

ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Piper tuberculatum* JACQ. SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* *in vitro*

PHYTOCHEMICAL STUDY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF *Piper tuberculatum* JACQ. ON STRAINS OF *Escherichia coli* *in vitro*

Evanilson Gomes Pinto¹; Aline Jacobi Dalla Lana¹; Renato Abreu Lima^{2*}

¹Graduação em Farmácia das Faculdades Integradas Aparício Carvalho, FIMCA, Porto Velho-RO;

²Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Benjamin Constant, AM.

* Autor correspondente: renatoabreu07@hotmail.com

Recebido: 12/08/2016; Aceito 09/12/2016

RESUMO

Frente ao cenário promissor do uso indiscriminado das drogas antimicrobianas as buscas por fontes naturais tem se tornado importante. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico de folhas de *Piper tuberculatum* sobre cepas de *Escherichia coli* microrganismo responsável por 75% de infecções urinárias. Os testes foram realizados *in vitro*, o material botânico foi coletado e levado à estufa para desidratação e desnaturação de enzimas. Após esse processo, foi incubado por 72 horas em etanol P.A. sendo levado ao processo de rotaevaporação para obtenção do extrato bruto. Obtido o extrato, foram realizados os testes de identificação dos constituintes químicos, que identificaram a presença de alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonoides, saponinas, triterpenos e a ausência de taninos. Após essa identificação foram realizados os testes microbiológicos pelo método de difusão de poços as placas de Petri com meio de Müeller Hinton juntamente com as bactérias de acordo com a escala MarcFarland onde foram preparadas e separados quatro poços para aplicação das concentrações do extrato de 100% e 50% já diluídas em DMSO, clorofórmio e RPMI tendo como controle positivo o antibiótico de ampicilina+sulbactam e um poço determinados para os seguintes solventes. Os testes foram realizados em duplicatas e após 24 horas de serem incubadas, realizou-se a leitura de crescimento da bactéria. Verificou-se que o bruto de *P. tuberculatum* não apresentou atividade antibacteriana sobre o *E. coli* nas concentrações utilizadas. Perante o resultado obtido, submeteremos uma nova linhagem com diferentes partes da planta com novas metodologias, concentrações e solventes para que assim possamos verificar o uso dessa planta pela população em tratamento a infecção urinária para estudos *in vitro*.

Palavras-chave: *Piper tuberculatum*, *Escherichia coli*, Antimicrobiano.

ABSTRACT

Front of the promising scenario of indiscriminate use of antimicrobial drugs searches for natural resources has become important. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of the ethanol extract of *Piper tuberculatum* leaves on *Escherichia coli* microorganism responsible for 75% of urinary tract infections. The tests were performed *in vitro*, the botanical material was collected and taken to the stove for dehydration and denaturation of enzymes. After this process was incubated for 72 hours in ethanol using a rotary evaporator P.A. being brought to the process for obtaining the crude extract. The extract obtained, identification tests were performed on the chemical constituents that identify the presence of alkaloids, cardiotonic glycosides, coumarins, flavonoids, saponins, triterpenos and absence of tannins. After this identification were conducted

microbiological testing the well diffusion method Petri plates with medium Mueller hington together with bacteria according to MarcFarland scale which were prepared and separated four wells for the application of concentrations from 100% extract and 50% are diluted in DMSO, chloroform and RPMI having as positive control antibiotic ampicillin and sulbactam + a well determined for the following solvents. The tests were performed in duplicates and after 24 hours are incubated held the growth of the bacterium reading. It was found that the crude *P. tuberculatum* showed no antibacterial activity on *E. coli* concentrations used. Given the results, we will submit a new strain with different parts of the plant with new methodologies, concentrations and solvents so that we can check the use of this plant by the population in treatment of urinary tract infection in vitro studies.

Keywords: *Piper tuberculatum*, *Escherichia coli*, antimicrobial.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o primeiro em número de plantas, apresentando mais de 57 mil espécies o que corresponde a 22% do valor mundial. Estima-se ainda que aproximadamente 48% dos medicamentos utilizados no tratamento de doenças locais possuem ligação com os produtos naturais, especialmente plantas medicinais. No entanto, apesar da vasta quantidade de vegetais disponíveis, a grande maioria não possui seus princípios ativos conhecidos [1].

As plantas são ricas em metabólitos biológicos ativos que podem ter grandes constituintes para a manipulação de um fármaco, sendo muito utilizadas a nível popular para o tratamento de diversos tipos de doenças, desde tempos mais remotos até os dias atuais, porém, pouco se sabe a respeito das verdadeiras atividades biológicas dessas plantas usadas no tratamento popular, em termos de estudos da atividade *in vitro* desses extratos medicinais existem apenas menos de 1% de comprovação científica de sua verdadeira atividade biológica [2].

Com isso, o uso indiscriminado de antibióticos é o que mais preocupa a comunidade científica e profissional da área de saúde, uma vez

que existem patógenos humanos que não são susceptíveis a alguns agentes disponíveis bem como no mecanismo de desenvolvimento de resistência que podem ser aplicados contra alguns antibióticos que futuramente possam ser desenvolvidos [3].

A grande maioria dos antibacterianos comercializados tem tido como alvo a parede da célula bacteriana ou biossíntese de macromoléculas. As bactérias, no entanto, desenvolvem mecanismos de defesa, por mutação ou aquisição de novos genes de outras bactérias. Essas defesas têm incluído aquisição de enzimas, alteração da permeabilidade da parede celular, proteínas de efluxo, alteração das moléculas alvo, a fim de protegê-las contra ataques de agentes antibacterianos [4].

A família Piperaceae é considerada uma das famílias mais primitivas das Angiospermas possui de 10 a 12 gêneros catalogados. Esses gêneros têm sido mencionados em relevantes estudos constantes, um dos gêneros que houve o maior relato nos últimos anos foi o *Piper*, provida de lugares úmidos e sombrios nas regiões tropicais, tem sido foco de pesquisas tanto nas áreas farmacológica quanto nas áreas das Ciências Agrárias [5].

Piper tuberculatum oriunda de solos úmidos, já existe sobre o uso desta planta como antídoto contra picadas de cobras, e alguns constituintes químicos presentes no extrato e óleos essenciais (3,4,5-trimetoxi-dihidrocinâmico) apresentaram atividades antinociceptivas contra dores abdominais em testes *in vitro* e resultados comprovaram que esse isolado foram mais eficaz que a própria aspirina [5], porém, há poucos relatos sobre a atividade antimicrobiana do extrato dessa planta contra agente patológico humanos.

É distribuída geograficamente em solos desde o continente Americanos e Antilhas. E se encontra no Brasil, nos estados do Amazonas, Rondônia, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso. Cresce nas proximidades de 550 m, em encostas úmidas, capoeiras e locais brejosos [6].

A bactéria *Escherichia coli* é conhecida por ser um dos maiores microrganismo causadores de infecção trato urinários segundo estudos feitos no Brasil e no mundo, com isso, é importante frisar que o uso indiscriminado de antimicrobiano nesse microrganismo desencadeia mecanismo de resistência a fármacos comerciais tornando o tratamento de difícil cura. Nesse contexto, a busca por novas fontes naturais com atividade antibacteriana principalmente no bioma amazônico tem crescido no último tempo na pesquisa de substâncias que apresente um potencial antibactericida ou mesmo antibacteriostático [6].

Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação microbicida do extrato etanólico de *P. tuberculatum* sobre *E. coli* *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE *P. tuberculatum*.

A coleta do vegetal foi realizada as 09h da manhã em bairro central do município de Porto Velho, Rondônia, com coordenadas geográficas 8°42'19" de latitude sul e 63°52'46" de longitude oeste e altitude. Foram coletadas as folhas, inflorescência e talos de *P. tuberculatum*, sendo as folhas, por conterem mais quantidade, foram utilizadas para os ensaios biológicos esse extrato.

A identificação da espécie foi realizada pela confecção de exsicata e o envio desta ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde encontra-se sob o número 211724.

Após a coleta foram pesadas as diferentes partes ao modo fresco e levado à estufa a 37°C e armazenado por 72 horas com a seguinte finalidade de desidratação, inativar enzimas e estabilizar os princípios ativos, sendo posteriormente, pesado e submetidos ao processo de trituração.

Os materiais adquiridos após a trituração foram armazenados em recipientes esterilizados adicionando a quantidade de 1L de etanol a 99,9% em vidrarias de erlemeyer com o sedimento de folha, 800 mL de etanol a 99,9% deixando armazenado por sete dias, após sete dias, foram substituídas as respectivas medidas de etanol e armazenado por mais sete dias repetindo esse processo durante 21 dias.

2.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS

Obtendo o extrato etanólico concentrado iniciaram-se o segundo processo de destilação simples que provém a remover o etanol e obter o extrato bruto de *P. tuberculatum* no aparelho rotaevaporador. Após obter-se o extrato bruto da *P. tuberculatum* iniciaram o processo de identificação de metabólitos presentes nos extratos com os métodos adequados de precipitação e coloração dos extratos diluídos em solução e reativos específicos para cada teste conforme [7]:

• Alcaloides

Para realizar o ensaio utilizou-se 2,0 mL da solução etanólica, sendo adicionados 2,0 mL de ácido clorídrico (10%), onde aqueceu mistura por 10 minutos. Após o resfriamento, o extrato foi dividido em três tubos de ensaios e colocaram-se oito gotas, utilizando pipeta de Pasteur, dos seguintes reativos de reconhecimento:

Tubo 1 - Reativo de Mayer: observando formação de precipitado branco ou leve turvação branca;

Tubo 2 - Reativo de Dragendorff: observando formação de precipitado de coloração laranja a vermelho;

Tubo 3 - Reativo de Wagner: observando formação de precipitado de coloração alaranjado.

• Glicosídeos cardiotônicos

A 2,0 mL de solução do extrato foi adicionado 3,0 mL de solução de acetato de chumbo a 10% e 2,0 mL de água destilada. Aqueceu a mistura em banho-maria durante 10 minutos. Em seguida, o

extrato foi filtrado e agitado com 10,0 ml de clorofórmio, separando a fase clorofórmica em 4 tubos de ensaio. Após a evaporação do clorofórmio, obteve-se a formação de resíduos nos tubos, os quais foram acrescidos dos seguintes reagentes:

Tubo 1: Realizou-se a reação de Salkowski para a determinação de núcleo esteroidal. Coloração indo do amarelo para o roxo é um resultado positivo.

Tubo 2: 1,0 mL de Reativo de Kedde.

Coloração rosa ou azul-violeta ao visível indica cardenólidos, os bufadienólidos não reagem. A cor se atenua em poucos minutos.

Tubo 3: Realizou-se a reação de Keller-Kiliani (ácido acético glacial, numa gota de cloreto férrico III a 5% em metanol e ácido sulfúrico concentrado). Colorações intensas é resultado positivo.

Tubo 4: Realizou-se a reação de Liebermann-Burchard (1,0 ml da amostra/algumas gotas de ácido acético + 3,0 mL anidrido acético/ácido sulfúrico (50:1, v/v). Resultado positivo: coloração verde, azul esverdeado, roxo a azul.

Tubo 5: Realizou-se a reação de Baljet (1,0 ml da amostra/oito gotas de ácido acético + 3,0 ml de clorofórmio). Resultado positivo: coloração laranja, roxo ou vermelho.

Tubo 6: Realizou-se a reação de Raymond (Filtraram-se o extrato e adicionaram-se 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10% + duas gotas de acetato de chumbo a 10%). Resultado positivo: coloração indo do amarelo ao roxo.

- **Cumarinas**

Em um tubo de ensaio colocou-se 2,00 mL da solução etanólica, tampou-se com papel de filtro impregnado em solução 10 % de NaOH e levou-se a banho de água a 100° C por alguns 10 minutos. Removeu-se o papel-filtro e examinou-se sob luz ultravioleta. A fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

- **Flavonoides**

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido. Colocou-se em um tubo, 2,0 mL do extrato etanólico, sendo adicionadas duas gotas de acetato de chumbo a 10%. A presença de um precipitado corado indica positividade da reação.

- **Taninos**

A 2,0 mL do extrato etanólico, adicionou-se 10 mL de água destilada. Filtraram-se e adicionaram-se duas gotas, utilizando a pipeta de Pasteur, da solução de cloreto férrico a 10%. Coloração azul indica possível presença de taninos hidrolisáveis, e coloração verde de taninos condensados.

- **Saponinas**

Neste ensaio, com 2,0 mL da solução etanólica, foi adicionado 5,0 mL de água destilada fervendo. Após resfriamento, agitou-se vigorosamente, deixando em repouso por 20 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas.

- **Triterpenos**

Neste ensaio, com 2,0 mL da solução etanólica, foi adicionado 5,0 mL de clorofórmio. Após filtração, o extrato foi dividido em duas porções. Em cada um dos tubos realizaram-se as reações de Liebermann-Burchard e Salkowski. Os triterpenos desenvolvem coloração estável e os esteroides desenvolvem coloração mutável com o tempo.

2.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Na determinação da atividade antimicrobiana foi utilizada cepa pertencente à “Coleção de Culturas do Laboratório de Análises Microbiológicas” da Faculdade São Lucas (FSL-RO), *E. coli* (ATCC 25922) e *E. coli* (UPEC) oriunda de paciente com cistite. A atividade antimicrobiana dos isolados e extrato etanólico de *P. tuberculatum* foram determinada pela metodologia de Técnica de embebedamento de discos. No teste, as culturas microbianas foram preparadas a partir de colônias isoladas das cepas reativadas e suspensas em 5mL de solução salina estéril.

A turvação da suspensão microbiana foi padronizada comparando-se com a escala 0,5 de MacFarland, a qual corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro), semeando cada suspensão microbiana com o auxílio de um swab estéril sobre a superfície da placa contendo 20 mL de ágar Müeller Hinton (bactérias) para obter um tapete homogêneo, e aplicando-se os discos embebedados com as seguintes concentrações das respectivas soluções: os extratos em duas diferentes concentrações; a

solução do antibiótico padrão ampicilina+sulbactam e os diluentes utilizados DMSO/H₂O, Clorofórmio e RPMI.

Assim, as concentrações dos extratos em teste foram 100 mg/mL (10 mg/100 µL) e 50 mg/mL (5 mg/100 µL), respectivamente; no quarto poço foi introduzida a concentração do antibiótico ampicilina+sulbactam 0,1 mg/mL (10 µg/100 µL), deixando o quarto poço para o controle do diluente (DMSO/H₂O à 20%, Clorofórmio e RPMI). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C ± 1°, e após medindo-se os halos de inibição produzidos, sendo realizados todos os ensaios em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 RESULTADOS FITOQUÍMICOS

O rendimento das folhas frescas de *P. tuberculatum* foi de 648,63 gramas, e das folhas secas foi de 149,60 gramas, obtendo-se 3 mL de extrato bruto para os estudos fitoquímicos e biológico

Para identificação dos alcaloides presente no extrato bruto das folhas de *P. tuberculatum* utilizou-se os reagentes de Mayer, Wagner e Drangedorff. Observou ausência da coloração marrom e verde para os reagentes de Mayer e Wagner, respectivamente, enquanto que para o reagente de Drangedorff observou a presença da colocação marrom.

Para a verificação da presença dos glicosídeos cardiotônicos foram empregados os reagentes de Kedde, Salkowski e Baljet obtendo-se como resultado a ausência da coloração laranja, porém observou-se e a presença de cor para os reagentes de Keller-Killiani, Lieberman e Raymond-Marthoud com coloração marrom, verde e laranja respectivamente.

A identificação da presença de flavonoides no extrato bruto das folhas de *P. tuberculatum* foi verificada pela formação de precipitação e coloração marrom.

Na avaliação da presença de taninos no extrato da planta foram realizados dois testes, um para os taninos hidrolisáveis e outro para os condensados. Obteve se como resultado a ausência dos dois tipos de taninos.

A presença de cumarinas foi analisada por meio da metodologia de fluorescência que observou a presença através da luminosidade. As saponinas estavam presentes no extrato bruto das folhas de *P. tuberculatum* devido à observação da formação de espuma e precipitados.

Os triterpenos e/ou esteroides foram analisados através dos testes com os reagentes Liebermann-Buchard observando a presença deles devido à formação da coloração verde claro e para o reagente de Salkowski observando a ausência pela formação da coloração verde claro, conforme demonstrado todos os resultados na Tabela 1:

Tabela 1. Identificação de metabólitos secundários das folhas de *P. tuberculatum*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	PRESENÇA OU AUSÊNCIA	COLORAÇÃO
Alcaloides		
Reagente de Mayer	Ausente	Marrom
Reagente de Wagner	Ausente	Verde
Reagente de Dragendorff	Presente	Marrom
Glicosídeos cardiotônicos		
Reagente de Kedde	Ausente	Laranja
Reagente de Keller-Killiani	Presente	Verde
Reagente de Lieberman	Presente	Laranja
Reagente de Salkowski	Ausente	Laranja
Reagente de Baljet	Ausente	Laranja
Reagente de Raymond-Marthoud	Presente	Laranja
Flavonoides		
	Positivo	Marrom
Taninos		
Hidrolisáveis		
	Ausente	Marrom
Condensados		
	Ausente	Marrom
Cumarinas		
	Presente	Com fluorescência
Saponinas		
	Presente	Com espumas
Triterpenos e/ou Esteroides		
Liebermann-Buchard	Presente	Verde
Salkowski	Ausente	Verde

Os metabólitos secundários possuem atividades importantes na proteção das plantas contra microrganismos fitopatogênicos [8]. Conforme estudos realizados com óleos essenciais de talos de *P. tuberculatum* no estado de Rondônia foi constatado que 92,7% são constituintes químicos sendo que 15,2% são sesquiterpenos e 77,5% são monoterpenos [9].

3.2 RESULTADOS DE ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Conforme a metodologia descrita anteriormente foi avaliada a atividade antibactericida do extrato da planta, através do halo de inibição de diferentes concentrações do extrato, visando analisar quais concentrações apresentaram melhor atividade inibitória para *E. coli*.

Nenhum halo de inibição sobre cepas de *E.coli* foi encontrado conforme a tabela 2 e 3.

Tabela 2. Resultados de halos de inibição na concentração de 50%.

Concentração de 50 %	Halo de inibição (mm)		Porcentagem de atividade (%)
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>E. coli</i> (Resistentes)	
<i>E.E.P. tuberculatum</i> + Cloróformio	0	0	0
<i>E.E.P. tuberculatum</i> + DMSO	0	0	0
<i>E.E.P. tuberculatum</i> + RPMI	0	0	0

Tabela 3. Resultados de halos de inibição na concentração de 100%.

Concentração de 100%	Halo de inibição (mm)		Porcentagem de atividade (%)
	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>E. coli</i> (Resistentes)	
<i>E.E.P. tuberculatum</i> + Cloróformio	0	0	0
<i>E.E.P. tuberculatum</i> + DMSO	0	0	0
<i>E.E.P. tuberculatum</i> + RPMI	0	0	0

Segundos levantamentos bibliográficos, existem poucos resultados positivos de atividade antibacteriana descrita para microrganismos pertencente à classe de gram-negativos. Com conformidade da metodologia utilizada os solventes necessitam ser levada em consideração a possível interação do extrato bruto de *P. tuberculatum* com

as cepas de *E. coli* com isso visar futuros possíveis estudos com diluições e solventes diferentes.

Resultados similares foram obtidos por [10] e [11] que avaliaram a atividade antibacteriana de espécie de plantas do mesmo gênero e observaram que as mesmas não eram eficazes contra microrganismo gram-negativos por apresentarem

uma espessa membrana de difícil permeabilidade algo diferente aos microrganismos gram-positivo que se tornaram susceptível ao extrato por serem mais expostos ao ambiente e em possuir membrana com facilidade na permeabilidade.

Segundo [5] o uso da família de Pipereaceae tem sido muito empregado na medicina popular para o tratamento de diversos tipos de doenças, com atividade anti-helmíntica, anti-inflamatória, anti-hemorrágica, e antibacteriana, além de também ser bastante empregado para terapias de micose.

Conforme [12] aplicação de espécies do gênero *Piper* no tratamento contra microrganismos patogênicos, tanto bactérias gram-negativas como gram-positivas, eram utilizadas devido aos conhecimentos etnofarmacológico da população. Estudos demonstrando potencial atividade biológica do gênero *Piper* para diversas enfermidades tem sido relatado constantemente, porém, pouco se sabe sobre a atividade antimicrobiana da *Piper tuberculatum*, esta espécie foi pouco pesquisada na área farmacológica, outras pesquisas vêm sendo realizadas em busca de novos fármacos. Já existem estudos demonstrando que as plantas quando atacada por microrganismo, sintetizam substância para se proteger da invasão desses microrganismos, essas substâncias são chamadas de metabólitos secundários, e esses compostos apresentam-se capazes de inibir ou até mesmo exterminar os invasores.

4. CONCLUSÃO

No processo do extrato fitoquímico de *P. tuberculatum* foram encontrados os seguintes

metabólitos secundários: alcolóides, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas, flavonóides, saponinas e triterpernos e a ausência de taninos. Foram realizados testes microbiológicos do extrato na concentração de 100% e 50% já diluídas em DMSO, clorofórmio e RPMI que não apresentaram atividade microbicida sobre cepas de *E. coli*. Diante do resultado sugere-se que possam ser realizados outros testes sobre o uso de novas metodologias.

5. REFERÊNCIAS

- [1] DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, n.7, 2006.
- [2] BRAZÃO, M.A.B. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente, Dilapiol frente à *Staphylococcus spp.* Multirresistentes.** Dissertação (Dissertação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.
- [3] LIMA, R.A. **Estudo químico das cascas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Rissek e seu potencial antimicrobiano.** 2016. 188f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
- [4] ALMEIDA, A.M.S. **Características biológicas e antigênicas de *Escherichia coli* com ênfase aos genes de virulência.** 2013. 30f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- [5] RODRIGUES, R.V. **Estudos fitoquímicos dos frutos de *Piper tuberculatum* (JACQ.) e avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos e constituintes isolados.** 2009. Tese (Doutorado em Biologia Experimental), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2009.
- [6] LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil; nativas e exóticas.** 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008.

[7] RADI, P.A.; TERRONES, M.G.H. Metabólitos secundários de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.20, n.2, p.18-22, 2007.

[8] FEIJÓ, A.M.; LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; SERPA, R.; BUENO, M.E.N.; RIBEIRO, G.A.; FREITA, R.A.; DELPINO, F.A.B. **Estudo do efeito antimicrobiano dos extratos etanólicos de *Mentha arvensis* L. (Laminaceae) sobre patógenos orais**, 2008. Disponível em <http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/arquivos/CS_01666.rtf> Acesso em 10 jul., 2009.

[9] FACUNDO, V.A.; POLLI, A.R.; RODRIGUES, R.V.; MILITÃO, J.S.L.T.; STABELLI, R.G.; CARDOSO, C.T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H.B.K. **Revista Acta Amazonica**, v.38, n.4, p.733-742, 2005.

[10] FREITAS, L.A.B.; ARAÚJO, J.M.; RAMOS, C.S. Perfil Químico e atividade antimicrobiana das raízes, folhas, caules e frutos da *Piper caldense* (PIPERACEAE). In: XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2013, Recife. **Anais... Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 8, UFRPE, 2013.

[11] NASCIMENTO, S.; SILVA, M.; SILVA, R.; ARAUJO, J.; RAMOS, C. Estudo Preliminar da atividade bactericida dos extratos dos tecidos de *Piper arboreum* frente *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* e MRSA. In: **Anais... Congresso Brasileiro de Química**, 52, Recife-PE, 2012.

[12] REGASINI, L.O.; CONTIGUIBA, F.; PASSERINI, G.D.; BOLZANI, V.S.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper abroreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p.199-203, 2009.