



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Piper aduncum L. E SEU COMPONENTE, DILAPIOL,
FRENTE A *Staphylococcus* spp. MULTIRRESISTENTES**

Maria Angélica Bolini Brazão

BELÉM - PA
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Piper aduncum L. E SEU COMPONENTE, DILAPIOL,
FRENTE A *Staphylococcus* spp. MULTIRRESISTENTES**

Autor: Maria Angélica Bolini Brazão

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Brazão, Maria Angélica Bolini.

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente, dilapiol, frente a *Staphylococcus* spp. multirresistentes / Maria Angélica Bolini Brazão ; orientadora, Marta Chagas Monteiro - 2012.

81 fls.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia. Belém, 2012.

1.*Piper aduncum*. 2.*Staphylococcus aureus*. 3.Óleos essenciais. 4. Farmacorresistência bacteriana. I. Título.

CDD: 22. ed.:616.90724

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Angélica Bolini Brazão

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum* L. E SEU COMPONENTE, DILAPIOL, FRENTE A *Staphylococcus* spp. MULTIRRESISTENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 31/08/2012

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira / UFPA

Prof.^a Dr.^a. Mioni Thieli F. Magalhães de Brito / UFPA

Prof.^a Dr.^a. Marta Chagas Monteiro / UFPA
Orientadora

*Ao meu marido Fábio e
meus filhos Giovanna, Thiago e
Giulia, pelo amor, dedicação e
incentivo. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que é o nosso refúgio e nossa força, socorro que não falta em tempos de aflição. Por me dar tudo aquilo que sonho e até mesmo o que ainda não sonhei.

Ao meu marido, Fábio, pelo incentivo maior. Por entender meus momentos de angústia. Por estar ao meu lado, me apoiando, me encorajando e cuidando da nossa família.

Aos meus filhos, Giovanna, Thiago e Giulia, pelo sorriso de cada um, por existirem e serem a inspiração em minha vida. Logo mais dividiremos lindos sonhos.

À Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro, com quem aprendi muito, contribuindo com meu crescimento intelectual e pessoal; pela competência e ética; sempre com muitas ideias, paciência, por palavras de apoio. Foi muito bom tê-la como orientadora. Um grande exemplo.

Aos meus pais Edison e Cida, pelo amor e dedicação à minha formação profissional, que sempre me incentivaram mesmo que distantes. Tudo o que sou, devo a vocês.

Aos meus queridos irmãos, Adriana e Ricardo, pelo amor e incentivo, pela alegria e cada sorriso em nossos encontros.

À minha família de Belém, Ruth, Patrícia, Ilvana, Maurício, Alain, Helder, David, Sarah, pelo amor que nos une, por estarem sempre por perto.

À Direção do Laboratório Ruth Brazão, por me incentivarem, e entenderem minha ausência. E também por muitas vezes viabilizarem material para execução dos meus experimentos.

Ao Laboratório Jaime Aben Athar da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, em especial a Dra. Maria de Deus Baena Rodrigues por disponibilizar uma amostra MRSA.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

À Direção da Faculdade de Farmácia, Prof. Dr. Marcos Valério Silva, pelo incentivo a crescer profissionalmente.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, por colocar à disposição o laboratório de Microbiologia e Setor de Esterilização para a execução da parte experimental.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia da UFPA, pois direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

A Regina do Laboratório de Bioquímica, por compreender os momentos de atribulação.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia da Faculdade de Engenharia Química da UFPA do Laboratório de Produtos Naturais, LEPRON, e sua equipe, por me ceder o óleo essencial, em especial a Caroline Franco, pelo auxílio ao acesso a este laboratório.

Às minhas queridas amigas Edinilza e Rosa Márcia, por estarmos juntas nesta empreitada e com isso nos entendermos e nos incentivarmos em muitas situações que pareciam desesperadoras.

Ao Mário, pela contribuição para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Tempo para tudo!

*“Tudo neste mundo tem seu tempo; cada coisa tem sua ocasião.
Há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar;
tempo de matar e tempo de curar; tempo de derrubar e tempo de construir.
Há tempo de ficar triste e tempo de se alegrar; tempo de chorar e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las; tempo de abraçar e tempo de afastar.
Há tempo de procurar e tempo de perder; tempo de economizar e tempo de desperdiçar;
Tempo de rasgar e tempo de remendar; tempo de ficar calado e tempo de falar.
Há tempo de amar e tempo de odiar; tempo de guerra e tempo de paz.
Deus marcou o tempo certo para cada coisa.”*

Eclesiastes 3:2-8

RESUMO

BRAZÃO, M.A.B. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente, dilapiol, frente a *Staphylococcus* spp. Multirresistentes.** 2012. 82.f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

O óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPA) e seu componente principal, o dilapiol (76,5%), foram avaliados quanto a atividade antibacteriana frente a diferentes cepas de *Staphylococcus* spp. ATCC e multirresistentes. Para os ensaios da atividade antibacteriana do OEPA e do dilapiol foram determinados a Concentração Mínima Inibitória (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), pela técnica da microdiluição e por contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), utilizando concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL do OEPA e concentrações de 100 e 1000 µg/mL de dilapiol. O inóculo bacteriano utilizado foi ajustado a 1×10^4 a partir da escala 0,5 de Mc Farland. Como controle negativo foi utilizado o inóculo juntamente com Tween 20, solubilizante do óleo essencial e dilapiol, e como controle positivo, utilizou-se o cloranfenicol 0,05 mg/mL. Esses compostos foram testados frente as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, MRSA hospitalar, *S. epidermidis* e *S. lentus* multirresistentes de origem hospitalar. Os resultados mostraram que o OEPA apresentou a CIM_{90%} de 500 µg/mL e a CBM de 1000 µg/mL frente a *S. aureus* ATCC 25923, cuja concentração de 500 µg/mL foi capaz de inibir 60% do crescimento bacteriano. Quanto à cepa MRSA, o OEPA mostrou uma inibição (10%) na concentração de 750 µg/mL, sendo a CIM_{90%} obtida em 1000 µg/mL. Em *S. epidermidis* ATCC 12228, o OEPA mostrou atividade antimicrobiana, com a CIM_{90%} em 500 µg/mL e CBM em 750 µg/mL. Para a cepa *S. epidermidis* multirresistente, o OEPA foi capaz de inibir somente 35% do crescimento dessa cepa na concentração de 750 µg/mL, mas obteve o valor de CIM_{90%} em 1000 µg/mL. Quanto ao dilapiol, o composto apresentou atividade antimicrobiana contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 na concentração de 1000 µg/mL, inibindo 100% do crescimento (CBM). Por outro lado, não apresentou efeito antimicrobiano sobre as cepas MRSA e *S. lentus* multirresistente. Além disso, o dilapiol inibiu somente 20% do crescimento de *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* multirresistente na concentração de 1000 µg/mL. Desta forma, os dados mostram uma moderada atividade antibacteriana do óleo essencial, sendo que o dilapiol mostrou fraca atividade antimicrobiana *in vitro*.

Palavras-chave: *Piper aduncum*, *Staphylococcus aureus*, óleos essenciais e farmacorresistência bacteriana.

ABSTRACT

BRAZÃO, M. A. B **Antimicrobial activity of essential oil of *Piper aduncum* L. and its component, dilapiol, against *Staphylococcus* spp. Multiresistant.** 2012. 82 f. – Dissertation (Master's degree) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

The essential oil of *Piper aduncum* (EPO) and its main component, the dilapiol (76.5%), were evaluated for antibacterial activity against different strains of *Staphylococcus* spp. ATCC and multiresistant. For testing the antibacterial activity of EPO and dilapiol were determined Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), the technique of microdilution and by counting Colony Forming Units (CFU) using concentrations of 250, 500, 750 and 1000 µg/ml of EPO and concentrations of 100 and 1000 µg/ml dilapiol. The bacterial inoculum used was adjusted to 1×10^4 range from 0.5 Mc Farland. As a negative control inoculum was used along with Tween 20, solubilising the essential oil and dilapiol, and as positive control we used the chloramphenicol 0.05 mg/mL. These compounds were tested against strains of *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, MRSA hospital, and *S. epidermidis*, *S. lentus* multiresistant nosocomial. The results showed that the EPO showed the MIC_{90%} of 500 µg/mL and MBC of 1000 µg/mL against *S. aureus* ATCC 25923, whose concentration of 500 µg/mL was able to inhibit 60% of bacterial growth. The strain MRSA, the EPO showed a small inhibition (10%) at a concentration of 750 µg/mL, being obtained in the MIC_{90%} 1000 µg/mL. In *S. epidermidis* ATCC 12228, the OEPA showed antimicrobial activity with MIC_{90%} at 500 µg/mL and MBC at 750 µg/mL. For the strain *S. epidermidis* multiresistant, the PEO was able to inhibit only 35% growth of this strain at a concentration of 750 µg/mL, but the value obtained in the MIC_{90%} 1000 mg/mL. As for dilapiol, the compound showed antimicrobial activity against a strain of *S. aureus* ATCC 25923 at a concentration of 1000 µg/mL, 100% growth inhibiting (CBM). On the other hand, had no antimicrobial effect on MRSA strain nor *S. lentus* multiresistant. Furthermore, the dilapiol inhibited only 20% of the growth of *S. epidermidis* ATCC 12228 and *S. epidermidis* multiresistant concentration of 1000 µg/mL. Thus, the data show a moderate antibacterial activity of the essential oil, and the dilapiol showed weak in vitro antimicrobial activity.

Keywords: *Piper aduncum*, *Staphylococcus aureus*, essential oils and bacterial farmacorresistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Piper aduncum</i> L. Fonte: Maia et al. 2000	22
Figura 2 -	Cronograma da evolução da resistência bacteriana. Fonte: ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B, 2005.....	31
Figura 3 -	Equipamento Clevenger – Utilizado para extração do óleo essencial da espécie <i>P. aduncum</i> , no Laboratório de Produtos Naturais da UFPA. Fonte: BRAZÃO, M.A.B. 2011.....	38
Figura 4 -	<i>S. aureus</i> em ágar Manitol (a), em ágar Muller Hinton (b) - em teste de sensibilidade a oxacilina, verificando halo de inibição ≥ 13 mm.....	41
Figura 5 -	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, verificando halo de inibição ≥ 18 mm.....	41
Figura 6 -	MRSA - <i>S. aureus</i> resistente a oxacilina/meticilina em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, demonstrando ausência de halo de inibição.....	42
Figura 7 -	<i>S. epidermidis</i> hospitalar resistente a oxacilina/meticilina em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, demonstrando ausência de halo de inibição.....	43
Figura 8 -	<i>S. lentus</i> hospitalar resistente a oxacilina/meticilina em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, demonstrando ausência de halo de inibição.....	44
Figura 9 -	Fluxograma do ensaio de microdiluição para obtenção de CIM e CBM. Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2005.....	46
Figura 10 -	Figura 10 - Esquema mostrando os ensaios para obtenção do CIM e CBM, a partir da contagem de UFC. Fonte: Adaptado de DUARTE, 2011.....	47
Figura 11 -	OEPA frente à cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição	48
Figura 12	OEPA frente à cepa hospitalar MRSA nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição	49

Figura 13	Dilapiol frente às cepas <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (a e b, respectivamente) e cepa hospitalar MRSA (c e d, respectivamente) nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.....	49
Figura 14	Controles Positivo e Negativo das cepas <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (a e b, respectivamente) e cepa hospitalar MRSA (c e d, respectivamente). Como controle Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, como controle Positivo, utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/ml.....	50
Figura 15	Demonstração do % de crescimento bacteriano das cepas de <i>S. aureus</i> ATCC (a) e MRSA (b) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL de OEPA e nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL de dilapiol, comparados com os controles, no Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, e como controle Positivo utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/ml.....	51
Figura 16	OEPA testado em cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano está demonstrado nas placas com ágar Mueller Hinton	52
Figura 17	OEPA testado em cepa hospitalar <i>S. epidermidis</i> multirresistente nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano está demonstrado nas placas com ágar Mueller Hinton.....	52
Figura 18	Dilapiol frente às cepas <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (a e b, respectivamente) e cepa hospitalar <i>S. epidermidis</i> multirresistente (c e d, respectivamente) nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 36°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.....	53
Figura 19	Controles Positivo e Negativo das cepas <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 (a e b, respectivamente) e da cepa hospitalar <i>S. epidermidis</i> Multirresistente (c e d, respectivamente). Como controle Negativo foi utilizado inóculo bacteriano e Tween 20 e como controle Positivo, utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/ml.....	54
Figura 20	Demonstração do % de crescimento bacteriano das cepas de <i>S. epidermidis</i> ATCC (a) e <i>S. epidermidis</i> multirresistente (b) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL de OEPA e nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL de dilapiol, comparados com os controles, no Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, e como controle Positivo utilizou-se o cloranfenicol a 0,05mg/ml.....	55

Figura 21	OEPA testado em cepa hospitalar <i>S. lentus</i> multirresistente nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano está demonstrado nas placas com ágar Mueller Hinton.....	56
Figura 22	Dilapiol frente às cepas <i>S. lentus</i> multirresistente (a e b) nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.....	56
Figura 23	Controles Positivo e Negativo das cepas <i>S. lentus</i> (a e b, respectivamente). Como controle Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, e como controle Positivo, utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/ml.....	57
Quadro 1	Propriedades de algumas espécies de <i>Piper</i>	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Resultados de CIM e CBM do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e do dilapiol testados nos micro-organismos em 24 h de incubação a 35°C.....	50
Tabela 2-	Resultados de CIM e CBM do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e do dilapiol testados nos micro-organismos em 24 h de incubação a 36°C	53
Tabela 3-	Resultados de CIM e CBM do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> e do dilapiol testados em <i>S. lentus</i> em 24 h de incubação a 36°C.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
µg/ml	microgramas por mililitros
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CL ₅₀	Concentração letal em 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm/s	centímetros por segundo
DCCC	Droplet countercurrent chromatography
DL ₅₀	Dose letal em 50%
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMB	Eosina Azul de Metileno
ESBL	Extended spectrum beta lactamases
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
GCMS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GISA	<i>S. aureus</i> com resistência intermediária aos glicopeptídeos
h	Horas
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ISO	<i>International Standard Organization</i>
LEPRON	Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais
m	Metros
MDCCC	Micro droplet countercurrent chromatography
mL	Mililitros
mL/min	Mililitros por minuto

mm	Milímetros
MRS	<i>Staphylococcus</i> resistente a meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
NCCLS	National Commitee for Laboratory Standards
OEPA	Óleo Essencial de <i>Piper aduncum</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina/meticilina
OSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível a oxacilina/meticilina
PAL	Enzima fenilalanina amônia liase
PBP	Proteína ligadora de penicilinas
PRSP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente à penicilina
SARO	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina/meticilina
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromossomal
SCoN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-negativa
SNC	Sistema nervoso central
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitros
UFPA	Universidade Federal do Pará
VRE	<i>Enterococcus</i> spp. com resistência à vancomicina
VRSA	<i>S. aureus</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	Plantas medicinais.....	19
2.2	Classificação botânica.....	20
2.3	Gênero <i>Piper</i> e espécie <i>P. aduncum</i> L.....	20
2.4	Óleos essenciais.....	23
2.5	Micro-organismos.....	25
2.5.1	<i>Staphylococcus</i>	25
2.5.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa – SCoN.....	25
2.5.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.6	Atividade antimicrobiana e toxicidade de óleos essenciais das Piperaceas.....	31
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Equipamentos.....	36
4.2	Reagentes.....	36
4.3	Obtenção do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> L.....	37
4.3.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	37
4.3.2	ÓLEO ESSENCIAL.....	37
4.3.3	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL.....	38
4.4	Preparo dos meios de cultura.....	39
4.5	Cepas de micro-organismos.....	39
4.5.1	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS TESTADAS.....	39
4.5.2	<i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	40
4.5.3	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	41
4.5.4	<i>S. aureus</i> MULTIRRESISTENTE.....	42

4.5.5	<i>S. epidermidis</i> MULTIRRESISTENTE.....	42
4.5.6	<i>S. lentus</i> MULTIRRESISTENTE.....	43
4.6	Preparo do inóculo bacteriano.....	44
4.7	Preparações das concentrações do óleo essencial.....	44
4.8	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	45
4.9	Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	47
5	RESULTADOS.....	48
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÃO.....	64
8	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes importantes de compostos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Estima-se que existam de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas na medicina tradicional no mundo, das quais apenas 1% foi validada por estudos científicos, com demonstração de seu valor terapêutico, quando administradas em seres humanos (LIMA et al. 2007). Exemplos importantes de fármacos obtidos de plantas é a digoxina (*Digitalis* spp.), a quinina e a quinidina (*Cinchona* spp.), a vincristina e a vinblastina (*Catharanthus roseus*), a atropina (*Atropa belladonna*), a morfina e a codeína (*Papaver somniferum*) (VIEGAS et al. 2006; TUROLLA, NASCIMENTO, 2006)

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO e SILVA, 2006). Segundo SIMÕES et al. (2004), apenas 8% desse percentual biológico foi estudado em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Dessas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização. Dentre as várias classes de compostos isolados de plantas com propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais são reconhecidos por apresentarem atividade contra um grande número de micro-organismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (BERTINI et al. 2005). Nos últimos anos, a crescente resistência dos patógenos aos antimicrobianos e o aumento da população de pacientes imunocomprometidos têm estimulado a busca de compostos terapêuticos alternativos (BERTINI et al. 2005; AMARAL, 2004).

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, entre elas, a produção de anti-sépticos tópicos. Tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vista na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (ALMEIDA et al. 2006; ARRUDA et al. 2006; NUNES et al. 2006; BENKEBLIA, 2004; REHDER et al. 2004; CLAFFEY, 2003; SEYMOUR, 2003; ARWEILER et al. 2000; FINE et al. 2000; PAN et al. 2000). As espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) são amplamente aplicadas na medicina popular em função das propriedades microbianas exibidas por seus constituintes, pimenta-de-macaco (*P. aduncum* L.) é excelente espécie

produtora de óleo essencial, o qual possui alto teor do éter fenílico dilapiol (MAIA et al. 1998). Produtos naturais de *P. aduncum* têm apresentado ação eficaz no controle de fitopatógenos (NAIR e BURKE, 1990). Nesse sentido, Bastos (1997) demonstrou em experimentos *in vitro* e *in vivo*, a ação inibitória do óleo essencial de *P. aduncum* (OEPA) contra *Crinipellis pernicioso* (STAHLE) Singer, agente causal da vassoura-de bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e a inibição *in vitro* do crescimento micelial de vários fitopatógenos.

A espécie *P. aduncum* L. ocorre naturalmente na Amazônia (MOTA et al. 2001a), produz um óleo essencial com grande potencial de exploração, uma vez que possui ação comprovada sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, como os fungos (BASTOS, 1997; MORANDIM et al. 2002), bactérias e moluscos (ORJALA et al. 1994), além de ação analgésica e anti-inflamatória com baixos níveis de toxicidade (MONTEIRO et al. 2001; FONTES JUNIOR et al. 2002).

Um importante agente etiológico associado às infecções adquiridas, tanto na comunidade como em hospitais, é o *Staphylococcus aureus*. Considerado um dos principais patógenos humanos se destaca por sua elevada frequência e patogenicidade em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes, além de estar associado à múltipla resistência aos antibióticos e de fácil disseminação intra-hospitalar (ENRIGHT, 2002). Nos anos 1960 e 1970, o uso indiscriminado de penicilinas semi-sintéticas, penicilinas resistentes e cefalosporinas favoreceu a emergência de cepas de *S. aureus* metilicina-resistente (MRSA) (KAYE, 2000). Além disso, os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCoN) se encontram entre os principais micro-organismos emergentes, nosocomiais e com resistência a vários antimicrobianos, sendo que a multirresistência dos SCoN se apresenta frequente em pacientes hospitalizados. A emergência do SCoN tem limitado o arsenal terapêutico o que contribui para um aumento no índice de fracasso no tratamento (HIGUCHI et al. 2007; MONSEN et al. 2005; NASCIMENTO et al. 2006).

Desta forma, o uso de óleos essenciais para fins medicinais é uma tradição antiga de uso popular, devido suas propriedades antibacterianas, principalmente contra bactérias Gram-positivas, o que incentiva a sua investigação como agente antibacteriano (KLOUCEK et al. 2005). Com isso, estudos que avaliem a atividade antibacteriana do OEPA e de seu componente, o dilapiol, contra cepas de *Staphylococcus* são de extrema importância à área clínica e microbiológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são as mais antigas fontes de compostos farmacologicamente ativos e praticamente a única fonte de compostos medicinais por séculos (SOUSA et al. 2007). A humanidade utiliza plantas desde antes de Cristo, primeiro numa relação de consumidor e mais tarde para a cura de suas enfermidades. Iniciada antes da medicina moderna, a medicina tradicional é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo a soma de todos os conhecimentos teóricos e práticos, explicáveis ou não, utilizados para diagnóstico, prevenção e tratamento físicos, mentais ou sociais, baseados exclusivamente na experiência e observação e transmitidos verbalmente ou por escrito de uma geração a outra (PEREIRA et al. 2004).

Uma planta é classificada como medicinal por possuir substâncias que têm ação farmacológica. Estas substâncias são denominadas princípio ativo e, na maioria das vezes, não se sabe quais destes realmente estão atuando na terapêutica (ROCHA e ROCHA, 2006).

A medicina tradicional é utilizada em todas as partes do mundo e tem um rápido crescimento econômico pelo uso de plantas medicinais, especialmente nos países em desenvolvimento, onde o serviço de saúde é limitado e as plantas representam o único tratamento acessível (AGRA et al. 2008).

Segundo a OMS, as atuais estimativas sugerem que muitos países desenvolvidos têm uma grande proporção da população que recorre à prática tradicional de saúde, especialmente a utilização de plantas medicinais. Embora o acesso à medicina moderna seja disponível nestes países, o uso de plantas medicinais tem mantido sua popularidade por razões históricas e culturais. Por outro lado, nos países em desenvolvimento, 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais como cuidados básicos de saúde, até 80% da população na África, 71% no Chile e 40% na Colômbia, entre outros (AGRA et al. 2008).

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 40. Em 1943 foi pesquisada por OSBORN, a atividade de 2.300 plantas superiores, *in vitro*, contra *S. aureus* e *Escherichia coli*, verificando que 63 gêneros continham substâncias que inibiram o crescimento de um ou de ambos os micro-organismos.

No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com CARDOSO e SANTOS (1948), os quais avaliaram extratos de 100 diferentes espécies vegetais, indicadas na terapêutica popular como anti-inflamatórias ou cicatrizantes. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *Proteus* X-19. A partir de 1950, foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais: o diterpeno biflorinina e o triterpeno maltenina. Posteriormente, compostos flavonoides com propriedades antimicrobianas efetivas contra *S. aureus* resistentes a metilicina foram isolados, tais como a primina, a mocinidina, lapachol e derivados, a plumbagina, a xantoxilina, a filantimida, a leteolina e a mirecetina.

2.2 Classificação botânica do *P. aduncum* L.

Reino: Plantae
Divisão: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Piperales
Família: Piperaceae
Gênero: *Piper*
Espécie: *P. Aduncum*

2.3 Gênero *Piper* e espécie *P. aduncum* L.

A família Piperaceae pertence à ordem das Piperales é composta por 10 a 12 gêneros com cerca de 2000 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais. No

Brasil, a família é representada por cinco gêneros, tendo o gênero *Piper* como um dos maiores, com cerca de 260 espécies, sendo que a Amazônia abriga próximo de 140 espécies (MAIA et al. 1998; JARAMILLO e MANOS, 2001; GUIMARÃES et al. 2004). O gênero *Piper* é um dos maiores da família, com cerca de 1.000 espécies, dentre elas o *P. aduncum* L. (NUNES et al. 2007).

Espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas para fins medicinais (Quadro 1) e, dentre as atividades biológicas relevantes descritas para esse gênero, podem ser enfatizadas as propriedades antitumorais de algumas espécies (DUH et al. 1990). Recentemente foi descrito o isolamento de amidas obtidas de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) assim como suas propriedades hipotensoras (ARAÚJO-JR, 1996; ARAÚJO-JR et al. 1997). A síntese e transformações estruturais de amidas de espécies de *Piper* foram também relatadas (DAS et al. 1998; NASKAR et al. 1998). De *Piper cubeba* L., utilizada como antisséptico urinário se isolou a lignana cubebina que também ocorre em *Zanthoxylum naranjillo* (Rutaceae) e apresenta atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (BASTOS et al. 1999). Isolou-se de *Piper futokadzura* Sieb. a piperenona, uma neolignana que possui atividade de defesa contra insetos (GOTTLIEB, 1982).

ESPÉCIES	PROPRIEDADES
<i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	Hipotensoras (ARAÚJO JR, 1996)
<i>Piper regnellii</i>	Analgesica (ANDRADE et al.1998)
<i>Piper cubeba</i> L.	Anti-séptico urinário Anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> (BASTOS, 1999)
<i>Piper methysticum</i> Forst.	Dor, nevralgia, convulsões, insônia (BLUMENTHAL e SING, 1997)
<i>Piper futokadzura</i> Sieb.	Defesa contra insetos (GOTTLIEB, 1982)
<i>Piper renitens</i>	Atividade sobre <i>S. aureus</i> (Ferreira, 2007)
<i>P. aduncum</i> L.	Antiinflamatória, antibacteriano, citotóxico (KLOUCEK et al.2005) Sobre fungo <i>Crinipellis perniciosus</i> (MAIA et al.1998)

Quadro1 – Propriedades de algumas espécies de *Piper*.

As raízes e rizomas de *Piper methysticum* Forst. são de uso tradicional em algumas ilhas do Pacífico sul no tratamento da dor, nevralgia, convulsões,

inquietação e insônia. Produtos contendo extratos hidro alcoólicos, ou mesmo o pó de raízes e rizomas de *Piper methysticum* são comercializados na Europa, com indicação em ansiedade e insônia. Como substâncias responsáveis pela atividade no sistema nervoso central, foram isoladas a-pironas denominadas cavapironas (BLUMENTHAL e SING, 1997).

A espécie *P. aduncum* L. conhecida popularmente como pimenta-de-macaco e aperta-ruão (MAIA et al. 2000), é arbusto ou arvoreta de 2 a 7 m (Figura 1) bastante nodoso; folhas membranáceas ou cartáceas, elípticas, elíptico-ovaladas ou elíptico-lanceoladas, ápices curtamente acuminado, base assimétrica arredondada ou cordiforme, opacas em ambas as faces, sendo a inferior finamente pubescente, nervação com pelos quase adpressos espigas alongadas, flores minúsculas e frutos obpiramidais; frutos drupa amarelada, com minúsculas sementes marrons (MAIA et al. 2000). Largamente usada na medicina popular para tratar de inflamações e dores de estômago. Uma investigação fitoquímica desta espécie apresentou derivados de ácido benzóico, de chromanas e flavonóides com atividades antibacteriana e citotóxica. (KAPLAN et al. 1998)

Muitos estudos revelam que o extrato da parte aérea de *P. aduncum* é largamente utilizado por possuir propriedades antibacterianas em *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacteria intracellulare*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo significativamente mais ativo em Gram-positivas confirmando assim o seu grande uso popular e, também para detectar novas fontes de agentes antibacterianos. (KLOUCEK et al. 2005).



Figura 1 - *P. aduncum* L.
Fonte: Maia et al. 2000

2.4 Óleos essenciais

Dentre os agentes terapêuticos provenientes das plantas com uso medicinal popular e científico, destacam-se os óleos essenciais. A ISO (*International Standard Organization*) define óleos essenciais como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por compressão dos pericarpos de frutos cítricos (COSTA et al. 2008). Os óleos essenciais também podem ser chamados de óleos voláteis, essências, azeites etéreos ou azeites voláteis e constituem um grupo de substâncias líquidas, voláteis, responsáveis pelo odor aromático de diversas plantas (MATOS e MATOS, 1989). A qualidade das essências pode variar de um gênero a outro, de uma espécie a outra (AMARAL, 2004). Os óleos essenciais em geral não são muito estáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. São raramente encontrados em gimnospermas, no entanto, são abundantes em angiospermas dicotiledôneas (SIMÕES et al. 2004)

Dados da literatura provam que o ambiente no qual o vegetal se desenvolve, bem como o tipo de cultivo, influem sobre a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície (MORAIS et al. 2006)

Os óleos essenciais podem ocorrer, dependendo da família, em estruturas secretoras especializadas, como em pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígena (Pinaceae, Rutaceae) (MARQUES et al. 2008).

Podem ser extraídos a partir de flores (rosa; *Rosa centifolia*), folhas (mameleiro preto; *Croton sonderianus*), frutos (funcho; *Foeniculum vulgare*), sementes (sucupira branca; *Pterodum polygalaeflorus*), parte aérea (capim-santo; *Cymbopogon citratus*), raízes (vetiver; *Vetiveria zizanioids*), casca (jatobá; *Hymenaea courbaril*), tubérculos (tiririca; *Cyperus* sp.), capítulos florais (macela; *Egletes viscosa*) e bulbos (alho; *Allium sativum*) (AMARAL, 2004). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar

segundo a localização anatômica das estruturas produtoras (DESCHAMPS et al. 2008).

Os métodos de extração dos óleos essenciais variam conforme a localização do óleo na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns são: enfloração, arraste por vapor d'água, extração com solventes orgânicos, prensagem e extração por CO₂ supercrítico (SIMÕES et al. 2004). Uma vez obtido um óleo ou extrato de uma espécie é necessário fracioná-lo para determinar quais componentes estão presentes, ou quando for o caso, quais componentes possuem atividade biológica. Em geral, na separação e isolamento dos componentes de um extrato ou óleo essencial utilizam-se métodos cromatográficos, tais como a cromatografia em coluna (CC), cromatografia líquida sob vácuo, cromatografia sob pressão, cromatografia flash, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em papel, cromatografia-contra-corrente-gota-a-gota -"droplet countercurrent chromatography"; DCCC ou "micro droplet countercurrent chromatography"; MDCCC (ARAÚJO, 2005).

Ao óleo essencial de inúmeras famílias e espécies, não apenas de Piperaceae e Piper, atribui-se algumas propriedades farmacológicas como, por exemplo, ação carminativa, anti-espasmódica, cardiovascular, irritante, secretolítica, sobre o SNC, anestésica local, anti-inflamatória e antisséptica. Dentre as atividades biológicas reputadas para os óleos voláteis das espécies de Piper, tem-se como exemplo, o OEPA, com efeito sobre o fungo *Crinipellis pernicioso* (MAIA et al. 1998); atividade analgésica foi comprovada para o óleo volátil de *P. regnellii* (ANDRADE et al. 1998) e atividade inseticida foi demonstrada para óleo de *P. aduncum* (MESQUITA et al. 2005).

Praticamente, todos os óleos essenciais constituem uma mistura de princípios químicos muito complexos e variam amplamente em sua composição, sendo a maior parte constituída principalmente por terpenos (MATOS e MATOS, 1989). Os constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos se apresentam em diferentes concentrações; normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES et al. 2004).

2.5 Micro-organismos

2.5.1 *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* apresenta 37 espécies, 14 subespécies, sendo que somente 15 espécies são encontradas em amostras humanas, e de uma maneira prática, os estafilococos são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos de acordo com a resposta ao teste da plasmó coagulase. As bactérias Gram-positivas, especialmente os cocos, estão entre os micro-organismos mais frequentemente isolados de amostras biológicas humanas em laboratórios de microbiologia. ANVISA, 2008

Os estafilococos são geralmente encontrados na pele e mucosas do homem e de outros animais. São cocos gram-positivos, que podem se apresentar isolados ou aos pares, em cadeias curtas ou agrupados, são micro-organismos imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e produtores de catalase. O aspecto macroscópico da colônia em meio sólido com presença de pigmento e hemólise em ágar sangue de carneiro são características auxiliares na identificação destes micro-organismos. A identificação da espécie de estafilococos é baseada em uma variedade de características fenotípicas convencionais. ANVISA, 2008

As espécies mais importantes do ponto de vista clínico podem ser identificadas com algumas provas específicas, como pigmentação da colônia, estafilo-coagulase, “fator clumping” ou “fator de agregação”, prova da desoxiribonuclease, resistência à novobiocina, fermentação do manitol, entre outras. A habilidade de coagular o plasma continua sendo o critério mais aceito e utilizado para identificar estafilococos patogênicos associados com infecções agudas (ANVISA, 2008).

2.5.2 *Staphylococcus* COAGULASE-NEGATIVA – SCoN

No gênero *Staphylococcus*, a espécie *S. aureus* é a mais conhecida do gênero, é produtora de coagulase (coagulase-positiva) e de outras enzimas e toxinas, e está frequentemente associada à etiologia de várias infecções e intoxicações no homem e em animais, enquanto que os estafilococos coagulase-negativa (SCoN) têm sido considerados saprófitas ou raramente patogênicos (KLOOS, 1975). Dados da literatura relatam que o *S. aureus* não é mais a espécie dominante nas infecções, visto que o SCoN representa uma importante ameaça, especialmente considerando a frequência que essas bactérias colonizam narina, faringe, axilas, mãos, umbigo, trato urinário e feridas abertas (CAVALCANTI et al. 2005; CEPEDA et al. 2005).

Além disso, o considerável progresso na classificação sistemática dos estafilococos e no desenvolvimento de métodos para a identificação do gênero, espécies e subespécies, tem permitido aos clínicos identificarem vários SCoN em amostras clínicas e, assim, os considerarem como agentes etiológicos de diversos processos infecciosos (KLOOS, 1994). Embora, algumas vezes sejam reconhecidos como micro-organismos essencialmente oportunistas, que se prevalecem de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções (KLOOS, 1999).

No ambiente hospitalar, bactérias Gram-negativas e *S. aureus* ainda são os principais agentes de infecção no Brasil. No entanto, alguns hospitais têm sofrido mudanças nesse perfil microbiológico, passando a ser semelhante aos dos países desenvolvidos, nos quais os SCoNs são os principais agentes de infecção nas unidades de terapia intensiva neonatal (ANVISA, 2005). Nesse sentido, embora a presença dos SCoN em hemoculturas alguma vezes se trate de um contaminante (pseudobacteremia) por não apresentarem associação ao processo infeccioso, em outros casos também podem ser a verdadeira causa da bacteremia (MARSHALL et al. 1998; RUPP e ARCHER, 1994), fato que cria dúvidas na interpretação dos resultados pelos clínicos (SILBERT et al. 1997, ALVES e LEMOS, 2007).

Segundo Cordeiro (2007), SCoN constitui um dos principais representantes da microbiota humana e atualmente também está relacionado a casos sérios de infecções. Em vários estudos, constatou-se que a espécie *S. epidermidis* foi a mais frequentemente isolada (60%) em infecções bacterianas (NEUMEITER, 1995; SILBERT et al. 1997; HUDOME, 2001; CUNHA et al. 2002; CENTER et al. 2003, CORDEIRO, 2007). Das infecções associadas aos SCoN, encontram-se: infecções urinárias, infecções associadas a dispositivos permanentes, bacteremia em

hospedeiros comprometidos, receptores de transplante, endocardite, osteomielite, endoftalmite, dentre outras (RUPP e ARCHER, 1994; KLOSS e BANNERMAN, 1999); e em outras infecções relacionadas com válvulas cardíacas naturais e protéticas, osteomielite e endoftalmite pós cirúrgica (KONEMAN et al. 1997; BARRETO e PICOLI, 2008; CUNHA, SINZATO e SIVEIRA, 2004).

Durante as últimas duas décadas a incidência de SCoN vem aumentando e esses passaram a ser reconhecidos como agentes oportunistas causadores de infecções nosocomiais e comunitárias. Além disso, SCoN apresentam elevada resistência a múltiplos antibióticos como, a gentamicina, trimetoprim, eritromicina, cloranfenicol e meticilina, o que reflete provavelmente a pressão seletiva do uso indiscriminado de antimicrobianos no ambiente hospitalar (PATRIK, 1990).

Os estafilococos coagulase positiva ou negativa apresentam elevada resistência em todo o mundo (acima de 60%) a benzilpenicilina (penicilina G). Com a resistência a esses antimicrobianos foram criadas as penicilinas semissintéticas, que possuem radicais que as protegem da ação das β -lactamases, porém entre 1948 a 1961 surgiram na Europa bactérias resistentes a essas penicilinas, comprovando a plasticidade do seu genoma e a capacidade em adaptar-se à pressão seletiva dos antibióticos (ROBINSON e ENRIGHT, 2003).

A multirresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre amostras hospitalares de SCoN, destacando-se a resistência à meticilina (oxacilina). Em termos clínicos, cepas de SCoN resistentes à meticilina-MRS, são problemáticas porque esses micro-organismos vão apresentar resistência cruzada a virtualmente todos os β -lactâmicos e também à outras classes de agentes antimicrobianos. A meticilina é um antimicrobiano do grupo das penicilinas de primeira escolha para tratamento das infecções estafilocócicas em hospitais, quando não há resistência aparente. A determinação correta da suscetibilidade a meticilina em amostras de estafilococos é fundamental, pois a falha na detecção desta resistência pode resultar em uma terapêutica ineficaz, levando ao uso desnecessário e indiscriminado da vancomicina e outros agentes de amplo espectro em hospitais (KAISER, 2010).

A importância desses micro-organismos se deve também ao fato de estarem associados as bacteremias em recém-nascidos de baixo peso (PATRIK, 1990), e assim ocasionarem aumento de mortalidade e tempo de hospitalização (MARTIN, 1989). Em estudo realizado em UTI de hospital em São Paulo evidenciou elevada

ocorrência de bactérias multirresistentes, predominando o SCoN com 36,4%, seguido por *S. aureus* multirresistente com 19% de frequência (ANDRADE; LEOPOLDO; HAAS, 2006).

Quanto a laboratório clínico, a resistência a meticilina entre os SCoN também é preocupante, visto que os isolados de estafilococos podem variar no nível de expressão fenotípica de resistência a este antimicrobiano, podendo levar um caráter de heterorresistência a meticilina. Nesse sentido, os SCoN resistentes a meticilina produzem uma proteína ligadora de penicilina chamada PBP'2 ou 2^a, com baixa afinidade aos β -lactâmicos que pode ser codificada pelo gene *mecA*. (De GIUSTI et al. 1999; CAIERÃO et al. 2004).

Com o aparecimento de cepas de SCoN resistentes a meticilina, estas tornaram-se um problema clinicamente grave, pois as drogas utilizadas para o combate a infecções passam a não mais desempenhar corretamente sua função tornando o tratamento inviável. Essa problemática direcionou as pesquisas para elucidar possíveis mecanismos de resistência e novos tratamentos direcionados as cepas multirresistentes provenientes principalmente de ambientes hospitalares (ALCARÁZ et al. 2003).

2.5.3 *Staphylococcus aureus*

No indivíduo sadio, *S. aureus* é usualmente um comensal das fossas nasais, pele e intestino. Por isso, as infecções frequentemente resultam da introdução dessas cepas em locais previamente estéreis após um trauma, abrasões de pele e mucosas ou durante procedimentos cirúrgicos. (LEE et al.1997; CUEVAS et al. 2004). Micro-organismos Gram-positivos, em especial o *S. aureus*, emergiram como importantes agentes causadores de infecção da corrente sanguínea (MACGOWAN JR, 1985; SALOMÃO, 1993; CDC, 1983; MORRISON, 1986). Estas infecções acometem pacientes em todas as faixas etárias, com maior frequência nos extremos de idade e apresentam pior prognóstico em pacientes com idade acima de 50 anos (SHAH, 1979; MIRIMANOFF, 1982; BRYAN et al. 1984; GRANSDEN, 1984; LIBMAN, 1984; WATANAKUNAKORN, 1987). Entre as infecções hospitalares, as

sepses por *S. aureus* são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade (GRANSDEN, 1984; WATANAKUNAKORN, MYLOTTE, 1987).

A terapia antimicrobiana contra *S. aureus*, tem se tornado um grande problema no tocante a infecções hospitalares, devido à frequente resistência adquirida por esse patógeno, desde a descoberta das penicilinas e, em seguida, aos beta-lactâmicos. A aquisição desses genes de resistência é facilitada pelo uso abusivo de drogas antimicrobianas, e disseminados via plasmídeo de resistência presentes em cepas de *S. aureus*. (STRATTON, 2000). O problema torna-se mais preocupante, porque *S. aureus* tem a capacidade de desenvolver múltiplos mecanismos de resistência como: bomba de efluxo, inativação de aminoglicosídeos e modificação nas PBPs - Proteínas ligadoras de penicilinas e uma alteração de extrema importância em PBP-2, que confere resistência a todos os beta-lactâmicos originando cepas chamadas de *S. aureus* meticilina resistente - MRSA (ITO et al. 2003).

Neste sentido, o *S. aureus* foi capaz de desenvolver rapidamente resistência aos antibióticos. Já na década de 60, tornou-se resistente à meticilina (MRSA) devido à presença do gene *mecA*, sendo renomeado *Staphylococcal Cassette Chromosome* – SCCmec. MRSA caracterizava a resistência aos antibióticos β -lactâmicos em geral (MARK et al. 2002; ROHRER et al. 2003).

Particularmente, em *S. aureus* a sua versatilidade no desenvolvimento de resistência a vários agentes antimicrobianos contribui para a sobrevivência em ambientes hospitalares e difusão entre os pacientes, como é o caso do *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), que usualmente é resistente não somente as penicilinas e cefalosporinas, mas também aminoglicosídeos, lincomicinas, tetraciclina, rifampicina e mais recentemente a vancomicina (VAN WAMEL et al. 1995; GILLESPIE et al. 1997).

Historicamente, a resistência às penicilinas β -lactamase-estáveis anti-estafilococos têm sido denominadas de “meticilina-resistentes,” que é a razão das siglas “MRSA”, em inglês (*methicillin-resistant S. aureus*), ou “MRS” (*methicillin-resistant staphylococci*), que ainda são usadas de maneira generalizada, embora a meticilina não seja mais o agente de escolha para testes ou tratamento. A resistência a esses agentes é denominada usando vários termos, ex., “MRS”, “meticilina-resistente,” ou “oxacilina-resistente” (CLSI, 2009).

As primeiras cepas de MRSA foram descritas na década de 60 (JEVONS, 1961; PARKER, 1970), porém este micro-organismo se tornou uma importante causa de infecção hospitalar no início da década de 70 (Figura 6), quando começaram a ser descritos os primeiros surtos (BARRET, 1968; O'TOOLE, 1970).

Depois de 1975, o MRSA tornou-se problema nos Estados Unidos da América (EUA), com aumento no número de surtos em várias instituições (BOYCE, 1982; CASEWELL, 1986), e hoje são endêmicos em muitos hospitais (BENNER e KAYSER, 1968; KAYSER, MARK, 1972; BOYCE et al. 1981; LINNEMAN et al. 1982; THOMPSON et al. 1982; OPAL et al. 1990; BOYCE, 1991; STAMM, LONG, BELCHER, 1993), contribuindo, inclusive, com o aumento das taxas de infecção hospitalar (STAMM, LONG, BELCHER, 1993).

Os MRSA se situam entre os agentes de infecção hospitalares mais frequentes, sendo responsáveis por mais da metade das estafilococcias hospitalares (CDC, 1997; CHAMBERS, 2001), acarretando um aumento no uso de vancomicina (HIRAMATSU et al. 1997; TENOVER et al. 2001; GEMMELL, 2004). No Brasil, a situação é agravada pela pouca utilização de critérios microbiológicos de diagnóstico de infecções hospitalares (GONTIJO FILHO, 2002) e o consequente uso empírico desse antimicrobiano (PANNUTI e GRINBAUM, 1995; COUTO et al. 1998; OLIVEIRA et al. 2001).

As infecções por MRSA apresentam alta letalidade, variando entre 4,5 a 50% (LOCKSLEY et al. 1982; BOYCE, 1991; JAMBON et al. 1993; PUJOL et al. 1994; COELLO et al. 1994; JERNINGAN et al. 1995) e se considerarmos especificamente as bacteremias, estas variam de 5 a 47%, dependendo das unidades estudadas e do tratamento instituído (CROSSLEY et al. 1978; PEACOCK et al. 1980, GRIEBLE et al. 1981; LINNEMAN et al. 1982; SORREL et al. 1982; LEWIS e SARAVOLATZ, 1985; HUNT et al. 1988; CHENG e FRENCH, 1988; CONTERNO, 1994; JERNINGAN et al. 1995).

No Brasil, o MRSA é responsável por 26,6 a 71% das cepas de *S. aureus* isoladas em diversos hospitais do país (LEVY et al. 1991; NUNES et al. 1994; REZENDE et al. 1994; COSTA et al. 1994). Foi identificada uma cepa de MRSA por Sader, em 1994, de origem comum entre diversas instituições brasileiras, sugerindo que exista transmissão interhospitalar desse micro-organismo.

Relatos de 1982 do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) sugeriam que as infecções por MRSA envolviam, predominantemente, grandes

centros terciários de referência e as instituições universitárias (HALEY et al. 1982). Dados mostram que 96% dos hospitais nos EUA que fazem vigilância epidemiológica, tiveram pacientes com infecção por MRSA no período de 1987 a 1989 (BOYCE, 1991).

A incidência de infecções por este micro-organismo continua alta, e estudos veem demonstrando que o MRSA apresenta letalidade maior que os *S. aureus* sensível à oxacilina – (OSSA), segundo ASENSIO et al. 1996 e ROMERO-VIVAS et al. 1995. Em 1995 ROMERO-VIVAS et al. demonstraram através de estudo que houve relação entre mortalidade e resistência a oxacilina. CONTERNO, 1994, no Hospital São Paulo, Brasil, demonstrou que o *S. aureus* foi um agente importante das bacteremias, principalmente hospitalares, que a letalidade foi elevada e que o MRSA foi identificado como fator de risco.

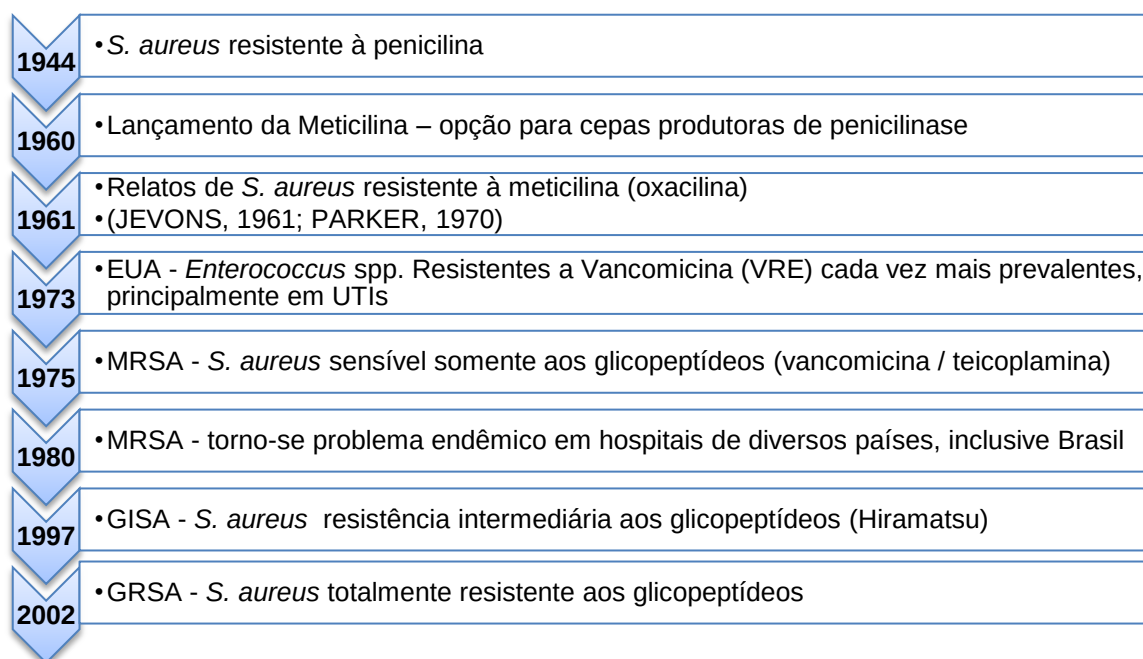


Figura 2 - Cronograma da evolução da resistência bacteriana.
Fonte: ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B, 2005.

2.6 Atividade antimicrobiana e toxicidade de óleos essenciais das Piperaceas

Estudos indicam que os óleos essenciais de várias plantas têm efeito bactericida contra muitas espécies, apresentando ação tanto contra bactérias Gram-

positivas quanto Gram-negativas (PRASHAR, 2003). No entanto, a atividade antimicrobiana depende do tipo, composição e concentração da espécie de óleo essencial avaliado, o tipo do micro-organismo em questão, a composição do substrato, o processamento e condição de estocagem da planta (MARINO, 2001).

Dentre as Piperáceas da Amazônia, o *P. aduncum* é uma excelente produtora de óleo essencial, de elevado padrão de oxigenação (MAIA et al. 1998; FAZOLIN et al. 2007). Na investigação fitoquímica da espécie numerosos compostos com atividade biológica já foram isolados como a aduncamida, uma nova amida isolada do *P. aduncum* com ação bactericida contra o *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*, fenilpropanoides como o dilapiol, miristicina e apiol, sendo esses compostos sinérgicos de inseticidas naturais e sintéticos; e compostos terpênicos como piperitona, com ação inseticida (VIDAL et al. 2008). As chalconas como piperaduncina, com ação bactericida (PAMAR et al. 1997).

Dentre os fenilpropanoides, o dilapiol é o composto majoritário do *P. aduncum* (PARMAR et al. 1997). O óleo de *P. aduncum* é constituído por um grupo metilenodioxidofenila, que varia de 58% a 88,4% de dilapiol (SMITH e KASSIM, 1979; BELZILE et al. 2000; GOTTLIEB et al. 1981; FAZOLIN et al. 2005; MAIA et al. 1998; FAZOLIN et al. 2007). Por se tratar de um fenilpropanoide, origina-se da fenilalanina pela ação da enzima fenilalanina amônia-liase (SIMÕES, 2007).

Ferreira (2007), realizou um estudo com óleo essencial de *Piper renitens* frente a *S. aureus* sensível e resistente a vancomicina, *Streptococcus* sp, *P. aeruginosa* sensível e resistente a imipenem, *E. coli* e *K. ozeanae*. Em seus resultados foi observado que o *S. aureus* sensível a vancomicina apresentou sensibilidade ao óleo, obtendo halos de inibição de 12 mm, porém não obteve inibição frente as bactérias *Streptococcus* sp., *E. coli*, *S. aureus* resistente a vancomicina, *P. aeruginosa* sensível e resistente e *K. ozaenae*.

Nove extratos etanólicos de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas na cidade Calleria no Peru, entre elas o de *P. aduncum*, foram testados para atividade antimicrobiana contra nove cepas de bactérias (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, pelo método de microdiluição em caldo. Dentre as plantas testadas, a *Phyllanthus amarus* e *Terminalia catappa* apresentaram propriedades antibacterianas, inibindo

todas as cepas testadas, com CIM variando de 0,25 a 16 mg/mL. O extrato da parte aérea de *P. Aduncum* foi significativamente mais ativo frente bactérias Gram-positivas, CIM variando de 1 a 2 mg/mL, do que contra as bactérias Gram-negativas com CIM > 16 mg/mL (KLOUCEK et al. 2005).

Em outro estudo, a composição dos óleos essenciais das folhas, caules e frutos de *P. aduncum*, *P. arboreum* e *P. tuberculatum* foram examinados por meio de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e ensaios antifúngicos. Houve uma predominância de monoterpenos em *P. aduncum* e *P. tuberculatum* e de sesquiterpenos em *P. arboreum*. *P. Aduncum* apresentou a composição mais rica do óleo essencial, incluindo o linalol. Os óleos essenciais dos frutos de *P. aduncum* e *P. tuberculatum* mostraram a maior atividade antifúngica com a CIM de 10 mg, contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. (NAVICKIENE et al. 2006).

Nos ensaios larvicide e inseticide contra *Anopheles marajoara* e *Aedes aegypti*, o dilapiol, um dos principais componentes de *P. Aduncum*, promoveu 100% da mortalidade das larvas após 48h de exposição, na concentração de 100 ppm. Para o ensaio inseticide, o dilapiol induziu mortalidade de 100% dos adultos dos mosquitos de *A. marajoara* e *A. aegypti* após 37 de 60 e 180 minutos de exposição ao composto, com CL₅₀ de 417 e 325 ppm para o *A. marajoara* e CL₅₀ 401 e 361 ppm para o *A. aegypti*, respectivamente. (ALMEIDA et al. 2009).

Quanto a toxicidade do OEPA, SOUSA et al. 2008 realizou essa avaliação pela determinação da DL₅₀ em camundongos e também a análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos. Na determinação da DL₅₀, os camundongos que receberam por via oral doses de 1000, 2000, 2350, 2500, 2700 e 3000 mg/kg do OEPA apresentaram um percentual de mortalidade variando de 0, 30, 40, 60, 80 e 100%, respectivamente. O valor da DL₅₀, obtido por interpolação semi-logarítmica, correspondeu a 2.400 ± 191,7 mg/kg de massa corpórea. Segundo SOUSA et al, 2008 o óleo de *P. aduncum* pertence à classe dos agentes xenobióticos, de baixa toxicidade. Além disso, após administração das doses diárias constatou-se que em todas as doses os animais apresentaram perda de equilíbrio, respiração abdominal e ausência de coordenação motora. Em doses entre 200 e 2000 mg/ kg os camundongos apresentaram aumento na excreção de fezes e urina e a partir da dose de 3500 mg/kg os animais ficaram momentaneamente paralisados e com redução na excreção de fezes e urina.

No estudo da toxicidade subaguda do OEPA em ratos observou-se que não houve alteração no comportamento dos animais ou no consumo de água e ração. Além do óleo essencial não alterar de maneira significativa os parâmetros hematológicos e bioquímicos em relação ao controle no tratamento subagudo, exceto a redução da creatinina. O valor da DL_{50} e dados hematológicos e bioquímicos sugerem que o óleo essencial do *P. aduncum* apresenta baixa toxicidade em modelo animal (SOUSA et al. 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana do OEPA (pimenta-de-macaco) e do componente majoritário deste óleo essencial, o dilapiol, frente a diferentes cepas de *Staphylococcus* spp. multirresistentes.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar CIM e CBM do OEPA em cepas de *S. aureus* ATCC e MRSA a partir da técnica de microdiluição e por contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Determinar CIM e CBM do dilapiol em cepas de *S. aureus* ATCC e MRSA a partir da técnica de microdiluição e por contagem de UFC.

Determinar CIM e CBM do OEPA em cepas de *S. coagulase-negativa* ATCC (*S. epidermidis*) e multirresistentes (*S. epidermidis* e *S. lentus*) a partir da técnica de microdiluição e por contagem de UFC.

Determinar CIM e CBM do dilapiol em cepas de *S. coagulase-negativa* ATCC e multirresistentes a partir da técnica de microdiluição e por contagem de UFC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Clevenger

Vitek 2 - Biomerieux

Agitador de tubos - Vortex - Phenix - Modelo AT 56

Balança digital analítica de precisão - Quimis - BG440

Cabine de segurança biológica classe II

Densimat - Biomerieux

Estufa bacteriológica - Fanem

Micropipetas automáticas - Finpippete

4.2 Reagentes

Ágar MAC-CONKEY (MERCK, Alemanha)

Ágar Manitol (HIMEDIA, Índia)

Ágar Mueller Hinton (MERCK, Alemanha)

Caldo Mueller Hinton (MERCK, Alemanha)

Caldo BHI (MERCK, Alemanha)

Cloranfenicol 0,05 mg/mL

Cartela de identificação de Gram-positivos- Vitek2

Cartela de antibiograma Vitek2

Tween 20

Álcool 70%

Oxacilina 1g - Disco de antibiograma

4.3 Obtenção do óleo essencial de *P. aduncum* L.

4.3.1 MATERIAL BOTÂNICO

As partes aéreas (folhas e talos finos) do *Piper aduncum* foram coletadas no Município de Santo Antônio do Tauá, em propriedade particular, onde há um experimento agrônômico com matrizes de *P. aduncum*. A espécie é conhecida na região como pimenta-de-macaco. Exemplares da planta estão depositados no Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, sob o registro 150.678. A planta foi identificada pela Dra Elsie F. Guimarães, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, especialista da família Piperaceae.

4.3.2 ÓLEO ESSENCIAL

O processo de extração do óleo essencial foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais (LEPRON), com a colaboração da equipe do Prof. Dr. José Guilherme Maia, pela técnica de arraste a vapor d'água utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado (Figura 3), com duração de 3 horas. O hidrolato foi recolhido e as fases aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação, em centrífuga de cruzeta horizontal a 965 G a 25°C por 5 minutos. O óleo foi coletado com o auxílio de uma micropipeta, pesado e colocado em frasco âmbar, devidamente limpo, envolto com papel alumínio e armazenado no freezer a 4°C, de acordo com a metodologia de CASTRO et al.(2006).



Figura 3 – Equipamento Clevenger – Utilizado para extração do óleo essencial da espécie *P. aduncum*, no Laboratório de Produtos Naturais da UFPA.

Fonte: BRAZÃO, M.A.B. 2011.

4.3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL.

O óleo essencial foi submetido à cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS), em equipamento Shimadzu, modelo CG-17A, com detector seletivo de massa, modelo QP 5000, operado nas seguintes condições: coluna cromatográfica do tipo capilar de sílica fundida com fase ligada DB5, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador (1 mL/min). As temperaturas foram de 220°C no injetor e 240°C no detector. A temperatura do forno foi programada de 40 a 240°C, com acréscimo de 3°C a cada minuto.

Análise do óleo foi realizada qualitativamente em um GC-MS Thermo DSQ II (Figura 4), com as seguintes condições: coluna capilar de sílica DB-5ms (30 m x 0,25 mm e 0,25 µm de espessura do filme); temperatura programada de 60 a 240 °C (3°C/min); temperatura do injetor a 250 °C; hélio como gás de arraste, ajustado para fornecer uma velocidade linear de 32 cm/s (medidos a 100 °C); tipo de injeção splitless (1 µl de sol 1:1000 em hexano); split flow foi ajustado para fornecer uma relação 20:1; o detector de massas trabalhou no modo impacto eletrônico com 70 eV e a temperatura da fonte de íons e conexões foi de 200 °C. Os dados quantitativos dos constituintes voláteis foram obtidos por normalização da área do pico, usando-

se um cromatógrafo Thermo Focus, com detector de ionização de chamas, operando nas mesmas condições do GC-MS, exceto o gás de arraste que foi nitrogênio (ADAMS, 2001; MIRANDA JUNIOR, 2010).

Os componentes voláteis do OEPA foram identificados por comparação dos seus espectros de massas e índices de retenção com aqueles de padrões autênticos, previamente analisados e armazenados no sistema de dados do instrumento. Outras identificações foram feitas por comparação de seus espectros de massas com aqueles existentes em sistemas de dados de bibliotecas de referências e citados na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2005). O rendimento do óleo foi de 3,0% e seu constituinte majoritário foi o dilapiol (76,5%), seguido de piperitona (6,1%), terpinen-4-ol (2,3%), miristicina (2,1%), (*E*)-cariofileno (1,5%), γ -terpineno (1,3%), germacreno D (1,2%) e apiol (1,2%) entre outros.

4.4 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Manitol (HIMEDIA, Índia) e ágar EMB (MERCK, Alemanha). Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

4.5 Cepas de micro-organismos

4.5.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS TESTADAS

Os micro-organismos de referência utilizados para a realização da pesquisa foram bactérias: *S. aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), fornecidas pelo INCQS/FIOCRUZ (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde). As amostras se encontravam liofilizadas e após reconstituição com água destilada estéril, foi mantida no laboratório de Microbiologia

da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará/ UFPA, em meio de cultura nutritivo e refrigeradas.

As amostras bacterianas de origem hospitalar, *S. aureus* MRSA, *S. epidermidis* multirresistente, *S. lentus* multirresistente foram armazenados em caldo BHI com glicerol e depois mantidos em ágar Nutriente para prosseguimento dos testes. Foram realizados testes de sensibilidade a oxacilina, conforme orientação do CLSI 2009, para *S. aureus* um halo ≥ 13 mm como sensível e ≤ 10 mm resistentes a oxacilina; e para *Staphylococcus* coagulase-negativos diâmetro do halo ≥ 18 mm são considerados sensíveis e ≤ 17 mm como resistentes.

Para os ensaios, todas as bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio específico para a bactéria. Para *S. aureus* utilizou-se o meio ágar Manitol. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 35°C por 24h em estufa bacteriológica.

4.5.2 *S. aureus* ATCC 25923

Cepa de referência, (Figuras 4) padrão com características de sensibilidade e resistência já conhecidos. Apresenta sensibilidade aos antibióticos Oxacilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Moxifloxacina, Norfloxacina, Eritromicina, Clindamicina, Linezolid, Teicoplanina, Vancomicina, Tigeciclina, Ácido Fusídico, Rifampicina e Trimetoprim/Sulfametoxazol, sendo Resistente a Benzilpenicilina. Resultado obtido por automação em equipamento Vitek 2- Biomerieux, e confirmados em disco difusão.

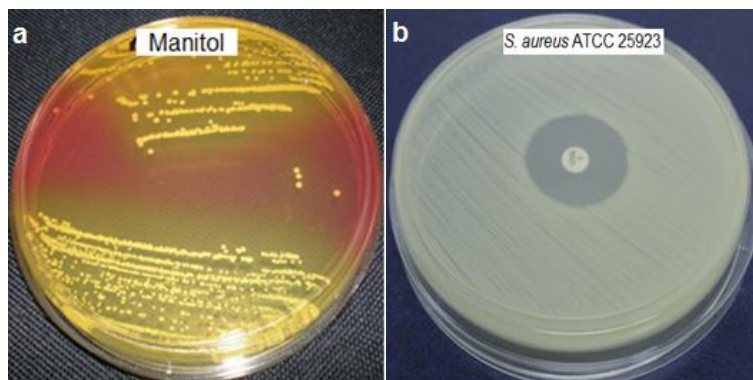


Figura 4 – *S. aureus* em ágar Manitol (a), em ágar Muller Hinton (b) - em teste de sensibilidade a oxacilina, verificando halo de inibição ≥ 13 mm.

4.5.3 *S. epidermidis* ATCC 12228

Cepa de referência catalogada, (Figuras 5) padrão com características de sensibilidade e resistência já conhecidos. Apresenta sensibilidade aos antibióticos Oxacilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Moxifloxacina, Norfloxacina, Eritromicina, Clindamicina, Linezolid, Teicoplanina, Vancomicina, Tigeciclina, Ácido Fusídico, Rifampicina e Trimetoprim/Sulfametoxazol, sendo Resistente a Benzilpenicilina. Resultado obtido por automação em equipamento Vitek 2- Biomerieux, e confirmados em disco difusão.

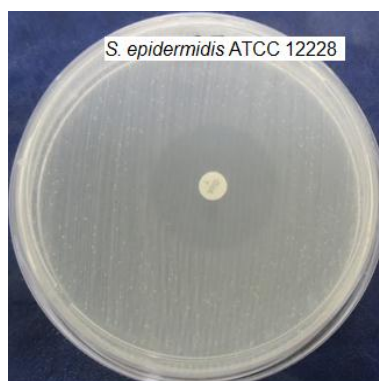


Figura 5 - *S. epidermidis* ATCC 12228 em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, verificando halo de inibição ≥ 18 mm.

4.5.4 *S. aureus* MULTIRRESISTENTE

S. aureus (MRSA) em estudo é proveniente de caso clínico hospitalar, foi fornecida pelo Laboratório Jayme Aben Athar, da Santa Casa de Misericórdia do Pará, com multiresistência e inclusive resistência a oxacilina (Figura 6). A amostra estava armazenada em ágar nutriente, foi repicada e submetida a teste de resistência à oxacilina, atestando estar viável para ser submetida aos ensaios com óleo essencial. Tem como sítio de infecção hemocultura. Mostrou-se Resistente aos antibióticos testados: Benzilpenicilina, Oxacilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Norfloxacina, Eritromicina, Rifampicina, Clindamicina, Trimetoprim/Sulfametoxa; e apresentou Sensibilidade aos seguintes antibióticos Oxifloxacina, Teicoplanina, Vancomicina, Tigeciclina.

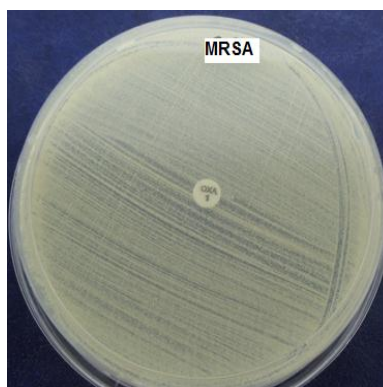


Figura 6- MRSA - *S. aureus* resistente a oxacilina/meticilina em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, demonstrando ausência de halo de inibição.

4.5.5 *S. epidermidis* MULTIRRESISTENTE.

S. epidermidis multirresistente em estudo é uma amostra hospitalar, fornecida pelo Laboratório Ruth Brazão, com resistência a vários antibióticos, inclusive resistência a oxacilina (Figura 7). A amostra estava armazenada em ágar nutriente,

foi repicada e submetida a teste de resistência à oxacilina, apresentando resultados adequados para ser submetida aos ensaios com óleo essencial. Tem como sítio de infecção hemocultura, mostrou-se resistente aos antibióticos testados: Benzilpenicilina, Oxacilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Moxifloxacina, Norfloxacina, Eritromicina, Clindamicina, Trimetoprim/Sulfametoxa; e apresentou Sensibilidade aos seguintes antibióticos: Linezolid, Teicoplanina, Vancomicina, Tigeciclina, Ácido fusídico e Rifampicina. Resultado obtido por automação em equipamento Vitek 2-Biomerieux, e confirmados em disco difusão.

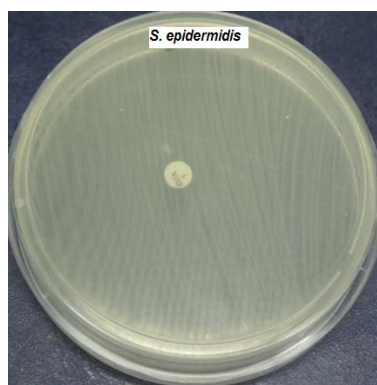


Figura 7- *S.epidermidis* hospitalar resistente a oxacilina/meticilina em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, demonstrando ausência de halo de inibição.

4.5.6 *S. lentus* MULTIRRESISTENTE.

S. lentus é proveniente de hospital, foi fornecida pelo Laboratório Jayme Aben Athar, da Santa Casa de Misericórdia do Pará, com multirresistência e inclusive resistência a oxacilina (Figura 8). A amostra estava armazenada em ágar nutriente, foi repicada e submetida a teste de resistência à oxacilina, atestando estar viável para ser submetida aos ensaios com óleo essencial. Tem como sítio de infecção hemocultura, mostrou-se Resistente aos antibióticos testados: Benzilpenicilina, Oxacilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Moxifloxacina, Norfloxacina, Eritromicina, Clindamicina,; e apresentou Sensibilidade aos seguintes antibióticos: Linezolid, Teicoplanina, Vancomicina, Tigeciclina, Trimetoprim/Sulfametoxa e Rifampicina, e

Intermediária sensibilidade a Ácido fusídico. Resultado obtido por automação em equipamento Vitek 2- Biomerieux, e confirmados em disco difusão.

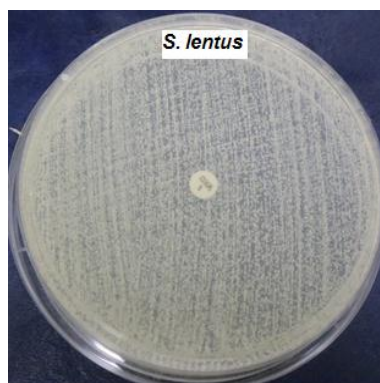


Figura 8 - *S. lentus* hospitalar resistente a oxacilina/meticilina em ágar Muller-Hinton, em teste de sensibilidade a oxacilina, demonstrando ausência de halo de inibição.

4.6 Preparo do inóculo bacteriano

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas as cepas previamente citadas. Após o período de incubação, selecionou-se 3 a 4 colônias dessas bactérias e transferiu-se para tubo contendo 1 mL de meio caldo Mueller-Hinton estéril. Quando necessário, foram realizados ajustes para alcançar a concentração desejada de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, foi realizada a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo 1×10^8 UFC/mL por 2 horas para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, foram realizadas diluições seriadas até a obtenção do inóculo 1×10^4 UFC/mL.

4.7 Preparações das concentrações do óleo essencial

Em tubo eppendorf estéril foi pesado 0,004 g do óleo essencial do *P. aduncum*, adicionou-se 100 µl de Tween 20 para solubilizar e 900 µl de caldo Mueller-Hinton estéril, obtendo-se uma solução com concentração estoque de 4000 µg/ml do óleo essencial. Para os ensaios antimicrobianos, o óleo essencial foi utilizado nas seguintes concentrações: 1000, 750, 500 e 250 µg/ml, para obter a concentração correspondente a Concentração Inibitória Mínima - CIM dos óleos essenciais (ALLEGRI et al. 1973).

4.8 Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A CIM representa a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo sob condições conhecidas. A microdiluição foi baseada nos procedimentos adotados de acordo com a Norma M7-A8 vol. 26 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico”- Norma Aprovada- Oitava edição do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2009.

A CIM obtida usando o teste de diluição pode mostrar ao médico qual a concentração do agente antimicrobiano necessária no sítio da infecção para inibir o organismo infectante. A CIM, entretanto, não representa um valor absoluto. A “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do teste que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do teste (CLSI, M7A8, 2009).

Recomenda-se o caldo de Mueller-Hinton como meio de primeira escolha para testes de sensibilidade de organismos facultativos ou organismos aeróbios de crescimento rápido mais comumente isolado. Além disso, há um grande acervo de dados e experiências sobre testes realizados com esse meio (CLSI, M7A8, 2009). Para isso, os testes foram realizados em caldo Mueller Hinton contidos em placa “Sensitive microtiter” de 96 cavidades estéreis. Nos ensaios de microdiluição foram utilizados 100 µL de cada concentração de 1000, 750, 500 e 250 µg/ml do óleo de *P. aduncum* contidas em de caldo Muller Hinton, em seguida, adicionou-se 100 µL de inóculo bacteriano a 1×10^4 UFC/mL em cada poço da microplaca (Figura 9). A

microplaca foi incubada a 35°C por 24 horas, após esse tempo, 10 µL de cada cavidade da microplaca foi semeado em placas de petri contendo ágar Muller Hinton e novamente incubados a 35°C por 24 horas. Em seguida, as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) foram contadas e o percentual de inibição do crescimento bacteriano de cada concentração foi determinado, sendo a CIM₉₀, a concentração do extrato capaz de inibir 90% do crescimento microbiano. Os dados foram expressos nos resultados em percentual de crescimento das cepas testadas por concentração do óleo. Para controle positivo foi utilizado o antimicrobiano comercial cloranfenicol na concentração de 0,05 mg/mL e como controle negativo, o Tween 20.

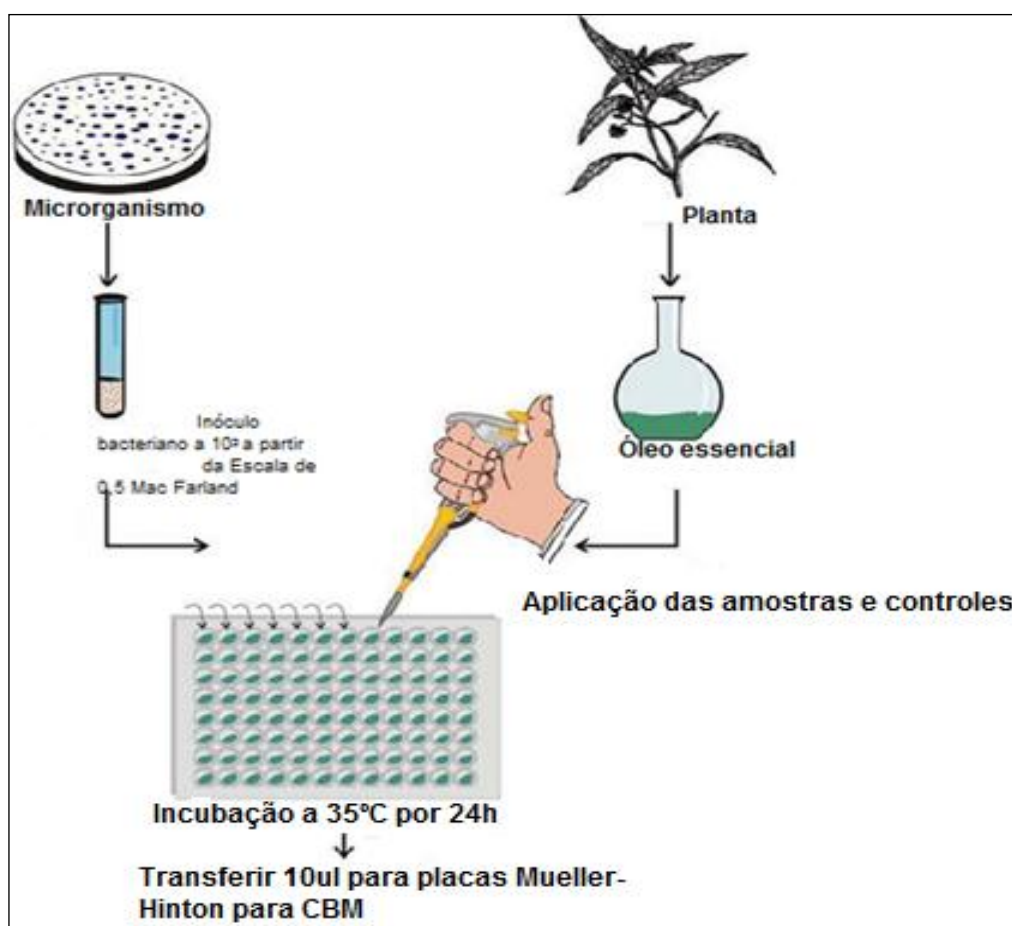


Figura 9 - Fluxograma do ensaio de microdiluição para obtenção de CIM e CBM.
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2005.

4.9 Concentração Bactericida Mínima (CBM).

A CBM é traduzida pela concentração mínima de um medicamento, que reduz em quase 100% a contagem bacteriana inicial, sob condições próprias de incubação e de tempo.

Uma alíquota (10 μ L) do conteúdo das cavidades da placa de microdiluição foi transferida para as placas de Petri previamente preparadas com ágar Mueller-Hinton, (Figura 10) e incubou-se em estufa a 35°C por 24 h. Em seguida, as Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) foram contadas. As leituras de inibição/crescimento microbiano foram realizadas após 24 horas de incubação. Sendo que foi considerado como compostos com atividade bactericida aqueles em que se detectam o crescimento de até 10 UFC (Bauer et al. 1966), ressaltando que acima deste valor é atribuída apenas atividade bacteriostática aos compostos testados.

Nos poços que continham soluções em que não se detectou crescimento do micro-organismo teste foi realizada a determinação da CBM, seguindo metodologia descrita por Kirby-Bauer (BAUER et al. 1966). Com isso, a determinação de CBM foi considerada como a menor concentração do extrato capaz de matar pelo menos 99 a 100% dos micro-organismos, tendo como referência o seu respectivo controle positivo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para controle positivo foi utilizado o antimicrobiano comercial cloranfenicol na concentração de 0,05 mg/mL e como controle negativo, Tween 20.

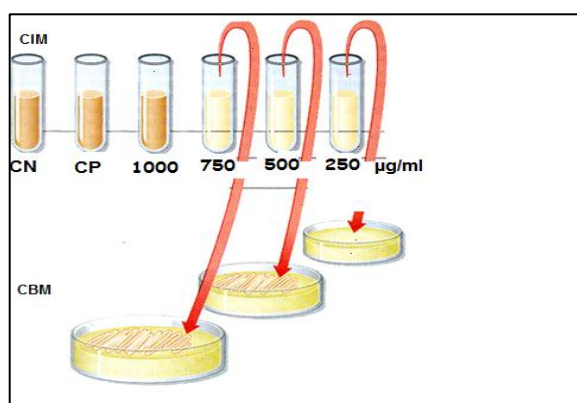


Figura 10 - Esquema dos ensaios para obtenção de CIM e CBM, a partir da contagem de UFC.

Fonte: Adaptado de DUARTE, 2011.

5 RESULTADOS

Neste estudo, o OEPA, bem como o seu constituinte majoritário, o dilapiol, foram testados quanto a atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* ATCC com perfil de sensibilidade amplo e uma cepa de *S. aureus* MRSA, causadora de infecção hospitalar e multirresistente (Figura 1 e 2, respectivamente). Como controle negativo foi utilizado o inóculo juntamente com Tween 20, solvente do óleo essencial e dilapiol, e como controle positivo, utilizou-se o cloranfenicol 0,05 mg/mL (Figura 3 a e b, respectivamente).

Nos ensaios de microdiluição para obtenção de CIM_{90%} e CBM, o OEP frente a *S. aureus* ATCC 25923, apresentou a CIM_{90%} de 500 µg/mL e a CBM de 1000 µg/mL. Sendo que a concentração de 500 µg/mL foi capaz de inibir 60% do crescimento bacteriano (Figura 11). Foi realizada contagem de UFC a partir da microdiluição obtendo o percentual de crescimento bacteriano. Quanto à cepa MRSA, o óleo essencial mostrou uma inibição (10%) na concentração de 750 µg/mL, sendo que a CIM_{90%} foi obtida em 1000 µg/mL (Figura 12).

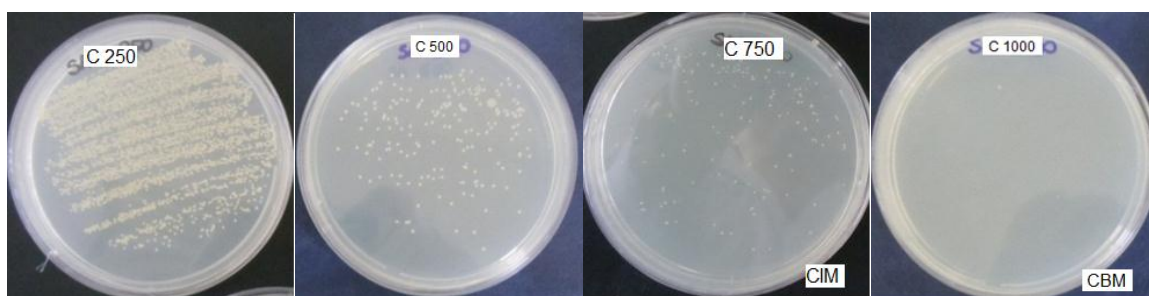


Figura 11 – OEPA frente à cepa *S. aureus* ATCC 25923 nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.

O dilapiol, constituinte do OEPA, foi testado frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA. Com isto, observa-se, nas figuras abaixo, que este constituinte apresentou atividade antimicrobiana somente contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923, sendo que na concentração de 1000 µg/mL foi capaz de inibir 100% do crescimento desta cepa, correspondendo ao valor de CBM (Figura 13b).

Por outro lado, o dilapiol não apresentou efeito bactericida sobre a cepa multirresistente de *S. aureus* MRSA (Figura 13c e d)

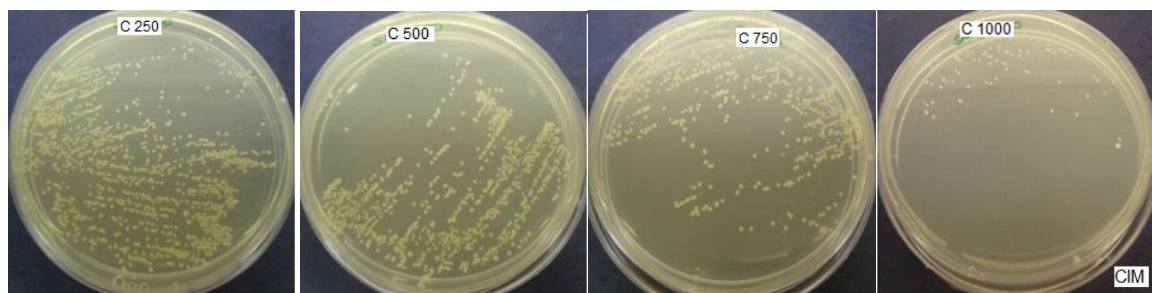
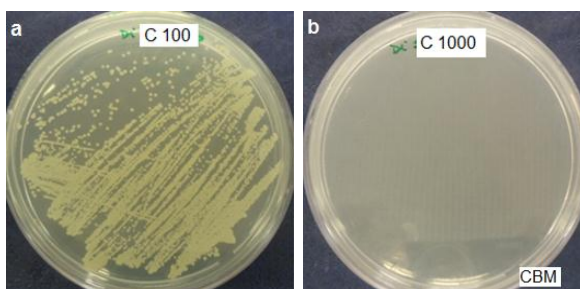


Figura12 - OEPA frente à cepa hospitalar **MRSA** nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.

***S. aureus* ATCC 25923**



***S. aureus* MRSA**

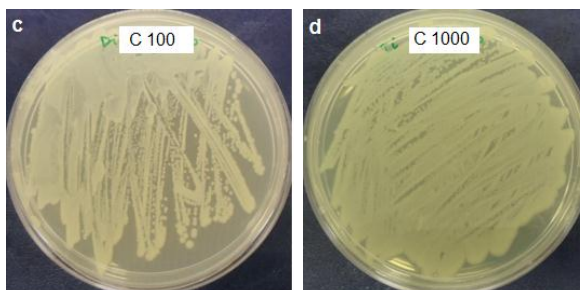
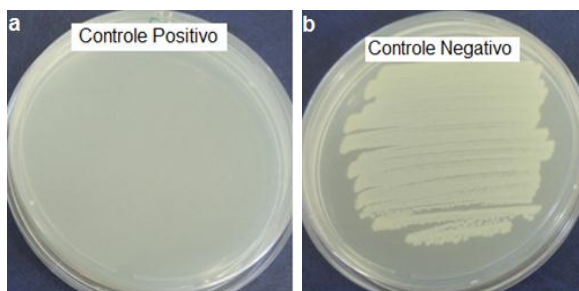


Figura 13 – Dilapiol frente às cepas *S. aureus* ATCC 25923 (a e b, respectivamente) e cepa hospitalar MRSA (c e d, respectivamente) nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.

A figura 14 mostra os resultados dos controles positivo e negativo frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA, na qual se observam que o cloranfenicol foi capaz de inibir 100% do crescimento de ambas as cepas (Figuras 14a e 14c), enquanto o solubilizante Tween 20 não alterou o crescimento do inóculo bacteriano (Figuras 14b e 14d).

***S. aureus* ATCC 25923**



***S. aureus* MRSA**

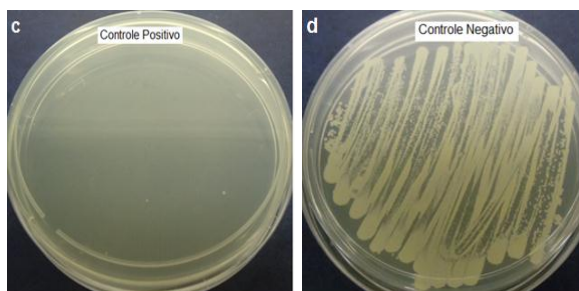


Figura 14 - Controles Positivo e Negativo das cepas *S. aureus* ATCC 25923 (**a e b, respectivamente**) e cepa hospitalar MRSA (**c e d, respectivamente**). Como controle Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, como controle Positivo, utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/mL

A tabela 1 resume os valores de CIM_{90%} e CBM obtidos para o OEPA e dilapiol frente a *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA, mostrando que o óleo essencial apresentou significativa ação antimicrobiana mesmo contra cepas multirresistentes, enquanto o dilapiol não apresentou o mesmo efeito frente à cepa hospitalar MRSA.

Tabela 1- Resultados de CIM e CBM do OEPA e do dilapiol testados nos micro-organismos em 24 h de incubação a 35°C

			CIM (90%inib) µg/mL	CBM (100%inib) µg/mL
Óleo essencial	<i>S. aureus</i>	ATCC	750	1000
		MRSA	1000	ND
Dilapiol	<i>S. aureus</i>	ATCC	ND	1000
		MRSA	ND	ND

ND: Não Detectado

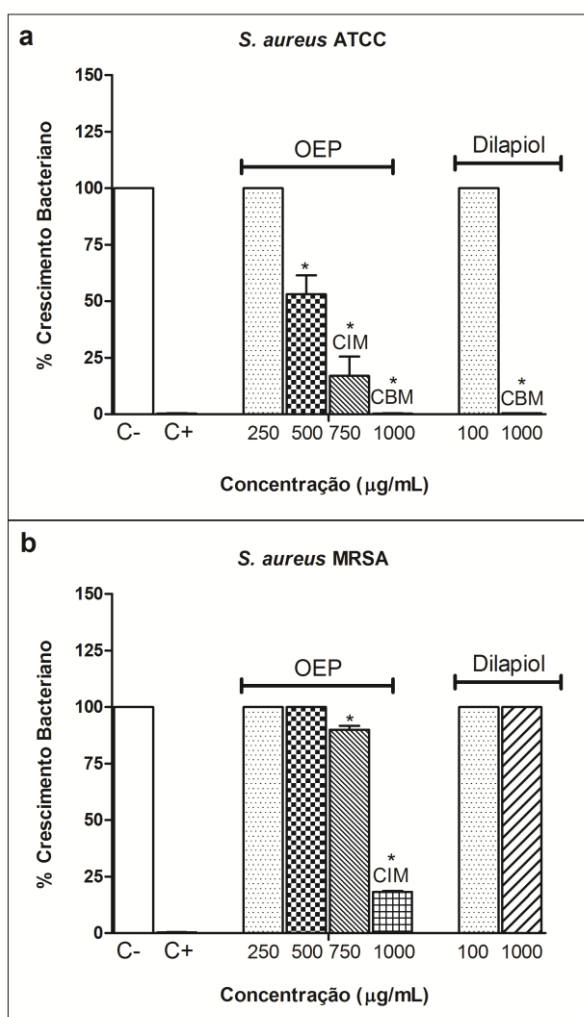


Figura 15 –Demonstração do % de crescimento bacteriano das cepas de *S. aureus* ATCC (a) e MRSA (b) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL de OEP e nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL de dilapiol, comparados com os controles, no Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, e como controle Positivo utilizou-se o cloranfenicol a 0,05mg/mL.

Nos ensaios com *S. epidermidis* ATCC 12228, o OEPA apresentou excelente atividade antimicrobiana, obtendo a CIM_{90%} na concentração de 500 µg/mL e CBM em 750 µg/mL (Figura 15). Enquanto, para a cepa *S. epidermidis* multirresistente, o óleo essencial mostrou atividade a partir da concentração de 750 µg/mL (35%), com valor de CIM_{90%} de 1000 µg/mL (Figura 17).

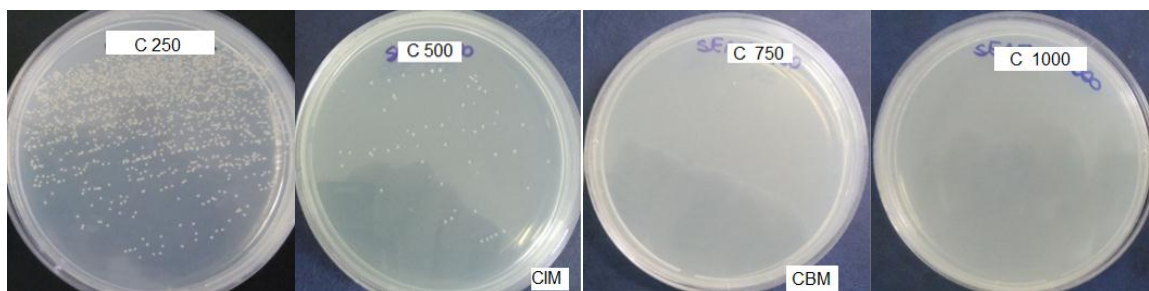


Figura 16 - OEPA testado em cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano está demonstrado nas placas com ágar Mueller Hinton.

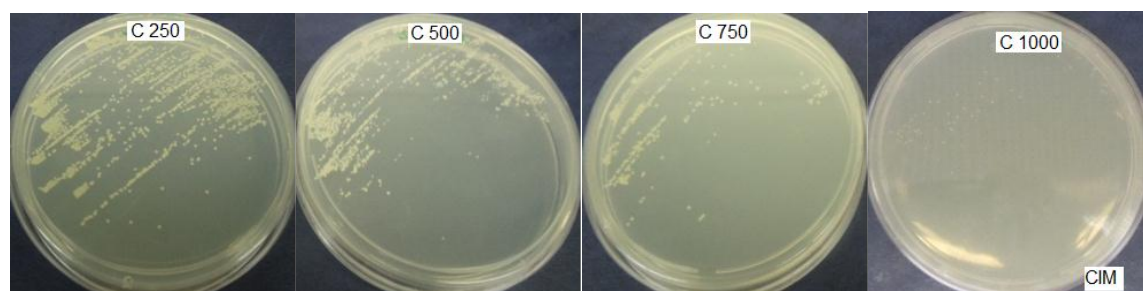
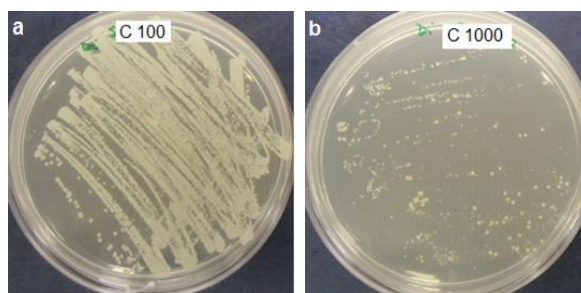


Figura 17 - OEPA testado em cepa hospitalar *S. epidermidis* multirresistente nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano está demonstrado nas placas com ágar Mueller Hinton.

O dilapiol foi testado frente às cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* multirresistente, mostrando que este composto não apresentou efeito bactericida frente estas cepas nas concentrações testadas, embora se observe que a concentração de 1000 µg/mL inibiu parcialmente o crescimento das cepas, com pelo menos 20% de inibição em ambas as cepas (Figura 18).

***S. epidermidis* ATCC 12228**



***S. epidermidis* multirresistente**

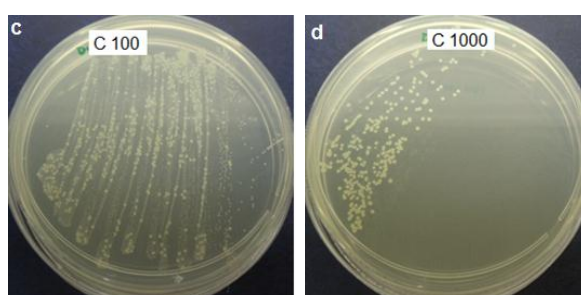


Figura 18 – Dilapiol frente às cepas *S. epidermidis* ATCC 12228 (a e b, respectivamente) e cepa hospitalar *S. epidermidis* multirresistente (c e d, respectivamente) nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ em 24h de incubação a 36°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.

A figura 19 mostra os resultados dos controles positivo e negativo frente às cepas de *S. epidermidis* ATCC 12228 e multirresistentes, na qual se observam que o cloranfenicol foi capaz de inibir 100% do crescimento de ambas as cepas (Figuras 19a e 19c), enquanto o solvente Tween 20 não influenciou no crescimento do inóculo bacteriano (Figura 19b e 19d).

A tabela 2 resume os valores de $\text{CIM}_{90\%}$ e CBM obtidos para o OEPA e dilapiol frente a *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* multirresistentes, mostrando que o óleo essencial também apresentou excelente ação antimicrobiana contra ambas as cepas, enquanto o dilapiol não apresentou ação bactericida mesmo contra a cepa ATCC.

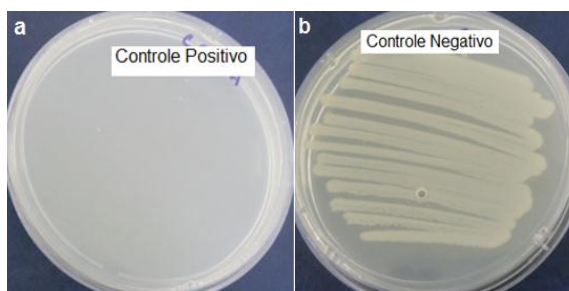
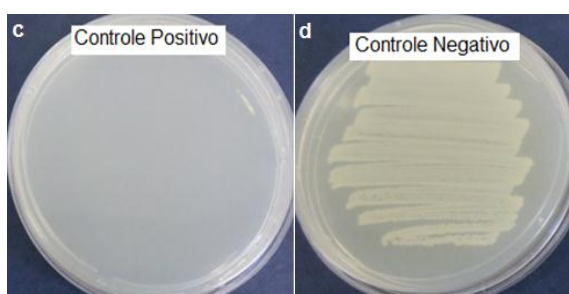
S. epidermidis* ATCC 12228**S. epidermidis* multirresistente**

Figura 19 - Controles Positivo e Negativo das cepas *S. epidermidis* ATCC 12228 **(a e b, respectivamente)** e da cepa hospitalar *S. epidermidis* Multirresistente **(c e d, respectivamente)**. Como control Negativo foi utilizado inóculo bacteriano e Tween 20 e como controle Positivo, utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/mL

Tabela 2- Resultados de CIM e CBM do OEPA e do dilapiol testados nos micro-organismos em 24 h de incubação a 36°C

			CIM (90%inib) µg/mL	CBM (100%inib) µg/mL
Óleo essencial	<i>S. epidermidis</i>	ATCC	500	750
		Hospitalar resistente	1000	ND
dilapiol	<i>S. epidermidis</i>	ATCC	ND	ND
		Hospitalar resistente	ND	ND

ND- Não Detectado

A Figura 20 demonstra os valores de CIM_{90%} e CBM obtidos para o OEPA e dilapiol frente a *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* multirresistentes, mostrando que o óleo essencial também apresentou ação antimicrobiana

significativa contra ambas as cepas, enquanto o dilapiol não apresentou atividade bactericida mesmo contra a cepa ATCC.

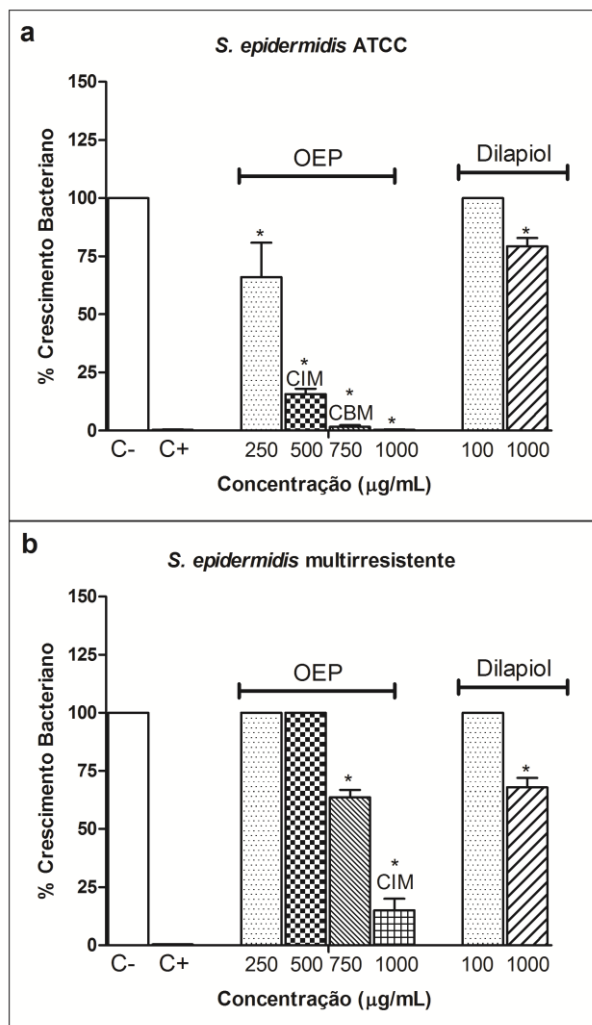


Figura 20 – Demonstração do % de crescimento bacteriano das cepas de *S. epidermidis* ATCC (a) e *S. epidermidis* multirresistente (b) nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL de **OEPA** e nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL de **dilapiol**, comparados com os controles, no Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, e como controle Positivo utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/mL.

O OEPA e o dilapiol também foram testados frente à outra bactéria multirresistente, o *S. lentus*, como mostrado nas figuras 21 e 22, respectivamente. Quanto ao óleo essencial, observa-se que quanto maior a concentração do óleo maior é a inibição do crescimento bacteriano, embora nenhuma das concentrações testadas tenha inibido pelo menos 90% do crescimento, para corresponder aos

valores de CIM_{90%} (Figura 20). Resultados similares ao óleo essencial foram obtidos com o uso do dilapiol, visto que a concentração de 1000 µg/mL também foi capaz de inibir parcialmente o crescimento do *S. lentus* multirresistentes (Figura 22).

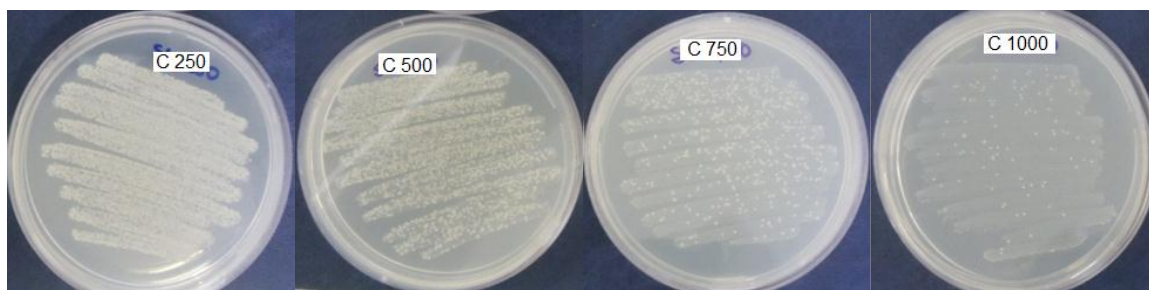


Figura 21 - OEPA testado em cepa hospitalar *S. lentus* multirresistente nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano está demonstrado nas placas com ágar Mueller Hinton.

S. lentus multirresistente

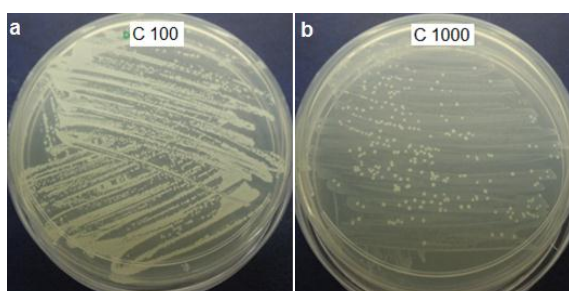


Figura 22 – Dilapiol frente às cepas *S. lentus* multirresistente (a e b) nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL em 24h de incubação a 35°C. O crescimento bacteriano foi demonstrado em placas com ágar Mueller Hinton após os ensaios de microdiluição.

A figura 23 mostra os resultados dos controles positivo e negativo frente às cepas de *S. lentus*, na qual se observam que o cloranfenicol foi capaz de inibir 100% do crescimento de ambas as cepas (Figura a), enquanto o solvente Tween 20 não alterou o crescimento do inóculo bacteriano (Figura b).

A tabela 3 mostra que neste estudo não foi possível obter os valores de CIM_{90%} e CBM para o OEPA e dilapiol frente a *S. lentus* multirresistentes.

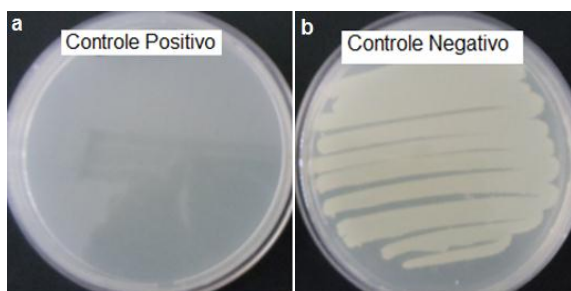
***S. lentus* multirresistente**

Figura 23 - Controles Positivo e Negativo das cepas *S. lentus* (a e b, respectivamente). Como controle Negativo foi utilizado inóculo bacteriano com Tween 20, e como controle Positivo, utilizou-se o cloranfenicol a 0,05 mg/mL

Tabela 3- Resultados de CIM e CBM do OEPA e do dilapiol testados em *S. lentus* em 24 h de incubação a 36°C

			CIM (90%inib)	CBM (100%inib)
Óleo essencial	<i>S. lentus</i>	Hospitalar resistente	ND	ND
dilapiol	<i>S. lentus</i>	Hospitalar resistente	ND	ND

ND- Não detectado

6 DISCUSSÃO

Óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular, principalmente as espécies do gênero *Piper* (Piperaceae), como o *P. aduncum* L., em função das propriedades antimicrobianas do seu óleo essencial (OEPA) e de seus constituintes, como o éter fenílico dilapiol (MAIA et al. 1998).

Desta forma, esse estudo teve por objetivo avaliar a atividade antibacteriana do OEPA e do dilapiol frente às cepas padrão (ATCC) e multirresistentes do gênero *Staphylococcus*, bactérias Gram-positivas frequentemente encontradas em rotinas de laboratórios de microbiologia clínica e associadas às infecções hospitalares. Essas bactérias podem acometer pacientes de todas as faixas etárias e são responsáveis por elevada taxa de mortalidade em ambiente hospitalar, sendo a terapia antimicrobiana contra os *Staphylococcus* um grave problema, devido a grande resistência dessa bactéria a vários antibióticos utilizados na clínica.

Sendo assim, a utilização de cepas ATCC com elevado grau de sensibilidade aos antibióticos e cepas hospitalares que apresentam multirresistência foi um critério de escolha para a determinação da atividade antibacteriana neste estudo, tendo em vista a necessidade de outras opções terapêuticas.

Os dados desse estudo mostraram a partir da técnica de microdiluição com contagem de UFC's seguindo os critérios sugeridos por HOLETZ et al. 2002, que o OEPA apresentou fraca atividade antimicrobiana frente a cepa *S. aureus* ATCC, MRSA e *S. epidermidis* multirresistente e moderada atividade contra a cepa *S. epidermidis* ATCC, enquanto se mostrou inativo contra a cepa de *S. lentus*. A análise dos resultados foi realizada após determinação de CIM e CBM. Nesse sentido, HOLETZ et al. 2002 considera que CIM menor que 100 µg/mL, o extrato apresenta boa atividade antimicrobiana, enquanto o CIM de 100 a 500 µg/mL apresenta atividade moderada, CIM de 500 a 1000 µg/mL fraca atividade e acima de 1000 µg/mL o extrato é considerado inativo.

A espécie *P. aduncum* L. ocorre naturalmente na Amazônia (MOTA et al. 2001), produz um óleo essencial com grande potencial de exploração, uma vez que possui ação comprovada sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, como os fungos (BASTOS, 1997; MORANDIM et al. 2002), bactérias e moluscos (ORJALA et

al. 1994), além de ação analgésica e anti-inflamatória com baixos níveis de toxicidade (MONTEIRO et al. 2001; FONTES JUNIOR et al. 2002).

A inibição do crescimento bacteriano por óleos essenciais depende da composição e concentração da espécie do óleo, do tipo de micro-organismo em questão, a composição do substrato e estocagem (MARINO, 2001).

A atividade antibacteriana de outros óleos essenciais da família das Piperaceae já foi demonstrada por outros estudos, como se observa nos resultados de KLOUCEK et al. 2005, em ensaio antibacteriano utilizando método da microdiluição em caldo segundo JORGENSEN et al. (1999), efetuadas diluições a partir de 16 mg/mL em microplacas, com 5 µl de inóculo a 10^7 UFC/mL e incubadas por 24h a 37°C, os resultados revelaram que a parte aérea de *P. aduncum* foi significativamente mais ativo contra bactérias Gram-positivas entre elas os *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, com CIM variando de 1 a 2 mg/mL. Sendo assim, estes dados corroboram com os resultados apresentados nesse estudo, inclusive na utilização de duas cepas bacterianas ATCC, evidenciando a atividade antibacteriana do óleo essencial do *P. aduncum* frente à *Staphylococcus*.

Em análise do extrato e do óleo essencial de *Piper renitens* realizada por FERREIRA (2006) com *S. aureus* sensível e resistente a vancomicina, utilizando teste da microdiluição com inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, evidenciaram atividade antimicrobiana na concentração de 0,9 mg/disco contra a cepa de *S. aureus* sensível a vancomicina, entretanto não houve inibição do crescimento frente a *S. aureus* resistente. Contrariamente, os dados mostraram que o OEPA mostrou atividade antimicrobiana frente às cepas de MRSA e *S. epidermidis* multirresistente na concentração 1000 µg/mL. Esse fato é de grande interesse, visto que nos últimos anos tem se investido em novos fármacos com efeito em bactérias multirresistentes, embora a CIM tenha um valor elevado, sugere-se que a família das piperaceaes têm atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas.

OKUNADE et al. 1997 também realizaram estudo com o *P. aduncum*, cujos resultados corroboraram com os apresentados neste trabalho, pois utilizando as frações do extrato de *P. aduncum*, as mesmas apresentaram boa atividade contra *S. aureus* ATCC 6538 e fraca atividade contra *P. aeruginosa* ATCC 15442 (CIM >100mg/ml), fato que fortalece a hipótese que o óleo essencial e seus constituintes tem boa atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas.

Em ensaios realizados com outras espécies da família das piperaceae, PUHL et al. (2011), utilizando frações do *Piper gaudichaudianum* que possuem na composição a cromona, mostraram resultados que revelam ação antifúngica e antibacteriana, contra *S. aureus*, *Bacillus Subtilis* e *Candida tropicalis*, quando empregados em sinergismo com antibióticos utilizados na rotina clínica.

Em estudos realizados por MARÇAL et al. (2010), com a fração acetato de etila do extrato de *Piper regnellii*, foi determinado a CIM e CBM. Os resultados demonstraram a atividade antibacteriana do extrato, obtendo boa atividade contra MRSA com CIM e CBM de 16 µg/mL e com a fração hexano obteve CIM de 4µg/ml contra MRSA, sustentando seu uso na alegação popular. Nesse sentido, há relatos de que o principal componente deste óleo é Eupomatenóide-5, sendo um composto ativo frente às *S. aureus* sensíveis e resistentes a meticilina (CHAURET et al. 1996; HOLETZ et al. 2002; FREIXA, et al.2001).

Outro trabalho que demonstrou resultados favoráveis quanto ao uso das piperaceaes, utilizando *Piper ovatum* Vahl, com constituintes δ-amorphene (16,5%), cis-muuro-la-4 (14%), 5-dieno (14,29%) e γ-muuro-lene (13,26%), em atividade antibacteriana foi o de SILVA et al. (2009), que realizando técnica da microdiluição para determinações de CIM e CBM em bactérias Gram-positivas, obteve CIM de 15,6 e 31,2 µg/ml para *B. subtilis* e 3,9 µg/ml para *Candida tropicalis*. Além disso, CARMO et al. 2012 avaliou *Piper duckei* que possui os seguintes constituintes: germacrene D (14.7%) e trans-caryophyllene (27.1%) e *Piper demeraranum* que contém o limonene (19.3%) e β-elemene (33.1%) quanto a atividade biológica, mostrando que esses óleos podem ser utilizados como medicamento auxiliar em casos de leishmaniose cutânea, com menos efeitos colaterais e menores custos do que os fármacos habituais.

Em estudo realizado por Santos et al. 2010 com *Piper malacophyllum* foram encontrados como sendo os principais constituintes do óleo: cânfora (33,5%), canfeno (23,0%), E-nerolidol (8,1%), α- pineno (6,8%), γ-muuro-leno (4,7%), β-cariofileno (4,1%), α-cariofileno (2,5%) e α-selineno (2,5%). A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados expressos mostram CIM e CBM de 3700 µg/mL em *S. aureus* e CIM de 1850 e CBM de 3700 µg/mL para *Bacillus cereus*. Neste trabalho verificou-se que esta espécie de *Piper* estudada não

possui o dilapiol como constituinte, mas ainda assim apresenta atividade antibacteriana frente as cepas analisadas.

DIAZ et al. (2012) constataram que o extrato das flores de *Piper imperiale* foi capaz de inibir o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*, os extratos de folhas e caules foram inativos mesmo nas concentrações mais elevadas de 500 µg/mL. O extrato de flores foi capaz de inibir completamente o crescimento dos bacilos com 75 µg/mL. O efeito potente antimicobacteriano do extrato de flores foi confirmado quando o ensaio foi realizado contra o *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. Os mesmos valores de CIM foram observados para os extratos contra a cepa da vacina BCG, demonstrando o potencial antimicobacteriano deste extrato. Foram identificados 6 compostos, ácido gálico (ácido fenólico), catequina (flavonoide), epicatequina (flavonoide), ácido ferúlico (ácido hidroxicinâmico), resveratrol (stilbene) e quercetina (flavonoide). Mais de 80% da quantidade total de compostos fenólicos encontrados nas folhas e nas flores de *P. imperiale* são flavonoides, que têm importantes propriedades biológicas, tais como antibacteriana, antioxidante e cardio-protector (HODGSON et al. 2010, HEIM et al. 2002, ORHAN et al. 2010).

Nos estudos de atividade antimicrobiana com as piperáceas, é possível verificar que a composição das espécies do gênero *Piper* testadas frente às diferentes bactérias é bem diferente da composição da espécie *P. aduncum*. Nessa espécie, o dilapiol é o principal constituinte, principalmente em amostras coletadas da região Amazônica como descrito por MAIA et al. (1998), que relata maior rendimento do óleo essencial tendo o dilapiol como seu principal constituinte (91,1 a 97,3% nas amostras). Além disso, em estudo realizado por GUERRINI et al. (2009), com OEPA, foi verificado 45,92% de dilapiol na sua composição. Os autores mostraram a obtenção de CIM pela técnica de disco difusão em concentrações de 0,01 – 0,5 mg/mL. Entre os micro-organismos testados, o óleo essencial apresentou atividade antibacteriana com CIM > 5,24 mg/ml frente a *S. aureus* ATCC 29213, favorecendo seu uso etnofarmacológico.

As folhas de *P. aduncum* oriundas da Amazônia são usadas contra distúrbios intestinais e inflamações ginecológicas, como diurético, pielite, cistite, erisipelas e cicatrização de feridas. Outros estudos relatam que as folhas de *P. aduncum* que ocorrem na Mata Atlântica, com derivados prenilados de ácido 4-hidroxibenzóico, dihidrochalcones e cromenos apresentam atividades moluscocida, antibacteriana, leishmanicida, anti-dano de DNA e atividade citotóxica (ORJALA et al. 1993;

ORJALA et al. 1994; OKUNADE et al. 1997; TORRES-SANTOS et al. 1999; BALDOQUI et al. 1999).

Por outro lado, o óleo essencial e o hidrolato de *P. aduncum* da Amazônia apresentaram forte atividade contra *Clinipellis perniciosa* (vassoura de bruxa), *Fusarium solani* e *Colletotricum musae*, fungos responsáveis pela infecção patogênica do cacau, da pimenta e da banana, respectivamente (BASTOS, 1997; BENCHIMOL et al. 2001; BASTOS E ALBUQUERQUE, 2004). Extratos e óleos essenciais de exemplares de *P. aduncum* obtidos da América Central e Amazônia mostraram propriedades inseticida e larvicida, contra os insetos *Ostrinia nubilalis* (Lepdoptera), *Solenopsis saevissima* (Hymenoptera), *Cerotona tingomarianus* (Coleoptera), *Anopheles marajoara* e *Aedes aegypti* (Diptera) (BERNARD et al. 1995; FAZOLIN et al. 2005; SOUTO, 2006].

Além disso, ALMEIDA et al. (2009) relatou que o dilapiol presente no *Piper aduncum* apresentou uma ação fungicida contra o fungo *Clinipellis perniciosa* (vassoura de bruxa), além de ação larvicida e inseticida contra as larvas e os insetos adultos de *Anopheles marajoara* e *Aedes aegypti* (mosquitos da malária e da dengue), com a mortalidade de 100% dos insetos em 30 minutos de exposição na concentração de 600 ppm. Entretanto, a concentração de 100 ppm resultou em 100% de mortalidade das larvas após 48 h de exposição ao dilapiol, sugerindo o potencial do mesmo para sua aplicação como agente de controle de vetores da malária. Por outro lado, o isômero, isodilapiol, presente em *P. aduncum* de regiões sudeste e nordeste não mostrou nenhuma atividade significativa nesses mesmos testes biológicos.

Outros estudos relatam que o sesquiterpeno E-nerolidol (peruviol) também é um dos principais compostos do *P. aduncum* (MESQUITA et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2006). 2'-6'-di-hidroxi-4'-metoxichalcona, isolado a partir da inflorescência de *P. aduncum*, foi encontrado para ser seletivamente eficazes contra *Leishmania amazonensis* (TORRES-SANTOS et al. 1999). Os constituintes de óleos voláteis podem variar de acordo com as condições ambientais, como o tipo de clima e solo.

Outras atividades biológicas testadas com as espécies do gênero *Piper* são as atividades anti-inflamatória, anti-secretora, anti-*Helicobacter pylori* com frações isoladas de extrato etanólico de *Piper carpunya*, tais como dados relatados por QUILEZ et al. (2010), que concluíram que os flavonóides isolados das frações FI e FII (vitexina, isovitexina, rhamnopyranosylvitexin e isoembigenin) contribuem para

atividade anti-*Helicobacter pylori*, incentivando continuar com novos estudos fitoquímicos com estas frações, a fim de obter validação científica completa para esta espécie. Dessa forma, pode-se observar, a partir dos dados em conjunto, que o óleo essencial e extratos obtidos do gênero *Piper* apresentam inúmeras atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, fato que vem proporcionando um grande incentivo para novas descobertas e identificação de compostos com as diferentes atividades.

Neste contexto, pode-se concluir que a maioria dos óleos essenciais do gênero *Piper* estudados apresentaram dados promissores, com isso se fundamenta o uso dessas plantas na medicina popular, o que incentiva cada vez mais as pesquisas e estudos para desenvolvimento e aplicação sobre diferentes patologias.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados, concluiu-se que o OEPA apresenta atividade antibacteriana significativa, podendo ser considerado promissor no tratamento das infecções por *Staphylococcus* sensíveis, enquanto o dilapiol apresentou resultados menos expressivos, sendo necessários estudos mais aprofundados para confirmação desta atividade em se tratando de cepas bacterianas multirresistentes.

O dilapiol como composto majoritário do óleo essencial apresentou menor atividade, sugerindo que esta atividade pode estar sob influência dos metabólitos secundários presentes no óleo atuando com o dilapiol presentes no mesmo.

8 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, **Allured Publishing Corporation**. London p. 804, 2007.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, Illinois, USA, v. 3, p. 456, 2001.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. J.; BARBOSA-FILHO, M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALCARÁZ, et al. Species identification, slime production and oxacilin susceptibility in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from nosocomial specimens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34. São Paulo, 2003.
- ALLEGRI, M.; SIMEON, M.; MAILLOS H.; OILOOT, A. Émulsions et applications en microbiologie. **Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier**, v. 33, p. 73-86, 1973.
- ALMEIDA, J. R. G. A.; SILVA-FILHO R. N.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16 (Supl.), p. 638-641, 2006.
- ALMEIDA, R. P.; SOUTO, R. N. P.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 6, p. 1427-1434, 2009.
- ALMEIDA, R. R. P.; SOUTO, R. N. P.; BASTOS, C. N.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1427, 2009.
- ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. V. F. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 74, n. 3, p. 2007-2013, São Paulo, 2007.
- AMARAL, J. F. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell.** 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, 2004.
- ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. - Ocorrência de bactérias multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, p. 31-37, 2006.
- ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. G.; SANTOS, A. S.; MAIA, J. G. S. Essential oil of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C. D. C. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 465-467, 1998.

ANVISA Ministério da Saúde, **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_5_2004.pdf

ANVISA. (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Módulo 4, **Gram-positivos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm Acesso em 09/06/2011.

ANVISA. (2005). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Pediatria: Prevenção e controle de infecção hospitalar** / Ministério da Saúde. Brasília, 2006, p. 42, disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/manual_pediatria.pdf Acesso em 02/09/2011.

ARAÚJO, M. E. M. **Química analítica aplicada aos produtos naturais**. 2005. Dissertação (Mestrado em química analítica aplicada)- Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2005. Disponível em: <http://www.dqb.fc.ul.pt/docentes/earaujo/MQAA05.pdf> Acesso em 02/02/2011.

ARAUJO-JUNIOR J. X. . **Elucidación estructural dos constituintes químicos de *Piper tuberculatum* Jacq. var. *tuberculatum* e avaliação sobre o sistema cardiovascular de uma mistura contendo duas alcaloides: piperina e piperdardina**. 1996 p. 155. Dissertação de Mestrado – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 1996.

ARAUJO-JR, J. X.; DA CUNHA, E. V. L.; CHAVES, M. C. O.; GRAY, A. I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 559, 1997.

ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 307-311, 2006.

ARWEILER, N. B.; DONOS, N.; NETUSCHIL, L.; REICH, E.; SCULEAN, A. Clinical and antibacterial effect of tea tree oil - a pilot study. **Clinical Oral Investigations**, v. 4, p. 70-73, 2000.

ASENSIO, A.; GUERRERO, A.; QUEREDA, C.; LIZÁN, M.; MARTINEZ-FERRER, M. Colonization an infection with methicillin-resistant *S. aureus*: Associated factors and eradication. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 17, p. 20-28, 1996.

AZEVEDO, S. K. S.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 185-194, 2006.

BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 899 – 902, 1999.

BARRET, F. F., MCGEHEE, R. F., FINLAND, M. Methicillin-resistant *S. aureus* at Boston City Hospital: bacteriologic and epidemiologic observations. **The New England Journal of Medicine**, v. 279, p. 441-448, 1968.

BARRETO, M. F.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus* em um Hospital de Porto Alegre (RS). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40. Porto Alegre, 2008.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3, n. 22, p. 441-443, 1997.

BASTOS, M. do S. R.; FEITOSA, T.; OLIVEIRA, M. E. B. de. Análise qualitativa e tecnológica da agroindústria de polpa de fruta na Região Nordeste. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 3, p. 252-257, dez. 1999.

BASTOS, N. B.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle de pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 555 – 557, 2004.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.

BELZILE, A. S.; MAJERUS, S. L.; PODESZFINSKI, C.; GUILLET, G.; DURST, T.; ARNASON, J. T. Dillapiol derivatives as synergists: structure – activity relationship analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 66, p. 33-40, 2000.

BENCHIMOL, R. L.; FERNANDO, C. A.; LUZ, S. P.; DINALDO, R. T.; MULLER, C. H. Podridão do estipe da pupunheira. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Editora Rural, Campinas-SP, 2001, p. 608-628.

BENKEBLIA N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm-Wiss Technology**, v. 37, p. 263-268, 2004.

BENNER, E. J.; KAYSER, F. H. Growing clinical significance of methicillin-resistant *S. aureus*. **Lancet**, v. 5, p. 740-745, 1968.

BERNARD, C. B.; KRISHNAMURTY H. G.; CHAURET D.; DURST T.; PHILOGÈNE B. J. R.; SÁNCHEZ-VINDAS P.; HASBUN C.; POVEDA L.; ROMÁN L. S. & ARNASON J. T. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 801-814, 1995.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BLUMENTHAL, M.; SING, Y. N. Pharmacology of kava and its constituents. **Herbal Gram**, v. 39, p. 50-56, 1997.

BOYCE, J. M. Patterns of methicillin-resistant *S. aureus* prevalence. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 12, p. 79-82, 1991.

BOYCE, J. M.; CAUSEY, W. A. Increasing occurrence of methicillin-resistant *S. aureus* in the United States. **American Journal of Infection Control**, v. 3, p. 377-383, 1982.

BOYCE, J. M.; LANDRY, M.; DEETZ, T. R.; DUPONT, H. L. Epidemiologic studies of an outbreak of nosocomial methicillin-resistant *S. aureus* infections. **American Journal of Infection Control**, v. 2, p. 110-116, 1981.

BRYAN, C. S.; KIRKHART, B.; BRENNER, E. R. Staphylococcal bacteremia: current patterns in non university hospitals. **Southern Medical Journal**, v. 77, p. 693-696, 1984.

CAIERAO, J.; SUPERTI, S.; ROESCH, E.; DIAS, C. A. G.; d' AZEVEDO, P. A. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in Coagulase-Negative *Staphylococci* (CNS). **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 1195-1199, 2004.

CARDOSO, H. T.; SANTOS, M. L. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 62, p. 67-70, 1948.

CARMO, D. F. M.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; SILVA, J. R. A. Chemical and Biological Analyses of the Essential Oils and Main Constituents of *Piper* Species. **Molecules**, v. 17, p. 1819-1829, 2012.

CASEWELL, M. W. Epidemiology and control of the "modern" methicillin-resistant *S. aureus*. **Journal of Hospital Infection**, v. 7, p. 1-11, 1986.

CASTRO, D. P., M. G. CARDOSO, J. C. MORAES, N. M. SANTOS & D. P. BALIZA. 2006. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, p. 27-32, 2006.

CAVALCANTI, M.; VALENCIA, M.; TORRES, A. Respiratory nosocomial infections in the medical intensive care unit. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 2, p. 292-301, 2005.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). - Nosocomial infections Surveillance/1980, 82. **C. D. C. Surveillance Summaries**, v. 32, p. 155-65, 1983.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *S. aureus* with reduce susceptibility to vancomycin –United States. **MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report**. Atlanta, v. 46, p. 765-766, 1997.

CENTER, K. J.; REBOLLI, A. C. *et al.* Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4660-4665, 2003.

CEPEDA, J.; WHITEHOUSE, T.; COOPER B. Isolation of patients in single rooms or cohorts to reduce spread of MRSA in intensive-care units: prospective two-centre study. **Lancet**, v. 365, p. 295-304, 2005.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *S. aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 178-182, 2001.

CHAURET, D. C.; BERNAD, C. B.; ARNASON, J. T.; DURST, T. Inseticidal neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Product**, v. 59, p. 152-155, 1996.

CHENG, A. F.; FRENCH, G. L.; Methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia in Hong Kong. **Journal of Hospital Infection**, v. 12, p. 91-101, 1988.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 22-24, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, **Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that Grow Aerobically**; Approved Standard Eighth edition, M07-A08, 2009, v. 29, n. 2.

COELLO, R.; JIMÉNEZ, J.; GARCÍA, M.; ARROYO, P.; MINGUEZ, D.; FERNÁNDEZ, C.; CRUZET, F.; GASPAS, C. Prospective study of infection, colonization and carriage of methicillin-resistant *S. aureus* in an outbreak affecting 990 patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, p. 74-81, 1994.

CONTERNO, L. O. **Fatores de risco para letalidade da bacteremia por *S. aureus***, 1994, f. 96, Dissertação (Mestrado) Escola Paulista de Medicina - UNIFESP, São Paulo, 1994.

CORDEIRO, D. N. DA G. **Significância clínica da presença de Staphylococcus coagulase negativa isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília**. 2007. p. 141. (Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, DF, 2007.

COSTA, J. M.; RAMOS, I. B.; CARVALHO, D. J.; DIAS, J. R. R. Análise da sensibilidade de *S. aureus* hospitalar aos antimicrobianos no período de 1988 a 1993. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR, IV, 1994, Recife. **Anais**, PE, p. 83.

COSTA, M. A. C.; JESUS, J. G.; FARIAS, J. G.; NOGUEIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, A. L. R.; FERRI, P. H. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 53-65, 2008.

COUTO, H. G.; LELES, C. C. V.; LIMA, H. V.; ASSUNÇÃO, U. F.; RIBAS, R. M.; DIOGO FILHO, A.; GONTIJO FILHO, P. P. Vancomycin use in a Brazilian University Hospital. Comparacion with Hospital Infection Control Practices Advisory Committees Guidelines. In: Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar; 6º, 1998, **Anais**, Campos do Jordão, SP, 1998.

CRITCHLEY, I. A.; THORNSBERRY, C.; PIAZZA, G.; JONES, M.; HICKEY, M. L.; BARTH, A. L. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected from five centers in Brazil, 1997-98. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p. 178-84, 2000.

CROSSLEY, R.; LOESCH, D.; LANDESMAN, B.; MEAD, K.; CHERN, M.; STRAT, R. An outbreak of infection caused by strains of *S. aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides: I clinical studies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 139, p. 273-279, 1978.

CUEVAS, O.; CERCENADO, E.; VINDEL, A.; GUINEA, J.; SANCHEZ-CONDE, M.; SANCHEZ-SOMOLINOS, M.; BOUZA, E. Evolution of the Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: Five Nationwide Prevalence Studies, 1986 to 2002. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4240-4245. Nov. 2004

CUNHA, M. L. R. S.; LOPES, C. A. M.; RUGOLO, L. M. S. S.; CHALITA, L. V. A. S. Significância clínica de *Estafilococos* coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. **Journal of Pediatric**, v. 78, p. 279-288, 2002.

CUNHA, MARIA DE LOURDES R. S.; SINZATO, YURI K.; SILVEIRA, LICIANA V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *Staphylococci*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8. Rio de Janeiro, 2004.

DAS, B.; KASHINATHAN, A.; MADHUSUDHAN, P. Regioselective reduction of the α -double bond of some naturally occurring dienamides using NaBH_4/I_2 system. **Tetrahedron Lett**, v. 39, p. 677, 1998.

De GIUSTI, M. *et al.* Phenotypic detection of nosocomial *mecA*-positive coagulase-negative *staphylococci* from neonates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 351-358, 1999.

DESCHAMPS, C.; ZANATA, J. L.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, M. C.; ROSWALKA, L. C. Avaliação sazonal do rendimento do óleo essencial em espécies de menta. **Ciência agrotécnica**, v. 32, n. 3, p. 725-730, 2008.

DIAZ, L. E.; MUNOZ, D. R.; PRIETO, R. E.; CUERVO, S. A.; GONZALEZ, D. L. GUZMAN, J. D.; BHAKTA, S. Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of *Piper imperiale*. **Molecules**, v. 17, p. 4142-4157, 2012.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, n. 88, p. 306-316, 2000.

DUARTE, A. **Estudo da sensibilidade aos antibióticos**. Curso ministrado. FFUL. Universidade de Lisboa. Disponível e consultado em fev. 2011. [www. ff. ul. pt/paginas/aduarte/acetato/antibioticos.doc](http://www.ff.ul.pt/paginas/aduarte/acetato/antibioticos.doc)

DUH C-Y, WU Y-C, WUANG, S-K. Cytotoxic piperidine alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 2689-2691, 1990.

ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, A.; RANDLE, G.; FEIL, E.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. The evolutionary history of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99(4), p. 7687-7698. 2002.

FAZOLIN, M. *et al.* Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. D C.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L. 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, jan. /fev. 2007.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. S.; ALECIO, M. R. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 485-489, maio/jun. 2005.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; LIMA, M. S.; ALÉCIO, M. R. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 485-489, 2005.

FERREIRA, H. S. M.; AZEVEDO, M. S.; ROVER, M. **Relatório de pesquisa: Estudo Fitoquímico e avaliação Antimicrobiana da *Piper renitens* (Miq.) Yunck.** Rondônia, 2006, Universidade Federal da Rondônia - UNIR

FERREIRA, H. S. M.; AZEVEDO, M. S. **Estudo Fitoquímico e Avaliação Antimicrobiana da *Piper renitens* (Miq.) Yunck.** Disponível em http://www.unir.br/html/pesquisa/documentos/relatorios_finais/ciec_exat_terra/Helida%20Soleane%20Mendonca%20Ferreira%20rf.pdf

FINE, D. H.; FURGANG, D.; BARNETT, M. L.; DREW, C.; STEINBERG, L.; CHARLES, C. H.; VINCENT, J. W. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, p. 157-161, 2000.

FONTES JÚNIOR, E. A.; SOUSA, P. J. C.; SOUSA, R. C.; MAIA, J. G. S.; SANTOS, A. M. S. Atividade antiinflamatória e analgésica do OEPA In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 17. 2002. Salvador, **FESBE - Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2002. Salvador- Ba: Mix Tecnologia Digital, 2002, p. 66.

FREIXA, B.; VILA, R.; FERRO, E. A.; ADZET, T.; CAÑIGUERA, L. S. Antifungal principles from *Piper fulvens*. **Planta Medica**, v. 67, p. 873-875, 2001.

GEMMELL, C. Glycopeptide resistance in *S. aureus*: is it a real threat? **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, p. 69-75, 2004.

GILLESPIE, S. H.; MCHUGH, T. D. The biological coast of antimicrobial resistance. **Trends in Microbiology**, ano 5, v. 9, p. 337-338, 1997.

GONTIJO FILHO, P. P. Definições de infecções hospitalares sem a utilização de critérios microbiológicos e sua consequência na vigilância epidemiológica no Brasil. **News Lab**, v. 53, p. 120-124, 2002.

GOTTLIEB, O. R. Ethnopharmacology versus chemosystematics in the search for biologically active principles in plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 227-238, 1982.

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Essential oils from the Amazon VII. **Acta Amazonica**, v. 11, p. 143-148, 1981.

GRANSDEN, W. R.; EYKYN, S. J.; PHILLIPS, I. *S. aureus* bacteremia: 400 episodes in St. Thomas's Hospital. **British medical journal**; v. 288, p. 300-303, 1984.

GRIEBLE, H. G.; KRAUSE, S. L.; PAPPAS, S. A.; DICONSTANZO, M. B. The prevalence of high-level methicillin resistance in multiply resistant hospital *Staphylococci*. **Medicine**, v. 60, p. 62-69, 1981.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, M. M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADO, M. E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Elsevier-Environmental Toxicology and Pharmacology**, n. 27, p. 39-48, 2009.

GUIMARÃES, K. V.; MARINHO, P. S. B.; SILVA, M. das G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; MULLER, M. W. In: XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares Instituto de Química, **Limonóides isolados na família meliaceae**. Universidade Federal Fluminense, 2004.

HALEY, R. W.; HIGHROWER, A. W.; KHABBAZ, R. F.; THORNSBERRY, C.; MARTONE, W. J.; ALLEN, J. R.; HUGHER, J. M. The emergence of methicillin-resistant *S. aureus* infections in United States hospitals: Possible role of the house staff-patient transfer circuit. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, p. 297-308, 1982.

HEIM, K.; TAGLIAFERRO, A.; BOBILYA, D. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HIGUCHI, W.; ISOBE, H.; IWAO, Y.; DOHMAE, S.; SAITO, K.; TAKANO, T.; OTSUKA, T.; BARANOVISH, T.; ENDO, C.; SUZUKI, N.; TOMIYAMA, Y.; YAMAMOTO, T. Extensive multidrug resistance of coagulase-negative *staphylococci* in medical students. **Journal of Infection and Chemotherapy** v. 13, p. 63-66, 2007.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *S. aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350(9092), p. 1670-1673, 1997.

HODGSON, J.; CROFT, K. Tea flavonoids and cardiovascular health. **Molecular Aspects of Medicin**, v. 31, p. 495-502, 2010.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

KLOOS WE, BANNERMAN TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. **Manual of Clinical Microbiology**. 7a ed. Washington: American Society Microbiology; 1999. p. 264-82.

KLOOS WE, BANNERMAN TL. Update on clinical significance of coagulase-negative *staphylococci*. **Clinical Microbiology Reviews** 1994;7:117-40.

KLOOS WE, SCHLEIFER KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus species*. **Journal of Clinical Microbiology**, 1975;1:82-8.

KLOUCEK, P.; POLESNY, Z.; SVOBODOVA, B.; VLKOVA, E.; KOKOSKA L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Caller'ia District, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 309–312, 2005.

KONEMAN, **Color atlas 1997 and textbook of diagnostic microbiology**. Lippincott, Raven Publishers, 5^a ed., cap. 11, Cocos gram-positivos parte I: Estafilococcus e micro-organismos relacionados, p. 559, Philadelphia, 1997.

LEE, Y. L.; CESARIO, T.; GUPTA, G.; FLIONIS, L.; TRAN, C.; DECKER, M.; THRUPE, L. Surveillance of Colonization and Infection with *S. aureus* Susceptible or Resistant to Methicillin in a Community Skilled-Nursing Facility. **American Journal of Infection Control**, v. 25, n. 14, p. 312-321, 1997

LEVY, C. E.; MONTELLI, A. C.; FURTADO, J. S. Resistência a drogas em cepas bacterianas de pacientes de serviços hospitalares: laboratório de referência do sistema COBA. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 21-27, 1991.

LEWIS, E.; SARAVOLATZ, L. A. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *S. aureus* bacteremia. **American Journal of Infection Control**, v. 13, p. 109-14, 1985.

LIBMAN, H.; ARBEIT, R. A. Complications associated with *S. aureus* bacteremia. **Archives of Internal Medicine**, v. 114, p. 541-545, 1984.

LIMA, C. B. N.; BELLETTINI, M. T.; SILVA, A. S.; CHEIRUBIM, A. P.; JANANI, J. K.; VIEIRA, M. A. V.; AMADOR, T. S. Uso de Plantas Medicinais pela População da Zona Urbana de Bandeirantes-PR. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 600-602, 2007.

LINNEMAN, C. C.; MASON, M.; MOORE, P.; KORFHAGEN, T. R.; STANEK, J. L.; Methicillin-resistant *S. aureus* experience in a general hospital over four years. **American Journal of Epidemiology**, v. 115, p. 941-950, 1982.

LOCKSLEY, R. M.; COHEN, M. L.; QUIN, T. C.; TOMPKENS, L. S.; COYLE, M. B.; KERIHARA, J. M.; COUNTS, G. W. Multiple-resistant *S. aureus*: introduction transmission and evolution of nosocomial infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, p. 317-324, 1982.

MACGOWAN JR, J. E. Changing etiology of nosocomial bacteremia and fungemia and other hospital-acquired infections. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 7 (suppl. 3), p. S357-S370, 1985.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém: **Museu Paraense Emílio Goeldi**, 2000, 186 p. 123-127. (Coleção Adolpho Ducke).

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; LUZ, A. I. R.; BASTOS, C. N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region, **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, 269-272, 1998.

MARÇAL, F. J. B.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* against Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA). **Molecules**, v. 15, p. 2060-2069, 2010

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance Measurements to Study the Antimicrobial Activity of Essential Oil from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 67, p. 187- 195, 2001.

MARK C. ENRIGHT, M., ROBINSON, A.; RANDLE, G.; FEIL, E.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. The evolutionary history of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). **PNAS- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 7687-7698. 2002. (4)

MARQUES, C. A.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; KRANZ, W. M.; PEIXOTO, A. L.; VIEIRA, R. C. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 415-429, 2008.

MARSHALL, A. S.; WILKE, W. W.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. – *S. aureus* and coagulase-negative *staphylococci* from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (mec A) characterization of oxacilina resistance in the SCOPE Program. **Diagn. Microbiology Infections Diseases**. 30:205-214, 1998.

MARTIM, M. A.; PFALLER, M. A.; WENZEL, R. P. (1989). Coagulase-negative staphylococcal bacteremia. **Annals of Internal Medicine** . 110:9-16.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia**: Curso teórico e prático. Fortaleza, edições, Universidade Federal do Ceará, UFC, 1989.

MESQUITA, J. M. O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A. P.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 6–12, 2005.

MESQUITA, M. L.; *et al.* Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** .; v. 100 (7), p. 783-787, 2005.

MIRANDA, R. N. C. Jr. **Avaliação da atividade antiplasmódica *in vitro* dos óleos de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L).** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas., 2010

MIRIMANOFF, R. O.; GLAUSER, M. P.; Endocarditis during *S. aureus* septicemia in a population of non-drug addicts. **Archives of Internal Medicine**, v. 142, p. 1. 311-1. 313, 1982.

MONNET, D. L.; BIDDLE, J. W.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; TOLSON, J. S.; MARTONE, W. J.; TENOVER, F. C.; GAYNES, R. P. Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum β -lactam resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1986 to 1993. **Infection Control and Hospital Epidemiology** ., v. 18, p. 492-498, 1997.

MONSEN, T.; KARLSSON, C.; WISTROM, J.; Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative *staphylococci* within a university hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology** v. 26, p. 76-80, 2005.

MONTEIRO, G. M.; LIRA, D. S.; MAIA, J. G. S.; BARROS, C. A. L.; SOUSA, P. J. C. Acute and subacute toxicity of the essential oil of *Piper aduncum* In: Congresso Internacional de Ciências Farmacêuticas, 3. Águas de Lindóia. 2001. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13. p. S153, 2001.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Química nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORANDIM, A. A.; NAVICKIENE, H. M. D.; REGASINI, L. O.; TELASCREA, M.; AGRIPINO, D.; FIRRI, A. F.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Comparação da composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Piper aduncum* L., *P. arboreum* AUBLET. e *P. tuberculatum* JACQ. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17, **Anais/Resumos** [CD-ROM]. Cuiabá: CBO, 2002.

MORRISON JR, A. J.; FREER, C. V.; SEARCY, M. A.; LANDRY, S. M.; WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections: secular trends in a statewide surveillance program in Virginia. **Journal of Infection Control**, v. 7, p. 550-553, 1986.

MOTA, M. G. C.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; MAIA, J. G. S., GAIA, J. M. D. **Variabilidade fenotípica em populações naturais de *Piper aduncum*. na Amazônia Brasileira.** In: Simpósio de recursos genéticos da América Latina e Caribe, 3. Resumos. Londrina: III SIRGEALC, 2001b.

MOTA, M. G. C.; COSTA, C. C. C.; MAIA, J. G. S.; GAIA, J. M. D. **Coleta de germoplasma e distribuição geográfica de *Piper aduncum* I. na Amazônia Brasileira.** In: Simpósio de recursos genéticos da América Latina e Caribe, 3. Resumos. Londrina- PR: III SIRGEALC, 2001a.

MYLOTTE, J. M.; McDERMOTT, C.; SPOONER, J. A. Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, p. 891-907, 1987.

NAIR, M. G. e BURKE, B. A. Antimicrobial *Piper* metabolite and related compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, p. 1093-1906, 1990.

NASCIMENTO, J. S.; CEOTTO, H.; NASCIMENTO, S. B.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; SANTOS, K. R.; BASTOS, M. C. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant *staphylococcal* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 215-221, 2006.

NASKAR, D.; CHOWDHURY, S.; ROY, S. Is metal necessary in the Hunsdiecker-Borodin Reaction. **Tetrahedron Lett**, v. 39, p. 699, 1998.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621, 2000.

NEUMEITER, B.; KASTNER, S.; CONRAD, S.; KLOTZ, G.; BARTMANN, P. Characterization of coagulase negative *staphylococci* causing nosocomial infections in preterm infants. **Eur Journal of Clinical Microbiology Infect Dis.** 14:856-63. . (1995).

NUNES, J. D.; TORRES, G. A.; DAVIDE, L. C.; SALGADO, C. C. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1049-1052, 2007.

NUNES, M. R. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; FARIAS, L. M. LIMA, M. C. ***S. aureus* multi resistente em infecções hospitalares no Hospital Getúlio Vargas**, Teresina - Piauí. In: Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar R, Recife, 1994 p. 82.

NUNES, X. P.; MAIA, G. L. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16(Supl.), p. 642-644, 2006.

OKUNADE, A. L.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M.; LENTZ, D. Antimicrobial Properties of the Constituents of *Piper aduncum*. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 142–144, 1997.

OLIVEIRA, G. A.; DELL'AQUILA, A. M.; MASIERO, R. L.; LEVY, C. E.; GOMES, M. S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E. M. Isolation in Brazil of nosocomial *S. aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. **Journal of Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001.

OLIVEIRA, G. F. **Avaliação da atividade Antimicrobiana *in vitro*, do extrato hidroalcolólico bruto das folhas de *Syzygium cumini* (L).** SKEELS, (Jambolão). 2005. 67 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade de Franca, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Promoção de Saúde. Franca, 2005.

OLIVEIRA, J. C. S.; DIAS, O. J. M.; CAMARA, C. A. G.; SCHWARTZ, M. O. E. Volatile constituents of the leaf oils of *Piper aduncum* L. from different regions of pernambuco (Northeast of Brazil). **Journal of Essential Oil Research**, n. 18, p. 557–559, 2006.

OPAL, S. M.; MAYER, K. H.; STEMBERG, M. J.; BLAZEK, J. E.; MIKOLCH, D. J.; DICKNSHEETS, L.; LYHTE, L. W.; TRUDEI, R. R.; MUSSER, J. M. Frequent acquisition of multiple strains of methicillin-resistant *S. aureus* by healthcare workers in an epidemic hospital environment. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 11, p. 479-485, 1990.

ORHAN, D.; OZCELIK, B.; OZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, p. 496-504, 2010.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C.A.J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T.; STICHER, O. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. **Planta Medica**, v. 59, p. 546, 1993.

ORJALA, J.; WRIGHT, A. D.; BEHREND, H.; FOLKERS, G.; STICHER, O.; RUEGGER, H.; RALI, T. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Product**, v. 57, p. 18-26, 1994.

OSBORN, E. M., On the occurrence of antibacterial substances in green plants. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 24, n. 6, p. 227-231, 1993.

O'TOOLE, R. D.; DREW, W. L.; DAHLGREN, B. J.; BEAT, H. N. An outbreak of methicillin-resistant *S. aureus*: infection- observations in hospital and nursing home. **JAMA- Journal of the American Medical Association**, v. 213, n. 2, p. 257-263, 1970.

PAN, P.; BARNETT, M. L.; COELHO, J.; BROGDON, C.; FINNEGAN, M. B. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, p. 256-261, 2000.

PANNUTI C. S.; GRINBAUM, R. S. An Overview of Nosocomial Infection Control in Brazil. **Journal of Infection Control Hosp Epidemiol.**, v. 16(3), p. 170-4, 1995.

PARKER, M. T.; HEWITT, J. G. Methicillin-resistant in *S. aureus*. **Lancet**, v. 1, p. 800-804, 1970.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. M.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997

PATRICK, C. C. Coagulase-negative staphylococci: pathogens with increasing clinical significance. **Jornal de Pediatria**, v. 116, p. 497-507, 1990.

PEACOCK, J. E.; MARSIK, F. J.; WENZEL, R. P. Methicillin-resistant *S. aureus*: introduction and spread within a hospital. **Annals of Internal Medicine**, v. 93, p. 532-562, 1980.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, M. T. R.; LEMOS, G. C. S. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl. 01, p. 37-40, 2004.

PLOY, M. C.; GRELAUD, C.; MARTIN, C.; DE LUMLEY, L.; DENIS, F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *S. aureus* in a French hospital. **Lancet**, v. 351, p. 1212, 1998.

PRASHAR, A.; HILI, P.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of Palmarosa Oil (*Cymbopogon martini*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569-575, 2003.

PUHL, M. C. M. N.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Antimicrobial Activity of *Piper audichaudianum* Kuntze and Its Synergism with Different Antibiotics. **Molecules**, v. 16, p. 9925-9938, 2011.

PUJOL, M.; PEÑA, C.; PALLARES, R.; AYATS, J.; ARISA, J.; GUDIOL, F. Risk factors for nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *S. aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, n. 13, p. 96-102, 1994.

QUILEZ, A.; GILARDONI, G.; SOUCCAR, C.; DE MENDONCA, S.; OLIVEIRA, L.; MARTIN-CALERO, M.; 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. 583–589, 2010.

REHDER, V. L. G.; MACHADO, A. L. M.; DELARMEILINA, C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 67-71, 2004.

REZENDE, E. M.; STARLING, C. E. F.; COUTO, B. R. G. M.; RIEGG, E.; PRADO, I. **Prevalência de *S. aureus* multi-resistente em hospitais gerais de Belo Horizonte**. In: Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar, Recife, 1994, p. 83.

ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C. Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant *S. aureus*. **American Society for Microbiology**, v. 47, n. 12, 2003.

ROCHA, G. M.; ROCHA, M. E. N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 1, n. 2, p. 76-85, 2006.

ROHRER, S.; MAKI, H.; BERGER-BÄCHI, B. What makes resistance to methicillin heterogeneous? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 605 – 607. 2003.

ROMERO-VIVAS, J.; RUBIO, M.; FERNANDEZ, C.; PICAZO, J. J. Mortality associated with nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *S. aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 1. 417-1. 423, 1995.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005, cap. 1; p. 5-7; cap. 4, p. 33-38.

RUPP, M. E. e ARCHER, G. L. – Coagulase –Negative Staphylococci: pathogens associated with medical progress. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, p. 231-245, 1994.

SADER, S. S.; PIGNATARI, A. C.; RICHARD, J. H.; RONALD, N. J. Evaluation of interhospital spread of methicillin - resistant *S. aureus* in São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Journal of Infection Control Hosp Epidemiol**, ; v. 15, p. 320-323, 1994.

SALOMÃO, R.; CASTELO, A.; PIGNATARI, A. C. C.; WEY, S. B Nosocomial and community acquired bacteremia: variables associated with outcomes. **Revista Paulista de Medicina**, v. 111, p. 456-461, 1993.

SANTOS, T. G.; CRUZ, A. B.; GASPER, A. L.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; REBELO, R. A.; Composição Química e Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de *Piper malacophyllum* (C. Presl) C. DC. **33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010.

SEYMOUR, R. Additional properties and uses of essential oils. **Journal of Clinical Periodontology** v. 30, p. 19-21, 2003.

SHAH, M.; WATANAKUNAKORN, C. Changing patterns of *S. aureus* bacteremia. **American Journal of Medical Sciences**, v. 278, p. 115-121, 1979.

SILBERT, S.; ROSA, D. D.; MATTE, U.; GOLDIM, J. R.; BARCELLOS, S. H.; PROCANOY, R. S. *Staphylococcus* sp. coagulase-negativa em hemoculturas de pacientes com menos de sessenta dias de idade: infecção versus contaminação **Jornal de Pediatria**. v. 73, p. 161-165, 1997.

SILVA, D. R.; ENDO, E. H.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SOUZA, A.; YOUNG, M. C. M.; NAKAMURA, T. U.; CORTEZ, D. A. G. Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Piper ovatum* Vahl. **Molecules**. v. 14, p. 1171-1182, 2009.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6o Ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ UFSC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed, Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ UFSC, 2004.

SMITH, R. M e KASSIM, H. Essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. **New Zealand Journal of Science** v. 2, p. 127-128, 1979.

SORREL, T. C.; PACKHAM, D. R.; SHANKER, S.; FOLDS, M.; MEINRO, R. Vancomycin therapy for methicillin-resistant *S. aureus*. **Annals of Internal Medicine**, v. 97, p. 344-50, 1982.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, P. J. C.; BARROS, C. A. L.; ROCHA, J. C. S.; LIRA, D. S.; MONTEIRO, G. M.; MAIA, J. G. S. Avaliação toxicológica do OEPA L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008.

SOUTO, R. N. P. **Avaliação das atividades repelente e inseticida de óleos essenciais de Piper da Amazônia em *Anopheles marajoara*, *Stegomyia aegypti* e *Solenopsis saevissima***. 2006, 221p. Tese de doutorado: Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém, Pará, 2006.

STAMM, A. M.; LONG, M. N.; BELCHER, B. Higher overall nosocomial infection rate because of increased attack rate of methicillin-resistant *S. aureus*. **American Journal of Infection Control**, n. 21, p. 70-74, 1993.

STRATTON, M. D. C. W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant Gram-positive organisms. **Antimicrobial Infectious Diseases New**, v. 18, p. 57-64, 2000.

TAVARES, W. **Resistência bacteriana**. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos 3ª ed. Atheneu, São Paulo. p. 79, 2001.

TENOVER, F. C.; BIDDLE, J. W.; LANCASTER, M. V. Increasing Resistance to Vancomycin and Other Glycopeptides in *S. aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 327-332, 2001.

THOMPSON, R. L.; CABEZUDO, I.; WENZEL, R. P.; Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *S. aureus*. **Annals of Internal Medicine**, n. 97, p. 309-317, 1982.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VAN WAMEL, W. J. B.; FLUIT, A. D. C.; WADSTROM, T.; VAN, D. I. J. K.; H., VERHOEF, H. J. e VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. Phenotypic characterization of epidemic versus sporadic strains of methicillin-resistant *S. aureus*. **Journal of clinical Microbiology**, ano 33, v. 7, p. 1769-1774, 1995.

VEIGAS, J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIDAL, J.; CARBAJAL, A.; SISNIEGAS, M.; BOBADILLA, M. Efecto tóxico de Argemone subfusiformis Ownb. y Tagetes patula Link sobre larvas del IV estadio y pupas de Aedes aegypti L. **Peruvian Journal of Biology**. Lima, v. 15, n. 2, 2008.

WATANAKUNAKORN, C.; CHAN, S. J.; DEMARGO, D. G.; PALMER, J. A. S. *aureus* bacteremia: significance of hyperbilirubinemia. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, n. 19, p. 195-203, 1987.