do Instituto pelo conhecimento compartilhado, em especial Vanessa Farias dos Santos Ayres, Roosalyn Santos da Silva e Midiã Rodrigues de Oliveira.

A todos os professores que tive em toda minha vida, desde o pré-escolar e ensinos fundamental e médio, até os mestres e doutores da Conceituada Universidade Federal do Amazonas que nortearam minha incessante busca pelo conhecimento. Aos técnicos de nossos laboratórios, em especial Francisco Emiliano Neto, Idercley Souza e Emerson Dantas.

Aos meus colegas de curso pelo apoio e incentivo, em especial Felipe Gaspar, Rafaela Silva e Beatriz Rebelo.

“Tal conhecimento é maravilhoso demais e está além do meu alcance; é tão elevado que não o posso atingir”. (Salmo 139:6)

RESUMO

A espécie *Piper callosum* é uma das mais de 3.700 espécies integrantes da Família Piperaceae, sendo popularmente conhecida como “óleo elétrico”. Suas folhas e talos são usados sob a forma de chá para tratar disenteria, náusea, dismenorreia, dores reumáticas e musculares e como repelente natural. Tais efeitos podem ser atribuídos às substâncias presentes nos extratos de suas folhas, pertencentes às classes das amidas, esteroides e alcaloides. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum* e avaliar a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. As folhas foram coletadas no Campus do ICET e extraídas com etanol 70% sob refluxo. O extrato foi fracionado por partição líquido-líquido com hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação do material fresco em aparelho de Clevenger. O perfil químico do extrato bruto e das frações foi analisado através de reações cromáticas em tubos e cromatografia em camada fina. A determinação dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O extrato bruto, frações e óleos essenciais foram submetidos ao ensaio de atividade antimicrobiana. Os rendimentos para o extrato bruto, fração hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanol e hidroalcoólica foram, respectivamente 19,22%, 15,13%, 1,64%, 1,45%, 10,41% e 71,35%. Foram obtidas três frações dos óleos essenciais, com rendimentos de 0,36% em OE1 (mais denso), 0,17% em OE2 (menos denso) e 0,27% em OE3 (densidade intermediária). As classes de metabólitos detectadas em cromatografia em camada fina e confirmadas através de prospecções fitoquímicas foram esteroides, saponinas e compostos fenólicos. O óleo essencial apresentou como compostos majoritários safrol (74,24%), α -pineno, β -pineno e 1,8-cineol, demonstrando atividade antimicrobiana frente aos microrganismos estudados. São necessários mais estudos para se determinar a concentração inibitória mínima e confirmar qual substância isolada é responsável por essa ação antimicrobiana.

Palavras-chave: *Piper callosum*; Piperaceae; óleos essenciais; extrato; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The *Piper callosum* species is one of the more than 3,700 species belonging to Piperaceae family, being popularly known as “electric oil. Its leaves and stalks are used in the form of tea to treat dysentery, nausea, dysmenorrhea, rheumatic and muscle pain, and as a natural repellent. These effects can be attributed to substances present in its leaf extracts, belonging to the classes of amides, steroids and alkaloids. Therefore, the objective of this work was to evaluate the chemical composition of the essential oil, crude extract and fractions of *Piper callosum* and to evaluate the antimicrobial activity against the microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. The extract was fractionated by liquid-liquid partition with hexane, chloroform, ethyl acetate and butanol. Essential oils were obtained by hydrodistillation of fresh material in a Clevenger apparatus. The chemical profile of crude extract and fractions was analyzed through chromatic reactions in tubes and thin-layer chromatography. The determination of chemical constituents of essential oils was carried out through gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry. The crude extract, fractions and essential oils were submitted to the antimicrobial activity test. The yields of the crude extract, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and hydroalcoholic fraction were respectively 19.22%, 15.13%, 1.64%, 1.45%, 10.41% and 71.35%. Three fractions of essential oils were obtained, with yields of 0.36% in OE1 (densest), 0.17% in OE2 (less dense) and 0.27% in OE3 (intermediate density). The classes of metabolites detected in thin-layer chromatography and confirmed through phytochemical surveys were steroids, saponins and phenolic compounds. The essential oil presented as major compounds safrole (74.24%), α -pinene, β -pinene and 1,8-cineole, demonstrating antimicrobial activity against all microorganisms studied. Further studies are needed to determine the minimum inhibitory concentration and confirm which isolated substance is responsible for this antimicrobial action.

Keywords: *Piper callosum*; Piperaceae; essential oils; extract; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Piper callosum</i>	19
Figura 2 - Substâncias fenólicas reveladas por meio de cromatografia em camada fina.....	30
Figura 3 - Substâncias terpênicas e fenólicas reveladas em cromatografia em camada fina.....	31
Figura 4 - Prospecção em tubos de ensaio para caracterização de fenólicos.....	33
Figura 5 - Caracterização fitoquímica para detecção de terpenos.....	33
Figura 6 - Caracterização fitoquímica para detecção de saponinas.....	33
Figura 7 - <i>Escherichia coli</i>	36
Figura 8 - (A) <i>Staphylococcus aureus</i> e (B) <i>Candida parapsilosis</i>	36
Figura 9 - <i>Candida albicans</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado colorimétrico esperado do teste.....	22
Tabela 2 - Relação dos constituintes e as cores esperadas.....	23
Tabela 3 - Classificação dos constituintes.....	23
Tabela 4 - Classificação de saponinas através do teste de Lieberman- Burchard.....	24
Tabela 5 - Rendimentos do óleo essencial de <i>Piper callosum</i>	28
Tabela 6 - Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>P. callosum</i> coletada em outubro (2018).....	29
Tabela 7 - Massa e rendimento do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i>	30
Tabela 8 - Classes químicas analisadas no extrato bruto e frações de <i>Piper callosum</i>	35
Tabela 9 - Resultados da avaliação de atividade inibitória para o óleo essencial, extrato bruto e frações de OE1 Outubro/2018.....	37

Sumário

1.0 INTRODUÇÃO.....	13
2.0 JUSTIFICATIVA.....	14
3.0 OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1 Produtos Naturais.....	16
4.2 Óleos essenciais.....	16
4.3 Família Piperaceae.....	17
4.4 O Gênero <i>Piper</i>	17
4.5 A espécie <i>Piper callosum</i>	18
4.6 Microrganismos patogênicos.....	19
5.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5.1 Óleos essenciais.....	20
5.1.1 Coletas do vegetal.....	20
5.1.2 Extração dos óleos essenciais.....	20
5.1.3 Identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais.....	21
5.2 Extrato Bruto e Frações.....	21
5.2.1 Preparo do extrato e fracionamento.....	21
5.2.2 Prospecção fitoquímica para caracterização dos constituintes fenólicos.....	21
5.2.3 Teste para fenois e taninos.....	22
5.2.4 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides.....	22
5.2.5 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.....	23
5.2.6 Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos (Lieberman-Burchard).....	23
5.2.7 Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas.....	24
5.2.8 Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides.....	24
5.2.9 Análise do extrato e frações em placas cromatográficas de gel de sílica.....	25

5.3 Ensaio Antimicrobiano.....	26
5.3.1 Avaliação da atividade inibitória.....	26
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
6.1 Óleos essenciais.....	27
6.1.1 Rendimentos.....	27
6.1.2 Composição química.....	27
6.2 Extrato e frações.....	29
6.2.1 Rendimentos.....	29
6.2.2 Cromatografia em camada fina	30
6.2.3 Prospecção fitoquímica para caracterização de grupos fenólicos e taninos.....	31
6.2.4 Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenos e esteroides.....	34
6.2.5 Teste para saponinas.....	34
6.3 Atividade antimicrobiana.....	35
6.3.1 Avaliação da atividade inibitória.....	35
7.0 CONCLUSÃO.....	38
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1.0 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, resultantes do metabolismo secundário das plantas, possuem funções fundamentais para o desenvolvimento e manutenção dos mais diversos tipos de organismos vivos. Tais produtos podem ser compostos por diversas substâncias, dentre as quais estão moléculas bioativas, de importância médica e até mesmo tóxica para seres humanos (HU et al, 2019). Dentre as atividades biológicas evidenciadas para os produtos naturais estão a capacidade de atuar na prevenção e tratamento de doenças renais (CHEN et al, 2018), atuar como repelentes de insetos, funções larvicida, anti-helmíntica, anti-inflamatória (KHAN, 2018), antioxidante e antimicrobiana (NASCIMENTO et al, 2015).

A família Piperaceae abrange cinco gêneros, sendo eles *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Piper* e *Peperomia* (SAMAIN, 2010) e aproximadamente 3.700 espécies (CHRISTENHUSZ & BYNG, 2016). Os óleos essenciais extraídos de espécies da família são compostos por substâncias como: terpinoleno, que possui atividade larvicida (SILVA et al, 2016); (*E*)-cariofileno e α -humuleno, que têm potencial antinociceptivo e antiinflamatório (PINHEIRO et al, 2011); e os fenilpropanoides miristicina e elemicina os quais tem potencial inseticida (DORLA et al, 2017). Extratos de espécies da família Piperaceae também apresentaram potencial inseticida (SANTOS et al, 2013), atividade acaricida (BRAGA et al, 2018) e antimicrobiana, ligado à presença de esteroides, alcaloides e compostos fenólicos (KALAIARASI et al, 2016; HASTUTI et al, 2017).

O gênero *Piper* é um dos cinco gêneros que integram a família Piperaceae, possuindo cerca de 700 representantes espalhados em ambos os hemisférios (PARMAR et al, 1997). As espécies desse gênero têm grande importância para a ciência pelo fato de apresentarem em sua composição substâncias capazes de atuar no combate ao câncer (MACEDO et al, 2019), fungos, bactérias (CHANPRAPAI & CHAVASIRI, 2017) e parasitas (FLORES et al, 2019).

No Brasil, a espécie *Piper callosum* é popularmente conhecida como “elixir-paregórico”, “matricá” e “óleo elétrico”, sendo usada para tratar gonorreia, dores em geral, distúrbios digestivos e como repelente, adstringente e hemostática. As folhas são de formato elipsoide e de cor esverdeada em ambas as faces, um tanto brilhantes na face adaxial e ao serem maceradas liberam odor aromático característico (SILVA

et al, 2017). Há relatos de sua ocorrência nos estados do Acre, Amapá, Rondônia, Pará, Distrito Federal, Mato Grosso, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná (GUIMARÃES et al, 2015). Os produtos do metabolismo secundário extraídos de *Piper callosum* possuem propriedades biológicas, tais como: inseticida (BALDIN et al, 2015), moluscicida/ovicida sobre *Niomphalaria glabrata* (RAPADO et al, 2011).

A busca por novos agentes antibacterianos é uma preocupação de escala mundial. Algumas cepas de bactérias são resistentes a mais de 100 diferentes tipos de antibióticos, mesmo que estes possuam diferentes mecanismos de ação antibacteriana (ELTZOV et al, 2012). Bactérias resistentes à penicilina, quinolonas e sulfonamidas, como *E. coli* e *S. aureus* são responsáveis por cerca de 80% das internações em unidades de terapia intensiva (UTI's) em Portugal (LINHARES et al, 2015). Nos Estados Unidos, bactérias gram-negativas resistentes a antibióticos são a causa de cerca de 70% das internações dos pacientes em UTI's (PELEG & HOOPER, 2010). No Brasil, além da resistência à antimicrobianos convencionais, estudos também revelaram a existência de plasmídeos responsáveis pela tolerância das bactérias a outros antimicrobianos (compostos não antibióticos) como os metais pesados prata e cobre, usados nas infecções bacterianas superficiais e para prevenir a infecção microbiana (ANDRADE et al, 2018).

2.0 JUSTIFICATIVA

Piper callosum é uma erva nativa em países da América do Sul, ocorrendo de forma abundante em diversos estados do Brasil, inclusive no Amazonas (GUIMARÃES et al, 2015). Popularmente conhecida como “óleo elétrico”, suas folhas e talos são usados sob a forma de chá para tratar disenteria, náusea, dismenorreia, dores reumáticas e musculares, e como repelente natural (SILVA et al, 2017). Tais efeitos podem ser atribuídos às substâncias presentes nos extratos de suas folhas, pertencentes às classes das amidas, esteroides e alcaloides (PARMAR et al, 1997). Essas substâncias também são apontadas como responsáveis pelos efeitos moluscicida/ovicida sobre *Niomphalaria glabrata* (RAPADO et al, 2011), inseticida (BALDIN et al, 2015). As amidas pipericallosina e piperovatina encontradas em extratos de *Piper callosum* demonstraram atividade anestésica local e anti-inflamatória, respectivamente (RODRÍGUEZ et al, 2005; SILVA et al, 2008). O óleo essencial extraído de suas folhas é constituído majoritariamente pelo fenilpropanoide

safrol (69,2%) e os monoterpenos metil-eugenol (8,6%) e β -pineno (6,2%) (SOUTO et al, 2012). Tais substâncias apresentam diversas atividades biológicas tais como atividades larvicida/adulticida sobre *Aedes aegypti* e acetilcolinestásica pelas quais o metileugenol é responsável (VORIS et al, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o problema de resistência a antimicrobianos como uma das dez principais ameaças à saúde global. Estima-se que até 2050 o problema causará, anualmente, a perda de 10 milhões de vidas em todo o mundo, além de um prejuízo econômico de 100 trilhões de dólares (BRASIL, 2019). Atualmente, o uso de drogas comerciais está relacionado com muitos problemas que limitam seu uso, como resistência parasitária, danos ambientais e a toxicidade de muitas drogas sintéticas. Estes problemas estimulam a busca por novos métodos alternativos de controle, incluindo a busca de compostos efetivos caracterizados por menores impactos ambientais em termos de resíduos e toxicidade, uma vez que compostos derivados de planta são, geralmente, mais facilmente degradáveis e poderiam mostrar danos ambientais reduzidos comparados com as drogas sintéticas (FLAMINI, 2003).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas, extrato bruto e frações obtidos a partir das partes aéreas e das folhas de *Piper callosum*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar quimicamente a (s) substância (s) dos óleos essenciais por CG-EM (Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas);
2. Detectar grupos de metabólitos presentes no extrato e frações de *Piper callosum* por meio de reações cromáticas em tubos e cromatografia em camada fina;
3. Analisar o potencial antimicrobiano do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum*.

4.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais obtidos de plantas, minerais ou animais são abundantemente utilizados para o tratamento de numerosas doenças há milhares de anos (LAHLOU, 2007; PATWARDHAN et al, 2004). Como exemplos de substâncias naturais com potencial farmacológico tem-se a morfina, extraída do ópio e a digoxina, substância antiarrítmica extraída da flor de *Digitalis lanata* (LAHLOU, 2013). Esses e outros produtos naturais, tornaram-se recursos mundialmente importantes no desenvolvimento de novos fármacos (KHAN, 2018). Dessa maneira, os produtos naturais e seus derivados representam cerca de 35% dos 1,1 trilhões de dólares arrecadados anualmente pela indústria global de medicamentos. Do mesmo modo, o mercado brasileiro movimentou, só no ano de 2016, cerca de 25,68 milhões de dólares, apenas com as vendas dos fitoterápicos Acheflan[®], Syntocalmy[®] e Melagrião[®] produzidos à base de *Codia verbenaceae*, *Passiflora incarnata* e *Mikania glomerata*, respectivamente (CALIXTO, 2019). Atualmente, os estudos com plantas medicinais já evidenciaram importantes atividades biológicas tais como propriedades inibidoras de enzima (YIN et al, 2019) e antifibrose (SHAN et al, 2019). Outras evidências incluem atividade antimicrobiana (SAVANT et al, 2014; MANANDHAR et al, 2019; MICKYMARAY, 2019), podendo até servir como base para o desenvolvimento de novos antibióticos (MOLONEY, 2016).

4.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, sendo compostos por misturas complexas de substâncias voláteis e por isso apresentam forte odor. São normalmente extraídos de plantas encontradas em países com temperaturas mais elevadas, sendo muito utilizados popularmente. Esses usos consistem em saborizar comidas e bebidas, disfarçar odores desagradáveis e controle sanitário. Tais misturas são compostas principalmente por hidrocarbonetos de dez e quinze átomos de carbono (mono e sesquiterpenos) e substâncias oxigenadas (fenilpropanoides) (MACHADO & FERNANDES JUNIOR et al, 2011).

No tocante à aplicabilidade dos óleos essenciais na indústria, pode-se destacar seu emprego como princípios ativos, excipientes ou sinergistas na indústria farmacêutica, como também nas formulações de cosméticos, agrícola e alimentícia (JUGREET et al, 2020). Além disso, os óleos essenciais também podem ser utilizados na formulação de sabonetes, cremes e perfumes, produzidos e vendidos em escala local e nacional, proporcionando maior geração de emprego (AFILAL et al, 2016). Dentre as propriedades biológicas evidenciadas para os óleos essenciais, encontram-se atividade larvicida frente a larvas de *Culex quinquefasciatus* (AMMAR et al, 2020), atividade antioxidante (FARIAS et al, 2019) e atividade antibacteriana (GONÇALVES et al, 2017).

4.3 Família Piperaceae

Informações atualizadas sobre a Família Piperaceae mencionam que esta abriga aproximadamente 3.700 espécies vegetais (CHRISTENHUZ & BYNG, 2016) dos gêneros *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Peperomia* e *Piper* (SAMAIN et al, 2010). De forma complementar, Andrade et al (2009) afirma que na Região Amazônica podem ser encontrados 140-300 espécies representantes dessa família. Os integrantes dessa família diferem de outras plantas, principalmente, por apresentarem inflorescências no formato de espigas e por possuírem caules nodosos e articulados (CARVALHO-SILVA, 2013). Tanto óleos essenciais quanto extratos das espécies de Piperaceae tiveram atividades biológicas investigadas e evidenciadas e, recentemente, as pesquisas enfatizaram as atividades anticâncer (AL-MADHAGI et al, 2018), antidiabética, imunomoduladora (SHIVAKUMAR & HIMA, 2018) e antimicrobiana sinérgica (LEAL et al, 2019). As propriedades biológicas das plantas da família Piperaceae, como a *Peperomia pelúcida*, podem ter relação com a presença de taninos, flavonoides, glicosídeos, alcaloides e saponinas nos extratos (AMARATHUNGA & KANKANAMGE, 2017) ou com compostos majoritários do óleo essencial como dilapiol, miristicina e trans-cariofileno (RAGHAVENDRA & PRASHITH, 2018).

4.4 Gênero Piper

As espécies pertencentes ao gênero *Piper* encontram-se amplamente distribuídas nas regiões pantropicais, sendo popularmente chamadas de “pimentas”.

Por apresentarem estruturas armazenadoras de óleo em quase todas as espécies, as espécies desse gênero são classificadas como plantas aromáticas. Além de seus usos na culinária como tempero, as espécies de *Piper* demonstraram serem possuidoras de diversas atividades biológicas. Tais propriedades podem ter relação com a presença de substâncias como a piperina, alcaloide encontrado em extratos de vários indivíduos do gênero *Piper*, com propriedades anticâncer e anti-helmíntica (SALEHI et al, 2019). Além de nerolidol e linalol, hidrocarbonetos terpenoides são encontrados majoritariamente em algumas espécies de *Piper* (VILLAMIZAR et al, 2017; CRUZ et al, 2012). Ademais, existem outros indivíduos desse gênero, recentemente estudados, que apresentaram atividades tais como esquistossomicida (GONÇALVES et al, 2019), herbicida (JARAMILLO-COLORADO et al, 2019), inseticida, anti-inflamatória (TAKEARA et al, 2017) e antibacteriana (RHAMAN et al, 2016; VYAS et al, 2017).

4.5 A espécie *Piper callosum*

No Brasil, a espécie é popularmente conhecida como “elixir-paregórico”, “matricá” e “óleo elétrico”, sendo usada para tratar gonorreia, dores em geral, desordens digestivas e como repelente, adstringente e hemostática. As folhas são de formato elipsoide e cor esverdeada em ambas as faces, um tanto brilhante na face adaxial e ao serem maceradas liberam odor aromático característico (SILVA et al, 2017). As calosidades presentes na base de sua lâmina foliar distinguem a espécie *Piper callosum* de outras espécies do gênero *Piper* (YUNCKER, 1972). Há relatos de sua ocorrência nos estados do Acre, Amapá, Rondônia, Pará, Distrito Federal, Mato Grosso, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná (GUIMARÃES et al, 2015). Dentre as classes de substâncias presentes nos extratos das folhas de *P. callosum* estão amidas, esteroides e alcaloides (PARMAR et al, 1997). Estudos demonstraram que, a espécie coletada na Amazônia possui altos teores de safrol (SOUTO et al, 2012), além de apresentar metileugenol e elemicina como substâncias predominantes em seu óleo essencial. Estas substâncias presentes nos óleos essenciais de *Piper callosum* podem ser responsáveis por suas propriedades esquistossomicida (GONÇALVES et al, 2019) e antimicrobiana (MAJOLO et al, 2019). O safrol também é utilizado na produção de heliotropina, importante fixador de fragrâncias para perfumes, na fabricação de sabões e de butóxido de piperonil que é um agente sinérgico usado

em pesticidas (GAD & PHAM, 2014). Além disso, existem evidências de que os extratos dessa espécie vegetal são possuidores de propriedades moluscicida e ovicida sobre *Niomphalaria glabrata* (RAPADO et al, 2011), inibidora de oviposição (BALDIN et al, 2015). As amidas pipercalosina e piperovatina isoladas de extratos de *Piper callosum* demonstraram atividade anestésica e anti-inflamatória, respectivamente (RODRÍGUEZ et al, 2005; SILVA et al, 2008). Dessa forma, diante do grande potencial apresentado pelos óleos essenciais de espécies de Piper, torna-se de grande importância a investigação de outras atividades biológicas do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum*.



Figura 1. *Piper callosum* em campo de coleta em Itacoatiara-AM (S 03°08.555' W 058°25.889').

4.6 Microrganismos patogênicos

Staphylococcus aureus é uma bactéria comensal, mas oportunista de seres humanos, sendo que, aproximadamente 30% da população humana é colonizada com *S. aureus*. Este patógeno pode causar desde infecções de pele e tecidos moles até bacteremias e endocardites infecciosas (TONG et al, 2015) e está associado a uma alta taxa de mortalidade (LI et al, 2017). A espécie *Escherichia coli* pertence à família Enterobacteriaceae e pode ser encontrada tanto no intestino de animais (DIAS et al, 2019) quanto no intestino de seres humanos (PAIXÃO & CASTRO 2016). As enterobactérias da espécie *E. coli* são responsáveis por causar desde infecções intestinais até 95% das cistites e 90% das pielonefrites adquiridas na comunidade (POOLMAN, 2017). Todavia, as bactérias não são os únicos microrganismos patogênicos aos humanos, os fungos também são causadores de graves doenças nesses indivíduos, como é o caso de *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* em pacientes hospitalizados (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010). Todos os microrganismos citados acima apresentam determinado grau de resistência aos agentes

antimicrobianos existentes (ZAIDI et al, 2018; AWORH et al, 2019; MANILAL et al, 2019; PATEL et al, 2020). Diante da crescente resistência desses organismos aos tratamentos convencionais, tornou-se grande a procura por fontes alternativas de tratamento, incluindo o uso de produtos naturais. Nos últimos tempos, verificou-se a grande capacidade de combate a esses microrganismos patogênicos que as plantas medicinais oferecem (EGWU-IKECHUKWU et al, 2018; RAKHOLIYA et al, 2013). As espécies de *Piper*, em especial, exibem atividade antimicrobiana tanto frente a cepas não resistentes (EJELE et al, 2012; MASOMI & HASSANSHAHIAN, 2016; CARNEIRO et al, 2019), quanto contra os patógenos resistentes (LEAL et al, 2019).

5.0 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Óleos essenciais

5.1.1 Coleta do vegetal

Folhas e partes aéreas (folhas, galhos finos e inflorescências) de *P. callosum* foram coletadas no ICET - Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas, em Itacoatiara-AM (S 03°08.555' W 058°25.889'), para extração de óleos essenciais e preparo do extrato e frações (utilizou-se um único indivíduo). A espécie foi identificada pelo Professor Ari de Freitas Hidalgo (Faculdade de Ciências Agrárias – UFAM), tendo sua exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM – UFAM), sob o número de tombo 11653.

5.1.2 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais da planta foram obtidos a partir das partes aéreas frescas coletadas em outubro/2018, janeiro/2019, abril/2019 e julho/2019, por meio de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Obtiveram-se óleos que foram coletados na parte inferior, intermediária e superior da coluna do aparelho de Clevenger, sendo descritos como OE1 a fração mais densa, OE2 a fração menos densa e OE3 a fração de densidade intermediária. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm para separação e retirada da água. Os óleos essenciais obtidos foram mantidos separadamente em frascos âmbar tampados sob refrigeração até o momento de

serem analisados. Os rendimentos obtidos dos óleos essenciais foram calculados baseados no peso das folhas (v/m).

5.1.3 Identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Piper callosum* extraídos em outubro/2018 foram submetidos à análise em CG-EM em equipamento SHIMADZU acoplado a um espectrômetro de massas SHIMADZU QP2010. Para cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30 m x 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,25 µm. A identificação dos constituintes foi feita por interpretação de seus respectivos espectros de massas, cálculo do Índice de Kovat's e por comparação com dados da literatura. Para realização dessas análises, utilizou-se equipamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

5.2 Extrato Bruto e Frações

5.2.1 Preparo do extrato e fracionamento

Para a preparação do extrato foram utilizados 300 g de material seco e moído a partir das folhas da planta, que foi submetido à extração com etanol a 70% sob refluxo, e em seguida concentrado para evaporação do etanol em evaporador rotatório. O extrato aquoso obtido foi dividido igualmente, de maneira que, secou-se metade e fracionou-se a outra. A parte separada para fracionar foi submetida ao processo de partição líquido-líquido utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade, tais como: hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. As frações foram concentradas em evaporador rotatório, secas em banho maria e seus rendimentos foram determinados (m/m) através da fórmula abaixo:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

5.2.2 Prospecção fitoquímica para caracterização dos constituintes fenólicos

A metodologia para identificação dos constituintes fenólicos foi realizada segundo metodologia de Matos (2009) com adaptações. Esta análise foi realizada com o extrato bruto e as frações através de ensaios cromáticos usuais utilizando-se reagentes convencionais para detecção de grupos fenólicos específicos, tais como,

solução de cloreto férrico e diferentes valores de pH utilizando solução de HCl (0,1 mol/l) e NaOH (0,1 mol/l). Inicialmente, foram pesados 100 mg do extrato bruto e das frações em acetato de etila, butanol e hidro alcóolica. Adicionou-se clorofórmio ao extrato bruto por três vezes (10 ml de clorofórmio por vez), e a parte que não solubilizou foi diluída em 50 ml de metanol a 70%. As frações também foram solubilizadas em metanol 70% e em seguida, as soluções estoque foram transferidas para balões volumétricos de 100 ml e o volume foi ajustado. O ensaio foi realizado em triplicata. Foram separados 7 tubos e adicionados 3 ml das soluções estoque preparadas e o pH de cada tubo foi ajustado. Os testes que foram realizados estão descritos abaixo.

5.2.3 Teste para Fenois e Taninos

Ao tubo 1 foi adicionado 3 gotas de cloreto férrico (1%), observando-se então, a variação da cor da solução em tubo como apresentado na tabela 1.

Tabela1. Resultado colorimétrico esperado do teste

Cor esperada	
Fenois	Variável entre azul e vermelho
Taninos	Precipitado azul escuro

5.2.4 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Ao tubo 2 foram adicionadas 3 gotas de solução de HCl (0,1 mol/l) para ajustar o pH para 3. O pH da solução do tubo 3 foi ajustado para 8,5 com solução de NaOH (0,1 mol/l). O pH da solução do tubo 4 foi ajustado para 11 com solução de NaOH (0,1 mol/l). Observando-se, então, a variação da cor das soluções nos tubos de acordo com a tabela 2.

Tabela 2: Relação dos constituintes e as cores esperadas

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido ⁽³⁾	Alcalino ^(8,5)	Alcalino ⁽¹¹⁾
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonois e xantonas	-	-	Amarela
Chaconas e auronas	Vermelha	-	Verm. Púrpura
Flavanonol	-	-	Verm. Laranja

5.2.5 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

O pH da solução do tubo 5 foi ajustado para 3 com solução de HCl (0,1 mol/l) e o pH da solução do tubo 6 para 11 com solução de NaOH (0,1 mol/l). Então os tubos foram aquecidos por dois minutos em chama de bico de Bunsen, observando-se a variação da cor das soluções dos tubos como mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Classificação dos constituintes

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo amarelada	-
Flavanonas	-	Verm. Laranja

5.2.6 Prospeção fitoquímica para caracterização de terpenos (Lieberman-Burchard)

O extrato bruto e frações foram avaliados através de ensaios cromáticos usuais utilizando anidrido acético e ácido sulfúrico (MATOS, 2009). Inicialmente foram pesados 30 mg das frações em hexano e clorofórmio, onde foi acrescentado clorofórmio por 3 vezes (10ml por vez) para solubilização de substâncias apolares.

Em seguida, a solução do extrato bruto obtida no item anterior e a das frações foram filtradas em funil de vidro para os tubos de ensaio. Foram utilizados aproximadamente 3 ml de cada solução. Em seguida, foram adicionados 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico, observando-se, então, o aparecimento de coloração. Tais colorações poderiam variar desde o azul evanescente seguida de verde permanente, que caracteriza a presença de esteroides livres, até coloração parda a vermelho, indicativo de triterpenoides pentacíclicos livres.

5.2.7 Prospecção fitoquímica para caracterização de saponinas

Inicialmente foram pesados 100 mg do extrato bruto e das frações em acetato de etila, butanol e hidroalcoólica. Foi acrescentado clorofórmio por 3 vezes (10ml por vez) para solubilização de substâncias apolares. Em seguida, o resíduo insolúvel foi dissolvido com 10 ml de água destilada utilizando aparelho sonicador (Processador Ultrassônico). As soluções obtidas foram transferidas para tubos de ensaio identificados. Em seguida, os tubos foram agitados por dois minutos. O teste confirmatório foi realizado com a adição de 2 mL de ácido clorídrico concentrado seguido de aquecimento em banho maria durante 1 hora. Após o término do tempo de aquecimento os tubos foram resfriados e o pH foi neutralizado com solução de NaOH (0,1 mol/L). Em seguida os tubos foram agitados novamente para confirmação da presença de saponinas e em caso de resultado positivo, seguiu-se para a classificação da saponina através do teste de Lieberman-Burchard como mostrado na tabela 4 (Matos, 2009).

Tabela 4. Classificação de saponinas através do teste de Lieberman-Burchard

	Cor esperada
Saponinas Esteroidais	Azul evanescente
Saponinas Triterpênicas	Vermelho

5.2.8 Prospecção fitoquímica para caracterização de alcaloides

Inicialmente foram pesados 300 mg do extrato bruto e das frações em acetato de etila, butanol e hidroalcoólica. Em seguida as amostras foram solubilizadas com aproximadamente 25 ml de água destilada e o pH foi ajustado para 4-5 com HCl 0,1 mol/l. As soluções obtidas foram filtradas em papel de filtro e o pH do filtrado foi ajustado para 11 com solução de NaOH 0,1 mol/l, em seguida a solução foi transferida para um funil de separação e a solução foi reparticionada com 7 ml de CHCl₃. O pH da fase clorofórmica foi ajustado para 2 com solução de HCl 0,1 mol/l. Em seguida, a fase clorofórmica foi separada e nova repartição foi realizada com água. A fase aquosa foi utilizada para o teste em tubo, às soluções foram adicionadas algumas gotas de Reagente de Dragendorff, observando-se a formação de precipitado floculoso pesado, indicativo de alcaloides (MATOS, 2009).

5.2.9 Análise do extrato e frações em placas cromatográficas de gel de sílica

A análise do extrato e frações em placas cromatográficas de gel de sílica foi realizada seguindo a metodologia de Guimarães (2005). Inicialmente foram pesados 5 mg do extrato bruto e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidroalcoólica. As amostras foram dissolvidas com metanol para obter a concentração de 30 mg/mL. As placas de cromatografia em camada fina em gel de sílica 60 F₂₅₄ foram cortadas com 5 cm de comprimento e 7 cm de largura, permitindo aos eluentes percorrerem a distância de 4 cm. Após os cortes as placas foram eluídas com metanol para limpeza das mesmas e em seguida foram colocadas em estufa a 100°C por 30 minutos para a ativação. Em seguida, com o auxílio de um microcapilar calibrado, foram aplicados em banda 5 µL das soluções do extrato bruto e das frações e as placas foram eluídas com sistema de eluição BAW (butanol, ácido acético e água) na proporção 5:1:4. Após a eluição foram aplicados os reveladores NP/PEG, Dragendorff, vanilina e cloreto férrico. As placas que foram reveladas com NP/PEG foram observadas em câmara de ultravioleta (Biothec BT – 107/UV) no comprimento de onda de 365 nm. Já as placas reveladas com vanilina foram aquecidas em chapa. Em seguida calculou-se o fator de retenção (RF) de todas as manchas.

5.3 Ensaio Antimicrobiano

5.3.1 Avaliação da Atividade inibitória

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado no Laboratório de Microbiologia (LAB 106), coordenado pelo Profº Dr. Maxwel Adriano Abegg. A metodologia utilizada foi baseada em ROSA et al (2003) com suas devidas adaptações (VAZ et al, 2009).

As amostras avaliadas foram Extrato Bruto, Fração hexano, Fração clorofórmio, Fração acetato de etila, Fração butanol e o Óleo Essencial mais denso (coletado na parte inferior da coluna do aparelho de Clevenger - OE1 Outubro/2018), frente à *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* INCQS 0324, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. O óleo essencial foi aplicado sem diluição. Foi utilizado um controle negativo (Dimetilssulfóxido – DMSO 2%) e dois controles positivos (Antibacteriano e Antifúngico).

Foram pesados 10 mg de cada fração e solubilizado em 1 ml de DMSO 2%. As amostras foram pesadas em tubos criogênicos Grad. 1,8 ml com tampa. Os inóculos dos microrganismos alvo foram ajustados para um padrão McFarland nº 0,5 em densidade óptica para bactérias e leveduras, correspondente para 1×10^8 a 2×10^8 UFC/mL. As respectivas concentrações foram confirmadas por meio de leituras espectrofotométrica a 600 nm para leveduras e bactérias. Os microrganismos usados para o ensaio foram *Escherichia coli* ATCC 25922 (DO600nm = 0,02), *Staphylococcus aureus* INCQS 0324 (DO600nm = 0,05), *Candida albicans* (DO600nm = 0,05) e *Candida parapsilosis* (DO600nm = 0,05).

Foram aplicados três spots de 1 mL em cada placa contendo os microrganismos. Após a separação de todo o material (placas de Petri descartáveis, ponteiros de micropipeta, água destilada e tubos falcon, preparo do meio de cultura Ágar Muller Hilton (MHA) - pesando 36 g deste meio para 1000 mL de água destilada) e sua autoclavação, o ágar foi vertido nas placas de Petri, que foram refrigeradas até o momento do ensaio. No mesmo dia foram feitos os repiques das bactérias e fungos para o crescimento das colônias, e colocados na estufa a 37 °C por 24 horas. Após o crescimento das colônias, foi preparada uma suspensão ajustada para o padrão McFarland nº 0,5 com cada microrganismo citado acima, que foi semeada na placa contendo o ágar Muller Hilton, seguindo-se da aplicação de três spots em poço de

cada uma das amostras de extrato bruto, frações e óleo essencial e incubação por 24 horas para o crescimento das bactérias e fungos (VAZ et al, 2009). O halo de inibição foi medido e classificado em função de seu diâmetro em leve (menor que 20 mm), moderado (entre 20 e 30 mm) e intenso (maior que 30 mm).

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Óleos Essenciais

6.1.1 Rendimentos

A Tabela-5 demonstra os rendimentos dos óleos essenciais de *Piper callosum*.

Durante a extração do material coletado em out/18 foi observada a presença de três frações distintas de óleo essencial na coluna do aparelho de Clevenger, cada uma com densidade diferente. No entanto, apenas duas frações foram observadas nas extrações das amostras coletadas em jan/19, Abr/19 e jul/19. O óleo coletado na parte inferior da coluna (OE1) alcançou maior rendimento em abr/19, e menor rendimento em out/18. De forma contrária, o óleo essencial coletado na parte superior da coluna (OE2) apresentou maior produção (0,17%) em out/18 e menor rendimento no período de chuvas em abr/19.

Estudos anteriores com a mesma espécie detectaram a presença de uma única fração, mostrando rendimentos de 3,6% para região de Marituba-PA (SOUTO et al, 2012) e 1,9% para a espécie amazônica coletada em Manaus-AM (GOTTLIEB et al, 1981), diferindo dos rendimentos obtidos neste trabalho.

.6.1.2 Composição química dos óleos essenciais de *Piper callosum*

As substâncias identificadas nas amostras OE1, OE2 e OE3 coletadas em Outubro/2018 encontram-se descritas na Tabela 6. A amostra OE1, coletada na parte inferior da coluna, é constituída majoritariamente por safrol (74,24%), seguido de 1,8 cineol (5,98%) e beta-pineno (4,9%). Já OE2 apresenta constituição majoritária semelhante a OE3, sendo que a primeira contém safrol (22,23%), α -Pineno (20,94%) e β -Pineno (12,84%), enquanto que a segunda contém safrol (51,46%), α -Pineno (10,09%) e β -Pineno (10,97%).

Tabela 5. Rendimentos dos óleos essenciais de *Piper callosum*.

Mês/Ano Da Coleta	Código da Amostra	Volume OE (µL)	Rendimentos (%)	Rendimentos Totais (%)
Out/18	OE1	512,3	0,16	0,60
	OE2	544,3	0,17	
	OE3	864,5	0,27	
Jan/19	OE1	900,0	0,27	0,50
	OE2	450,0	0,13	
Abr/19	OE1	1070	0,36	0,42
	OE2	180	0,06	
Jul/19	OE1	960	0,27	0,41
	OE2	480	0,14	

OE1: óleo coletado na parte inferior da coluna; OE2: óleo coletado na parte superior da coluna; OE3: óleo coletado na parte intermediária da coluna.

Gottlieb et al (1981) descreveu como constituintes majoritários de folhas de *P. callosum* coletadas na estrada AM-010 (Manaus-Itacoatiara), safrol (69,0%), terpenos (23,0%) e metileugenol (8,0%). Silva et al (2016) encontrou safrol (66,0%) e metileugenol na constituição majoritária de folhas também coletadas na Região Amazônica (10,2%). Souto et al (2012) encontrou safrol (69,2%), metileugenol (8,6%) e β -Pinoeno (6,2%) em folhas da espécie coletadas no estado do Pará, corroborando com os dois trabalhos anteriores, exceto pela presença de β -Pinoeno. Os teores de safrol encontrados por esses pesquisadores é semelhante à de OE1 (74,24%) e OE3 (51,46%), no entanto, diferem destas e de OE2 pela ausência de 1,8-Cineol e α -Pinoeno na constituição majoritária. A natureza dos constituintes químicos ativos de uma planta não é constante durante o ano (SIMÕES & SPITZER, 2007). O estado nutricional da planta e especialmente a influência de muitos tipos de fatores externos causadores de “estresse” pode modificar a quantidade e a composição dos compostos químicos, em poucos dias ou mesmo em horas. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; SIMÕES & SPITZER, 2007).

Tabela 6. Constituintes químicos dos óleos essenciais de *P. callosum* em outubro/2018.

Componentes	*IR (exp)	*IR (lit)	Área (%) OE1	Área (%) OE2	Área (%) OE3
α-Pineno	932	932	2,71	20,94	10,09
Canfeno	947	946	0,24	0,68	0,53
Sabineno	972	969	1,34	3,39	2,96
β-Pineno	976	974	4,9	12,84	10,97
Mirceno	990	988	0,31	1,24	0,74
α-Felandreno	1005	1002	0,05	0,25	0,13
α-Terpineno	1016	1014	0,56	1,51	1,15
p-Cimeno	1024	1020	0,22	0,32	0,28
Limoneno	1028	1024	0,43	1,44	0,90
1,8-Cineol	1030	1026	5,98	1,70	4,23
(E)-β-Ocimeno	1046	1044	0,03	0,07	0,06
γ-Terpineno	1057	1054	1,47	3,72	2,83
trans-sabineno	1066	1064	0,21	0,06	0,11
α-Terpinoleno	1088	1086	0,37	0,92	0,68
l-Linalool	1100	1095	0,8	0,09	0,44
Isoborneol	1156	1155	0,23	0,08	0,29
Terpinen-4-ol	1177	1174	0,31	1,28	0,66
α-Terpineol	1191	1186	0,41	0,62	0,58
Safrol	1292	1285	74,24	22,23	51,46
α-Copaeno	1375	1374	0,03	1,83	0,27

*IR (exp): índice de retenção no experimento; *IR (lit): índice de retenção na literatura OE1: óleo coletado na parte inferior da coluna; OE2: óleo coletado na parte superior da coluna; OE3: óleo coletado na parte intermediária da coluna.

6.2 Extrato e frações

6.2.1 Rendimentos

O extrato bruto e frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol e hidroalcoólica forneceram os rendimentos descritos na tabela 7.

Fuertes et al (2018) obteve um rendimento de 2,55 % no extrato etanólico das folhas de *Piper callosum*. A diferença de rendimento encontrada para os extratos etanólicos deste trabalho e da literatura pode ser devida as adaptações de cada uma das técnicas extrativa.

Tabela 7. Massa e rendimento do extrato bruto e frações de *P. callosum*.

Códigos	Massa do extrato e frações (g)	Rendimento (%)
EB + Frações	55,5651	19,22
FHX	4,1192	15,13
FCHCl ₃	0,4472	1,64
FAC	0,3964	1,45
FBUT	2,8361	10,41
FHA	19,4252	71,35

EB: extrato bruto; FHX: fração hexano; FCHCl₃: fração clorofórmio; FAC: fração acetato de etila; FBUT: fração butanol; FHA: fração hidroalcoólica.

6.2.2 Cromatografia em camada fina

Quanto ao perfil químico do extrato bruto e frações das folhas de *P. callosum*, através de cromatografia em camada fina para grupos fenólicos, os resultados revelaram mancha de cor verde com Rf 0,1 e 0,5 para Extrato bruto e Fração acetato de etila. Também foi possível observar a cor verde com Rf 0,5 na Fração butanol. E na Fração hidroalcoólica. Na Fração acetato de etila e na Fração butanol observou-se a cor verde com Rf 0,9. Já para flavonoides a mancha observada apresentou coloração amarela e foram detectadas na Fração acetato de etila e na Fração butanol com Rf 0,8. Na placa B revelada com cloreto férrico foi possível observar várias manchas escuras, com diferentes Rfs, sugerindo a presença de substâncias fenólicas.

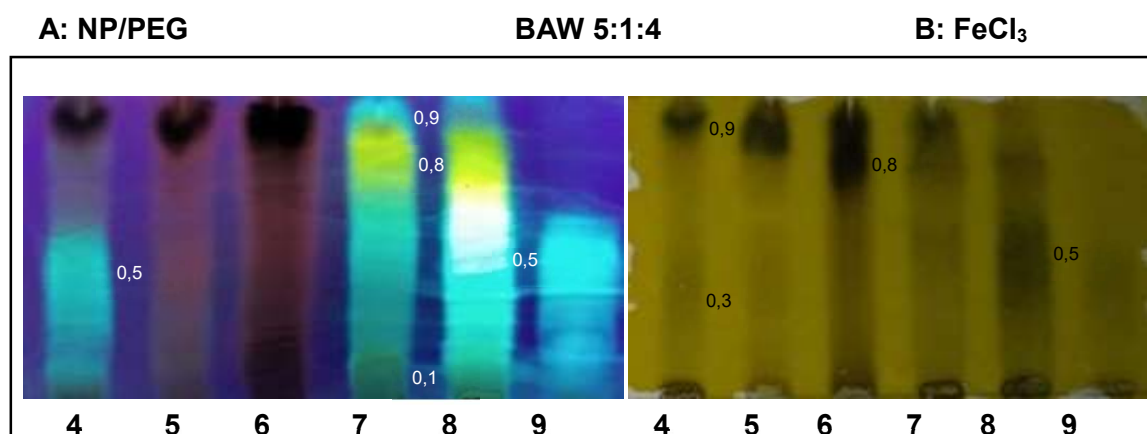


Figura 2. Substâncias fenólicas reveladas por meio de cromatografia em camada fina. Legenda: A: Placa para revelar substâncias fenólicas. Revelador: NP/PEG: 2-Aminoetil difenilborinato/Polietilenoglicol; Cloreto férrico (FeCl₃). Eluente: BAW: Butanol, ácido acético e água. 4: Extrato bruto. 5: Fração hexano. 6: Fração clorofórmio. 7: Fração acetato de etila. 8: Fração butanol. 9: Fração hidroalcoólica.

Para a placa revelada com Vanilina Sulfúrica (Figura 2), foram detectadas manchas de coloração amarela com Rfs 0,6 e 0,8 em Extrato Bruto, Fração acetato

de etila, Fração butanol e Fração hidroalcoólica, indicando a presença de flavonoides. Para a detecção de terpenos, derivados fenilpropanoides e fenóis foram observadas manchas de coloração verde, vermelho, marrom e cinza. Para a coloração verde com Rfs 0,2 e 0,9 foram observadas em Extrato Bruto, Fração hexano, Fração clorofórmio, Fração acetato de etila, Fração butanol e Fração hidroalcoólica. Manchas de coloração violeta com Rfs 0,3 e 0,4 foram detectadas em Extrato Bruto, Fração hexano e Fração clorofórmio. As manchas de coloração marrom com Rf 0,8 foram observadas em Extrato Bruto, Fração hexano, Fração clorofórmio, Fração acetato de etila, Fração butanol e Fração hidroalcoólica. Por fim, a mancha de coloração cinza com Rfs 0,1 e 0,7 foram observadas em Extrato Bruto, Fração hexano e Fração clorofórmio. No perfil cromatográfico para a detecção de alcaloides e substâncias glicosiladas, na placa borrifada com Dragendorff e Orcinol Sulfúrico, não foi possível observar nenhuma mancha característica (GUIMARÃES, 2005).

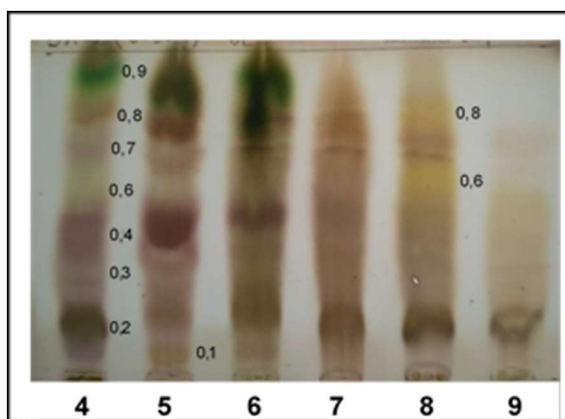


Figura 3. Substâncias terpênicas e fenólicas reveladas em cromatografia em camada fina. Revelador: Vanilina sulfúrica. Eluente: BAW: Butanol, ácido acético e água. 4: Extrato Bruto. 5: Fração hexano. 6: Fração clorofórmio. 7: Fração acetato de etila. 8: Fração butanol. 9: Fração hidroalcoólica.

6.2.3 Prospecção fitoquímica para caracterização de grupos fenólicos e taninos

Para confirmar a presença de substâncias fenólicas e flavonoides no teste de cromatografia em camada fina, realizou o ensaio do perfil químico em tubos de ensaio com as amostras Extrato Bruto, Fração acetato de etila, Fração butanol e Fração hidroalcoólica, adicionando cloreto férrico e soluções com diferentes valores de pH. As cores observadas variam conforme o núcleo, o número e a disposição dos substituintes hidroxilados, sendo possível distinguir as diversas classes de flavonoides (SIMÕES et al., 2003). Neste estudo, o resultado mostrou a presença de taninos flobabênicos no tubo 1 para as amostras Extrato Bruto, Fração acetato de

etila, Fração butanol e Fração hidroalcoólica, quando adicionado cloreto férrico, apresentou precipitado escuro de tonalidade verde. A presença de flavanonol em pH 11 para a amostra Extrato bruto foi demonstrada quando observada a coloração vermelho laranja. Para as Frações acetato de etila, butanol e hidroalcoólica o resultado indicou presença de flavonas, flavonóis e xantonas em pH 11, observando a coloração amarelo. Somente na fração hidroalcoólica houve presença de catequinas (taninos catéquicos), indicada no tubo 6, quando a coloração foi pardo-amarelado (Figura 3). Esses resultados confirmam a presença de substâncias fenólicas e flavonoides observados nas placas cromatográficas com coloração verde brilhante, amarelo e verde escuro (Figura 1 e 2). O fato de os taninos, flavonas, flavonóis, xantonas e catequinas não terem sido detectadas no extrato bruto, apenas nas frações, é comentada por Matos (2009) que explica que a presença de algumas substâncias pode mascarar a detecção de outras no extrato.

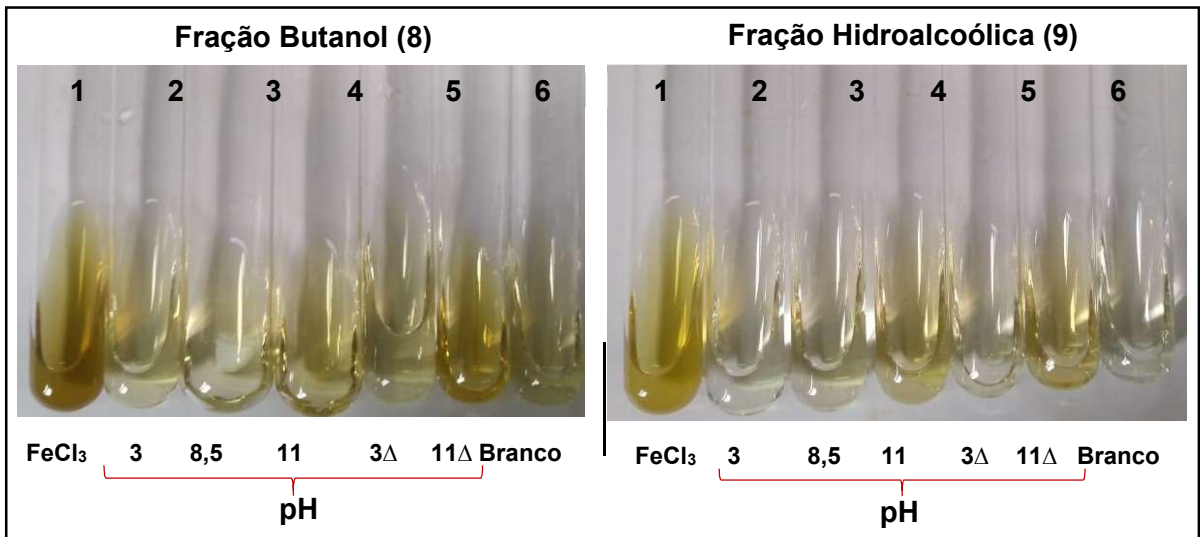
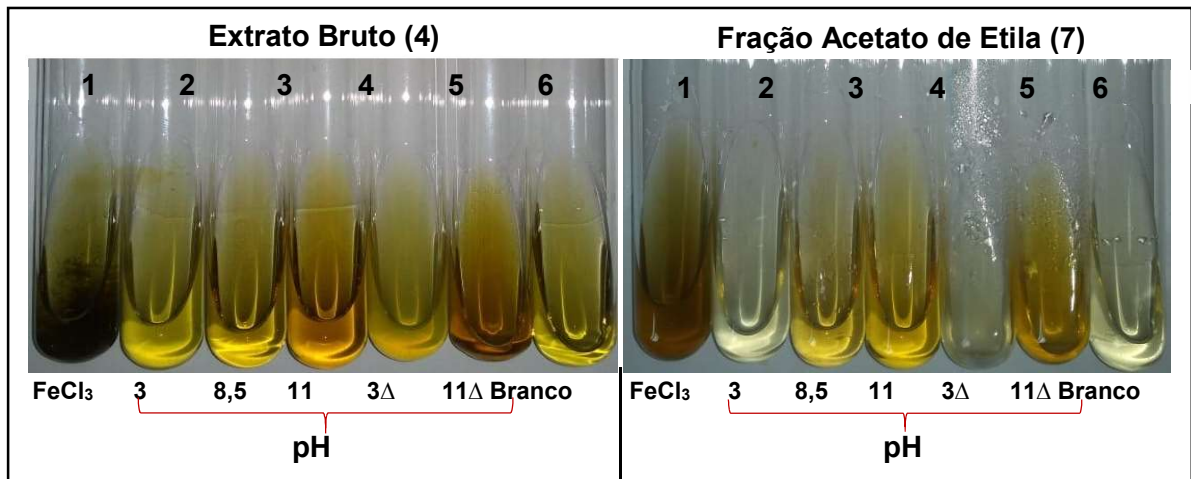


Figura 4. Prospecção em tubos de ensaio para caracterização de fenólicos.



Figura 5. Caracterização fitoquímica para detecção de terpenos. Legenda: 4: extrato bruto; 5: fração hexano; 6: fração clorofórmio.



Figura 6. Caracterização fitoquímica para detecção de saponinas. Legenda: 8: fração butanol.

6.2.4 Prospecção fitoquímica para caracterização de terpenoides e esteroides.

No ensaio de Lieberman-Buchard para caracterização de terpenos foi possível observar mudança de coloração para o verde permanente nas amostras Extrato Bruto, Fração hexano e Fração clorofórmio, indicando a presença de esteroides livres (Figura 4) (MATOS, 2009).

6.2.5 Teste para saponinas

O teste para detecção de saponinas foi realizado com as amostras Extrato Bruto, Fração acetato de etila, Fração butanol e Fração hidroalcoólica, contudo, apenas a Fração butanol, como apresentado na figura 5, apresentou espuma persistente por mais de três minutos, sendo realizado o teste confirmatório. Durante o teste confirmatório (hidrólise ácida), a solução apresentou precipitado floculoso, e não houve formação de espuma quando agitado novamente, confirmando a presença de saponinas (MATOS, 2009).

Para o teste de alcaloides o Extrato Bruto, Fração hexano, Fração clorofórmio, Fração acetato de etila, Fração butanol e Fração hidroalcoólica não apresentaram resultado positivo, indicando ausência desse grupo de metabólito.

As informações encontradas na literatura a respeito das classes de compostos químicos presentes nos extratos e frações de *Piper callosum* são demasiado escassas. No entanto, Parmar et al (1997) descreve a presença de esteroides, amidas e alcaloides nos extratos de *P. callosum*. Ainda de acordo com o mesmo autor, a presença de compostos fenólicos tais como chalconas, flavonas e flavanonas foram anteriormente evidenciadas em outras espécies do gênero. Quílez et al (2010) também detectaram a presença de terpenoides e Patil et al (2015) detectaram a presença de saponinas e taninos em outras espécies de *Piper*.

Tabela 8. Classes químicas analisadas no extrato bruto e frações de *Piper callosum*.

Classes químicas	EB	FHX	FCHCl3	FAC	FBUT	FHA
Saponinas	-	-	-	-	+	-
Esteroides Livres	+	+	+	-	-	-
Flavanonol	+	-	-	-	-	-
Taninos	+	-	-	+	+	+
Flobabênicos						
Flavonas	-	-	-	+	+	+
Flavonois	-	-	-	+	+	+
Flavanonas	-	-	-	-	-	-
Xantonas	-	-	-	+	+	+
Catequinas	-	-	-	-	-	+
Fenois	-	-	-	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-	-
Chalconas	-	-	-	-	-	-
Auronas	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-

EB: extrato bruto; FHX: fração hexano; FCHCl3: fração clorofórmio; FAC: fração acetato; FBUT: fração butanol; FHA: fração hidroalcoólica.

6.3 Atividade Antimicrobiana

6.3.1 Avaliação da Atividade Inibitória

Extrato Bruto, Fração hexano, Fração clorofórmio, Fração acetato de etila e Fração butanol não se mostraram capazes de inibir o crescimento bacteriano e fúngico, e por isso, não houve formação de halo de inibição para tais frações, como mostrado nas figuras 6, 7 e 8. No entanto, o óleo essencial OE1 Outubro/2018 demonstrou moderada inibição *in vitro* dos microrganismos, apresentando os valores de halos referidos na tabela 9.

Kayyat & Al-Zahrani (2011) demonstraram que o safrol inibe o crescimento de *Escherichia coli* (gram negativa), corroborando com os resultados de Barbosa et al (2012) para o óleo essencial de espécie do gênero contendo 92 a 98% de safrol.

Estudos adicionais demonstraram inibição do crescimento de 100% de espécies fúngicas (OLIVEIRA et al, 2019), e bacterianas (MAJOLO et al, 2019) para o óleo essencial extraído das folhas de *Piper callosum*. Além disso, foram encontradas na literatura propriedades biológicas tais como moluscicida sobre *Niomphalaria glabrata* (RAPADO et al, 2011) e esquistossomicida (GONÇALVES et al, 2019), atribuídas ao óleo essencial de *P. callosum*.

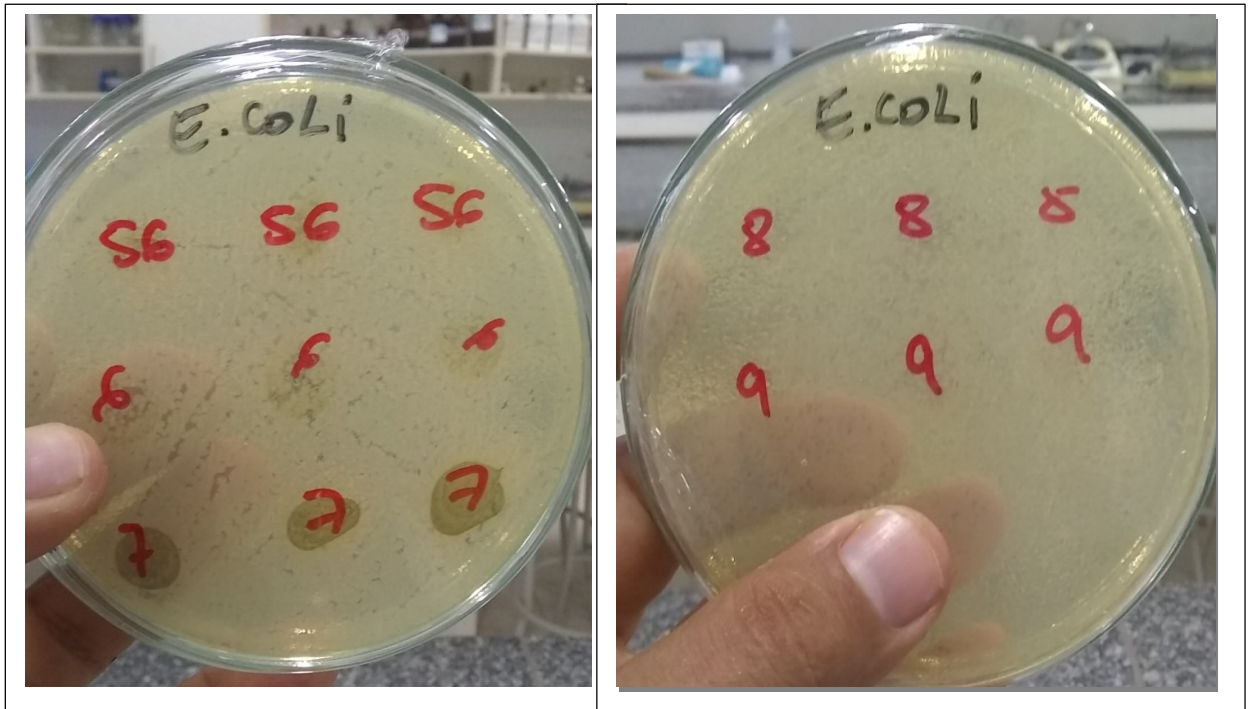


Figura 7. *Escherichia coli*. Legenda: 56: extrato bruto; 6: fração hexano; 7: fração clorofórmio; 8: fração acetato; 9: fração butanol

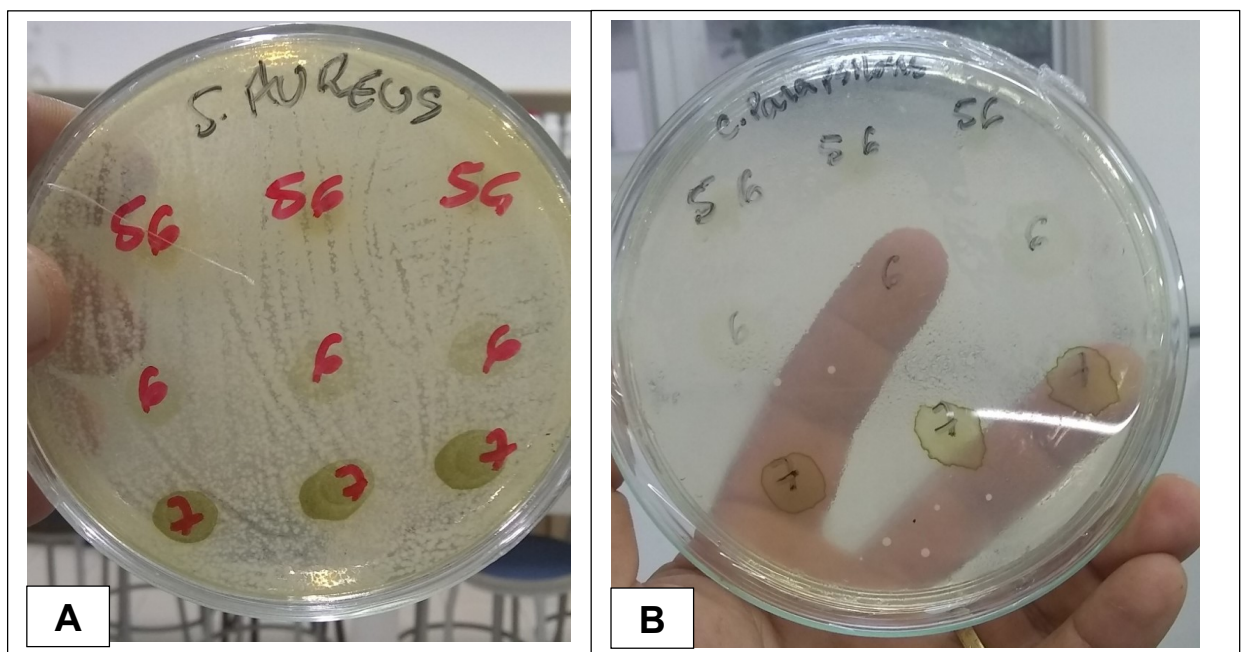


Figura 8. (A) *Staphylococcus aureus* e (B) *Candida parapsilosis*. Legenda: 56: extrato bruto; 6: fração hexano; 7: fração clorofórmio; 8: fração acetato; 9: fração butanol.



Figura 9. *Candida albicans*. Legenda: 56: extrato bruto; 6: fração hexano; 7: fração clorofórmio; 8: fração acetato; 9: fração butanol.

Tabela 9. Resultados da avaliação de atividade inibitória para o óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum*.

	Microrganismos			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>
OE1	20 mm	20 mm	25 mm	25 mm
EB	-	-	-	-
FHX	-	-	-	-
FCHCl3	-	-	-	-
FAC	-	-	-	-
FBUT	-	-	-	-

Tamanho dos halos de inibição do crescimento antimicrobiano. mm: tamanho do diâmetro em milímetros dos halos de inibição formados em torno dos spots das amostras. OE1: óleo essencial mais denso. EB: extrato bruto; FHX: fração hexano; FCHCl3: fração clorofórmio; FAC: fração acetato; FBUT: fração butanol; FHC: fração hidroalcoólica;

7.0 CONCLUSÃO

O extrato bruto e as frações hexano, clorofórmio, acetato e butanol, obtidos a partir das folhas de *Piper callosum* apresentam neste estudo esteroides, saponinas e substâncias fenólicas em sua composição química. Contudo, foi observada a ausência de atividade antimicrobiana. De outra maneira, o óleo essencial das partes aéreas da espécie vegetal obtido em outubro/2018 inibiu o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* de maneira moderada. Esse efeito ocorreu, possivelmente, devido aos altos teores de safrol, encontrado no óleo essencial de *P. callosum* ou, devido ao efeito sinérgico existente entre o safrol e os demais compostos majoritários, a saber: α -pineno, β -pineno e 1,8-cineol. Ensaio de Concentração Inibitória mínima são necessários para se quantificar o potencial inibitório dos óleos essenciais de *P. callosum*, assim como as devidas repetições em todos os ensaios de tal atividade, de maneira que se tenham informações suficientes para se fazerem os devidos tratamentos estatísticos.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFILAL, M. E.; OUAHID, E.; BEREBAH, M.; EL FARH, L. Valuation of aromatic and medicinal plants (AMP) of Rif (Northern Morocco). **Der Pharma Chemica**, v. 8, p. 439-445, 2016.

AL-MADHAGI, W. M.; HASHIM, N. M.; ALI, N. A. A.; ALHADI, A. A.; HALIM, S. N. A.; OTHMAN, R. Chemical profiling and biological activity of *Peperomia blanda* (Jacq.) Kunth. **PeerJ**, v. 6, p. 1-19, 2018.

AMARATHUNGA, A. A. M. D. D. N.; KANKANAMGE. A review on pharmacognostic, phytochemical and ethnopharmacological findings of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth: Pepper Elder. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 8, p. 16-23, 2017.

AMMAR, S.; NOUI, H.; DJAMEL, S.; MADANI, S.; MAGGI, F.; BRUNO, M.; ROMANO, D.; CANALE, A.; PAVELA, R.; BENELLI, G. Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria Arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides?. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 2020, p. 1-11, 2020.

ANDRADE, L.N.; SIQUEIRA, T.E.S.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L. C. Multidrug-Resistant CTX-M-(15,9,2-Producing *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter asburiae* Isolates Possessed a Set of Acquired Heavy Metal Tolerance Genes Including a Chromosomal *sil* Operon (for Acquired Silver Resistance). **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-6, 2018.

AWORH, M. K.; KWAGA, J.; OKOLOCHA, E.; MBA, N.; THAKUR, S. Prevalence and risk factors for multi-drug resistant *Escherichia coli* among poultry workers in the Federal Capital Territory, Abuja, Nigeria. **Plos One**, v. 14, p. 1-15, 2019.

BALDIN, E. L. L.; FANELA, T. L. M.; PANNUTI, L. F. R.; KATO, M. J.; TAKEARA, R.; CROTTI, A. E. M. Botanical extracts: alternative control for silverleaf whitefly management in tomato. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 59-65, 2015.

BARBOSA, Q. P. S.; CÂMARA, C. A. G.; RAMOS, C. S.; NASCIMENTO, D. C. O.; LIMA-FILHO, J. V. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: A new source of safrole. **Química Nova**, v. 35, p. 1806-1808, 2012.

BRAGA, A. G. S.; SOUZA, K. F. A.; BARBIERI, F. S.; FERNANDES, C. F.; ROCHA, R. B.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; LACERDA, C. L.; CELESTINO, C. O.; FACUNDO, V. A.; BRITO, L. G. Acaricidal activity of extracts from different structures of *Piper tuberculatum* against larvae and adults of *Rhipicephalus microplus*. **Acta Amazonica**, v. 48, p. 57-62, 2018.

BRASIL, 2019. Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS. **Portal ANVISA. Notícias**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias>. Acesso em: 26 de maio de 2020.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1-7, 2019.

CARNEIRO, J. N. P.; CRUZ, R. P.; SILVA, J. C. P.; ROCHA, J. E.; FREITAS, T. S.; SALES, D. L.; BEZERRA, C. F.; ALMEIDA, W. O.; COSTA, J. G. M.; SILVA, L. E.; AMARAL, W.; REBELO, R. A.; BEGNINI, I. M.; COUTINHO, H. D. M.; MORAIS-BRAGA, M. F. B. *Piper diospyrifolium* Kunth.: Chemical analysis and antimicrobial (intrinsic and combined) activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 136, p. 1-9, 2019.

CARVALHO-SILVA, M.; GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS E. V. S. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Piperaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** v. 3, p. 27-40, 2013.

CHANPRAPAI, P.; CHAVASIRI, W. Antimicrobial activity from *Piper sarmentosum* Roxb. Against rice pathogenic bacteria and fungi. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, p. 2513-2524, 2017.

CHEN, D. Q.; HU, H. H.; WANG, Y. N.; FENG, Y. L.; CAO, G.; ZHAO, Y. Y. Natural products for the prevention and treatment of kidney disease. **Phytomedicine**, v. 50, p. 50-60, 2018.

CHRISTENHUS, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, p. 201-217, 2016.

CRUZ, S. M.; CÁCERES, A.; ÁLVARES, L. E.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Chemical diversity of essential oils of 15 *Piper* species from Guatemala. **Acta Horticulturae**, v. 964, p. 39-46, 2012.

DIAS, P. A.; MORAES, T. P.; WILSMANN, D. E.; FERRASSO, M. M.; MARINHEIRO, M. F.; HEINEN, J. G.; CLABUIG, C. I. P.; TIMM, C. D. Ocorrência de *Campylobacter* e Enterobacteriaceae em aves silvestres e frangos de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 71, p. 225-231, 2019.

DORLA, E.; GAUVIN-BIALECKI, DEUSCHER, Z.; ALLIBERT, A.; GRONDIN, I.; DEGUINE, J. P.; LAURENT, P. Insecticidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Peperomia borbonensis* Miq. (Piperaceae) and Its Major Components against the Melon Fly *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, p. 1-9, 2017.

EJELE, A. E.; DURU, I. A.; OGUKE, C. E.; IWU, I. C. Phytochemistry and antimicrobial potential of basic metabolites of *Piper umbellatum*, *Piper guineense*, *Ocimum gratissimum* and *Newbouldia laevis* extracts. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v. 3, p. 309-314, 2012.

EGWU-IKECHUKWU, M. M.; OGBU, O.; UZOH, C. V.; UDE, I. U.; BRAIDE, W.; ADELEYE, S. A. Antibacterial properties of selected medicinal plants on *E. coli*,

Salmonella sp and *Shigella* sp. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 49, p. 120-127, 2018.

ELTZOV, E.; PENNYBAKER, S.; SHANIT-ORLAND, M.; MARKS, R. S.; KUSHMARO, A. Multi-resistance as a tool for detecting novel beta-lactam antibiotics in the environment **Sensor Actuat B-Chem**, v. 174, p. 342-8, 2012.

FARIAS, P. K. S.; SILVA, J. C. R. L.; SPUZA, C. N.; FONSECA, F. S. A.; BRANDI, I. V.; MARTINS, E. R.; AZEVEDO, A. M.; ALMEIDA, A. C. Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. **Ciência Rural**, v. 49, p. 1-12, 2019.

FLAMINI, G. Acaricides of natural origin, personal experiences and review of literature (1990- 2001). **Studies in Natural Products Chemistry** 2 381-451, 2003.

FLORES, N.; TICONA, J. C.; BILBAO-RAMOS, P.; DEA-AYUELA, M. A.; MACEDO, J. C. R.; BAZZOCCHI, I. L. An unprecedented chloride-containing piperamide from *Piper pseudoarboreum* a potential leishmanicidal agent. **Fitoterapia**, v. 134, p. 340-5, 2019.

FUERTES, C. M.; PACCO, G. A.; DEXTRE, R. Q.; CRUZ, C. A. Y. Actividad inhibitoria *in vitro* de extractos etanólicos de plantas del género *Annona* y *Piper* sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*. **Revista Peruana de Medicina Integrativa** v. 3, p. 112-117, 2018.

GAD, S. C.; PHAM, T. **Safrole**. In: Philip Wexler. **Encyclopedia of Toxicology**. Academic Press, v. 4, p. 205-207, 2014.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial de candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 225-234, 2010.

GOBBO-NETO, L., LOPES N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova** 30, 374-81, 2007.

GONÇALVES, R.; AYRES, V. F. S.; CARVALHO, C. E.; SOUZA, M. G. M.; GUIMARÃES, A. C.; CORRÊA, G. M.; MARTINS, C. H. G.; TAKEARA, R.; SILVA, E. O.; CROTTI, A. E. M. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Vitex agnus-castus* L. (Lamiaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2825-2832, 2017.

GONÇALVES, R.; AYRES, V. F. S.; MAGALHÃES, L. G.; CROTTI, A. E. M.; CORRÊA, G. M.; GUIMARÃES, A. C.; TAKEARA, R. Chemical Composition and Schistosomicidal Activity of Essential Oil of Two Piper Species from the Amazon Region. **Journal of essential Oil Bearing Plants**, v. 21, p. 811-820, 2019.

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazonica**, v. 11, p. 143-148, 1981.

GUIMARÃES, A. C. Estudo químico e biológico de *Cladocolea micranta* (Loranthaceae), uma planta medicinal da região Amazônica. Tese de Doutorado em Ciências. Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais. **Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil**, p. 305, 2005.

GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D. & MEDEIROS, E. **Piperaceae**. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB190>>. Acesso em 26 de maio de 2020.

HASTUTI, U. S.; UMMAH, Y.P. I.; KHASANAH, H. N. Antifungal activity of *Piper aduncum* and *Peperomia pellucida* leaf ethanol extract against *Candida albicans*. **AIP Conference Proceedings**, v. 10, p. 1-8, 2017.

HU, S.; CHEN, X.; WANG, R. Q.; YANG, L.; BAI, X. H. Natural product applications of liquid-phase microextraction. Natural product applications of liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 340-350, 2019.

JARAMILLO-COLORADO, B. E.; PINO-BENITEZ, N.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Volatile composition and biocidal (antifeedant and phytotoxic activity) of the essential oils of four Piperaceae species from Choco-Colombia. **Industrial Crops**, v. 138, p. 3-6, 2019.

JUGREET, B. S.; SUROOWAN, S.; RENGASAMY, K. R. R.; MAHOMOODALLY, M. F. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of Essential Oils. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

KALAIARASI, V.; JOHNSON, M.; JANAKIRAMAN, N.; SIVARAMAN, A. Phytochemical and Antibacterial Studies on *Peperomia Pellucida* (L.) H.B.K. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 1, p. 04-06, 2016.

KAYYAT, S. A.; AL-ZAHRANI, S. H. Thermal, photosynthesis and antibacterial studies of bioactive safrole derivate as precursor for natural flavor and fragrance. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 1-6, 2014.

KHAN, R. A. Natural Products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 739-753, 2018.

LAHLOU, M. Screening of natural products for drug discovery. **Expert Opinion**, v. 2, p. 697-705, 2007.

LAHLOU, M. The Sucesso of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.

LEAL, A. L. A. B.; BEZERRA, C. F.; ROCHA, J. E.; SANTOS, A. T. L.; CRUZ, R. P.; CARNEIRO, J. N. P.; SALES, D. L.; FREITAS, T. S.; TINTINO, S. R.; ALMEIDA, W. O.; AMARAL, W.; SILVA, L. E.; FERRIANI, A. P.; MAIA, B. H. L. N. S.; MORAIS-BRAGA, M. F. B.; BARRETO, H. M.; COUTINHO, H. D. M. *Piper cernuum* Vell.:

Chemical profile and antimicrobial potential evaluation. **Industrial Crops & Products**, v. 140, p. 1-9, 2019.

LI, Y.; YANG, L.; FU, J.; YAN, M.; CHEN, D.; ZHANG, L. Microbial pathogenic and virulence mediated by integrons on Gram-positive. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 481-486, 2017.

LINHARES, I.; RAPOSO, T.; RODRIGUES, A.; ALMEIDA, A. Incidence and Diversity of Antimicrobial Multidrug Resistance Profiles of Uropathogenic Bacteria. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

MACEDO, A. L.; SILVA, D. P. D.; MOREIRA, D. L.; QUEIROZ, L. N.; VASCONCELOS, T. R. A.; ARAUJO, G. F.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, S. S. C.; ALMEIDA, E. C. P.; VALVERDE, A. L.; ROBBS, B. K. Citotoxicity and selectiveness of Brazilian *Piper* species toward oral carcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 342-352, 2019.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, Tubarão, v. 3, p. 105-127, 2011.

MAJOLO, C.; MONTEIRO, P. C.; NASCIMENTO, A. V. P.; CHAVES, F. C. M.; GAMA, P. E.; BIZZO, H. R.; CHAGAS, E. C. Essential Oils from Brazilian Piper Species as Antimicrobials Against Strains of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22, p. 746-761, 2019.

MANANDHAR, S.; LUITEL, S.; DAHAL, R. K. In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2019, p. 1-5, 2019.

MANILAL, A.; SHEWANGIZAW, M.; MAMA, M.; GEZMU, T.; MERDEKIOS, B. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* colonization in HIV patients of Arba Minch Province, Ethiopia: Carriage rates, antibiotic resistance, and biofilm formation. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, p. 469-473, 2019.

MASOMI, F.; HASSANSHAHIAN, M. Antimicrobial Activity of Five Medicinal Plants on *Candida albicans*. **Iranian Journal of Toxicology**, v. 10, p. 39-43, 2016.

MICKYMARAY, S. Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. **Antibiotics**, v. 8, p. 1-57, 2019.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 3 ed. - Fortaleza: **Edições UFC**, 150 p., 2009.

MOLONEY, M. G. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, p. 689-701, 2016.

VAZ, A. B.; MOTA, R. C.; BOMFIM, M. R.; VIEIRA, M. L.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with *Orchidaceae* in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55(12) p. 1381-1391, 2009.

NASCIMENTO, P. L.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; GOMES, J. E. G.; SILVA, M. D. S.; SOUZA, S. A.; SILVA, T. M. S.; FALCÃO, R. A.; MOREIRA, K. A. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract of *Libidibia ferrea* pods. **Revista Fitos**, v. 9, p. 161-252, 2015.

NOUMI E, MERGHNI A, M ALRESHIDI M, HADDAD, O.; AKMADAR, G.; MARTINO, L.; MASTOURI, M.; CEYLAN, O.; SNOUSSI, M.; AL-SIENI, A.; FEO, V. *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Models for Evaluating Anti-Quorum Sensing Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and Its Main Component Terpinen-4-ol. **Molecules**, v. 23, p. 1-116, 2018.

OLIVEIRA, S. S.; HANADA, R. E.; CHAVES, F. C. M.; NASCIMENTO, G. O.; ASSIS, L. A. G.; OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, M. R. Fungitoxicidade de óleos essenciais de *Piper* spp. sobre *Colletotrichum theobromicola*. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, v. 3, p. 29-33, 2019.

PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, p. 85-96, 2016.

PARMAR, V. S.; JAIN S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, 597-673, 1997.

PATEL, A.; JEYASEKARAN, G.; JEYASHAKILA, R.; ANAND, T.; WILWET, PATHAK, N.; MALINI, A. H.; NEETHISELVAN, N. Prevalence of antibiotic resistant *Salmonella* spp. Strains in shrimp farm source waters of Nagapattinam region in South India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 155, p. 1-14, 2020.

PATIL, R. S.; HARALE, P. M.; SHIVANGEKAR, K. V.; KUMBHAR, P. P.; DESAI, R. R. Phytochemical potential and *in vitro* antimicrobial activity of *Piper betle* Linn. Leaf extracts. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, p. 1095-1101, 2015.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B.; CHORGHADE, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, p. 789-799, 2004.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 1804-13, 2010.

PINHEIRO, B. G.; SILVA, A. S. B.; SOUZA, G. E. P.; FIGUEIREDO, J. G.; CUNHA, F. Q.; LAHLOU, S.; SILVA, J. K. R.; MAIA, SOUSA, P. J. C. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 479-486, 2011.

POOLMAN, J. T. *Escherichia coli*. In: QUAH, S. R. **International Encyclopedia of Public Health** 2nd edition. Academic Press, v. 2 p.585-593, 2017.

QUÍLEZ, A.; BERENQUER, B.; GILARDONI, G.; SOUCCAR, C.; MENDONÇA, S.; OLIVEIRA, L. F. S.; MARTÍN-CALERO, M. J.; VIDARI, G. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 538-589, 2010.

RAGHAVENDRA, H. L.; PRASHITH, K. T. R. Ethnobotanical uses, phytochemistry and pharmacological activities of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth (Piperaceae) - A Review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 1-8, 2018.

RAKHOLIYA, K. D.; KANERIA, M. J.; CHANDA, S. V. Medicinal plants as alternative sources of therapeutics against multidrug-resistant pathogenic microorganisms based on their antimicrobial potential and synergistic properties. In: RAI, M. K.; KON, K. V. **Fighting Multidrug Resistance With Herbal Extracts, Essentials Oils and Their Components**. Academic Press, v. 1, p. 165-179, 2013.

RAPADO, L. N.; NAKANO, E; OHLWEILER, F. P.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Niomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of Helminthology**, 85, 66-72, 2011.

RHAMAN, S. F. S. A.; SIJAM, K.; OMAR, D. Antibacterial activity of the crude extract of *Piper sarmentosum* against *Pseudomonas fuscovaginae*. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 7, p. 67-72, 2016.

RODRÍGUEZ, N.; RODRÍGUEZ, M. CALDERÓN, A. I.; FELICIANO, A. S.; SOLÍS, P. B.; GUPTA, M. P. Anesthetic activity of pipericallosine isolated from *Piper darienense*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 33, p. 115-120, 2005.

ROSA, L.H.; MACHADO, K.M.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C.L. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98(7), p. 967-74, 2003.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIN, S. A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. C.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T. B.; FIDALGO, L. M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N. *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, p. 1-117, 2019.

SAMAIN, M. S.; VRIDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; RODRÍGUEZ, F. J.; STOLL, A.; NEINHUIS C.; 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.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; TEIXEIRA, C. A. D.; ALPIREZ, P. P. V.; FACUNDO, V. A. Composição química e atividade inseticida do extrato acetônico de *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae) sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 332-336, 2013.

SAVANT, C.; VENKATESH.; MANNASAHEB, B. A.; JOSHI, H. Importance of Antimicrobial Agents from Plants in Present Scenario: A Review. **International Journal of Pharmacology**, v. 1, p. 472-484, 2014.

SHAN, L.; LIU, Z.; CI, L.; SHUAI, C.; LV, X.; LI, J. Research progress on the anti-hepatic fibrosis action and mechanism of natural products. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 1-12, 2019.

SHIVAKUMAR, S. N.; HIMA, B. K. Phytochemistry and pharmacological potentiality of betelvine (*Piper betle* L.): Review article. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, p. 213-215, 2018.

SILVA, D. R.; BARONI, S.; SVIDZINSKI, A. E.; BERSANI-AMADO, C. A.; CORTEZ, D. A. G. Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae). **Ethnopharmacology**, v. 116, p. 569-573, 2008.

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

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS A. C. A.; FAIAL, K. C. F.; MENDONÇA, M. S. Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: valuable assessment. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 20-33, 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER VOLKER. Óleos voláteis. In: SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; V. MENTS, L. A.; PETROVICK, P. R.; SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. - 6. ed.- Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC; p. 467-495, 2007.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Insecticidal Activity of *Piper* Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera; Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p. 510-517, 2012.

Takeara, R.; Gonçalves, R.; Ayres, V. F. S. and Guimarães, A.C. **Biological properties of essential oils from the *Piper* species of Brazil: a review**. In: EL-SHEMY H. A. **Aromatic and Medicinal Plants**. Back to Nature. Publish: In Tech. p. 81-93, 2017.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; ELCHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER JR, V. G. *Stahylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, p. 603-661, 2015.

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

VORIS, D. G. R.; DIAS, L. S.; LIMA, J. A.; LIMA, K. S. C.; LIMA, J. B. P.; LIMA, A. L. S. Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* Hook. F., *Pimenta dioica* (L.) Merr., and *Myristica fragrans* Houtt. against Zika virus vectors. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 22541-22551, 2018.

VYAS, M.; SHARMA, M. K.; CHOUHAN, Y. S.; GOSWAMI, C. S. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of plant constituents of *Piper betle* leaves. **International Journal of Chemical Studies**, v. 5, p. 373-377, 2017.

YIN, B.; FANG, D. M.; ZHOU, X. L.; GAO, F. Natural products as important tyrosine kinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 1-16, 2019.

Yuncker, T.G. The Piperaceae of Brazil. I-Piper-Group I, II, III, IV. **Hoehnea** 2,19–366, 1972.

ZAIDI, K. U.; MANI, A.; PARMAR, R.; THAWANI, V. Antifungal susceptibility pattern of *Candida albicans* in human infections. **Open Biological Sciences Journal**, v. 4. p. 1-6, 2018.