



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

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *PIPER ADUNCUM* E DILAPIOL EM INFECÇÕES DE
PELE.**

Roseane Guimarães Ferreira

BELÉM – PA
2015



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

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *PIPER ADUNCUM* E DILAPIOL EM INFECÇÕES DE
PELE.**

Aluna: Roseane Guimarães Ferreira

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme S. Maia

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 aprovação de título de mestre.

BELÉM – PA
2015

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

Ferreira, Roseane Guimarães.

Ação antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* e dilapiol em infecções de pele / Roseane Guimarães Ferreira; orientador, José Guilherme Soares Maia. — 2015.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, Belém, 2015.

1. *Piper aduncum*. 2. Dilapiol. 3. Ação antimicrobiana. 4. Micro-organismos. 5. Pele- infecções I. Título

CDD: 22.ed. : 616.5

FOLHA DE APROVAÇÃO

Roseane Guimarães Ferreira

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *PIPER ADUNCUM* E DILAPIOL EM INFECÇÕES DE PELE.

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 aprovação de título de mestre.

Aprovado em 28/06/2015

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Eloisa Helena de Aguiar Andrade

Prof.^a Dr^a. Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia

BELÉM – PA
2015

DEDICATÓRIA

A minha mãe querida
Rosana e minha amiga
Maria, pelo carinho,
paciência e incentivo.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo por me conceder momentos tão especiais na vida.

A minha mãe, pela paciência e amor que me fazem sentir tão amada.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Guilherme Maia, pela orientação, pelo apoio, pela confiança e oportunidade de executar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Almeida pela ajuda no planejamento do trabalho e por compartilhar com muito carinho e paciência os seus conhecimentos.

À Prof.^a Dr.^a. Marta Chagas Monteiro pelo respeito, pela atenção e por permitir o acesso pleno ao laboratório de Microbiologia e Imunologia do departamento de farmácia.

A Rafaela, técnica do laboratório de engenharia de produtos naturais (LEPRON), pelas análises no aparelho de cromatografia gasosa e também pelo carinho e amizade.

A Prof.^a Dr.^a. Joyce Kelly do Rosário da Silva pela ajuda na cromatografia de coluna para separação do dilapiol.

A amiga Lúcia Carla, técnica do laboratório de Microbiologia e Imunologia do departamento de Farmácia, com quem muito aprendi.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia em especial a minha amiga Mariely Pessoa, por me proporcionar momentos de tanta alegria.

As meninas Ana Lígia, Magda, Tainá, Caroline, Nívea, Rafaelli e Kely navegantes pela amizade e colaboração no laboratório.

A minha grande amiga Maria José, pela força e pelo ombro amigo nos momentos de dificuldades.

Aos meus amigos da pós-graduação pela força e companheirismo, especialmente a Kelly Albuquerque, Rafaelle Matos e Érika Valério.

Ao instituto Evandro Chagas, por ceder às cepas dos fungos de isolados clínicos.

A CAPES pelo suporte financeiro.

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

As funcionárias da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Cliciane e Brasília pela ajuda sempre dispensada.

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

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Só existem dois dias no ano nos quais nada pode ser feito. “Um se chama ontem e o outro, amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

Dalai Lama

RESUMO

FERREIRA, R. G. **Ação Antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* e dilapiol em infecções de pele.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, Belém, 2015.

Piper aduncum L. é uma planta com várias propriedades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, que está associada principalmente à ação do seu óleo essencial rico em dilapiol. Nos últimos anos, a ocorrência de infecções de pele, causadas por bactérias e fungos, aumentou consideravelmente. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *P. aduncum* (OEPA) e do dilapiol, seu constituinte majoritário, contra micro-organismos patogênicos da pele e seus anexos. A atividade antimicrobiana foi realizada através do método de microdiluição e por contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Esses compostos vegetais foram testados frente aos fungos filamentosos dermatófitos (FFD) e aos não dermatófitos (FFND), a levedura e a bactéria gram-positiva. Os resultados mostraram frente às cepas de *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC e isolado clínico), valores de CIM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o OEPA e o dilapiol e CFM de 1500 e $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Para os isolados clínicos *Trichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum* os valores da CIM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a CFM de $1500\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram semelhantes para os dois compostos, assim como para *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* com valores da CIM de $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CFM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$. O FFND *Aspergillus fumigatus* ATCC apresentou CIM de $3,9\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CFM de $7,8\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para a cepa de isolado clínico a CIM foi de $3,9\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a CFM de $15,6\mu\text{g.mL}^{-1}$, para ambos os compostos. Entretanto, não mostrou atividade frente à levedura *Candida albicans* e a bactéria *Staphylococcus aureus* nas concentrações utilizadas.

Palavras-chave: *Piper aduncum*, dilapiol, atividade antimicrobiana, micro-organismo da pele.

ABSTRACT

FERREIRA, R. G. **Antimicrobial action of essential *Piper aduncum* and dillapiol oil in skin infections.** Thesis (Master's degree) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, Belém, 2015.

Piper aduncum L. is a plant with several biological properties such as antimicrobial activity, which is mainly associated with the action of its essential oil rich in dilapiolle. In recent years, the occurrence of skin infections caused by bacteria and fungi increased considered shape. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of essential oil of *P. aduncum* (OEPA) and dilapiolle, its major constituent, against pathogenic skin micro-organisms and their attachments. The antimicrobial activity was performed using the microdilution method and Forming Units count Cologne (UFC) for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the Bactericidal Concentration Minimum (CBM) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM). These plant compounds were tested against the filamentous fungi dermatophytes (FFD) and not dermatophyte (FFND), gram-positive bacteria and yeast. The results showed *Trichophyton mentagrophytes* front (ATCC and clinical isolate), MIC values of $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for OEPA and dilapiolle and CFM 1500 and $1000\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. For clinical isolates of *Trichophyton rubrum* and *Epidermophyton floccosum* the MIC values of $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and CFM $1500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, were similar for the two compounds as well as *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* with MIC values of $250\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and CFM $500\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The *Aspergillus fumigatus* ATCC FFND showed an MIC of $3.9\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $7.8\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the clinical isolate strain MIC of $3.9\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and CFM $15.6\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both. However showed no activity against *Candida albicans* and the yeast bacteria *Staphylococcus aureus* in the concentrations used.

Keywords: *Piper aduncum*, dilapiolle, antimicrobial activity, micro-organisms of skin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Porcentagem (%) dos constituintes identificados no OEPA e seus respectivos índices de retenção	51
Tabela 2- Resultado da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol frente aos FFD com valores da CIM e da CFM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	62
Tabela 3- Resultado da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol frente ao FFND com valores da CIM e CFM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	68
Tabela 4- Resultado da atividade do OEPA e do dilapiol frente à levedura <i>C. albicans</i> com valores da CIM e CFM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Piper aduncum</i> L.	22
Figura 2: dilapiol.	23
Figura 3: <i>S. aureus</i> em ágar sangue (β -hemólise).	24
Figura 4: Aspecto microscópico de <i>S. aureus</i>	25
Figura 5: Manifestação clínica das infecções cutâneas por <i>S. aureus</i>	26
Figura 6: Aspecto macroscópico (A) verso (B) reverso (C) aspecto microscópico de <i>T. rubrum</i>	27
Figura 7: Aspecto macroscópico de <i>T. mentagrophytes</i>	28
Figura 8: Aspecto microscópico de <i>T. mentagrophytes</i>	28
Figura 9: Aspecto macroscópico: (A) verso (B) reverso e (C) aspecto microscópico de <i>M.canis</i>	29
Figura 10: Aspecto macroscópico: (A) verso (B) reverso e (C) aspecto microscópico de <i>M.gypseum</i>	30
Figura 11: (A) Aspecto macroscópico e (B) aspecto microscópico de <i>E. floccosum</i>	30
Figura 12: Manifestação clínica das dermatofitoses.....	31
Figura 13: Aspecto macroscópico de <i>C. albicans</i>	32
Figura 14: Aspecto microscópico de <i>C. albicans</i>	33
Figura 15: Manifestação clínica da candidíase cutânea.....	34
Figura 16: Aspecto macroscópico de <i>A. fumigatus</i>	35
Figura 17: Aspecto microscópico de <i>A. fumigatus</i>	35
Figura 18: Aspergilose cutânea nodular em paciente HIV positivo	36
Figura 19: Esquema de obtenção do OEPA.....	40
Figura 20: Fluxograma da análise fitoquímica.....	42
Figura 21: Esquema de preparo do inóculo bacteriano.....	44
Figura 22: Esquema de microdiluição.	45

Figura 23: Esquema de aplicação da resazurina (A) visualização da CIM (B)..	45
Figura 24: Esquema de CBM.	46
Figura 25: Esquema de preparo do inóculo dos fungos filamentosos.	47
Figura 26: Esquema de preparo do inóculo das leveduras.	48
Figura 27: Esquema de microdiluição.	49
Figura 28: Visualização da CIM.....	49
Figura 29: Esquema da CFM (A) leveduras (B) fungos filamentosos.....	50
Figura 30: Resultado da microdiluição de <i>S. aureus</i>	53
Figura 31: Resultado da microdiluição de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC	56
Figura 32: Resultado da CFM de <i>T. mentagrophytes</i> ATCC	56
Figura 33: Resultado da microdiluição de <i>T. mentagrophytes</i> isolado clínico ..	57
Figura 34: Resultado da CFM de <i>T. mentagrophytes</i> isolado clínico	57
Figura 35: Resultado da microdiluição de <i>T. rubrum</i> isolado clínico	58
Figura 36: Resultado da CFM de <i>T. rubrum</i> isolado clínico	58
Figura 37: Resultado da microdiluição de <i>M.canis</i> isolado clínico.....	59
Figura 38: Resultado da CFM de <i>M. canis</i> isolado clínico.....	59
Figura 39: Resultado da microdiluição do <i>M. gypseum</i> isolado clínico	60
Figura 40: Resultado da CFM do <i>M. gypseum</i> isolado clínico	60
Figura 41: Resultado da microdiluição de <i>E. floccosum</i> isolado clínico	61
Figura 42: Resultado da CFM de <i>E. floccosum</i> isolado clínico.....	61
Figura 43: Representação gráfica da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol	63
Figura 44: Resultado da microdiluição de <i>A. fumigatus</i> ATCC.....	66
Figura 45: Resultado da CFM de <i>A. fumigatus</i> ATCC.....	66
Figura 46: Resultado da microdiluição de <i>A. fumigatus</i> isolado clínico	67
Figura 47: Resultado da CFM de <i>A. fumigatus</i> isolado clínico	67
Figura 48: Representação gráfica da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol	68

Figura 49: Resultado da microdiluição do OEPA e do dilapiol frente a *C. albicans*..... 71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

ASD - Ágar saboraund dextrose

ATCC - American Type Culture Collection

CBM - Concentração bactericida mínima

CC – Cromatografia em coluna

CCD - Cromatografia em camada delgada

CFM - Concentração fungicida mínima

CG - Cromatografia em fase gasosa

CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

CG/DIC - Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas

CIM - Concentração inibitória mínima

CL₅₀ - Concentração letal em 50%

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DL₅₀ - Dose letal em 50%

DNase - Desoxirribonuclease

FFD - Fungos filamentosos dermatófitos

FFND - Fungos filamentosos não dermatófitos

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro- RJ

IEC - Instituto Evandro Chagas

LEPRON - Laboratório de engenharia dos produtos naturais

mL - Mililitro

µg - Micrograma

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ - Microgramas por mililitros

MG - Herbário do Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, Pará

MOPS - Ácido morfolinopropanosulfônico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Plantas medicinais e Óleos essenciais	20
2.3 <i>Piper</i> (Piperaceae)	21
2.4 <i>Piper aduncum</i> L.	22
2.5 Infecções da pele por <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.6 Dermatomicose	26
2.6.1 FUNGOS FILAMENTOSOS DERMATÓFITOS (FFD)	27
2.6.2 LEVEDURAS.....	31
2.6.3 FUNGOS FILAMENTOSOS NÃO DERMATÓFITOS (FFND)	34
2.7 Tratamento das infecções de pele e necessidade de novos agentes antimicrobianos.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 Óleo de <i>Piper aduncum</i> L.	39
4.1.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	39
4.1.2 OBTENÇÃO DO OEPA	39
4.1.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	40
4.1.4 TÉCNICA PARA SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO CONSTITUINTE PRINCIPAL	41
4.1.4.1 Cromatografia.....	41
4.1.4.2 Cromatografia em coluna	41
4.1.4.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	41

4.1.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DO DILAPIOL.....	42
4.2 Atividade antimicrobiana.....	42
4.2.1 MEIOS DE CULTURA.....	42
4.2.2 CEPAS DOS MICRO-ORGANISMOS TESTADOS	42
4.2.3 PREPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES	43
4.3 Atividade antibacteriana.....	43
4.3.1 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO.....	43
4.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	44
4.3.3 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).....	46
4.4 Atividade antifúngica	46
4.4.1 PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO.....	46
4.4.1.1 Fungos filamentosos	46
4.4.1.2 Leveduras.....	47
4.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	48
4.4.3 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Obtenção do OEPA e purificação do dilapiol	51
5.2 Atividade antimicrobiana.....	53
5.2.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	53
5.2.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	56
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais sempre foram amplamente utilizadas na medicina popular, e nas últimas décadas têm sido alvo de diversas pesquisas científicas por conta das inúmeras propriedades terapêuticas apresentadas. Essas propriedades estão relacionadas aos compostos bioativos encontrados em muitas plantas aromáticas, especialmente nos óleos essenciais (SARTORATTO et al, 2004; KALAIIVANAN et al, 2013).

Os óleos essenciais são compostos naturais que apresentam atividade contra uma ampla variedade de micro-organismos como fungos e bactérias (SARTORATTO et al, 2004). As plantas ricas em óleos essenciais, como a espécie *Piper aduncum*, apresentam-se como promissoras no combate a esses agentes infecciosos, pois tem tido suas propriedades extensivamente estudadas e comprovadas pelo grupo de pesquisa (MAIA e ANDRADE, 2009).

Os fungos e as bactérias causam infecções da pele, destacando-se as dermatomicoses que são infecções cutâneas causadas por fungos filamentosos dermatófitos (FFD), leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos (FFND) (SILVA et al, 2014). Enquanto que as infecções estafilocócicas estão entre as infecções bacterianas da pele de maior importância clínica, em especial as causadas pela espécie *Staphylococcus aureus* (TOROK e DAY, 2014).

Essas enfermidades cutâneas representam um grande problema de saúde pública, trazendo prejuízos a qualidade de vida das pessoas acometidas, gerando gastos de milhões de reais em tratamentos todos os anos (ALMEIDA et al, 2009a; BRAZÃO et al, 2014). O tratamento atual envolvendo os antimicrobianos sintéticos apresenta uma série de inconvenientes dentre eles: elevada toxicidade, alto custo, muitos efeitos colaterais e ainda o surgimento de cepas resistentes (ALMEIDA et al, 2009a; MAGAGNIN et al, 2011; SALES e SILVA, 2012).

O óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPA) além de suas propriedades antimicrobianas já comprovadas, também apresentou baixa toxicidade e uma margem elevada de segurança nas doses utilizadas pelo grupo (SOUZA et al, 2008). Diante do cenário atual, torna-se clara a necessidade de novos agentes

antimicrobianos mais eficazes e menos tóxicos, constituindo-se o OEPA, uma ótima alternativa terapêutica de baixo custo e baixa toxicidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais e Óleos essenciais

A organização mundial da saúde (OMS) define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (VEIGA JÚNIOR et al, 2005). A contribuição das plantas na obtenção de novos fármacos está relacionada à grande quantidade de compostos biologicamente ativos com alto potencial farmacológico existente em algumas espécies, tornando-as uma fonte terapêutica alternativa para muitas doenças. Dentre essas plantas com potencial farmacológico destacam-se as espécies ricas em óleo essencial (OE) (MACHADO e FERNANDES JÚNIOR 2011; BADKE et al, 2012).

Os óleos essenciais (OE's), também chamados de óleos voláteis são compostos naturais, voláteis e complexos, caracterizados por um forte odor sendo sintetizados por plantas aromáticas durante o metabolismo secundário e são geralmente obtidos por arraste vapor ou hidrodestilação (BAKKALI et al, 2008; MACHADO e FERNANDES JÚNIOR, 2011). São caracterizados por serem líquidos, voláteis, límpidos e incolores ou ligeiramente amarelados, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos. De forma geral, os óleos voláteis são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (SIMÕES et al, 2010).

Os componentes químicos de OE's são constituídos de derivados fenilpropanóides formados a partir do ácido chiquímico ou de terpenóides originados a partir do ácido mevalônico, sendo o segundo mais abundante (SIMÕES et al, 2010). Eles apresentam diversas propriedades biológicas, como a ação larvicida, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória (KALEMBA e KUNICKA, 2003; MACHADO e FERNANDES JÚNIOR, 2011) e desempenham nas plantas funções relacionadas à sua volatilidade, agindo na atração de polinizadores, perda de água, inibição de germinação, proteção contra predadores e patógenos.

Nesse sentido, antimicrobianos de origem vegetal tem recebido especial destaque, haja vista o desenvolvimento de resistência aos antibióticos

tradicionais por diversos micro-organismos. Com isso, muitas espécies vegetais podem contribuir para o desenvolvimento de novos produtos, como as espécies do gênero *Piper* (Piperaceae) que são grandes produtoras de OE's com possível ação antimicrobiana contra vários micro-organismos, tais como bactérias e fungos (SILVA e BASTOS, 2007; FIUZA e KNAAK, 2010; OOTANI et al, 2013).

2.3 *Piper* (Piperaceae)

A família Piperaceae pertencente à ordem Piperales é formada por 12 gêneros e aproximadamente 2000 espécies. Destacando-se o gênero de maior expressão *Piper* L. com distribuição pantropical, compreendendo cerca de 700 espécies, sendo que em média 260 espécies ocorrem no Brasil e 140 delas encontram-se, especificamente, na Amazônia Brasileira (GUIMARÃES e GIORDANO, 2004).

O gênero *Piper* se destaca dos demais gêneros pela produção de OE's, tornando-se importante fonte de matéria-prima para a indústria química, farmacêutica e horticultura. O grupo de pesquisa tem contribuído de forma expressiva no trabalho com esta família e em especial a este gênero, promovendo coleta de campo, identificação e registro em herbário, análise química de componentes voláteis, ensaios biológicos e geração de tecnologias de cultivo (MAIA e ANDRADE, 2009).

Em relação aos componentes voláteis, o grupo realizou a obtenção e a análise por cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de muitas espécies de *Piper* ricos em terpenos como β -cariofileno, espatulenol e (E) -nerolidol ou fenilpropanóides como safrol (*Piper hispidinervium*) e metileugenol (*Piper divaricatum*). No caso dos fenilpropanóides, estes são os componentes majoritários destes óleos, com teores bastante elevados, como o dilapiol encontrado na espécie *Piper aduncum* (MAIA e ANDRADE, 2009).

2.4 *Piper aduncum* L.

Piper aduncum L é uma planta aromática que produz um alto teor de OE. É conhecida popularmente no Amazônia como "pimenta-de-macaco", no nordeste brasileiro como pimenta-de-fruto ganchoso, aperta-ruão e falso janborandi (MAIA et al, 2000; FAZOLIN et al, 2006). Morfologicamente é descrita como um arbusto ou arvoreta de 2 a 7 m bastante nodoso; com folhas membranáceas ou cartáceas, elípticas ou elíptico-ovaladas, com ápices curtamente acuminado, base assimétrica arredondada ou cordiforme, opacas em ambas as faces, inervação com pêlos quase adpressos, espigas alongadas, flores minúsculas e frutos obpiramidais e com minúsculas sementes marrons (Figura 1; MAIA et al, 2000).



Figura 1: *Piper aduncum* L.
Fonte: MAIA et al, 2000.

Esta planta possui uma ampla utilização na medicina tradicional, relatando-se seu uso como diurético, no controle de sangramento, náuseas, males do fígado, úlceras crônicas, laxante, distúrbios ginecológicos, gonorréia, leucorréia (corrimento vaginal), erisipela e cistite (VAN DEN BERG, 1993; COIMBRA, 1994; POHLIT et al, 2006; SOUSA et al, 2008; ALMEIDA et al, 2009; GUERINI et al, 2009).

São muitos os fatores importantes para a utilização desta espécie, como a sua ocorrência espontânea na natureza, sendo considerada como planta oportunista e invasora de áreas desmatadas (LOBATO et al, 2007; SOUZA et al, 2008; GAIA et al, 2010), por isso possui uma ampla distribuição

geográfica sendo encontrada desde o nível do mar até altitudes consideráveis (América Central, Antilhas e América do Sul) (FAZOLIN et al, 2006).

Outros fatores importantes para sua utilização dizem respeito ao seu ciclo vegetativo relativamente curto, a alta tolerância a solos ácidos de baixa fertilidade, facilidade de propagação vegetativa e uma ampla capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Essas características favorecem a domesticação e o cultivo desta planta, representando uma alternativa viável para a geração de renda para os agricultores, pois essa espécie apresenta um alto teor de óleo essencial em relação a outras espécies aromáticas (GAIA et al, 2010).

O teor de OEPA varia entre 2,5 a 3,5 % e seu constituinte principal é o dilapiol, um éter fenílico com elevado padrão de oxigenação, que está presente no OEPA em quantidades variando entre 58% a 88,4% (Figura 2; MAIA et al, 1998; ALMEIDA et al, 2009).

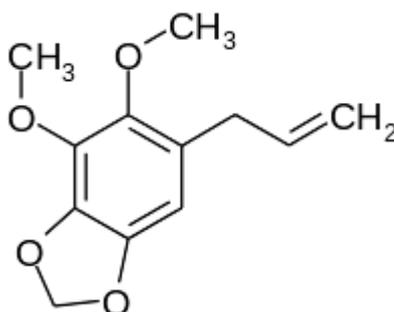


Figura 2: dilapiol.

O OEPA apresenta atividades biológicas importantes já comprovadas como: larvicida e inseticida (ALMEIDA et al, 2009), antifúngico contra fitopatógenos (BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004; BASTOS, 2007) e contra o fungo patogênico *Trichophyton mentagrophytes* (GUERRINI et al, 2009) e antibacteriano contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (BRAZÃO et al, 2014), sendo estes dois últimos micro-organismos causadores de infecções da pele.

2.5 Infecções da pele por *Staphylococcus aureus*

Ao considerar infecções bacterianas envolvendo a pele, destaca-se o gênero *Staphylococcus* sp., sendo a espécie *S. aureus* a mais comum e mais isolada a partir de infecções da pele e seus anexos (PERERA e HAY,2005). Este micro-organismo do grupo dos coagulase-positivo é considerado um colonizador da microbiota normal principalmente da pele e cavidade nasal de humanos, tornando-se patogênicos por ocasião de uma imunossupressão ou de traumas cutâneos (RODRIGUES et al, 2012).

Em relação aos aspectos microbiológicos, *S. aureus* é uma bactéria de crescimento rápido (18 a 24 h), aeróbia e anaeróbia facultativa, sua temperatura ótima é em torno de 35 a 37°C, crescendo em meios comuns e não seletivos. Macroscopicamente suas colônias variam quanto à coloração de acinzentadas a amarelo-ouro, em meio ágar sangue formam um halo de hemólise (β -hemólise) em torno de suas colônias (Figura 3; SANTOS et al, 2007).

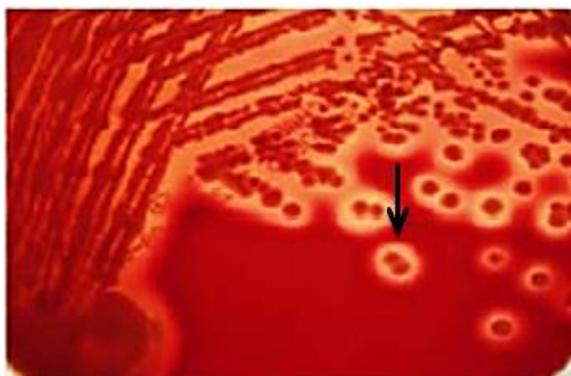


Figura 3: *S. aureus* em ágar sangue (β -hemólise).
Fonte: MELTER e RADOJEVIC, 2010.

Sua identificação é feita pelo cultivo em meio seletivo ágar manitol, onde esta bactéria consegue fermentar o manitol produzindo ácido lático, tornando o meio amarelado. A espécie é também positiva para catalase, coagulase e DNase (desoxirribonuclease). Microscopicamente são cocos gram-positivos, imóveis, não-esporulados, apresentando-se isolados, aos pares, em

cadeias curtas ou agrupados em forma de cacho de uva (Figura 4; SANTOS et al, 2007; TOROK e DAY, 2014).

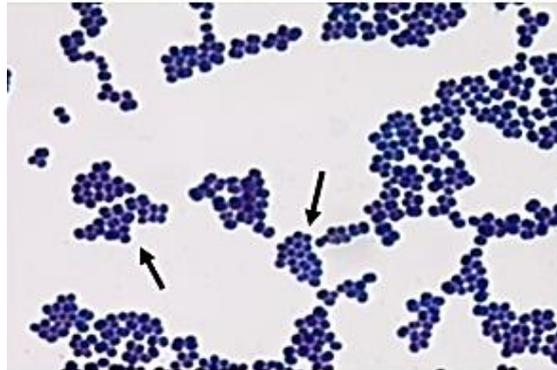


Figura 4: Aspecto microscópico de *S. aureus*.
Fonte: TANG e STRATTON, 2010.

Quanto à patogênese, *S. aureus* possui uma série de fatores de virulência que facilitam a instalação e a permanência do processo infeccioso, representado por constituintes da parede celular (adesinas), proteínas de superfície (proteína A, proteína de ligação à fibronectina), enzimas (catalase, coagulase, hialuronidase, b-lactamases, DNase), fatores de coagulação (protombriina) e toxinas (hemolisinas, leucocidinas, enterotoxinas) (COSTA et al, 2011; TOROK e DAY, 2014).

Primeiramente a bactéria se adere à pele ou à mucosa e em seguida rompe as barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de ligações intercelulares. Após a invasão, *S. aureus* utiliza diversas estratégias (fatores de virulência) para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro (SANTOS et al, 2007). As infecções estafilocócicas da pele podem se apresentar de forma variada, podendo ser no local da infecção ou mesmos distantes devido à produção de toxinas. As manifestações clínicas mais comuns são: impetigo, foliculite, furúnculo, carbúnculo, erisipela, celulite e fasciite necrosante (Figura 5; TANG e STRATTON, 2010; TOROK e DAY, 2014).



Figura 5: Manifestação clínica das infecções cutâneas por *S. aureus*.

Fonte: PÉREZ et al, 2014.

2.6 Dermatomicose

As infecções fúngicas da pele ou micoses cutâneas são infecções que envolvem a epiderme e derme, sendo denominada de dermatomicose. A dermatomicose acomete a pele e seus anexos como unhas, cabelos e dobras periungueais, sendo consideradas de ocorrência mundial com maior prevalência em regiões de clima quente e úmido (VANDER STRATEN et al, 2003). Este tipo de micose embora raramente apresente risco de vida para os pacientes, destaca-se como um importante problema de saúde pública por acarretarem algumas vezes efeitos debilitantes aos pacientes, afetando, sobretudo qualidade de vida dos indivíduos (SILVA et al, 2014).

Existe uma série de fatores predisponentes ao desenvolvimento desta enfermidade como os relacionados aos hábitos e atividades como: turismo, migração, esportes, contato com animais, uso de calçados fechados, uso de piscinas públicas, bem como o aumento da incidência de *diabetes mellitus*, doenças vasculares, pacientes com imunodeficiências e terapia com corticóide (COSTA-ORLANDI et al, 2012). Os agentes etiológicos mais frequentes da dermatomicose são os FFD, leveduras e FFND, sendo os dermatófitos mais prevalentes (80 – 90%), seguidos pelas leveduras (5 – 17%) e FFND (3 – 12%) (ALMEIDA et al, 2009a).

2.6.1 FUNGOS FILAMENTOSOS DERMATÓFITOS (FFD)

FFD são fungos que utilizam queratina como fonte de alimento e invadem tecidos queratinizados com pele, pêlos e unhas de seres humanos e animais, causando uma infecção chamada dermatofitose ou tínea. Normalmente, esses fungos são restritos as camadas mais superficiais por inabilidade de penetrar tecidos mais profundos ou órgãos de hospedeiros. Eles podem ser classificados de acordo com o gênero (*Trichophyton* sp., *Microsporum* sp., ou *Epidermophyton* sp.) e a ecologia (antropofílico, geofílicos ou zoofílicos), dependendo de seu habitat primário (animais, solo ou humanos, respectivamente) (PERES et al, 2010).

O caráter cosmopolita dos fungos dermatófitos, bem como fatores climáticos, geográficos e sociais, interferem na frequência de determinadas espécies ocorrendo variações regionais. O gênero *Trichophyton* sp. é o mais prevalente, destacando-se as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (PERES et al, 2010). A primeira espécie apresenta macroscopicamente colônias de crescimento lento de cor branca ou creme, felpudas ou granulares, o reverso caracteriza-se pela cor vermelha o que dá o nome de rubrum (Figura 6 A e B). Quanto à microscopia possuem pouco ou nenhum macroconídio e os microconídios são piriformes (forma de lágrima), isoladamente ao longo das hifas (Figura 6 C; DIEGO, 2011).

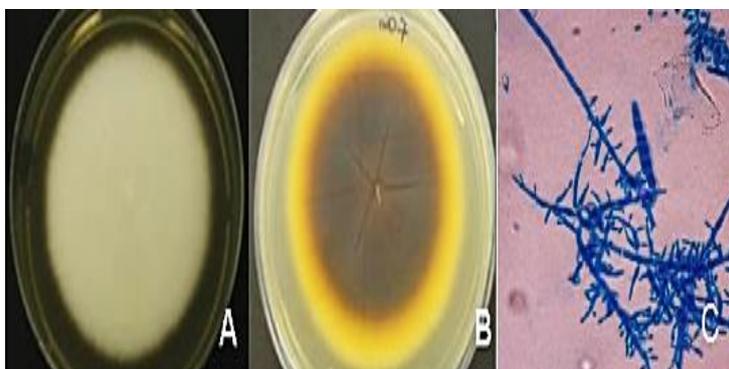


Figura 6: Aspecto macroscópico (A) verso (B) reverso e (C) aspecto microscópico de *T. rubrum*.

Fonte: HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al, 2007;
KHEBIZI e MANSOURI, 2014.

T. mentagrophytes se caracteriza macroscopicamente por apresentar crescimento rápido, com maturação de cerca de seis a onze dias após semeadura, formando colônias de cor branca, creme, amarelo ou cor de rosa, lisa ou granular, aveludadas, planas; o verso, amarelo, vermelho ou castanho-avermelhado (Figura 7; LARONE, 1996; LAKSHMIPATHY e KANNABIRAN, 2010).

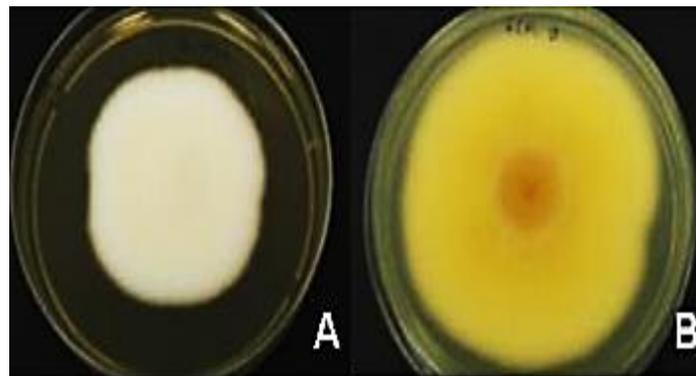


Figura 7: Aspecto macroscópico de *T. mentagrophytes* (A) frente (B) verso.

Fonte: SANTOS et al, 2010.

Microscopicamente há grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados, em aspecto de cacho de uva. Os macroconídios nem sempre estão presentes, mas quando presentes assemelham-se a um charuto, com um a seis septos transversais ligados a hifas hialinas, espiraladas e septadas e clamidoconídios intercalares (Figura 8). No diagnóstico diferencial, é positivo para os testes da urease (DIEGO, 2011).

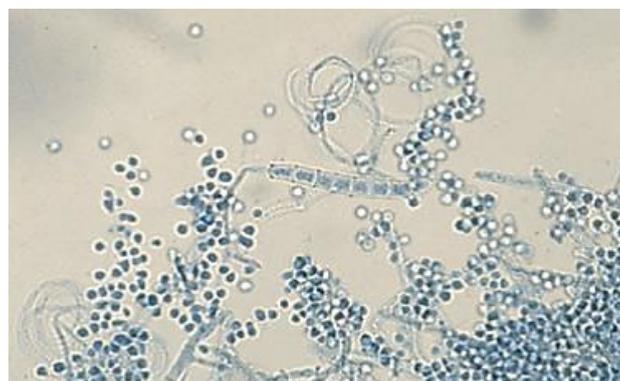


Figura 8: Aspecto microscópico de *T. mentagrophytes*.

Fonte: CZAIIKA e LAM, 2013.

O gênero *Microsporium* sp. forma colônias que podem parecer semelhantes a *Trichophyton* sp. (LAKSHMIPATHY e KANNABIRAN, 2010), as espécies mais importantes são *M. canis* e *M. gypseum*. *M. canis* apresenta superfície branca à amarelada, plana, o reverso de cor amarelo pálido, raramente são pigmentadas; seu crescimento é rápido (Figura 9 A e B). Os macroconídios são abundantes e fusiformes ligeiramente curvados, com paredes espessas, ásperas e poucos microconídios (Figura 9 C).

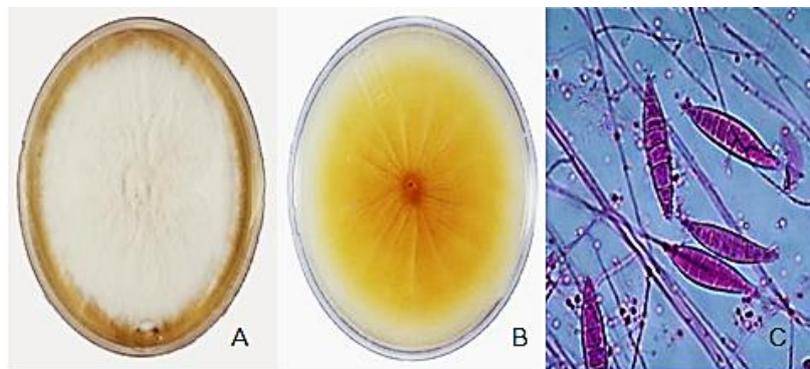


Figura 9: Aspecto macroscópico: (A) verso (B) reverso e (C) aspecto Microscópico de *M. canis*.

Fonte: CHERIF et al, 2009; CHIAPELLO et al, 2011.

M. gypseum apresenta superfície branca, amarelo clara, amarelo escura ou rosada, em pó ou lisa, o reverso amarelo-claro, amarelo-escuro ou marrom-avermelhado; o seu crescimento é rápido (Figura 10 A e B). Os macroconídios são abundantes multicelulares, elipsoidal, com paredes finas e ásperas, enquanto os microconídios são pouco abundantes (Figura 10 C; WEITZMAN e PADHYE, 1996).

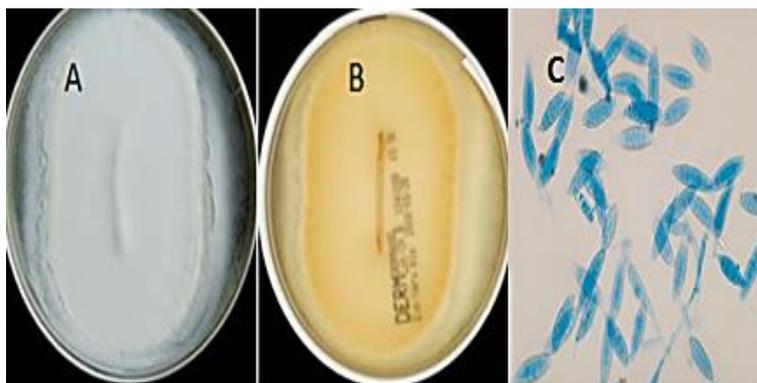


Figura 10: Aspecto macroscópico: (A) verso (B) reverso e (C) aspecto microscópico de *M. gypseum*.

Fonte: SUN e HO, 2006; SEYFARTH et al, 2010

O gênero *Epidermophyton*. sp inclui apenas duas espécies, sendo *E. floccosum* o único patogênico para o homem, com colônias de crescimento lento, visíveis após 7-9 dias incubação, diferenciando macroscopicamente a partir de *Trichophyton* e *Microsporum* sp. por ter colônias amarelo-acastanhado ou caqui e o reverso laranja-acastanhado (Figura 11 A e B). Microscopicamente os macroconídios são lisos, com paredes finas ou levemente espessas e os microconídios geralmente não são produzidos (Figura 11 C; DIEGO, 2011).

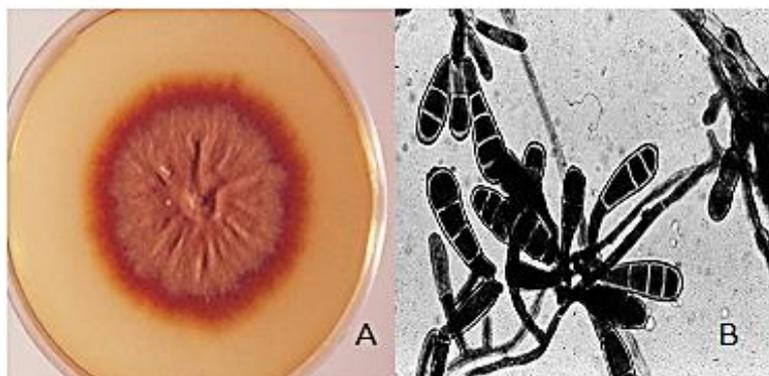


Figura 11: (A) Aspecto macroscópico e (B) aspecto microscópico de *E. floccosum*.

Fonte: BUTTY et al, 1992; DIEGO, 2011.

Quanto à patogênese os dermatófitos possuem vários fatores de virulência que permitem a instalação do processo infeccioso, constituem-se em três fases: a adesão através das glicoproteínas de manana da parede celular, seguido pelo processo da germinação (invasão), por último o crescimento, onde as hifas invadem as estruturas queratinizadas penetrando pelas fissuras das membranas através de enzimas hidrolíticas como nucleases, lipases,

proteases não específicas e queratinases (DE LA CALLE-RODRÍGUEZ et al, 2012).

As lesões produzidas pelas dermatofitoses são circulares, eritematosas e pruriginosas, sendo consequentes da ação direta do fungo ou indireta, através de reações de hipersensibilidade ao micro-organismo ou ainda da ação de seus produtos metabólicos. As manifestações clínicas são variadas sendo denominadas conforme a topografia do local acometido: *tinea capitis* (couro cabeludo), *tinea da barbae* (barba), *tinea corporis* (tronco e extremidades), *tinea cruris* (perianal), *tinea da unguium* (unha), *tinea pedis* (pés), entre outros (Figura12; PERES et al, 2010).



Figura 12: Manifestação clínica das dermatofitoses.
Fonte: NENOFF et al, 2014.

2.6.2 LEVEDURAS

As leveduras são micro-organismos considerados comensais e componentes da microbiota normal do homem. No entanto, tornam-se patogênicas quando ocorre um desequilíbrio por parte do hospedeiro, por isso são consideradas oportunistas, destacando-se o gênero *Candida* sp. como uma das leveduras de maior relevância clínica (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; MORENO et al, 2010).

As infecções fúngicas causadas por esse gênero são denominadas de candidíase, sendo as candidíases cutâneas infecções que acometem a pele, unhas e superfícies mucosas. *Candida* sp. é de distribuição universal e acomete todas as idades com predileção por alguns profissionais como

trabalhadores domésticos, lavadores, cozinheiros, profissionais da saúde (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; MORENO et al, 2010).

A espécie de maior prevalência desse gênero é *C. albicans*, caracterizada por possuir colônia úmida, cremosa e odor característico, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada em meio de cultura ágar sabouraud dextrose (Figura 13). Apresenta também formação de tubo germinativo, assimilação de carbono e capacidade fermentativa. Seu crescimento é rápido e acontece em temperaturas variando entre 20°C a 38°C (SANTANA et al, 2013).

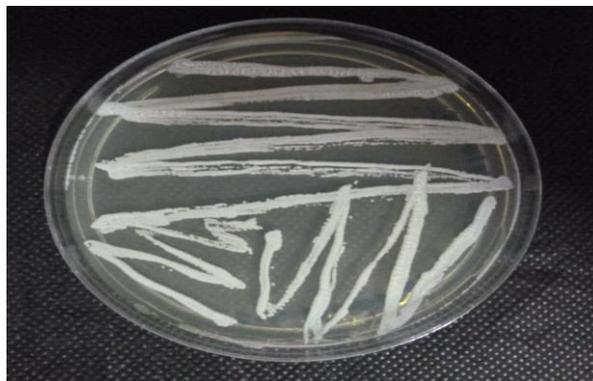


Figura 13: Aspecto macroscópico de *C. albicans*.
Fonte: Autora.

Microscopicamente essa espécie pode aparecer em três formas diferentes: as células em forma de levedura (também conhecidos como blastosporos), pseudohifas e células de hifas. As células de hifas derivam dos tubos germinativos e caracterizam-se por possuir paredes paralelas desde o seu ponto de origem no blastoconídeo (Figura 14). Essa capacidade de alternar sua morfologia pode explicar um de seus fatores de virulência (BERMAN e SUDBERY, 2002).

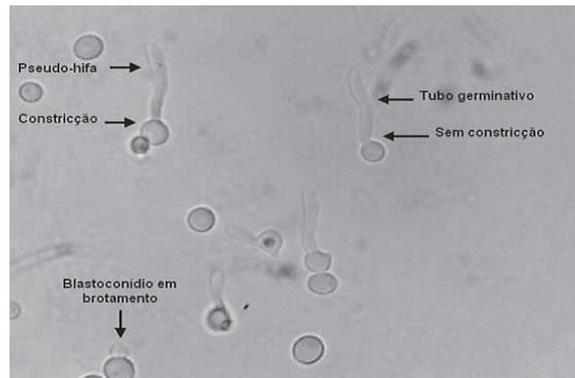


Figura 14: Aspecto microscópico de *C. albicans*.
Fonte: BRASIL, 2013.

Os principais fatores de virulência dessas leveduras são: expressão de enzimas extracelulares (fosfolipases e proteinases); produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular; capacidade de adesão a células e tecidos; formação de biofilmes; produção de tubo germinativo; produção de hemolisinas; hidrofobicidade da superfície celular e resistência ao peróxido de hidrogênio (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

O processo da patogênese produzida por *C. albicans* é diretamente favorecido por seus fatores de virulência, sendo a infecção dividida em etapas: colonização (adesão e aquisição de nutrientes), infecção superficial (penetração no epitélio e formação de hifas) e podendo chegar até uma infecção profunda e disseminada (penetração dos tecidos, invasão vascular e aderência ao endotélio, respectivamente) (DE LA CALLE-RODRÍGUEZ et al, 2012). A candidíase cutânea é caracterizada por lesões eritematosas, erosivas, secas e escamosas (Figura 15; NENOFF et al, 2014). Produzindo infecções que incluem aftas, vaginite, intertrigo, paroníquia, foliculite e distrofias da unha (LOO, 2004).



Figura 15: Manifestação clínica da candidíase cutânea.
Fonte: NENOFF et al, 2014.

2.6.3 FUNGOS FILAMENTOSOS NÃO DERMATÓFITOS (FFND)

Os FFND são fungos contaminantes, saprófitas da natureza, que alimentam de matéria orgânica em decomposição. Por não serem fungos queratinofílicos, ocorrem geralmente como invasores secundários em casos de infecções cutâneas, aproveitam-se de traumas, isquemia ou outras doenças para se restabelecerem, utilizando-se de resíduos orgânicos como fonte de alimentos (BATAWI et al, 2005).

Este grupo é representado por inúmeros gêneros como *Acremonium* sp, *Fusarium* sp, *Scopulariopsis* sp. e *Aspergillus* sp, possuindo este último mais de 900 espécies, dentre estas, o *Aspergillus fumigatus* se destaca por sua ampla distribuição na natureza, sendo considerado um contaminante de laboratório e por ser encontrado no solo e é isolado nas unhas dos pés em casos de onicomicoses (LÓPEZ e TORRES, 1999; GUGNANI, 2000).

A. fumigatus é uma espécie termófila, que cresce a temperatura de 37°C, mas também pode sobreviver em temperaturas muito elevadas em torno de 55 a 70°C (LATGE, 1999; MCCARTHY, 2004). Macroscopicamente, suas colônias podem ser felpudas, aveludadas, enrugadas ou rugosas com simetria radial e com coloração variando entre marrom, verde, cinza ao preto (Figura 16) e o seu crescimento visível ocorre dentro de 24 a 48 horas (LATGE, 1999; MCCARTHY, 2004).



Figura 16: Aspecto macroscópico de *A. fumigatus*: cor marrom da colônia.

Fonte: Autora.

Microscopicamente, o *A. fumigatus* é um fungo filamentoso hialino que apresenta um conidióforo curto e liso (produzem conídios pequenos) a partir da célula pé e este termina numa vesícula globosa onde assentam as fiáides unicelulares. Depois é possível ver ligado às fiáides, cadeias de fialoconídeos que dão o típico aspecto aspergilar e não ramificados (Figura 17; LÓPEZ e TORRES, 1999; GUGNANI, 2000).



Figura 17: Aspecto microscópico de *A. fumigatus*.

Fonte: LÓPEZ e TORRES, 1999.

Os fatores de virulência deste fungo estão ligados ao pequeno tamanho dos conídeos, facilitando a dispersão pelo ambiente, sua elevada temperatura de crescimento em torno de 37°C; capacidade de adesão ao endotélio e epitélio e a produção de um grande número de produtos extracelulares tóxicos como elastase, restrictocina, fumigatoxina, dentre outros (AMORIM et al, 2004).

As infecções cutâneas provocadas por *Aspergillus* são chamadas de aspergilose cutânea, possuindo como características lesões com máculas, pápulas, nódulos ou placas (BURIK et al, 1998). As formas clínicas da aspergilose cutânea primária são raras, sendo mais comuns as formas originárias de processos secundários como a onicomicose (BROOKMAN e DENNING, 2000; Figura 18).



Figura 18: Aspergilose cutânea nodular em paciente HIV positivo.

Fonte: BURIK et al, 1998.

2.7 Tratamento das infecções de pele e necessidade de novos agentes antimicrobianos

O tratamento das infecções da pele tanto bacterianas quanto fúngicas baseia-se em terapia tópica, sistêmica ou ainda em terapia combinada, sendo determinado por fatores como local e extensão da infecção e pela espécie de micro-organismo envolvido (MAGAGNIN et al, 2011).

No caso das infecções estafilocócicas as drogas de uso tópico mais utilizadas são neomicina, gentamicina e mupirocina e as de uso sistêmico incluem todas as suscetíveis a bactérias gram-positivas como: penicilinas, macrolídeo (eritromicina), aminoglicosídeo (gentamicina), quinolona (ciprofloxacino) e tetraciclina (SALES e SILVA, 2012).

Nas dermatomicoses as drogas de uso tópico mais utilizadas são preparações à base de tintura de iodo e ácido salicílico, antifúngicos em formas de cremes ou soluções de cetoconazol, isoconazol, miconazol, clotrimazol,

isoconazol, bifonazol, ciclopirox olamina e terbinafina. Entre os de ação sistêmica estão os imidázóis (cetoconazol), triazóis (fluconazol e itraconazol), alilamina (terbinafina) e a griseofulvina (BORGES et al, 2005; CAMPANHA et al, 2007; ALMEIDA et al, 2009a).

Embora hoje exista uma série de antimicrobianos de uso tópico e sistêmico disponíveis no mercado, as opções terapêuticas ainda são bastante limitadas (ALMEIDA et al, 2009a). Diversas razões justificam essas limitações, como o custo da terapia que é bastante elevado, principalmente dos antimicrobianos mais potentes; os efeitos colaterais da terapia oral ocasionado pelo longo período de tratamento dessas infecções, causando reações adversas importantes principalmente distúrbios gastrointestinais, tais como dispepsia, dor abdominal, náuseas e diarreia; a via tópica é restrita ao local da infecção devido a pouca disponibilidade pela falta de penetração do fármaco (ZHANG et al, 2007).

Outro fator preocupante da terapia antimicrobiana é o aparecimento de cepas resistentes, que tem se tornado um grande problema médico e um grande desafio para a saúde pública, mostrando-se evidente a necessidade de novos fármacos (SALES e SILVA, 2012). Dessa forma, justifica-se a necessidade de novos agentes antifúngicos e antibacterianos, pois apesar da existência de muito deles no mercado, o arsenal terapêutico ainda é bastante restrito, o custo da terapia e seus efeitos tóxicos são bastante elevados, bem como é notório o fenômeno da resistência microbiana, no qual os produtos naturais se constituem uma alternativa terapêutica promissora na busca de novos fármacos antimicrobianos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a atividade antimicrobiana do OEPA e de seu constituinte principal dilapiol, frente a cepas de micro-organismos patogênicos da pele e seus anexos.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair o OEPA pela técnica de araste a vapor;
- Submeter o OEPA à cromatografia em coluna (CC) com vistas a concentrar o dilapiol, constituinte principal deste óleo, para os testes biológicos previstos;
- Analisar e identificar os constituintes do óleo e da amostra de dilapiol concentrado (após separação por CC);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do OEPA e do dilapiol frente à bactéria gram-positiva *S. aureus* American Type Culture Collection (ATCC), pela técnica de microdiluição e por contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).
- Determinar a CIM e a concentração fungicida mínima (CFM) do OEPA e do dilapiol, frente às cepas de FFD *T. mentagrophytes* ATCC e seu isolado clínico, *T. rubrum* isolado clínico, *M. canis* isolado clínico, *M. gypseum* isolado clínico, *E. floccosum* isolado clínico pela técnica de microdiluição e por UFC.
- Determinar a CIM e a CFM do OEPA e do dilapiol, frente às cepas de FFND *A. fumigatus* ATCC e seu isolado clínico pela técnica de microdiluição e por UFC.
- Determinar a CIM e a CFM do OEPA e do dilapiol frente às cepas de leveduras *C. albicans* ATCC e seu isolado clínico, pela técnica de microdiluição e por UFC.

4 METODOLOGIA

4.1 Óleo de *Piper aduncum* L.

4.1.1 MATERIAL BOTÂNICO

As partes aéreas (folhas e talos finos) de *P. aduncum* foram coletadas no Município de Santo Antônio do Tauá (PA) (Latitude: 01° 09' 07" S, Longitude: 48° 07' 46" W, Altitude de 17m e a área de 539,9 Km²), 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 MG (Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará), sob o registro 150.678. A planta foi identificada pela Dr^a Elsie F. Guimarães, do Jardim Botânico do RJ (Rio de Janeiro), especialista em família Piperaceae.

4.1.2 OBTENÇÃO DO OEPA

O processo de extração do óleo essencial foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais (LEPRON), pela técnica de arraste a vapor d'água utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado, com duração de três horas. O óleo foi recolhido e seco em sulfato de sódio anidro, após centrifugação (centrífuga de cruzeta horizontal a 965 G, Excelsa, modelo Falcon) a 25°C por cinco minutos. O mesmo foi coletado com o auxílio de uma micropipeta (Finpippete), pesado e colocado em frasco âmbar com tampa, devidamente limpo e armazenado no freezer a 4°C (Figura 19), de acordo com a metodologia de CASTRO et al (2006).



Figura 19: Esquema de obtenção do OEPA.

Fonte: Autora.

4.1.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O OEPA foi analisado qualitativamente em um cromatografo de gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) Thermo DSQ II, 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; o gás de arraste foi o hélio, ajustado para fornecer uma velocidade linear de 32 cm/s (medidos a 100 °C); tipo de injeção splitless (2µl de solução 1:1000 em hexano); o split 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 a cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chamas (CG / DIC) FOCUS, operando nas mesmas condições do CG-EM, exceto o gás de arraste que foi nitrogênio. Um índice de retenção foi calculado para todos os constituintes voláteis usando-se uma série homóloga de *n*-alcanos (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963; DA SILVA et al, 2014).

Os componentes voláteis do OE 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 no sistema de dados da biblioteca de referência e citados na literatura (NIST, 2005; ADAMS, 2007).

4.1.4 TÉCNICA PARA SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO CONSTITUINTE PRINCIPAL

4.1.4.1 Cromatografia

A fase estacionária sólida utilizada foi sílica-gel (60-230 Mesh) para a cromatografia em coluna e sílica gel (GF e PF) para a cromatografia em placa. Enquanto que para a fase móvel líquida, foram utilizados os solventes n-hexano e acetato de etila.

4.1.4.2 Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna foi realizada em coluna de vidro (80 x 2 cm), empacotada com sílica (SiO₂, 200 g, Merck) e eluída inicialmente com hexano. O OEPA foi pesado (10g) e fracionado com misturas de solventes de polaridades crescentes: hexano e hexano+acetato de etila (10%).

4.1.4.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada, em cromatoplasas de alumínio (Merck, Alemanha) plana de 20x20cm, já elaboradas com uma fina camada de sílica-gel (60GF – Macherey-Nagel) de 0,20 mm de espessura. Cada placa foi cortada em pequenos pedaços de 10x5cm, para análise das várias frações obtidas no processo de cromatografia em coluna. A fase móvel utilizada foi o sistema hexano+acetato de etila 15%. As placas foram reveladas em câmara de luz UV (Cabine tipo SPECTROLINE modelo CM-10, 254 e 360 nm).

4.1.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DO DILAPIOL

Após a separação do OEPA por cromatografia de coluna, as frações purificadas foram determinadas por CG / DIC (FOCUS; Figura 20).

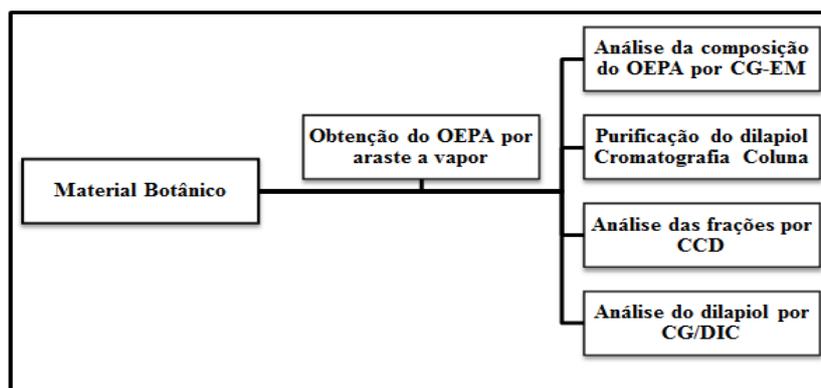


Figura 20: Fluxograma da análise fitoquímica.

Fonte: Autora

4.2 Atividade antimicrobiana

4.2.1 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados na atividade antibacteriana foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar manitol (HIMEDIA, Índia), enquanto que na atividade antifúngica foram utilizados os meios RPMI 1640 com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol e tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfurônico) PH 7 (HIMEDIA, INDIA), ágar saboraund dextrose (HIMEDIA, INDIA) e ágar batata (HIMEDIA, INDIA). Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

4.2.2 CEPAS DOS MICRO-ORGANISMOS TESTADOS

Os micro-organismos utilizados para a realização da pesquisa foram cepas de referência ATCC e seus isolados clínicos. Sendo eles: a bactéria

Staphylococcus aureus ATCC 6538 e os fungos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus fumigatus* ATCC 40152, fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro). As cepas de isolados clínicos foram *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, cedidos pelo instituto Evandro chagas (IEC).

A bactéria foi mantida em ágar nutriente, os FFD em ágar batata, as leveduras e os FFND em ágar sabourand dextrose (ASD), todos eles a temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

4.2.3 PREPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES

A preparação das soluções seguiu os critérios adotados por Allegrini et al (1973) e Brazão et al (2014). Foi pesado em um tubo *ependorf* estéril 0,004 g do OEPA, adicionou-se 100 µl de Tween 20 para solubilizar e 900 µl do meio RPMI-1640, obtendo-se uma solução com concentração padrão de 4000 µg.mL⁻¹ do OEPA. Repetiu-se o mesmo procedimento para obtenção da solução padrão de dilapiol. Para o ensaio antimicrobiano, o OEPA e o dilapiol foram utilizados nas seguintes concentrações: 2000, 1500, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 µg.mL⁻¹.

4.3 Atividade antibacteriana

4.3.1 PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO

A bactéria foi previamente semeada em placas de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton, assim como em meio de cultura específico (ágar manitol). Em seguida, foram incubadas a 35°C por 24 horas em estufa para a verificação do crescimento e posterior preparação do inóculo. A obtenção do inóculo seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de

Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” - Norma Aprovada - Nona edição da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

O inóculo foi preparado a partir da retirada de três a quatro colônias dessa bactéria, as quais foram transferidas para um tubo contendo 1 mL do caldo Mueller-Hinton, realizando-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente 1×10^8 UFC.mL⁻¹, em aparelho turbidímetro (Densimat-Biomerieux), sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland (0,09 a 0,11). Em seguida, a suspensão foi incubada por uma hora para alcançar o crescimento exponencial bacteriano. Logo após a incubação, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo 1×10^3 UFC.mL⁻¹ (unidades formadoras de colônias; Figura 21).

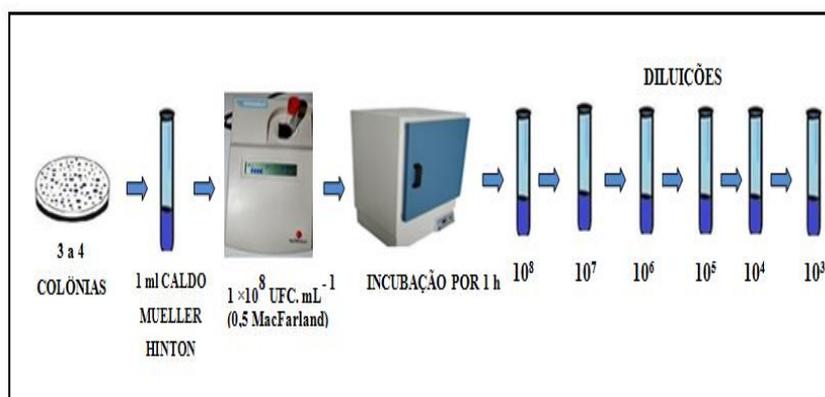


Figura 21: Esquema de preparo do inóculo bacteriano.
Fonte: Autora.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O método empregado para a avaliação da atividade antimicrobiana foi a microdiluição em caldo, descrito conforme a norma M7-A9 (vol. 32 nº 2) da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

As diluições da solução padrão de OEPA e dilapiol foram preparadas, conforme descrito anteriormente. Assim, na placa de microdiluição de 96 poços (Corning), adicionou-se 100µl do inóculo e mais 100µl de cada diluição dos compostos vegetais. Os controles receberam 100µl do inóculo e 100µl do

controle positivo o antibiótico cloranfenicol (Ariston) na concentração de 250µg/ml, 100µl do controle negativo Tween 20 (Interlab) e 100µl do meio RPMI no poço do inóculo, obtendo-se um volume final de 200µl em todos os poços. A incubação da placa ocorreu à temperatura de 35° C por 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata (Figura 22).

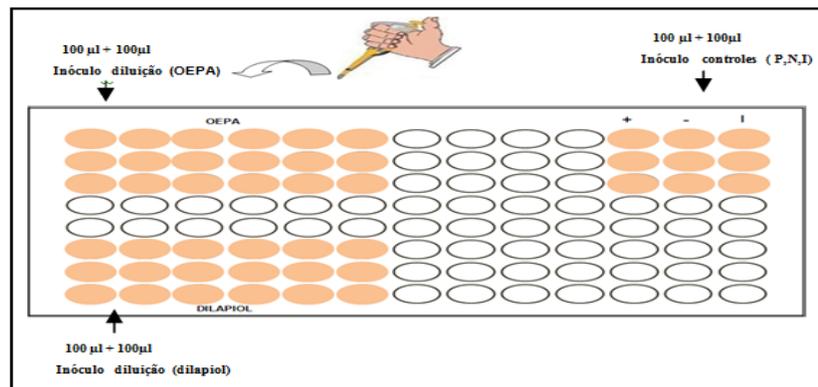


Figura 22: Esquema de microdiluição.
Fonte: Autora.

Após esse período foi adicionado a cada poço 30µl de resazurina 0,01% (Sigma Aldrich, Brasil), incubando-se novamente a placa por três horas. A resazurina é um corante de coloração azul, utilizado como indicador devido sua reação de óxido-redução passando de resazurina a resofurina, indicando a presença de células viáveis através da mudança de cor (cor azul para rosa) considerando-se a manutenção da coloração azul como ausência de crescimento (CLSI, M7-A9, 2012; Figura 23).

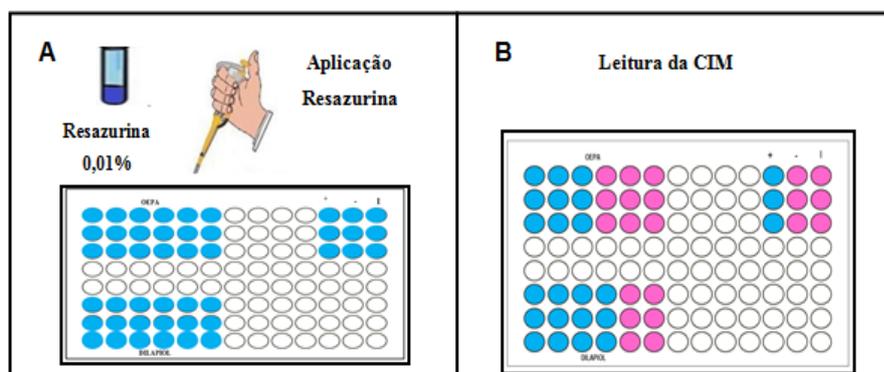


Figura 23: Esquema de aplicação da resazurina (A) visualização da CIM (B).
Fonte: Autora.

4.3.3 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A CIM representa a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo sob condições conhecidas (QUADROS et al, 2011). Dessa forma, a CBM foi obtida pelo método de semeadura, retirando-se uma alíquota de 10 µL do conteúdo dos poços, seguidas de espalhamento em placas de Petri previamente preparadas com ágar Mueller-Hinton e incubadas em estufa a 35°C por 24 h (Figura 24).

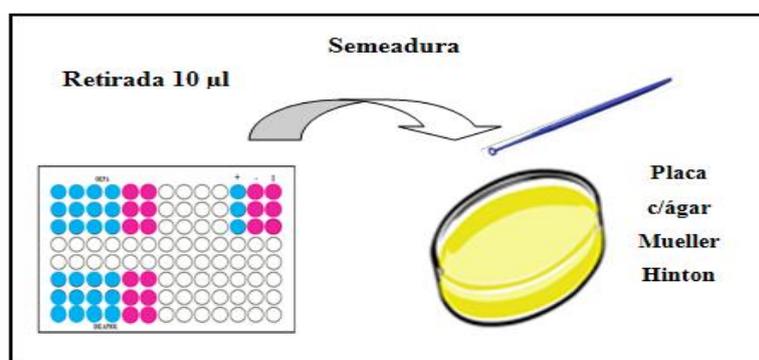


Figura 24: Esquema de CBM.
Fonte: Autora.

Posteriormente as UFC's foram contadas, na qual a CBM foi considerada a menor concentração dos compostos que resultou em ausência de crescimento ou o aparecimento de menos de três colônias, eliminando 99,9% dos micro-organismos (QUADROS et al, 2011).

4.4 Atividade antifúngica

4.4.1 PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO

4.4.1.1 Fungos filamentosos

Os FFD foram previamente cultivados em placa de Petri contendo ágar batata, mantidos em estufa (Fanem) a temperatura ambiente por quatorze

dias para *M. canis* e *M. gypseum*, por vinte e um dias para *T. mentagrophytes*, trinta dias para *T. rubrum* e *E. floccosum*, enquanto que o FFND *A. fumigatus* foi cultivado em ASD a temperatura de 37 °C por sete dias, no intuito de promover o crescimento exponencial dos conídios. O preparo do inóculo dos fungos filamentosos seguiu os procedimentos descritos na norma M38-A (vol.22, nº 16) da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com adaptações.

Dessa forma, o inóculo foi preparado a partir da lavagem dos conídios com 5mL do meio RPMI, em seguida a suspensão foi transferida para um tubo de ensaio afim de permitir a sedimentação das partículas maiores por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 3mL do meio líquido RPMI e este foi agitado em aparelho tipo vórtex (Phenix - Modelo AT 56) por quinze segundos. A turbidez da suspensão foi ajustada para 0,5 em relação à escala de Mac Farland em aparelho turbidímetro (Densimat-Biomerieux), correspondendo a $0,4 a 5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ (inóculo final do FFD). O FFND *A. fumigatus* recebeu mais uma diluição (1:50) em meio RPMI, correspondendo a $0,4 a 5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ (Figura 25).

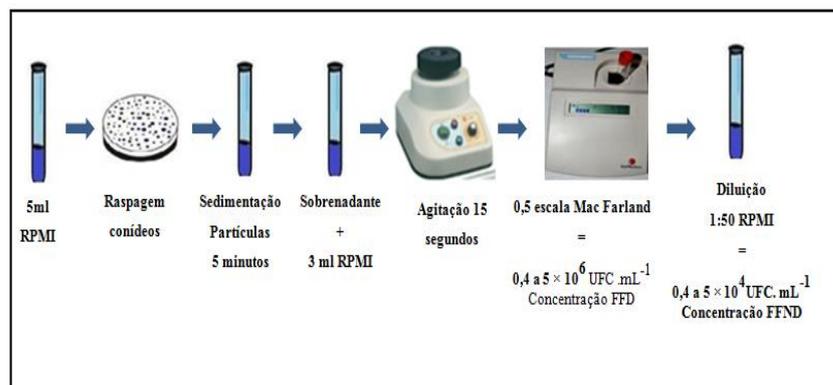


Figura 25: Esquema de preparo do inóculo dos fungos filamentosos.

Fonte: Autora.

4.4.1.2 Leveduras

A levedura foi cultivada em placa de Petri descartável contendo ASD a temperatura de 35°C por 24 horas. O preparo do inóculo obedeceu aos

procedimentos descritos na norma M27-A2 (vol.22, nº15) da CLSI (2008a), com adaptações.

O inóculo foi preparado a partir da retirada de aproximadamente cinco colônias de *C. albicans* e suspensas em 5mL do meio RPMI. A suspensão resultante foi agitada em aparelho vórtex durante 15 segundos e a densidade celular ajustada em aparelho turbidímetro (Densimat - Biomerieux), equivalente a de uma solução-padrão da escala de Mc Farland 0,5, que corresponde a $1 \text{ a } 5 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$. Logo após o ajuste, o inóculo foi incubado por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial da levedura. Em seguida foi realizada uma diluição 1:50 e depois de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI, resultando em uma concentração de $1 \text{ a } 5 \times 10^3 \text{ CFU. mL}^{-1}$ (Figura 26).

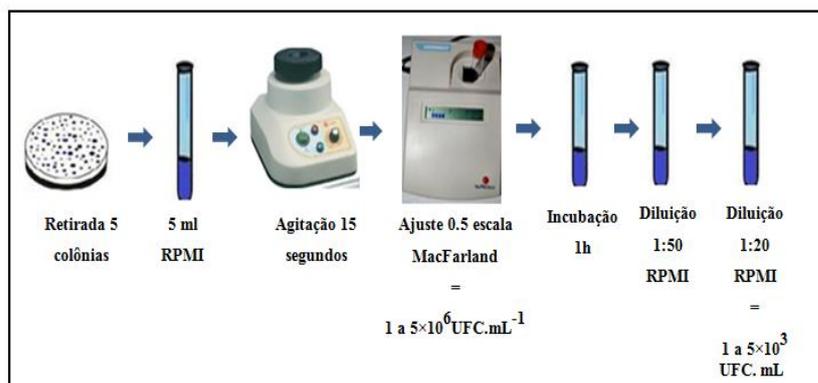


Figura 26: Esquema de preparo do inóculo das leveduras.

Fonte: Autora.

4.4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Os ensaios antifúngicos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, segundo metodologia descrita nas normas M38-A (CLSI, 2008) e M27-A2 (CLSI, 2008a), para fungos filamentosos e para leveduras, respectivamente.

As diluições da solução padrão de OEPA e dilapiol foram preparadas separadamente em *ependorf* nas concentrações desejadas, conforme descrita anteriormente. Assim, na placa de microdiluição de 96 poços (Corning), adicionou-se 100µl do inóculo e mais 100µl de cada diluição dos compostos vegetais. Os controles receberam 100µl do inóculo e 100µl do controle positivo

anfotericina B (cristália) na concentração de 10mg/ml, 100µl do controle negativo Tween 20 (Interlab) e 100µl do meio RPMI no poço do inóculo, obtendo-se um volume final de 200µl em todos os poços.

A incubação das placas ocorreu à temperatura ambiente por 48 horas para os fungos dermatófitos, a 35°C por 24 horas para as leveduras e a 37°C por 24 horas para *A. fumigatus*. Os ensaios foram realizados em triplicata (Figura 27).

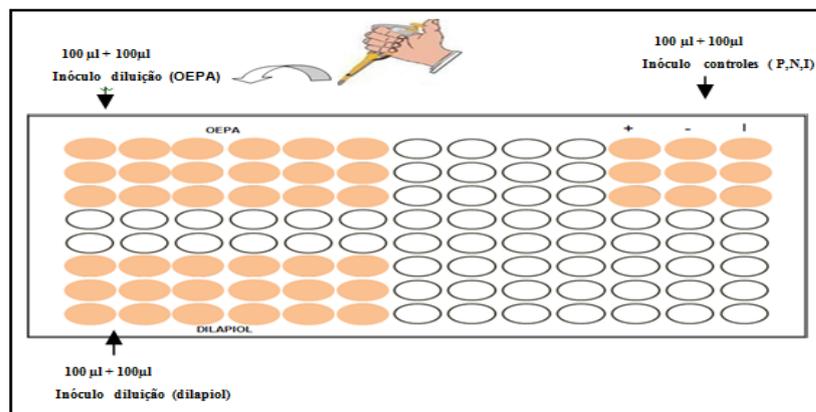


Figura 27: Esquema de microdiluição.

Fonte: Autora.

Após esse período foi adicionado a cada poço 30µl de resazurina 0,01% (Sigma Aldrich, Brasil), incubando-se novamente a placa por três horas. Em seguida, foi realizada a leitura visual para identificação da CIM, considerando-se a manutenção da coloração azul como ausência de crescimento (Figura 28).

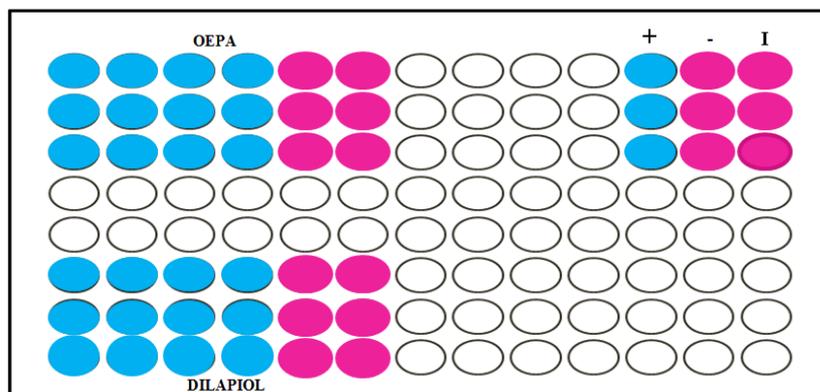


Figura 28: Visualização da CIM.

Fonte: Autora.

4.4.3 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

A CFM dos fungos filamentosos foi realizada através da técnica do *pour plate*, na qual foram adicionados 10µl do conteúdo de cada poço sobre uma placa de Petri descartável, adicionando-se aproximadamente 20mL de ASD seguida de homogeneização. Essas placas foram incubadas por 72 horas para os FFD e por 24 horas para os FFND. No caso das leveduras a CFM foi obtida pelo método de semeadura, retirando-se uma alíquota de 10 µL do conteúdo dos poços, seguidas de espalhamento em placas de Petri previamente preparadas com ASD e incubadas em estufa a 35°C por 24 h (Figura 29).

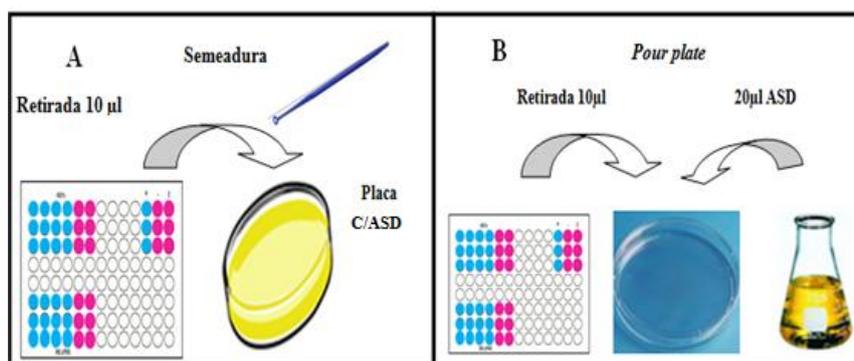


Figura 29: Esquema da CFM (A) leveduras (B) fungos filamentosos.
Fonte: Autora.

Posteriormente as UFC's foram contadas, na qual a CFM foi considerada a menor concentração dos compostos que resultou em ausência de crescimento ou o aparecimento de menos de três colônias, eliminando 99,9% dos micro-organismos (QUADROS et al, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do OEPA e purificação do dilapiol

Piper aduncum é uma espécie conhecida na região amazônica como pimenta-de-macaco, sendo identificadas em seu OE diversas atividades farmacológicas, dentre elas podemos citar a atividade antimicrobiana, sendo essa propriedade atribuída ao dilapiol seu componente majoritário (BASTOS, 1997; MAIA et al, 1998; ALMEIDA et al, 2009).

O OEPA foi obtido com um rendimento de 3,0% e seu constituinte majoritário foi o dilapiol (85,81%), seguido de outros constituintes como (E)- β -cariofileno (3,76%) e a miristicina com 1,41%, apresentados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1- Porcentagem (%) dos constituintes identificados no OEPA e seus respectivos índices de retenção

Constituintes	ÍRCalc.	IRLit.	OEPA %	Dilapiol %
α -Pinoeno	928	932	0,41	
p-Cimeno	1018	1020	0,12	
(E)- β -Ocimeno	1038	1044	0,12	
Ciclosativeno	1368	1369	0,11	
α -Copaeno	1369	1374	0,37	
β -Elemeno	1383	1389	0,12	
(E)-Cariofileno	1411	1417	3,76	
α -Humuleno	1447	1452	0,48	
Allo-Aromadendreno	1448	1458	0,14	
Germacreno D	1473	1484	0,30	
β -Selineno	1487	1489	0,37	
Pentadecano	1496	1500	1,52	
γ -Cadineno	1507	1513	0,35	
Miristicina	1512	1517	1,41	0,12
α -Calacoreno	1536	1544	0,11	
Elemicina	1542	1555	0,13	
(E)-Nerolidol	1555	1562	0,20	

Espatulenol	1567	1577	0,27	
Óxido de Cariofileno	1572	1582	0,70	0,10
Globulol	1584	1590	0,40	
Epóxido de Humuleno II	1599	1608	0,10	
Dilapiol	1615	1620	85,81	99,48
epi-α-Muurolol	1626	1640	0,13	
α-Muurolol	1634	1644	0,17	
Apiol	1665	1677	0,32	0,30
Total			97,92	100,00

IRCalc. = Índice de retenção calculado; IRLit. = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007).

O OEPA foi submetido a processo cromatográfico em coluna para aumento da pureza do dilapiol, com a finalidade de se avaliar a atividade antifúngica *in vitro* deste composto, bem como do próprio OEPA. Foram usados 10g desse óleo, obtendo-se 6g de dilapiol nas frações 48 (4.5g) e 49 (1.5g), com 99,48% de pureza. A análise por CG e CG-EM do concentrado de dilapiol encontra-se na Tabela 1.

Existem variações na composição do OEPA. Especificamente já foram mencionados dois quimiotipos distintos, um na Amazônia brasileira rico em dilapiol e outro na Mata atlântica brasileira rico em (E)-nerolidol e linalol (ALMEIDA et al, 2009). Atribui-se essa variabilidade a ampla distribuição dessa espécie na natureza e, conseqüentemente, pelo contato com fatores ambientais distintos como: clima, estação do ano, condições geográficas, período de colheita e ainda o processo de obtenção (ALMEIDA et al, 2009; GAIA et al, 2010; POTZERNHEIM et al, 2012).

A ocorrência de quimiotipos ou raças químicas diferentes (espécimes idênticos botanicamente e distintos quimicamente) são comuns na natureza e podem interferir na atividade biológica dos OE's (LAHLOU, 2004; FIUZA e KNAAK, 2010). Especificamente no caso da atividade antimicrobiana, os diferentes quimiotipos de OE's interferem na inibição do crescimento bacteriano e fúngico, implicando diretamente na presença ou não da atividade antimicrobiana pesquisada (MARINO, 2001).

5.2 Atividade antimicrobiana

5.2.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A bactéria *S. aureus* é a principal causadora de infecções na pele e possui múltiplos fatores de virulência ocasionando também processos infecciosos sistêmicos. Nos últimos anos, têm surgido cepas multirresistentes de *S. aureus*, tornando difícil o tratamento das infecções ocasionadas por esse patógeno (LOWY, 1998; ZAVADINACK et al, 2001). Nesse sentido, os OE's vêm passando por intensa investigação pela comunidade científica, tendo em vista que há muito tempo estes compostos são utilizados na medicina popular para diversas finalidades terapêuticas e, dentre estas as mais conhecidas são as propriedades antimicrobianas (NASCIMENTO et al, 2007).

Neste trabalho, os resultados obtidos frente à cepa de *S. aureus* (ATCC 6538) mostraram que o OEPA e o dilapiol não apresentam atividade antibacteriana nas concentrações utilizadas (Figura 30). A cor rosa indica presença de células viáveis ou crescimento bacteriano, enquanto a cor azul ausência de células viáveis ou ausência de crescimento bacteriano, como descrito anteriormente na metodologia.

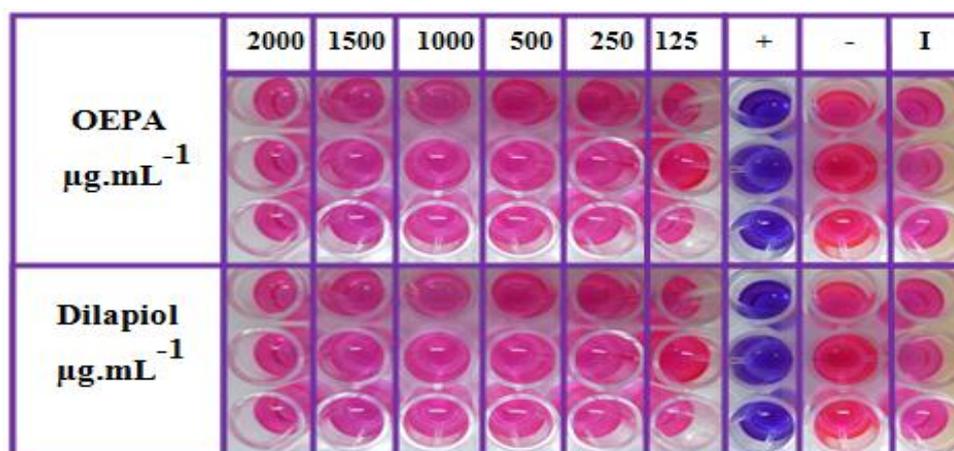


Figura 30: Resultado da microdiluição de *S. aureus*. Ao lado direito os controles: positivo (cloranfenicol), negativo (Tween 20) e o inóculo (caldo Mueller-Hinton).

A atividade antibacteriana do OEPA frente a *S. aureus* foi testada por alguns autores, como o realizado com OEPA do Equador através do método de

disco difusão, cujo dilapiol era o seu constituinte principal (45,92%). Neste ensaio, o óleo não apresentou atividade frente a esse micro-organismo corroborando com os resultados deste experimento (GUERRINI et al, 2009).

Por outro lado, outros trabalhos encontraram resultados diferentes aos obtidos em neste estudo, como o realizado com um OEPA do Brasil, cujo constituinte majoritário também era o dilapiol (76,5%), através do método de contagem de UFC (BRAZÃO et al, 2014). Os autores mostraram que o OEPA apresentou atividade antibacteriana frente às bactérias gram-positivas, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC12228, com valores de CIM variando de 250 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O dilapiol purificado (94,6%) também foi testado, mostrando atividade frente a *S. aureus* com a CIM de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e não apresentando resultado satisfatória frente a *S. epidermidis*.

Essas variações nos resultados podem ser explicadas por diversos fatores, tais como diferentes composições dos tipos de extratos e óleos essenciais das plantas, diferentes técnicas aplicadas, meios de cultura utilizados, variações no pH, nas condições de crescimento (aeróbico e anaeróbico), e no tempo de incubação dos micro-organismos cultivados, assim como no tamanho do inóculo (OSTROSKY et al, 2008).

No caso específico do OEPA do Brasil, neste trabalho o percentual de dilapiol foi bastante elevado (85,81%), seguidos do (E)- β -cariofileno (3,76%) e da miristicina (1,41%). Enquanto que no estudo de Brazão e colaboradores (2014), o dilapiol (76,5%) apresentou-se em menor concentração. Destacando-se também o percentual de dois constituintes a piperitona (6,1%) e a miristicina (2,1%). A literatura relata o (E)- β -cariofileno, a piperitona e a miristicina com importantes propriedades antibacterianas (NARASIMHAN e DHAKE, 2006; KIM et al, 2008; MAHBOUBI e HAGHI, 2008).

Dessa forma, o maior teor desses outros constituintes do OEPA dos autores acima citados, ajude a explicar a ação antibacteriana apresentada por esse óleo. Por outro, a presença majoritária do dilapiol no OEPA deste estudo, justifique a ausência de atividade antibacteriana pesquisada, mostrando que o dilapiol sozinho não é o responsável por essa atividade, mas sim o sinergismo dos componentes desse óleo.

Outros ensaios mostraram que o extrato alcoólico de *P. aduncum* apresentou propriedades antibacterianas frente a vários micro-organismos incluindo *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans*, *Intracellulare micobactérias*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, essa atividade parece estar relacionada aos ácidos p-hidroxibenzóico, derivados dihidrochalconas e cromenos, principais constituintes presentes no extrato alcoólico (NAIR e BURKE, 1990; ORJALA et al, 1993; ORJALA et al, 1994; OKUNADE et al, 1997; LENTZ et al, 1998; KLOUCEK et al, 2005; BRAZÃO et al, 2014) e não ao dilapiol que é o principal constituinte do OEPA, como discutido anteriormente.

Muitos trabalhos apontam a maior atividade de OE's contra bactérias gram-positivas do que contra as gram-negativas. Este fato é justificado principalmente pela lipofilicidade dos OE's e algumas diferenças principalmente na estrutura da parede celular e no arranjo das membranas externas das bactérias gram-positivas e gram-negativas (KALEMBA e KUNICKA, 2003; LANG e BUCHBAUER, 2011).

Os OE's atuam diretamente na membrana das bactérias gram-positivas que são mais lipofílicas, promovendo sua ruptura, bloqueando enzimas e interferindo na permeabilidade iônica (KALEMBA e KUNICKA, 2003). Em contra partida, não conseguem penetrar nas bactérias gram-negativas, pois sua membrana externa hidrofílica possui moléculas de lipopolissacarídeos e porfirinas que permitem a passagem de moléculas pequenas hidrofílicas e impedem a passagem de macromoléculas lipofílicas, como os OE's (LANG e BUCHBAUER, 2011).

Por outro lado, alguns autores relatam que os OE's são mais ativos contra fungos do que contra bactérias. Em média 60% dos OE's possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas, dados esses que corroboram com os resultados encontrados em nossos estudos (HOLLEY e PATEL, 2005).

5.2.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

As Figuras 31 e 32 mostram que o OEPA e o dilapiol apresentaram ação antifúngica frente a *T. mentagrophytes* (ATCC 9533), sendo que o valor da CIM foi similar entre os compostos (CIM=500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Figura 31). Entretanto, o CFM diferiu entre os grupos, com valor de CFM de 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para OEPA e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o dilapiol (Figura 32), mostrando que o composto purificado (dilapiol) apresentou melhor ação antifúngica do que o OE.

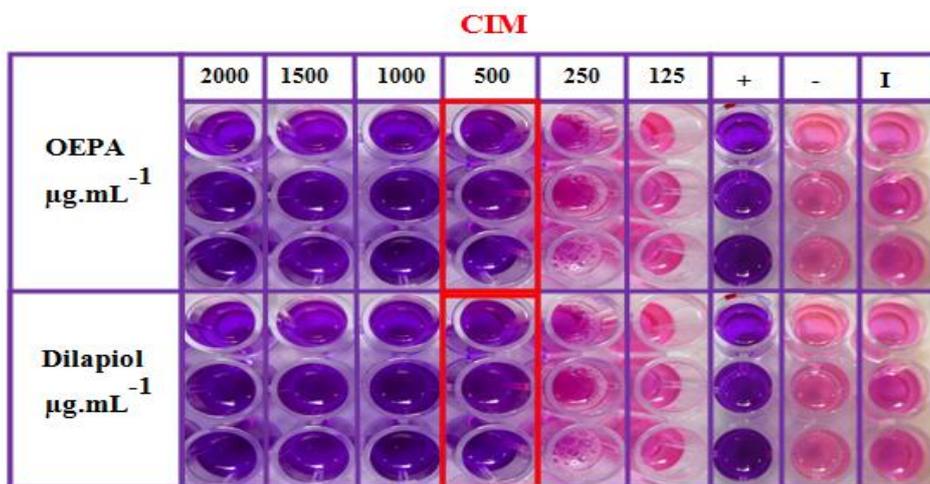


Figura 31: Resultado da microdiluição de *T. mentagrophytes* ATCC 9533: Valores de CIM de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (a cima) e o dilapiol (abaixo). Ao lado direito os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

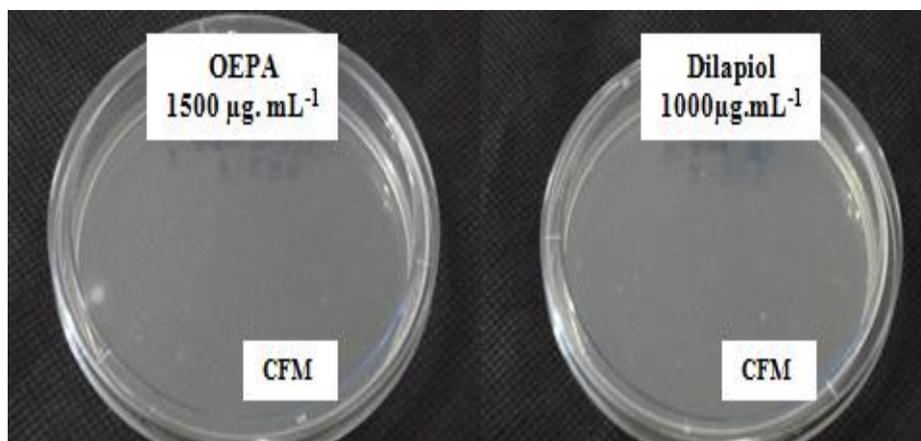


Figura 32: Resultado da CFM de *T. mentagrophytes* ATCC 9533: Valores da CFM de 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (à esquerda) e de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do dilapiol (à direita).

O resultado da atividade antifúngica do isolado clínico de *T. mentagrophytes* foi semelhante ao da cepa ATCC, visto que o valor de CIM do OEPA e do dilapiol foi de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 33) e o dilapiol apresentou um melhor resultado de CFM de $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto o OEPA apresentou uma CFM de $1500\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 34).

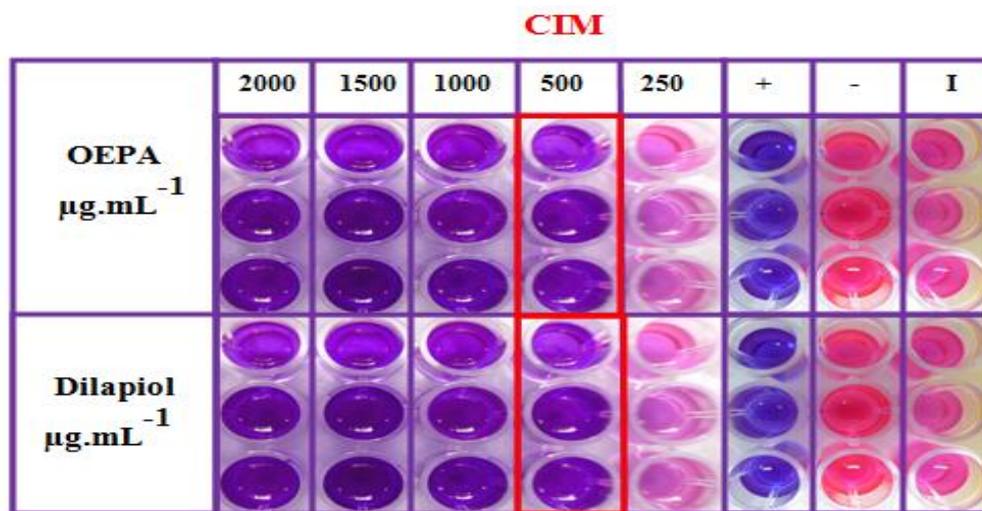


Figura 33: Resultado da microdiluição de *T. mentagrophytes* isolado clínico: Valores de CIM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (a cima) e do dilapiol (abaixo). Ao lado direito os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

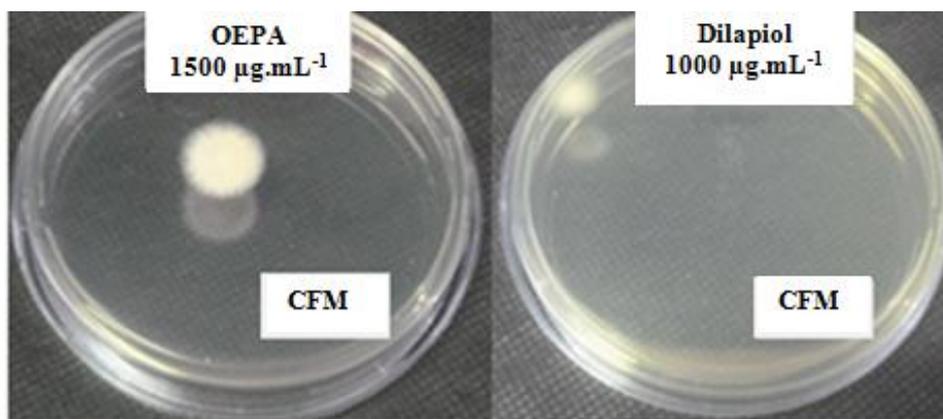


Figura 34: Resultado da CFM de *T. mentagrophytes* isolado clínico: Valores da CFM de $1500\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (à esquerda) e de $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ do dilapiol (à direita).

O OEPA e o dilapiol também apresentaram ação antifúngica frente a *T. rubrum* isolado clínico, sendo que o valor de CIM foi semelhante entre ambos (CIM=500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Figura 35). Similarmente ao ocorrido a CIM, os compostos apresentaram o mesmo valor de CFM (1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Figura 36).

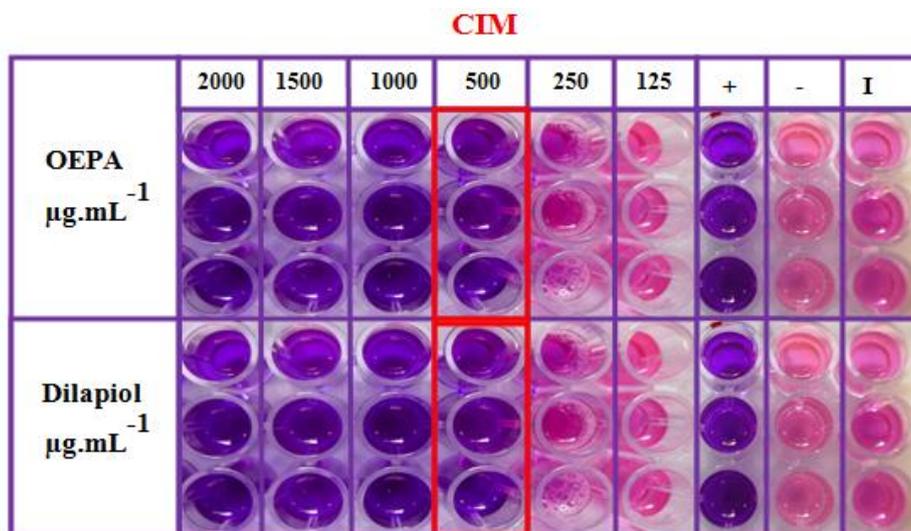


Figura 35: Resultado da microdiluição de *T. rubrum* isolado clínico: Valores da CIM de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (a cima) e do dilapiol (abaixo). Ao lado os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

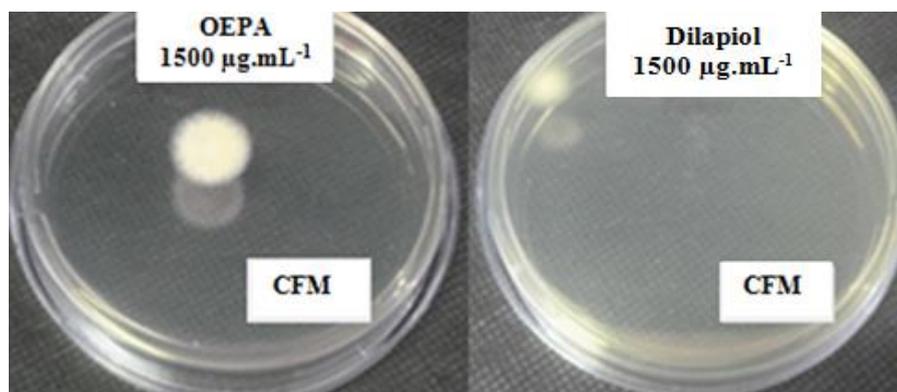


Figura 36: Resultado da CFM de *T. rubrum* isolado clínico: Valores da CFM de 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (à esquerda) e do dilapiol (à direita).

O resultado da atividade antifúngica do isolado clínico de *M. canis* está ilustrado nas figuras 37 e 38, revelando novamente semelhanças nos valores da CIM (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e do CFM (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) entre o OEPA e o dilapiol (Figuras 37 e 38).

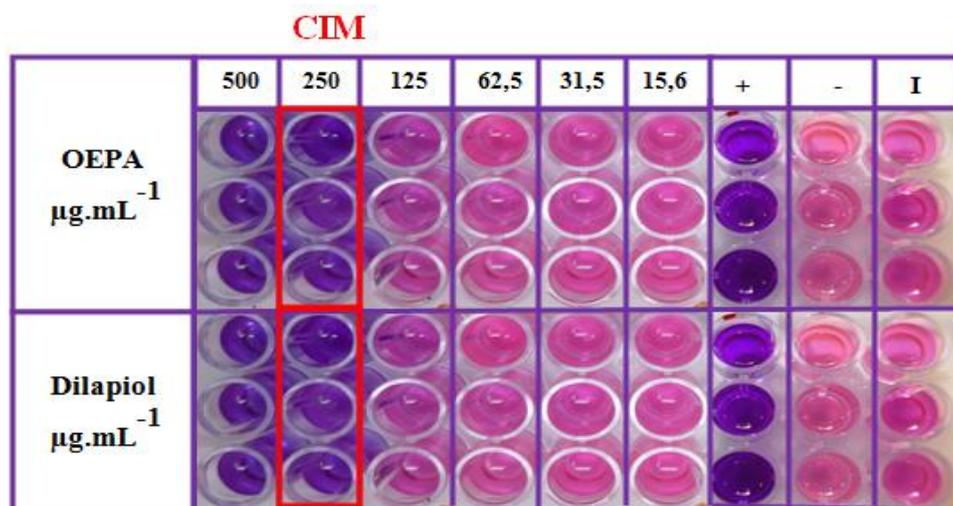


Figura 37: Resultado da microdiluição de *M.canis* isolado clínico: Valores da CIM de $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (a cima) e do dilapiol (abaixo). Ao lado os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

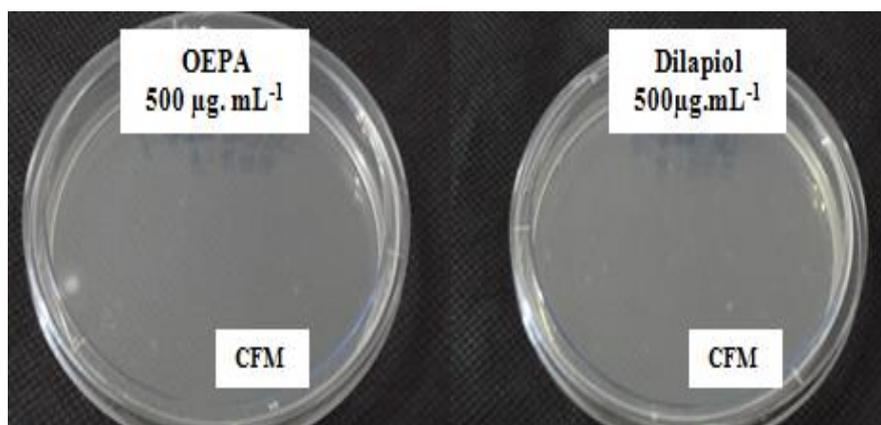


Figura 38: Resultado da CFM de *M. canis* isolado clínico: Valores da CFM $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (à esquerda) e do dilapiol (à direita).

Ação antifúngica do OEPA e do dilapiol frente a *M. gypseum* isolado clínico está representada nas figuras 39 e 40. Os valores de CIM e CFM foram iguais entre os compostos. Os valores da CIM corresponderam a $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 39) e de CFM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 40).

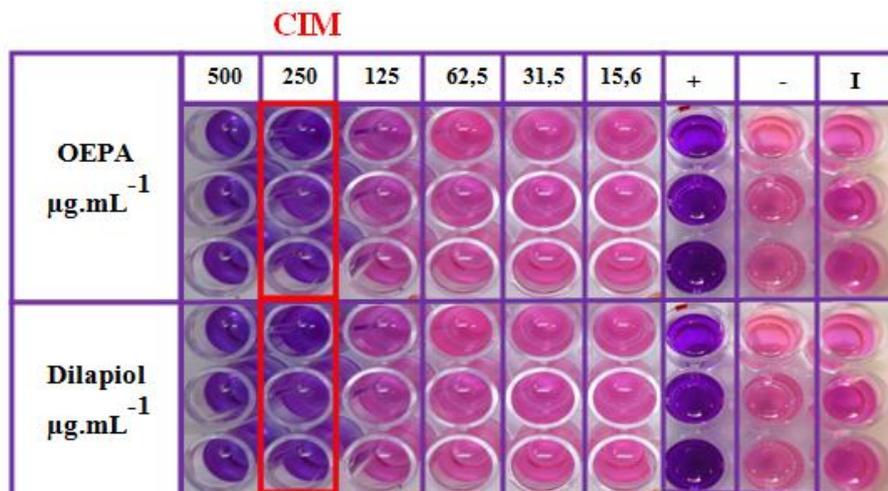


Figura 39: Resultado da microdiluição do *M. gypseum* isolado clínico: Valores da CIM de $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (a cima) e do dilapiol (abaixo). Ao lado os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

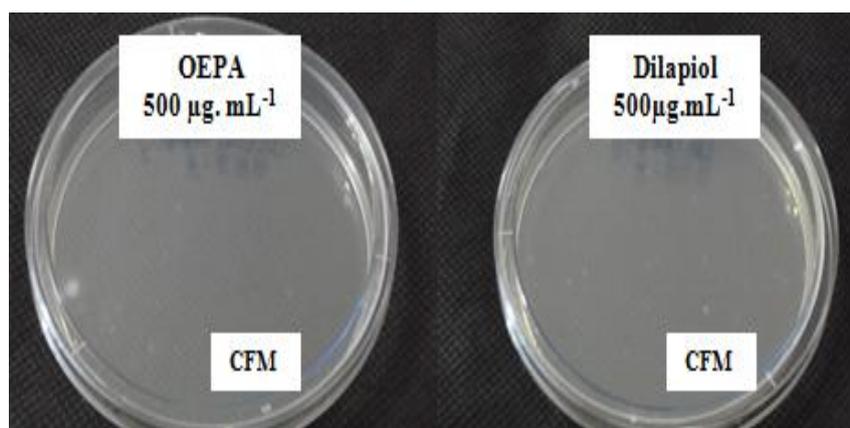


Figura 40: Resultado da CFM do *M. gypseum* isolado clínico: Valores da CFM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (à esquerda) e do dilapiol (à direita).

O OEPA e o dilapiol apresentaram atividade antifúngica frente à cepa de isolado clínico de *E. floccosum*, com os mesmos valores de CIM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ (figura 41) e CFM de $1500\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 42).

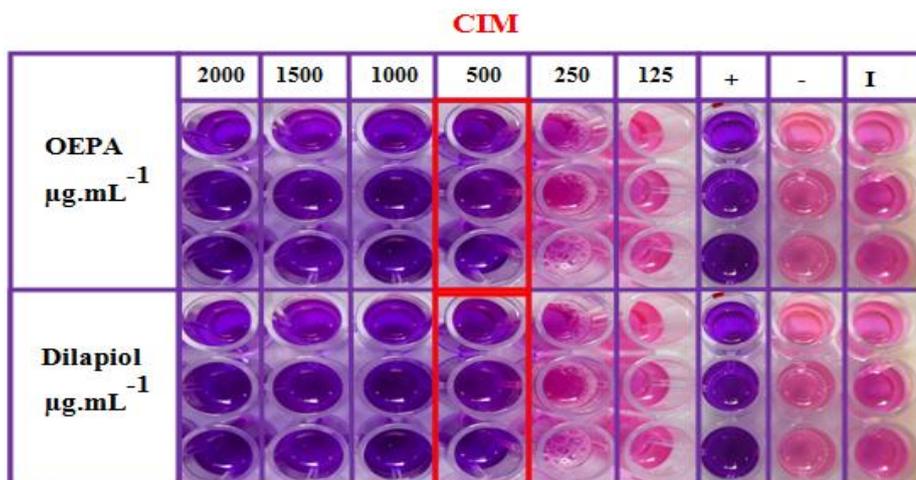


Figura 41: Resultado da microdiluição de *E. floccosum* isolado clínico: Valores da CIM de 500 do OEPA (a cima) e do dilapiol (abaixo). Ao lado os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

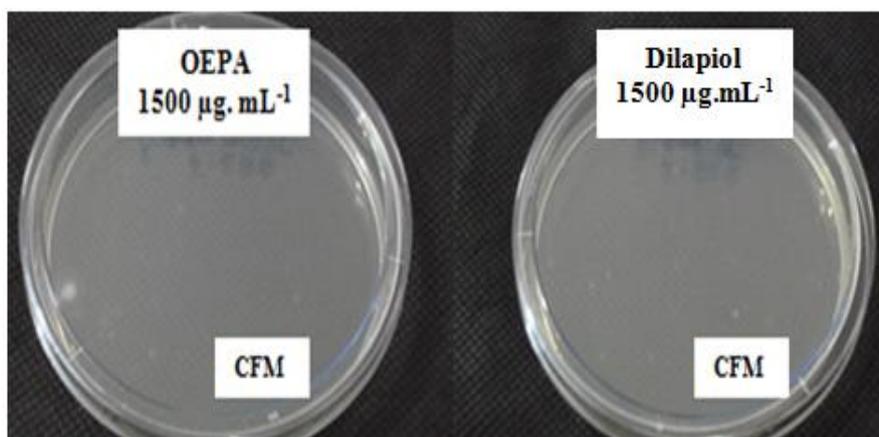


Figura 42: Resultado da CFM de *E. floccosum* isolado clínico: Valores da CFM de $1500\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (à esquerda) e do dilapiol (à direita).

A maior parte dos trabalhos sobre os OE's são referentes à sua atividade antimicrobiana, devido à função de defesa que exercem nos vegetais contra micro-organismos como bactérias e fungos (SIANI et al, 2002). Essa propriedade é facilitada pela sua elevada volatilidade permitindo uma esfera considerada de difusão, bem como elevada lipofilicidade associada ao baixo peso molecular, possibilitando a penetração nas membranas biológicas de vários patógenos (INOUE, 2003).

A família das Piperáceas possui reconhecida atividade antimicrobiana (BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004; REGASINI et al, 2009; SANTOS et al, 2013), destacando-se a atividade antifúngica de muitas espécies com seus

constituintes já identificados, como as amidas de *Piper tuberculatum* (NAVICKIENE et al, 2000) e *Piper arboreum* (SILVA et al, 2001), os ácidos benzóicos prenilados de *Piper aduncum* e *Piper gaudichaudianum* (BALDOQUI et al, 1999; LAGO et al, 2004) e os piperolídeos de *Piper malacophyllum* (LAGO et al, 2005).

As espécies de *Piper* presentes na região amazônica são ricas em fenilpropanóides como safrol, dilapiol, miristicina, elemicina e 3,4-metilenedioxipropiophenona ou em terpenos como β -cariofileno, espatulenol, (E)-nerolidol, biciclogermacreno e α -cadinol, sendo todas elas com propriedades antifúngicas comprovadas (MAIA e ANDRADE, 2009). O OEPA em especial possui reconhecida ação sobre muitos fungos fitopatógenos como *Clinipellis pernicioso* (vassoura de bruxa), um importante fungo que promove infecção no cacau (BASTOS, 1997); *Fusarium solani* espécie patogênico da pimenta (BENCHIMOL et al, 2001); e *Colletotricum musae* causador de doenças em bananeiras (BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004).

Os resultados da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol frente aos dermatófitos (Tabela 2 e Figura 43) mostram a diferença existente entre os valores da CIM e CFM. A CIM apresentou menores valores em relação ao CFM, indicando a ação fungistática de ambos os compostos naturais frente a esses micro-organismos.

Tabela 2- Resultado da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol frente aos FFD com valores da CIM e da CFM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Cepas	OEPA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		Dilapiol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	CIM-Pa	CFM-Pa	CIM-d	CFM-d
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC	500	1500	500	1000
<i>T. mentagrophytes</i> *	500	1500	500	1000
<i>T. rubrum</i> *	500	1500	500	1500
<i>M. canis</i> *	250	500	250	500
<i>M. gypseum</i> *	250	500	250	500
<i>E. floccosum</i> *	500	1500	500	1500

*Isolado clínico

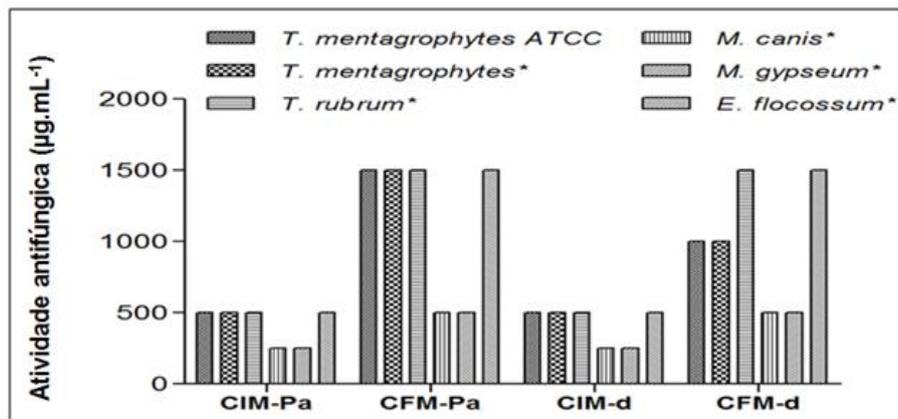


Figura 43: Representação gráfica da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol Frente aos FFD.

A ação antifúngica do OEPA frente a cepas de fungos filamentosos, principalmente dermatófitos foi pouco realizada. Entretanto, em ensaios envolvendo a cepa de *T. mentagrophytes* ATCC 16066, o OEPA demonstrou sua ação antifúngica com valor de CIM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$, através do método de disco difusão (GUERRINI et al, 2009). O OEPA dos autores citados também possuía dilapiol em elevado teor, corroborando com os resultados deste experimento frente a essa espécie. A literatura não relata experimentos envolvendo a atividade antifúngica frente a cepas patogênicas com o dilapiol purificado, sendo este um trabalho inédito. Portanto, não foi possível relacionar os dados sobre o dilapiol deste estudo com de outros autores.

A atividade antidermatófitos de *P. aduncum* na forma de extrato etanólico foi mais estudada do que do OE, como do experimento envolvendo a cepa de *T. mentagrophytes* (ATCC 9972) através do método de disco difusão. Os resultados mostraram uma CIM de $12\mu\text{g.mL}^{-1}$, valor bem menor se comparado ao obtido em neste ensaio. Nesse mesmo trabalho, foram isolados 3 componentes do extrato etanólico de *P. aduncum*, sendo 2,6-di-hidroxi-4-metoxi-calcona, ácido nervogênico e 2,2 - dimetoxi-8- (3-metil-2-butenil) -2H-chromene-Ácido 6-carboxílico (LENTZ et al,1998), todavia nenhum deles apresentou atividade diante deste fungo nas concentrações utilizadas ($1-100\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O extrato etanólico de *P. aduncum* também foi testado em outro ensaio, novamente através do método de microdiluição dessa vez frente a

várias cepas de *T. rubrum*. Os valores de CIM encontrados foram de $0,31\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CFM $0,62\mu\text{g.mL}^{-1}$, concentrações menores se comparados as encontradas neste trabalho (SANTOS et al, 2013). Os principais constituintes do extrato relatados pelos autores foram germacreno D, nerolidol e o δ -cardineno.

As espécies do gênero *Piper* tiveram também sua atividade testada frente aos fungos dermatófitos, como no experimento envolvendo o extrato de várias frações de *P. solmsianum* (método de difusão em ágar), frente a diversas cepas destes fungos. A média de CIM encontrada para o *T. mentagrophytes* foi de $20\text{-}500\mu\text{g.mL}^{-1}$, para o *T. rubrum* de $60\text{-}300\mu\text{g.mL}^{-1}$, *M. canis* $20\text{-}40\mu\text{g.mL}^{-1}$, *M. gypseum* de $20\text{-}500\mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *E. floccosum* de $20\text{-}300\mu\text{g.mL}^{-1}$ (De CAMPOS et al, 2005). Os resultados obtidos neste estudo diante das espécies de *T. mentagrophytes* e *M. canis* corroboram com os encontrados por esses autores. Por outro lado, os valores frente às cepas *T. rubrum*, *M. canis* e *E. floccosum* encontrados por eles foram menores se comparados aos resultados deste trabalho.

Neste mesmo experimento foi realizada a atividade dos compostos isolados de *P. solmsianum*, sendo eles: eupomatenoide-5, conocarpan e orientin, as quais foram atribuídas à ação antifúngica do extrato, pois os valores da CIM encontrados para esses isolados foram bem menores se comparado com as frações utilizadas.

A ação antidermatófitos dos OE's tem sido comprovada por muitos autores. Em estudo desenvolvido com três amostras do OE de *Origanum vulgare* através do método de microdiluição frente aos fungos *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum*, foram encontrados valores da CIM entre $0,32\text{-}1,25$, $0,16\text{-}1,25$, $0,32\text{-}0,64$, $0,32\text{-}1,25$ e $0,32\text{-}1,25\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (VALE-SILVA et al, 2012). Em outro experimento realizado dessa vez com o OE de *Thymus caespititius* (método de macrodiluição), os valores de CIM foram para *T. mentagrophytes* ($0,32\mu\text{g.mL}^{-1}$), *T. rubrum* ($0,16\mu\text{g.mL}^{-1}$), *M. canis* ($0,16\mu\text{g.mL}$), *M. gypseum* ($0,32\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *E. floccosum* ($0,16\mu\text{g.mL}^{-1}$) (PINTO et al, 2014). Ambos os ensaios obtiveram valores da CIM menores do que o encontrado neste trabalho.

A atividade contra fungos dermatófitos de constituintes isolados de OE também tem sido realizada. Os compostos isolados neral, nerol, genaral,

geraniol e citral foram estudados através do método de microdiluição, frente às cepas de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum*. Todos os compostos apresentaram atividade diante de todas as cepas testadas, com médias de CIM na faixa de 4-128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (MIRON et al, 2014). Os valores citados por esses autores foram menores se comparados ao encontrado neste ensaio.

A análise química das espécies *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum*, apontou perfis de composição da parede muito semelhantes entre eles com N-acetilhexosaminas representando 26 a 31% da massa da parede, glucose a 36 a 46%, a manose varia de 8 a 11%, e proteína em cerca de 7% (HECTOR, 1993). Um dos prováveis mecanismos de ação do OE é sobre a parede celular dos fungos, que é composta principal por quitina, glucanos e glicopeptídeos. Ele agiria destruindo componentes da parede celular e membrana celular, provocando a fuga de seus constituintes para o citoplasma e sua consequente coagulação (WAGNER e SOHNLE, 1995; KALEMBA e KUNICKA, 2003).

Os resultados obtidos frente aos fungos dermatófitos indicam também a semelhança de valores da CIM e CFM entre as espécies *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccosum*, bem como entre as espécies *M. canis* e *M. gypseum*. Porém, as cepas do gênero *Trichophyton* e *Epidermophyton* apresentaram maiores valores de CIM e CFM em relação ao gênero *Microsporum*.

A explicação para esse resultado seria a hipótese de que as espécies antropofílicas como *T. rubrum* e *E. floccosum* são mais resistentes aos antifúngicos por terem a capacidade de provocar imunossupressão através das mananas presentes na sua parede celular, silenciando a resposta imune dos hospedeiros, exibindo maiores valores de CIM e CFM do que as espécies zoofílicas (*M. canis*) e geofílicas (*M. gypseum*) (ALMEIDA et al 2009a; URIBE e CARDONA-CASTRO, 2013). Quanto à espécie *T. mentagrophytes*, sua ecologia é variável depende da subespécie a qual pertença, podendo ser tanto antropofílica se sua subespécie for *interdigitale* ou zoofílica se for da subespécie *mentagrophytes* (URIBE e CARDONA-CASTRO, 2013).

Nos ensaios com o FFND *A. fumigatus* (ATCC 40152), o OEPA e o dilapiol apresentaram os mesmos valores de CIM de $3.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e da CFM de $7.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 44 e Figura 45).

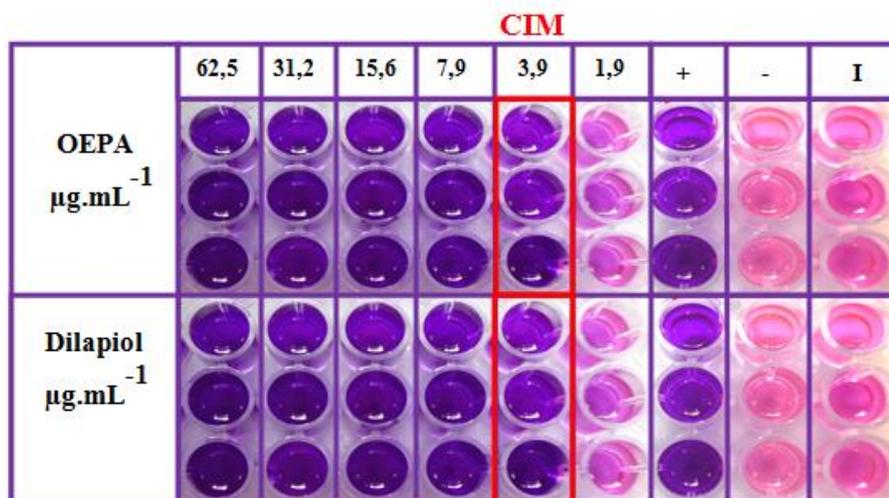


Figura 44: Resultado da microdiluição de *A. fumigatus* ATCC: Valores da CIM de $3,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (a cima) e do dilapiol (abaixo). Ao lado direito os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

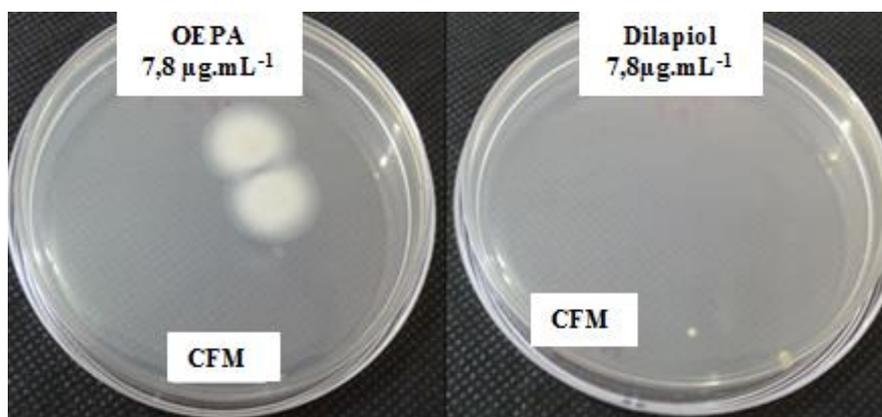


Figura 45: Resultado da CFM de *A. fumigatus* ATCC: Valores da CFM de $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (à esquerda) e do dilapiol (à direita).

A ação antifúngica do OEPA e o dilapiol frente ao isolado clínico de *A. fumigatus* está representada nas Figuras 46 e 47, onde os valores de CIM de $3.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e CFM de $15.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram iguais para os compostos.

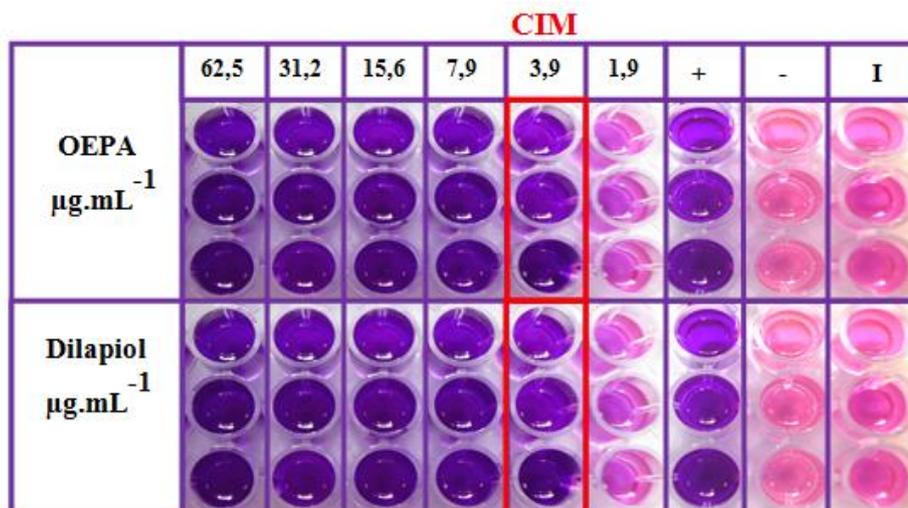


Figura 46: Resultado da microdiluição de *A. fumigatus* isolado clínico: Valores da CIM de $3,9\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA (acima) e do dilapiol (abaixo). Ao lado direito os controles: positivo (anfotericina B), negativo (Tween 20) e o inóculo (RPMI 1640).

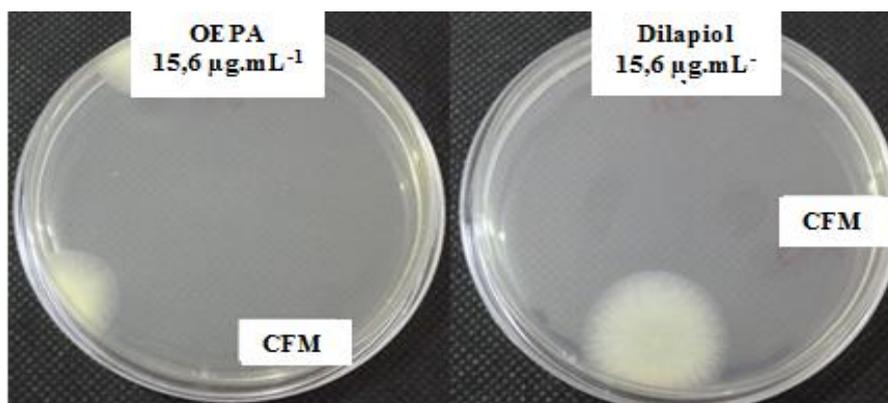


Figura 47: Resultado da CFM de *A. fumigatus* isolado clínico: Valores da CFM de $15,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ do OEPA e do dilapiol.

Os resultados da atividade antifúngica do OEPA e dilapiol contra FFND *A. fumigatus* (Tabela 3 e Figura 48) demonstraram novamente a ação fungistática desses compostos, com valores de CIM menores do que a CFM.

Tabela 3- Resultado da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol frente ao FFND com valores da CIM e CFM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Cepas	OEPA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		Dilapiol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	CIM-Pa	CFM-Pa	CIM-d	CFM-d
<i>A. fumigatus</i> ATCC	3,9	7,8	3,9	7,8
<i>A. fumigatus</i> *	3,9	15,6	3,9	15,6

* Isolado clínico

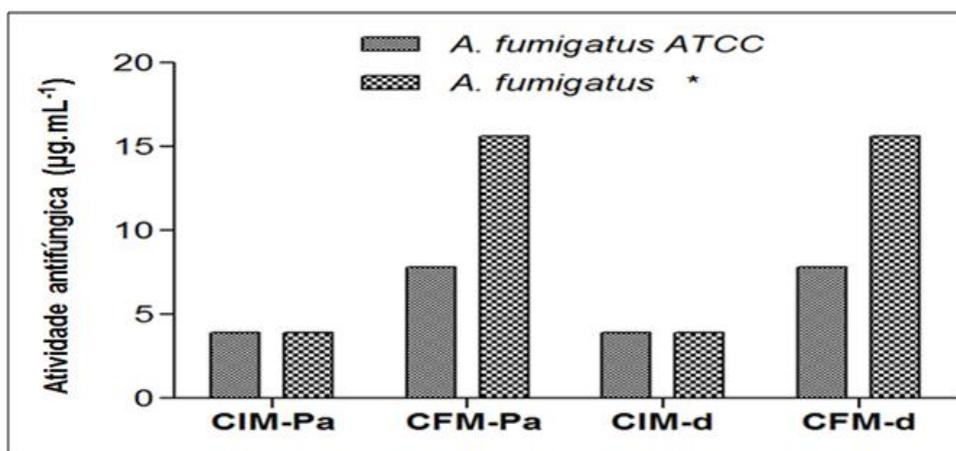


Figura 48: Representação gráfica da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol frente ao FFND *A. fumigatus* ATCC e isolado clínico.

O OEPA não teve sua atividade antifúngica frente *A. fumigatus* muito verificada, porém em estudos realizados com o OE dessa espécie e mais oito espécies de *Piper* (*P. sanctifelisis*, *P. auritum*, *P. bogotense*, *P. michita*, *P. friedestalina*, *P. brachypodom* e duas *Piper spp.*) através do método de microdiluição, o OEPA não apresentou atividade dentro das concentrações utilizadas ($500-31,25\mu\text{g.mL}^{-1}$), divergindo dos resultados encontrados neste ensaio. Dentre as espécies de *Piper* analisadas somente *P.bogotense* apresentou atividade com uma CIM de $125\mu\text{g.mL}^{-1}$. Não foram apontados nesse experimento os componentes químicos desses óleos (MESA et al, 2007).

O extrato de *P. aduncum* também foi analisado quanto a sua ação antifúngica diante de *A. fumigatus*. O extrato etanólico dessa planta foi testado através da técnica de disco difusão não apresentando atividade nas concentrações utilizadas ($1-100\mu\text{g.mL}^{-1}$), divergindo novamente dos resultados

obtidos em neste estudo. Nesse mesmo ensaio foram isolados do extrato os compostos 2,6-di-hidroxi-4-metoxi-calcona, ácido nervogênico e 2,2 - dimetoxi-8- (3-metil-2-butenil) -2H-chromene-Ácido 6-carboxílico, todavia nenhum deles demonstrou atividade frente a esse fungo (LENTZ et al, 1998).

Por outro lado, em outra atividade desenvolvida com o extrato de *P. aduncum* frente a *A. fumigatus* através do método de microdiluição, o valor da CIM ($1000\mu\text{g.mL}^{-1}$) se mostrou bem mais alta se comparado ao encontrado neste experimento. Os autores não relataram a composição do extrato (SVETAZ et al, 2010).

Os OE's de outras plantas tiveram sua ação antifúngica frente a *A. fumigatus* também comprovada, como em ensaios realizados com três amostras do OE de *Origanum vulgare* através da técnica de macrodiluição, onde a CIM dessas amostras ficou estabelecida na faixa de $0,32-0,64\mu\text{g.mL}^{-1}$ (VALE-SILVA et al, 2012). Assim como, em estudos realizados com OE de *Thymus caespitius* e seu constituinte majoritário α - terpineol, onde eles apresentaram a CIM na faixa de $1,25-2,5\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,32-0,64\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (PINTO et al, 2014). Os valores de CIM de ambos os ensaios foram menores se comparados ao encontrados neste trabalho.

Os resultados deste trabalho frente aos FFD e FFND sugerem que o dilapiol seja o responsável pela ação antifúngica do OEPA, visto que o teor desse constituinte principal se encontra já bastante elevado (85,81%) no OEPA, refletindo-se na semelhança nos valores de CIM e CFM encontrados entre o dilapiol purificado (99,48%) e OEPA em quase todos os ensaios realizados. Este fato é confirmado frente ao fungo *T. mentagrophytes* ATCC e isolado clínico com valores de CFM do dilapiol menores ($1000\mu\text{g.mL}^{-1}$) do que do OEPA ($1500\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Embora outros constituintes com propriedades antimicrobianas como o (E)-cariofileno (3,76%) e a miristicina (0,12%) estejam presentes no OEPA deste estudo, eles parecem não interferirem na atividade pesquisada, pois a literatura aponta esses componentes como tendo potencial antibacteriano e contra leveduras do gênero *Candida* sp. e não frente a fungos filamentosos. Neste estudo o OEPA mostrou ter ação somente contra fungos filamentosos (SABULAL et al, 2006; KIM et al, 2008; SHAFIEI et al, 2012).

Experimentos anteriores realizados com o dilapiol em frações purificadas (95-98,9%), já apontavam este constituinte como o responsável pela ação antifúngica contra o fitopatógeno *Clinipellis pernicioso*, atuando na germinação dos basidiósporos com valor da CIM ($0,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) menor do que do OEPA (CIM de $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (ALMEIDA et al, 2009).

Os dados obtidos mostraram também a diferença existente entre os valores de CIM e CFM dos FFD e FFND, onde esses valores frente aos FFND foram bem menores em relação aos FFD. Essa diferença é devido a maior patogenicidade dos dermatófitos pelos inúmeros fatores de virulência disponíveis, relacionados ao processo de adesão e invasão do tecido do hospedeiro, tornando-os fungos mais especializados e, portanto, mais patogênicos, exigindo maiores valores de CIM e CFM.

Um exemplo são os fungos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, ao expressarem na superfície adesinas fibrilares específicas que reconhecem e se ligam aos resíduos de manose e galactose na superfície celular. Essas estruturas são responsáveis por fazer a ancoragem correta desses fungos a células hospedeiras e impedir que eles sejam desconectados por agressões externas como o ato de coçar (URIBE e CARDONA-CASTRO, 2013).

Em relação ao processo de invasão, os dermatófitos se sobressaem do *A. fumigatus* pela sua capacidade lipolítica, que se traduz na liberação de enzimas extracelulares como lipases e fosfolipases quando ocorre o contato com os lipídeos do tecido do hospedeiro facilitando o processo de invasão. Eles possuem também uma substância chamada manana, um componente glicoproteico específico da parede celular desses fungos, que promovem a supressão da resposta inflamatória e da proliferação celular do organismo do hospedeiro (PERES et al, 2010).

Os dermatófitos e os fungos do gênero *Aspergillus* possuem em comum a secreção de várias endoproteases e aminopeptidases. Entretanto, os dermatófitos diferem pela secreção de várias endoproteases da subfamília subtilisina (serina proteases S8A) e da família fungalysin (metaloproteases M36). A especificidade dessas endoproteases em degradar substratos de queratina, bem como a multiplicidade delas reflete o alto grau de especialização dos dermatófitos (ZAUGGA et al, 2008).

Esse grau de especialização faz com que esses fungos sejam predominantemente cutâneos e queratinofílicos (usam a queratina como fonte de nutrientes) e por isso são considerados patógenos primários e os principais agentes etiológicos das dermatomicoses. Enquanto que o fungo *A. fumigatus* é uma espécie invasiva e oportunista que se aproveita do estado imunológico do indivíduo para se estabelecer, sendo sua principal entrada no organismo através das vias respiratórias (BAEZA et al, 2007).

Este FFND raramente provoca micose cutânea de forma primária e sim é considerado como um invasor secundário, pois se aproveita de traumas cutâneos ou da queratina já degradada pela presença primária de dermatófitos, como no caso das onicomicoses (SCHECHTMAN, 2008).

Os resultados da atividade antifúngica frente ao fungo leveduriforme *C. albicans* tanto ATCC (10231) quanto isolado clínico, mostraram que o OEPA e o dilapiol não apresentaram atividade nas concentrações utilizadas (Figura 49).

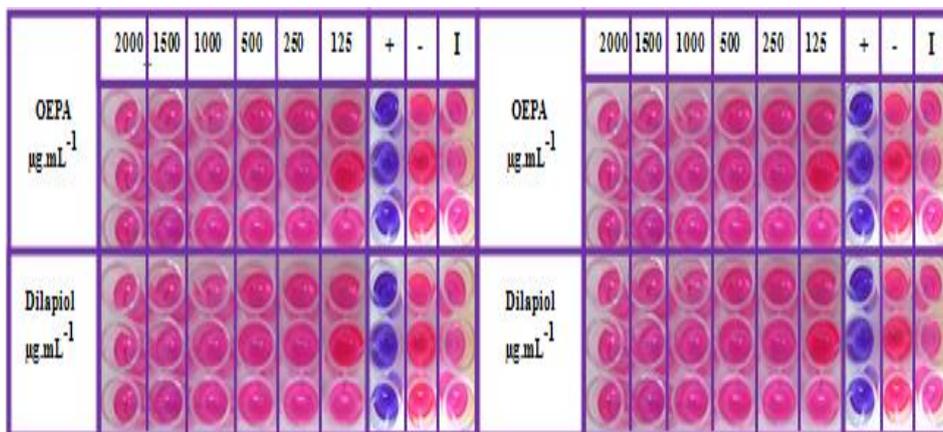


Figura 49: Resultado da microdiluição do OEPA e do dilapiol frente a *C. albicans*:
(A) ATCC (B) Isolado clínico.

Os resultados da atividade antifúngica do OEPA e do dilapiol frente *C. albicans* se encontram na Tabela 4 (abaixo), onde é possível perceber que ambos não demonstraram ação antifúngica frente a esta levedura na faixa de concentração pesquisada.

Tabela 4- Resultado da atividade do OEPA e do dilapiol frente à levedura *C. albicans* com valores da CIM e CFM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Cepas	OEPA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		Dilapiol ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> ATCC	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
<i>C. albicans</i> *	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000

*Isolado clínico

Em estudos realizados sobre a atividade antifúngica do OEPA frente a cepas *C. albicans* ATCC, pelo método de difusão em meio sólido, utilizando-se cavidades em placa, foi constatado que o OEPA não foi capaz de inibir o crescimento dessa levedura nas concentrações utilizadas, corroborando com os resultados deste experimento (MENEZES et al, 2009).

Por outro lado, outros trabalhos relataram essa ação antifúngica, como o realizado com o OE e o extrato etanólico de *P. aduncum* frente a *C. albicans*, pelo método de microdiluição, onde somente o OE apresentou ação antifúngica a partir da concentração de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (DUARTE et al, 2005). Por se tratar de um ensaio de triagem de plantas medicinais com potencial antimicrobiano, OEPA foi considerado um fraco inibidor, não sendo realizadas análises dos seus constituintes. Em outro experimento, a atividade contra *C. albicans* foi também evidenciada utilizando o extrato de *P. aduncum* em concentrações bem elevadas, com valores de CIM de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesse trabalho os autores não descreveram a composição dos extratos (SVETAZ et al, 2010).

A divergência nos dados obtidos na atividade antifúngica entre fungos filamentosos e leveduras pode ser explicada através do mecanismo de ação dos OE's. A alta efetividade dos OE's contra fungos filamentosos se comparado às leveduras e as bactérias, pode ser atribuída ao seu caráter lipofílico e a volatilidade dos OE's, bem como a natureza lipofílica e aeróbia da membrana de fungos filamentosos, permitindo que o óleo seja absorvido e difundido por toda a membrana (INOUYE, 2003). As leveduras, assim como as bactérias são micro-organismos unicelulares, delimitados e pequenos, ao contrário dos fungos filamentosos que são multicelulares constituídos de hifas que são células extremamente polarizadas, na forma de tubos (LEITE et al, 2006).

O mecanismo de ação sugerido dos OE's sobre fungos filamentosos é sobre o seu ciclo de vida, mais especificamente nos três estágios do ciclo desses micro-organismos: na fase de germinação (na bicamada lipídica recém-formado dos conídios de membrana), no crescimento apical das hifas e na fase de esporulação (INOUE, 2003).

Segundo os critérios estabelecidos por alguns autores é possível avaliar a eficácia dos compostos testados neste trabalho. Holetz e colaboradores (2002) consideram que a CIM menor que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ indica que o produto apresenta boa atividade antifúngica, enquanto o CIM de 100 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresenta atividade moderada, CIM de 500 a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ fraca atividade e acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ é considerado inativo. Já Aligiannis e colaboradores (2001) e Duarte e colaboradores (2005), na classificação do potencial de produtos de origem vegetal, adotaram os seguintes parâmetros: inibidor forte - CIM até $500 \mu\text{l.mL}^{-1}$; inibidor moderado - CIM entre 600 e $1500 \mu\text{l.mL}^{-1}$ inibidor fraco - CIM acima de $1600 \mu\text{l.mL}^{-1}$.

Dessa forma, se compararmos os dados deste trabalho com os dados dos autores acima descritos, o OEPA apresentou boa atividade para FFND e atividade moderada para FFD (HOLETZ et al, 2002). Entretanto, segundo Aligiannis e colaboradores (2001) e Duarte e colaboradores (2005), o OEPA foi considerado um forte inibidor sobre o crescimento de FFND e FFD. Essa forte inibição pode ser explicada pela elevada lipofilicidade do composto que favorece a passagem de substâncias lipossolúveis em relação às hidrossolúveis na membrana celular (MISSNER e POHL, 2009).

Este trabalho foi o primeiro a utilizar o dilapiol purificado na pesquisa da atividade antifúngica do OEPA frente a fungos patogênicos, mostrando que esse OE rico em dilapiol pode no futuro auxiliar no processo terapêutico contra as micoses causadas pelos fungos filamentosos. O estudo de compostos purificados é fundamental para o desenvolvimento de novos produtos, como os fitoterápicos, pois um dos pré-requisitos para a sua fabricação é a identificação da substância responsável pela atividade farmacológica esperada (KLEIN et al, 2009).

Portanto, a lipofilicidade e a volatilidade são características importantes na busca do desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana, porque favorece a interação da cadeia hidrofóbica com os lipídios da membrana celular. Nesse sentido, os óleos essenciais constituem-se em promissoras bases para novos medicamentos, fato esse demonstrado pelos resultados obtidos neste experimento.

6 CONCLUSÃO

O resultado da atividade antimicrobiana mostrou a ação antifúngica do OEPA e do dilapiol frente aos fungos filamentosos, onde este constituinte principal foi considerado o responsável pela atividade apresentada por esse OE.

Estudos posteriores são necessários para melhor quantificar essa atividade do OEPA e do dilapiol, assim como ensaios clínicos e a vinculação deste OE em uma base farmacêutica adequada para sua possível utilização na terapia antifúngica.

Dessa forma, o OEPA através do potencial demonstrado no combate aos fungos filamentosos pode representar uma boa alternativa terapêutica de baixa toxicidade e melhor biodegradabilidade em relação aos antifúngicos sintéticos já existentes no mercado.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, **Allured Publishing Corporation**. London, p. 804, 2007.

ALLEGRIANI, 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.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, L.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p.4168–4170, 2001.

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 Dillapiolene-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 6, p. 1427-1434, 2009.

ALMEIDA, L.M.; SOUZA, E.A.F.; BIANCHIN, D.B.; SVIDZINSKI, T.I.E. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiro Dermatologia**, v.84, n.3, p.249-55, 2009a.

AMORIM, D.S.; MOREIRA, N.L.M.; AMORIM, C.D.R. SANTOS, S.S.; OLIVEIRA, J.M.O.; NUNES, C.P.; OLIVEIRA, P. C.; GOMES, A. P. Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2 , Abr-Mai-Jun 2004.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIM, N.A.T.; ZANETTI, G.D.; HEISLER, E.V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 2, p. 363-370, Abr-Jun 2012.

BAEZA, L.C.; BAILÃO, A.M.; BORGES, C.L.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.A.; GIANNINI, M.J.S.M. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes and Infection**, v. 9, p.1415-1421, 2007.

BAKKALI, F.; S. AVERBECK; D.; AVERBECK; M.; IDAOMAR, R. Biological effects of essential Oils-review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.446-475, 2008.

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

BASTOS, C.N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciososa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, p.441-443,1997.

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

BATAWI, M. M.; ARNAOT, H.; SHOEIB, S.; BOSSEILA, M.; FANGARY, M.; HELMY, A.S. Prevalence of Non-Dermatophyte Molds in Patients with Abnormal Nails. **International Journal of Dermatology**, v.44, n.10, p.851-854, 2005.

BENCHIMOL, R.L.; SUTTON, J.C.; BASTOS, C.N.; DIAS FILHO, M. Survival of black pepper plants in soil infected with *Fusarium solani* f. sp. Piperis and amended with extracts or residues of *Piper aduncum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.194-210, 2001.

BERMAN, J. E SUDBERY, P.E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nat Rev. Genet.**, v.3, p.918-30, dez. 2002.

BORGES, M.; DEGREEF, H.; CAUWENBERGH, G. Fungal Infections of the Skin: Infection Process and Antimycotic Therapy. **Current Drug Targets**, v. 6, p.849-862, 2005.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

BRAZÃO, M. A. B; BRAZÃO, F. V.; MAIA, J.G.S.; MONTEIRO, M.C. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.13, n.6, p.517 – 526, 2014.

BROOKMAN, J.L. E DENNING, D.W. Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p.468–474, 2000.

BURIK, J.A.H.V; COLVEN, R.; SPACH, D.H. Cutaneous Aspergillosis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3115–312, nov.1998.

BUTTY, P.; MALLI, M.; BASTIDE, J.M. Antifungal activity of allylamines on *Epidermophyton floccosum*: scanning electron microscopy study. **Mycopathologia**, v. 120, p.147-153, 1992.

CAMPANHA, A.M.; TASCA, R.S.; SVIDZINSKI, T.I.E. Dermatomicoses: Frequência, Diagnóstico Laboratorial e Adesão de Pacientes ao Tratamento em um Sistema Público de Saúde, Maringá-PR, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, N. 3, p. 442-448, 2007.

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

CHERIF, A.; SADFI-ZOUAOUI, N.; ELEUCH, D.; DHAHRI, A. B. O.; BOUDABOUS, A. *Pseudomonas* isolates have in vitro antagonistic activity against the dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var *interdigitale* and *Microsporum canis*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.19, p.178-184, 2009.

CHIAPELLO L.S.; DIB, M.D.; NUNCIRA, C. T.; NARDELLI, L; VULLO, C.; COLLINO, C.; ABIEGA, C.; CORTESA, P.R.; SPESSO, M.F; MASIH, D.T. Mycetoma of the scalp due to *Microsporum canis*: hystopathologic, mycologic, and immunogenetic features in a 6-year-old girl. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p.145–149, 2011.

CLSI, Clinical and laboratory standards institute. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica**: norma aprovada - M27-A2, 3.ed. Wayne, 2008.

CLSI, Clinical and laboratory standards institute. **Método de referência para Diluição em Caldo para a determinação da sensibilidade de fungos filamentosos**: norma aprovada – M38-A. 3.ed. Wayne, 2008a.

CLSI, Clinical and laboratory standards institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: Approved standart: M7- A9, None Edition, v. 32, n 2, January, 2012.

COIMBRA, R. Manual de **fitoterapia**. Belém: CEJUP, 2 ed.,1994.

COSTA, M.G.; PEREIRA, U.P.; CUSTÓDIO, D.A.C.; SILVA, N. Caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.70, N.4, p. 584-8, 2011.

COSTA-ORLANDI, C.B; MAGALHÃES, G.M.; OLIVEIRA, M.B.; TAYLOR, E.L.S; MARQUES, C.R.S.; RESENDE-STOIANOFF, M.A. Prevalence of Dermatomycosis in a Brazilian Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, v. 174, p. 489–497, 2012.

CZAIKA, V.A. E LAM, P.A. *Trichophyton mentagrophytes* cause underestimated contagious zoophilic fungal infection. **Mycoses**, v.56, p.33–37, 2013.

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

DE CAMPOS, M. P.; CECHINEL FILHO, V.; DA SILVA, R. Z.; YUNES, R.A; ZACCHINO,S.; JUAREZ, S.; BELLA CRUZ, R.C.; BELLA CRUZ, A. Evaluation of Antifungal Activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, N.8, p.1527-1530, 2005.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, n.7, 1998.

DE LA CALLE-RODRÍGUEZ, N; SANTA-VÉLEZ, C; CARDONA-CASTRO, N. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. **Revista CES Med.**, v. 26, n.1, p. 43-55, 2012.

DIEGO, A.M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 29, p. 33-39, 2011.

DUARTE, M.C. T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G., DE LARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305–311, 2005.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V.; CATANI, V.; COSTA, C.R. **Potencialidades da Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): características gerais e resultados de pesquisa**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre. p.53. 2006 (Embrapa Acre. Documentos, 103).

FIUZA, L.M E KNAAK, N. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e micro-organismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v.5, n. 2, p.120-132, 2010.

GAIA, J.M.D; MOTA, M.G.C; CONCEIÇÃO, C.C.C; MAIA, J.G.S. Spiked pepper: selection of clones toward cropping on the edaphoclimatic conditions from Belém, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p.418-423, 2010.

GIOLO, P. E SVIDZINSKI, T.I.E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial**, v.46, n.3, p. 225-234, jun. 2010.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M; ADREOTTI E; TOGNOLINI M; MALDONADO, M.E; BRUNI. R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 27, p. 39-48, 2009.

GUGNANI, H. C. Nondermatophytic filamentous keratinophilic fungi and their role in human infection. **Revista Iberoamericana de Micologia**, p.109-114, 2000.

GUIMARÃES E.F E GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguesia**, v. 55, p. 21-46, 2004.

HECTOR, R.F. Compounds Active against Cell Walls of Medically Important Fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.1, p. 1-21, 1993.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; MANZANO-GAYOSSO, P.; CÓRDOVA-MARTÍNEZ, E.; MÉNDEZ-TOVAR, L. J.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; ACEVEDO, B. G.; OROZCO-TOPETE, R.; CERBÓN, M.A. Morphological varieties of

Trichophyton rubrum clinical isolates. **Revista Mexicana de Micología**, n.25, p. 9-14, 2007.

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.

HOLLEY, R. A. E PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.22, p.273–292, 2005.

INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). The **international journal of aromatherapy**, v.13, N.23, 2003.

KALAIVANAN, C.; CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Screening of selected medicinal plants for in vitro antidermatophytic activity. **Journal de Mycologie Médicale**, v.23, p.247-254, 2013.

KALEMBA, D. E KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p. 813–829, 2003.

KHEBIZI, S. E MANSOURI, R. Dermatophytose extensive et inflammatoire infantile due à *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 24, p.131-136, 2014.

KIM, Y.S. Antibacterial Compounds from Rose Bengal-Sensitized Photooxidation of β -Caryophyllene. **Journal of food Science**, v.73, n. 7, 2008.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.3, n 30, p. 241-248, 2009.

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

LAKSHMIPATHY, D.T. E KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, v. 2, n.7, p.726-731, 2010.

LAHLOU, M. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. **Flavour and fragrance journal**, v.19, n. 2, p.159 -165, 2004.

LAGO, J.G.G.; RAMOS, C.S.; CASANOVA, C.C.D.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, C. D.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E.F.; YOUNG, M.C.M.; KATO, M.J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*, **J. Nat. Prod.**, v. 67, p.1783-1788, 2004.

- LAGO, J.H.G.; TANIZAKI, T.; YOUNG, M.C.M.; GUIMARÃES, E.F.; KATO, M.J. Antifungal piperolides from *Piper malacophyllum* (Prels) C.DC. **J. Braz. Chem. Soc.** v.16, p.153-156, 2005.
- LANG, G. E BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance journal**, v.27, p.13–39, 2011.
- LATGE. J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, v.12, n. 2, p.310-350, 1999.
- LARONE, D.H. Culture and Identification of Dermatophytes. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.18, n.5, 1996.
- LEITE, C.L.; GROPOSO, C.; DRESCHLER-SANTOS, E. R.; FIGUEIREDO, N.F.; GODINHO, P.S.; ABRÃO, R.L. A particularidade de ser um fungo – Constituintes celulares. **Biotemas.**, v.19, p.17-27, jun. 2006.
- LENTZ, D.L.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C.M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A.L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, p.253-263, 1998.
- LOBATO, A.K.S.; SANTOS, D.G.C.; CASTRO, D.S.; TORRES, G.I.O.P.S.; NETO, C.F.O.; SILVA, M.H.L. Avaliação dos Efeitos da Temperatura e da Restrição Hídrica sobre a Germinação de Sementes de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p. 297-299, 2007.
- LOO, D.S. CUTANEOUS FUNGAL INFECTIONS IN THE ELDERLY. **Dermatologic Clinics of North America**, v.22, p.33–50, 2004.
- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n.8, 1998.
- LÓPEZ, J.O. E TORRES, R.J.M. Especies fúngicas poco communes responsables de Onicomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v.16, n.1, p.11-15, 1999.
- MACHADO, B.F.M.T. E FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Caderno Acadêmico Tubarão**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.
- 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, p.269-272, 1998.
- MAIA, J. G. S. ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais**. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi, p.186, 2000.

MAIA, J.G.S E ANDRADE, E.H.A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MAGAGNIN,C.M.; STOPIGLIA, C.D.O.; HEIDRICH, F.J.V.D.; MACHADO, M.; VETORATTO,G.; LAMB, F.M.; SCROFERNEKER, M;L. Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.86, n. 4, p. 694-701, 2011.

MAHBOUBI, M E HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal Ethnopharmacol.**, v.119, p. 325 - 327, 2008.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, L. 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.

MC CARTHY, D.J. Origins of onychomycosis. **Clin Podiatr Med Surg.**, v. 21, p.533-553, 2004.

MENEZES, T.O.A.; ALVES, A. C.B.A; VIEIRA, J.M.S; MENEZES, S.A.F.; ALVES; B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, p.184-91, 2009.

MELTER, O. E RADOJEVIČ, B. Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* – review. **Folia Microbiol.**, v.55, n.6, p.548–558, 2010.

MESA, A.C.; MONTIEL, J.; MARTÍNEZ; C.; ZAPATA, B.; PINO, N.; BUENO, J. G.; STASHENKO, E. Actividad in vitro anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia Piperaceae. **Scientia et Technica**, n. 33, 2007.

MIRON, D.; BATTISTI, F.; SILVA, F.G.; LANA, D.; PIPPI, B.; CASANOVA, B.; GNOATTO, S.; FUENTEFRIA, A.; MAYORGA, P.; SCHAPOVALA, E. E.S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 24, p.660-667, 2014.

MISSNER, A. E POHL, P. 110 years of the Meyer–Overton rule: predicting membrane permeability of gases and other small compounds. **Chemphys chem.**, v. 10, n. 9-10, p. 1405-1414, 2009.

MORENO, A.S; GÓMEZ, N.C; SOLAB, F.J.; IGLESIAS, M.A.R. Infecciones por hongos. **Medicine**, v.53, n.10, p. 68-3558, 2010.

NAIR, M.G. E BURKE, B.A. Antimicrobial *Piper* metabolite and related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p.1093 - 1096, 1990.

NARASIMHAN, B E DHAKE, A. Antibacterial principles from *Myristica fragrans* Seeds. **Journal Medical Food**, v. 9, p.395 – 399, 2006.

NASCIMENTO, P. F.C.; NASCIMENTO, A. L.C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p.108-113, 2007.

NAVICKIENE, H.M.D.; ALÉCIO, A.C.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *P. tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 621-626, 2000.

NENOFF, P; KRÜGER, C.; SCHALLER, J; GINTER-HANSELMAYER, G.; SCHULTE-BEERBÜHL, R.; TIETZ, H.J. Mycology – an update Part 2: Dermatmycoses: Clinical picture and diagnostics. **Journal of the German Society of Dermatology**, p. 379-1610, 2014.

NIST (National Institute of Standards and Technology). **Mass Spectral Library**. The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, USA, 2005.

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.

OOTANI, M.A; AGUIAR, R.W; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D. R.; SILVA, J.B; CAJAZEIRA, J.P. Use of Essential Oils in Agriculture. **Biotec. Biodivers.**, v. 4, n.2, p.162-175, May. 2013.

ORJALA, J., ERDELMEIER, C.A.J., WRIGHT, A.D., RALI, T., STICHER, O. New prenylated p-hydroxybenzoic acid-derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. **Planta Medica**, v. 59, p. 546-551, 1993.

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

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.301-307, 2008.

PERERA, G. E HAY, R. A guide to antibiotic resistance in bacterial skin infections. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, p. 531–545, 2005.

PERES, N.T.A; MARANHÃO, F.C.A; ANTONIO ROSSI, A; MARTINEZ-ROSSI, N.M.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.5, p.657-67, 2010.

PÉREZ, A.P; RODRÍGUEZ, O.B.; RODRÍGUEZ, M.C. C; CEMBRANOS, M.D.M.; DOMÍNGUEZ, M.C.; FERNANDEZ, R.S. Skin Infections Caused by Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Clinical and Microbiological Characteristics of 11 Cases. **Actas Dermo-sifiliograficas**, v.105, n. 2, p.150-158, 2014.

PINTO, E.; GONÇALVES, M.J.; OLIVEIRA, P.; COELHO, J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Activity of *Thymus caespititius* essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p.107–112, 2014.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MAUSE, R. *Piper aduncum* L.: Planta Pluripotente e Fonte de Substâncias Fitoquímicas Importantes. **Fitos**, v.2, n.11, 2006.

POTZERNHEIM, M.C.L.; BIZZO, H.R.; SILVA, J.P.; VIEIRA, R.F. Caracterização química do óleo essencial de constituents quatro populações de *Piper aduncum* L. do Distrito Federal, Brasil. **Bioch Syst Ecol.**, v.42, p.25-31, 2012.

QUADROS, A. U.; BINI, D.; PEREIRA,P.A.; MORONI, E.G.; MONTEIRO, M.C. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiol.**, v. 56, p.349-352, 2011.

REGASINI, L.O.; COTINGUIBA, F.; MORANDIM, A. A.; KATO, M.J.; SCORZONI, L.; MENDES-GIANNINI, M.J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.12, p. 2866-2870, 2009.

RODRIGUES, F.M; SANTOS, O. ; GELATTI, L.C. *Staphylococcus aureus*: uma revisão. **Revista Fasem Ciências**, v. 2, n. 2, 2012.

SABULAL, B.; DAN, M.; JOHN A.J.; KURUP, R.; PRADEEP, N. S.; VALSAMMA, R.K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2469–2473, 2006.

SHAFIEI, Z.; SHUHAIRI, N.N.; YAP, N.M.D.F.S.; SIBUNGKIL, C.H.; LATIP, J. Antibacterial Activity of *Myristica fragrans* against Oral Pathogens. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, 2012.

SALES, L.M. E SILVA, T.M. *Staphylococcus aureus* metilicina resistente: Um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v.3, n.1, 2012.

SANTANA, D.P.; RIBEIRO, E.L.; MENEZES, A.C.S.; NAVES, P.L.F. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v.12, n.2, p.229-233, mai-ago. 2013.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A; AFONSO, I.F.; RODRIGUES,C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, A.R.C.; TELLES, P.F.G.; LYRA, L.; SCHREIBER, A.Z. Avaliação da susceptibilidade de cepas de *Trichophyton* sp frente a betametasona e ao cetoconazol. **Laboratório de Investigação em Fungos-Departamento de Patologia Clínica, FCM-UNICAMP**, 2010.

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, C. F.; ROSA, M. B.;SANTOS, D. A.; BRASILEIRO, B. G.; CARVALHO, L. M.; SILVA, M. B.; ZANI, C.L.; SIQUEIRA, E. P.; PERES, R. L.; ANDRADE, A. A. Antifungal activity of extracts from *Piper aduncum* leaves prepared by diferente solvents and extraction techniques against dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p.1275-1278, 2013.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M. C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHECHTMAN, R. C. Nondermatophytic Filamentous Fungi Infection in South America Reality or Misdiagnosis? **Dermatologic Clinics**, v.26, p.271–283, 2008.

SEYFARTH, F.; GOETZE, S.; ERHARD, M.; BURMESTER, A.; ELSNER, P.; HIPLER, U.C. Infektion mit einem seltenen, geophilen Dermatophyten. **Hautarzt**, v.61, p.694-699, 2010.

SIANI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O; SOUSA RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**. 2002.

SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; MEDA, C.I.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboretum* and *P. tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.59, p.521-527, 2001.

SILVA, D.M.H E BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de Piper sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.143-145, 2007.

SILVA, L.B.; Oliveira, D.B.C.; DA SILVA, B.V.; DE SOUZA, R.A.; DA SILVA P.R.; FERREIRA-PAIM, K; ANDRADE-SILVA, L. E.; M.L. SILVA-VERGARA, M.L.; ANDRADE, A.A. Identification and antifungal susceptibility of fungi

isolated from dermatomycoses. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, p.633–640, 2014.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, p.468-469, 2010.

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 Óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008.

SUN, P.L. E HO, H.T. Concentric rings: an unusual presentation of *tinea corporis* caused by *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, v.49, p.150–151, 2006.

SVETAZ, L.; ZULJANA, F.; DERITA, M.; PETENATTIB, E.; TAMAYOC, G.; CÁCERES, A.; CECHINEL, F. V.; GIMÉNEZ, A.; Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 137–158, 2010.

TANG, Y. W. E STRATTON, C.W. *Staphylococcus aureus*: An Old Pathogen with New Weapons. **Clin Lab Med.**, v.30, p.179–208, 2010.

TOROK, M.E E DAY, N.P.J. Staphylococcal and Streptococcal infections. **Medicine**, v.42, N.1, 2014.

WAGNER, D.K E SOHNLE, P.G. Cutaneous Defenses against Dermatophytes and Yeasts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p.317-335, 1995.

WEITZMAN, I. E PADHYE, A.A. DERMATOPHYTES: Gross and Microscopic. **Dermatologic Clinics**, v.14, n.1, 1996.

URIBE M.P E CARDONA-CASTRO N. Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. **Rev CES Med**, v.27, n.1, p.67-75, 2013.

VAN DEN BERG, M.E. **Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2 ed.,1993.

VAN DEN DOOL, H E KRATZ, P.D.J.A. Generalização do sistema de índice de retenção, incluindo cromatografia de partição linear temperatura programada gás-líquido. **Jornal Chromatografia**, v. 11, p. 463-47, 1963.

VANDER STRATEN, M.R.; HOSSAIN, M.A; GHANNOUM, M.A. Cutaneous infections Dermatophytosis, onychomycosis, and tinea versicolor. **Infectious Disease Clinics Norte Americana**, v.17, p. 87–112, 2003.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, Jun. 2005.

ZAUGGA, C.; JOUSSON, O.; LE'CHENNE, B.; STAIB, P.; MONOD, M. *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 669–682, 2008.

ZHANG, A.Y.; CAMP, W.L.; ELEWSKI, B.E. Advances in Topical and Systemic Antifungals. **Dermatol Clin.**, v. 25, p.165–183, 2007.

ZAVADINACK NETO, M.; HERREIRO, F.; BANDEIRA, C.O.P.; ITO, Y.; CIORLIN, E.; SAQUETI, E.E. ANSILIEIRO, I. J.; GONSALVES, L.; SIQUEIRA, V.L.D.; *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum Maringa**, v. 23, n. 3, p.709-712, 2001.