

Modulação *in vitro* da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq

Modulación *in vitro* de la actividad antibiótica por el aceite esencial de frutos de *Piper tuberculatum* Jacq

In vitro modulation of the antibiotic activity of essential oil from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq

Valterlúcio dos Santos Sales, Emmily Petícia do Nascimento, Álefe Brito Monteiro, Maria Haiele Nogueira da Costa, Gyllyandeson de Araújo Delmondes, Tereza Raquel Carneiro Soares, Saulo Relison Tintino, Francisco Rodolpho Sobreira, Dantas Nóbrega de Figuêiredo, Cristina Kelly de Souza Rodrigues, José Galberto Martins da Costa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Cícero Francisco Bezerra Felipe, Irwin Rose Alencar de Menezes, Marta Regina Kerntopf

Universidade Regional do Cariri-Urca (ce/Brasil).

RESUMO

Introdução: *Piper tuberculatum* Jacq., popularmente conhecida como "pimenta-longa" ou "pimenta-d'Arda", é utilizada empiricamente no tratamento de doenças respiratórias (asma, bronquite e tosse) e digestivas (dores abdominais e diarreias). Na literatura é descrita com importantes atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antileucêmico e anti-helmíntica.

Objetivos: avaliar a atividade moduladora do óleo essencial dos frutos de *P. tuberculatum* (OEPT) em associação com diferentes antibióticos frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodos: Os frutos (frescos) de *P. tuberculatum* foram coletados em Barbalha/CE e submetidos à hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger* para ser extraído o óleo essencial, após a extração o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio anidro para eliminação da umidade residual. A avaliação da atividade antibacteriana e modulação (em resistência bacteriana) frente às cepas de *S. aureus* (SA358), *E. coli* (EC27) e *P. aeruginosa* (PA03) foram determinadas pelo método de

microdiluição para identificar a concentração inibitória mínima (CIM), realizada em triplicata. CIM de $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ foi considerado clinicamente relevante.

Resultados: a atividade antibacteriana do OEPT exibiu um CIM de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ contra as cepas de bactérias de padrão resistente a múltiplas drogas. Na avaliação da atividade moduladora, o OEPT antagonizou o efeito da amicacina contra *E. coli* e *S. aureus*, mas teve efeito sinérgico contra *P. aeruginosa*. Combinado com a getamicina o óleo exibiu antagonismo frente a *E. coli*, no entanto não apresentou resultado relevante contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A associação do OEPT com o antibiótico imipenem resultou efeito mais relevante, apresentando sinergismo para todas as bactérias avaliadas, por outro lado, em associação com ciprofloxacino não apresentou efeito significativo em relação ao controle.

Conclusão: O OEPT apresentou uma melhor atividade quando associado ao imipenem frente todas as bactérias avaliadas, mostrando ser uma possível alternativa no desenvolvimento de novos fármacos com atividade antibacteriana advindos de produtos fitoterápicos.

Palavras chave: *Piper tuberculatum* Jacq.; atividade antibacteriana; óleo essencial; modulação.

RESUMEN

Introducción: *Piper tuberculatum* Jacq. popularmente conocida como "pimenta-longa" o "pimenta-d'Arda", se utiliza empíricamente en el tratamiento de enfermedades respiratorias (asma, bronquitis y tos) y digestivas (dolor abdominal y diarrea). En la literatura se describe con importantes actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antileucémicas y antihelmínticas.

Objetivo: evaluar la actividad moduladora de los aceites esenciales de frutos de *P. tuberculatum* (AEPT) en asociación con diferentes antibióticos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodología: los frutos (frescos) de *P. tuberculatum* fueron recolectados en Barbalha/CE y sometidos a hidrodestilación en un equipo *Clevenger*, para extraer el aceite esencial (AEPT), el cual, una vez extraído, fue tratado con sulfato de sodio anhidro para eliminar la humedad residual. Se evaluó su actividad antibacteriana contra las cepas de *S. aureus* (SA358), *E. coli* (EC27) y *P. aeruginosa* (PA03). Empleando el método de microdilución se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM), con tres réplicas por cada tratamiento. Un valor de CIM $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ se considera clínicamente relevante.

Resultados: la actividad antibacteriana del AEPT exhibió una CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ contra las cepas estándar de bacterias resistentes a múltiples fármacos. En efecto, la actividad AEPT antagoniza el efecto de amikacina contra *E. coli* y *S. aureus*, pero tenía un efecto sinérgico contra *P. aeruginosa*. Combinado con la getamicina el aceite exhibió antagonismo contra *E. coli*, sin embargo, no presentó resultado relevante ante *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La asociación de AEPT con el antibiótico imipenem resultó el efecto más relevante, mostrando sinergismo frente a todas las bacterias evaluadas. Por el contrario, en asociación con ciprofloxacina no mostró ningún efecto significativo con respecto al control.

Conclusión: el AEPT presentó una mejor actividad cuando se asoció a imipenem, frente todas las bacterias evaluadas, demostrando ser una posible alternativa en el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antimicrobiana, a partir de productos herbarios.

Palabras clave: *Piper tuberculatum* Jacq.; actividad antibacteriana; aceite esencial; modulación.

ABSTRACT

Introduction: *Piper tuberculatum* Jacq., commonly known as *pimenta-longa* or *pimenta-d'Arda*, is empirically used to treat respiratory conditions (asthma, bronchitis and coughing) and digestive disorders (abdominal pain and diarrhea). Reference may be found in the literature to outstanding antiinflammatory, antimicrobial, antileukemic and antihelminthic activity.

Objective: Evaluate the modulatory activity of essential oils from fruits of *P. tuberculatum* (AEPT) combined with various antibiotics against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: Fresh fruits of *P. tuberculatum* were collected in Barbalha, CE, and subjected to hydrodistillation in a Clevenger set to extract the essential oil (AEPT). The oil extracted was then treated with anhydrous sodium sulfate to eliminate residual humidity. Antibacterial activity was evaluated against strains of *S. aureus* (SA358), *E. coli* (EC27) and *P. aeruginosa* (PA03). Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method, with three replications for each treatment. A MIC \leq 256 $\mu\text{g/mL}$ was considered to be clinically relevant.

Results: Antibacterial activity of AEPT displayed a MIC of $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ against standard strains of multi-drug resistant bacteria. In fact, activity of AEPT antagonized the effect of amikacin against *E. coli* and *S. aureus*, but had a synergic effect against *P. aeruginosa*. Combined with gentamicin, the oil exhibited antagonism against *E. coli*, but no relevant result was obtained against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Combination of AEPT with the antibiotic imipenem had the most relevant effect, displaying synergism against all the bacteria evaluated. However, in combination with ciprofloxacin it did not show any significant effect with respect to the control.

Conclusion: AEPT displayed better activity against all the bacteria evaluated when combined with imipenem, proving to be a possible alternative for the development of new herbal drugs with antimicrobial activity.

Keywords: *Piper tuberculatum* Jacq.; antibacterial activity; essential oil; modulation.

INTRODUÇÃO

A resistência de microrganismos patogênicos a substância antimicrobiana tem sido considerado um grande problema de saúde pública¹. As bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* são constantemente identificadas como promotoras de infecções oportunistas em vários animais e seres humanos; e caracterizadas por possuir cepas resistentes.²⁻³ Dentro desse gênero a *S. aureus* é um agente etiológico comum em infecções (furúnculos, carbúnculos, abscesso, miocardite, endocardite, meningite, pneumonia, e artrite bacteriana).⁴

Já a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é um dos principais patógenos causadores de infecção em seres humanos, tem cepas resistentes. É conhecida pela produção de enterotoxinas, cujas propriedades e papel na doença diarreica tem sido bastante investigada. As ações das citotoxina e sua atuação nas infecções humanas já foram apontadas, sobretudo no trato urinário.⁵ Outra Gram-negativa a

P. aeruginosa, é descrita em possuir alta resistência a antibióticos comuns,⁶ está relacionada como um dos principais agentes causadores de infecções hospitalares, como a peritonite, bacteremia, infecções do trato urinário e infecções cirúrgicas em indivíduos imunocompetentes.⁷

A pesquisa científica objetiva descobrir novas substâncias que possam ser uma alternativa à terapêutica de infecções bacterianas e um aliado na tentativa de reverter esses processos de resistência. Moléculas provenientes de espécies vegetais que possam conter propriedades antimicrobianas são alvos dessas pesquisas.

A família Piperaceae é considerada entre as famílias mais primitivas de angiospermas, estima-se ser composta por 10 a 12 gêneros com um significativo e indeterminado número de espécies, entre 1.400 e 2.000.^{8,9} O gênero *Piper* distribui-se geograficamente em regiões subtropicais, tropicais e temperadas de ambos os hemisférios, abrangendo mais de 1.000 espécies.¹⁰ No território brasileiro são descritas em torno de 266 espécies.¹¹ No Nordeste a *Piper tuberculatum* Jacq., é popularmente conhecido como "pimenta-longa" ou "pimenta-d'Arda",¹² utilizada empiricamente no tratamento de patologias do aparelho respiratório (asma, bronquite e tosse) e digestivo (dores abdominais e diarreias). Na literatura é descrita com importantes atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antileucêmico e anti-helmíntica.¹³

Portanto essa pesquisa objetiva avaliar a atividade moduladora do óleo essencial dos frutos de *P. tuberculatum* em associação com diferentes antibióticos frente a *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal (frutos da *P. tuberculatum*, família Piperaceae) foi coletado às 9h da manhã no sítio Arajara, no município de Barbalha, estado do Ceará, à orientação sul 07° 19'568", e a oeste 039° 23'580", estando de acordo com a autorização com base na Instrução Normativa no154/207; licença no 41398-1, do Ministério do Meio Ambiente-MMA/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade-ICMBio.

O material vegetal foi identificado e uma exsicata foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima - HCDAL da Universidade Regional do Cariri - URCA catalogada sob o registro de número 10.631.

Obtenção do óleo essencial de *P. tuberculatum*

Os frutos (frescos) coletados foram submetidos à hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger*. O material foi pesado (2,56 kg) e em seguida colocado em balão de vidro, sendo acrescentada água destilada e submetidos à ebulição por 2 h. O óleo essencial extraído foi tratado com sulfato de sódio anidro para eliminação da umidade residual e teve um rendimento de 0,46 %; após todo o processo de extração o material foi depositado em frasco âmbar sendo mantido em refrigerador.

Drogas

Os antibióticos utilizados foram: amicacina, gentamicina, imipenem e ciprofloxacino (SIGMA Chemicals, St Louis, EUA), preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Materiais bacterianos

As estirpes bacterianas utilizadas foram *S. aureus* (SA-ATCC25923 e SA358), *E. coli* (ATCC-CE10536 e EC27) e *P. aeruginosa* (PA-ATCC15442 e PA03). Todas as cepas foram mantidas em ágar infusão de coração inclina (HIA, DifcoLaboratories LTDA). Antes dos experimentos, as células foram cultivadas por 24 h em 37 °C em fusão de cérebro coração (BHI, DifcoLaboratories LTDA).

Atividade antimicrobiana do teste

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo,¹⁴ utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentava uma concentração de 10⁵ UFC/mL em placas de microtitulação com 96 poços, com diluições em série ½. Em cada poço foi adicionado 100 µL de solução do óleo essencial. As concentrações finais do óleo variaram entre 512 - 8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões amicacina, gentamicina, imipenem e ciprofloxacino cujas concentrações finais variaram entre 512 - 8 µg/mL. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento. Para evidenciá-las, preparou-se uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 h em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa, devido à redução da resazurina, indica o crescimento bacteriano,¹⁵ auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

Efeito sinérgista ou antagonista na associação com antibióticos

O óleo essencial foi misturado em caldo BHI 10 % em concentrações subinibitórias, obtidos e determinados após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação a concentração da solução de extrato foi reduzida 8 (oito) vezes (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídos seriadamente 1:1 em caldo BHI 10 %. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para o óleo foram utilizados durante a modulação.¹⁶ As placas preenchidas foram incubadas a 35 °C por 24 h e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina como citado anteriormente no teste de determinação da CIM.

Análise estatística

Os ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como média geométrica. Na análise estatística foi aplicada à análise de variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni (onde $p < 0,001$ foi considerado significativo) utilizando o *software GraphPad Prism 5.00.288*®.

RESULTADOS

Atividade antibacteriana do óleo essencial da *P. tuberculatum* (OEPT) exibiu um CIM de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ contra estirpes de bactérias multirresistentes e padrão (um valor CIM de $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ foi considerado clinicamente relevante) (tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) dos óleo essencial de *P. tuberculatum* e dos antibióticos (amicacina, gentamicina, imipenem, ciprofloxacino)

Bactéria	OEPT ($\mu\text{g/mL}$)	Amicacina ($\mu\text{g/mL}$)	Gentamicina ($\mu\text{g/mL}$)	Imipenem ($\mu\text{g/mL}$)	Ciprofloxacino ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. coli</i> - 27	≥ 1024	16	16	128	256
<i>P. aeruginosa</i> - 03	≥ 1024	32	16	256	256
<i>S. aureus</i> - 358	≥ 1024	32	16	256	256

Quando associado com os antibióticos, o OEPT apresentou importante atividade. A associação com amicacina resultou efeito antagônico frente *E. coli* e *S. aureus* em 60 % e 37 % respectivamente, por outro lado, manifestou efeito sinérgico (26 %) quando avaliado contra *P. aeruginosa*. Em associação com a gentamicina o óleo exibiu efeito antagônico em 37 % frente a *E. coli*, no entanto não apresentou resultado relevante contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*. O OEPT com imipenem apresentou efeito sinérgico para todas as bactérias avaliadas, *E. coli* 59 %, *P. aeruginosa* 50 % e *S. aureus* 26 %. Por outro lado em associação com ciprofloxacino não apresentou efeito significativo em relação ao controle (tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem das médias geométricas da associação do óleo essencial da *P. tuberculatum* com os antibióticos (amicacina, gentamicina, imipenem, ciprofloxacino)

	<i>E. coli</i> (EC27)	<i>P. aeruginosa</i> (PA03)	<i>S. aureus</i> (SA358)
OEPT + Amicacina	60**	26*	37**
OEPT + Gentaminina	37**	ns	ns
OEPT + Imipenem	59*	50*	26*
OEPT + Ciprofloxacino	ns	ns	ns

(*) Sinergismo; (**) Antagonismo; (ns) Sem significância.

DISCUSSÃO

Estudos prévios vêm mostrando a importância das interações de derivados de plantas, em variadas concentrações, com antimicrobianos na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos e multiresistentes a drogas.¹⁶⁻¹⁸ Muitas plantas podem servir como alternativa terapêutica devido à atividade antimicrobiana comumente associada aos seus óleos essenciais.¹⁹

Espécies correlata ao gênero *Piper* têm sido descritas na literatura apresentando atividade antimicrobiana, incluindo *Piper aduncum*,²⁰⁻²⁴ *Piper marginatum*,^{24,25} *Piper regnelli*,²⁵ *Piper arboreum*,^{26,27} *Piper caldense*, *Piper mollicomum*, *Piper montealegreanum*,²⁸ *Piper malacophyllum*,¹⁹ *Piper alliaceae*.²⁹

Estudos realizados com óleos essenciais e seus componentes isolados mostraram atividade antibacteriana.²⁹⁻³⁵ No OEPT foi identificado como componentes majoritários o alfa-pineno e o beta-pineno (dados não mostrados e não publicados). No trabalho realizado por Leite e colaboradores³⁰ β-pineno mostrou-se efetivo ao inibir as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Burt³² também encontrou atividade antimicrobiana dos pinenos frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Facundo e colaboradores¹² ao realizarem um estudo fitoquímico visando reconhecer os constituintes fixos e voláteis do óleo essencial dos frutos de *P. tuberculatum* verificaram a presença de monoterpêneos e sesquiterpêneos. Os terpenóides e óleos essenciais estão inclusos nos principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas extraídos de plantas.^{36,37} Facundo e colaboradores,¹² identificaram também a presença de limoneno e germacreno-D, substâncias reportadas para atividade antimicrobiana, contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.^{38,39} É provável que as atividades antagônicas observadas no presente estudo se devam a possíveis interações dos constituintes químicos do óleo com os antibióticos. No entanto, novos estudos devem ser realizados para elucidar essas interações e, assim, possivelmente, explicar a diminuição da atividade desses fármacos.

Com base nos resultados alcançados com neste estudo, pode se afirmar que o óleo essencial dos frutos de *P. tuberculatum* apresentou uma melhor atividade quando associado ao imipenem frente todas as bactérias avaliadas, mostrando ser uma possível alternativa no desenvolvimento de novos fármacos com atividade microbiológica advindos de produtos fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

1. Negreiros, M.D.O. Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Heterothalamus* sp. Sobre *Enterococcus faecalis*. 100f. (Dissertação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 2014
2. Nostro A, Blanco A.R, Cannatelli M.A, Enea V, Flami-NI G. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters*. 2004;230:191-5.
3. Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., Lima, E.O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2010;33:467-71.

4. Verhoeff, J., Beaujean, D., Vlok, H., Baars, A., Meyler, A., Werkwn, V.D.C. Adutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease. 1999;18:461-6.
5. Hughes C, Muller D, Hacher J, Goebel W. Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* haemolysin. Toxicon. 1982;20:247-52.
6. Koneman, E., Koneman, E. A função do laboratório de microbiologia no diagnóstico de doenças infecciosas: indicações para prática e manejo. In: Koneman, E.W. et al. *Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido*. Medsi, São Paulo, Brasil. 2001.p. 69-176.
7. Ferreira, H., Lala, E.R.P. *Pseudomonasaeruginosa*: um alerta aos profissionais de saúde. *Revista Panamericana de Infectologia*. 2010;12:44-50.
8. Cronquist, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York Colombia University Press. 1981.p. 262.
9. Joly, A.B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo, Ed. Nacional, ed., p. 777, 1991. 10ª.
10. Dyer, L.A., Palmer, A.D. Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. 2004.
11. Guimarães, E.F., Giordiano, L.C.S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado de Ceará. *Rodriguesia*. 2004;55:21-5.
12. Facundo V.A., Polli A.R., Rodrigues R.V., Militão J.S.T., Stabelli R.G., Cardoso C.T. Fixed and volatile chemical constituents from stems and fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. and from roots of *P. hispidum* HBK. *Acta Amazonica*. 2008;38:743-8.
13. Leal, L.F. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Farmacológica e Microbiológica de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. 158f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 2000.
14. Simbanda, T., Okoh, A.L. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *Afr J Biotechnol*. 2007;2886-96.
15. Silva, N.C.C., Fernandes-Júnior, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of venomous animal and toxins including tropical diseases*. 2010;16:402-13.
16. Ahmed Z., Khan S.S., Khan M., Tanveer A., Lone Z.A. Synergistic effect of *Salvadora persica* extracts, tetracycline and penicillin against *Staphylococcus aureus*. *Afr J Basic Appl Sci*. 2009;2:25-9.
17. Ćirković I., Jovalekić M., Jegorović B. *In vitro* antibacterial activity of garlic and synergism between garlic and antibacterial drugs. *Archives of Biological Sciences*. 2012;64:1369-75.
18. Ushimaru P.I., Barbosa L.N., Fernandes A.A.H., Di-Stasi L.C., Júnior, A.F. *In vitro* antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains

from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. Natural product research. 2012;26:1553-7.

19. Santos T.G., Rebelo R.A., Dalmarco E.M., Guedes A., De-Gasper A.L., Cruz A.B., *et al.* Composição Química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. *Quim. Nova.* 2012;35: 477-81.

20. Orjola J, Endelmeir C.A.J, Wright A.D, Rali T, Sticher O. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Dep. Pham. Swiss Fed. Inst. Technol, Zurich, Switz. Plant Med.* 1993;59:546-51.

21. Orjola J, Wright A.D, Behrends H, Folkers G., Sticher O. Cytotoxic and antimicrobial silyhydrochacones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.* 1994;57:18-26.

22. Alves R.D.S. Avaliação da atividade antimicrobiana entre óleos essenciais obtidos de folhas de manjeriço, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos veiculados por alimentos. 72f. (Dissertação) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. 2014.

23. Brazão M.A.B. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. E seu componente, dilapiol, frente a *Staphylococcus spp.* multirresistentes. 84f. (Dissertação) - Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil. 2012.

24. Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Silva, C.A.L., Delarmelina, C. Atividade antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de *Piperspp* cultivadas na coleção de germoplasmas do CPQBA-Unicamp. *Rev Bras Farm.* 2011;14:51-3.

25. Duarte M.C.T, Figueir G.M, Pereira B, Magalhães P. M, Delarmelina, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacogn.* 2004;14:6-8.

26. Tintino S.R, Souza C.E, Guedes G.M, Costa I.V.J, Duarte F.M, Chaves M.C.O, *et al.* Modulatory antimicrobial activity of *Piper arboreum* extracts. *Acta Botanica Croatica.* 2014;73:303-11.

27. Fernandes T.J.S. Atividade antimicrobiana e determinação da CIM de extratos e fases particionadas de produtos vegetais. 56f. (Dissertação) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Gande, Brasil; 2014

28. Duarte M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultCiência.* UNICAMP -Campinas, 2006. p. 16.

29. Kim J, Marshall M.R, Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and food chemistry.* 1995;43:2839-45.

30. Leite AM, Lima EO, Souza EL, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Rev Bras Ciên Farm.* 2007;43(1):121-6.

31. Burt, S. A., Reindes, S.D. Antimicrobial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* 0157: H7. *Letters in Applied Microbiology.* 2003;36:162-7.

32. Fisher K., Phillips C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;101:1232-40.
33. Cândido C.S, Portella C.S.A, Laranjeira B.J, Silva S.S.D, Arriaga A, Santiago G.M, *et al.* Effects of *Myrciaovata* Cambess. essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41:621-7.
34. Jadhav S, Shah R, Bhawe M, Palombo E.A. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria planktonic* cells and biofilms. *Food Control*. 2013;29:125-30.
35. Torssel B.G. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. *Natural product chemistry*; 1989.
36. Ferronato R. Análise química e antimicrobiana do óleo essencial de *Heliettaapiculata* Benth. (Rutaceae). 83f (Dissertação); 2010.
37. Ngassapa, O, Runyoro D.K, Harvala E, Chinou I.B. Composition and antimicrobial activity of essential oils of two populations of Tanzanian *Lippia javanica* (Burm. f.) Spreng. (Verbenaceae). *Flavour and fragrance journal*. 2003;18:221-4.

Recibido: 8 de marzo de 2016.

Aprobado: 31 de enero de 2017.

Marta Regina Kerntopf. Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato-CE, Brasil.
Correo electrónico: martareginakerntopf@outlook.com