

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA – ICET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA
RECURSOS AMAZÔNICOS

SÂMIA RAYSA PINTO NOGUEIRA

CONTRIBUIÇÕES MORFOANATÔMICAS, ESTUDO FITOQUÍMICO E DE
POTENCIAL ALELOPÁTICO, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO DO EXTRATO
ALCOÓLICO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Piper tuberculatum* Jacq. (PIPERACEAE)

ITACOATIARA – AM
2019

SÂMIA RAYSA PINTO NOGUEIRA

CONTRIBUIÇÕES MORFOANATÔMICAS, ESTUDO FITOQUÍMICO E DE
POTENCIAL ALELOPÁTICO, ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANO DO EXTRATO
ALCOÓLICO E FRAÇÕES DE FOLHAS DE *Piper tuberculatum* Jacq. (PIPERACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

ORIENTADOR: PROF. DR. RANIERI CAMPOS

COORIENTADOR: PROF. DR. PAULO JOSÉ DE SOUSA MAIA

ITACOATIARA – AM

2019

Ficha catalográfica

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

N778c Nogueira, Sâmia Raysa Pinto
Contribuições morfoanatômicas, estudo fitoquímico e de potencial alelopático, antioxidante e antibacteriano do extrato alcoólico e frações de folhas de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) / Sâmia Raysa Pinto Nogueira. 2019
94 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Ranieri Campos
Coorientador: Paulo José de Sousa Maia
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Aleloquímicos. 2. Compostos Fenólicos. 3. Germinação e Crescimento. 4. Histoquímica. 5. Idioblastos Secretores. I. Campos, Ranieri II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Sâmia Raysa Pinto Nogueira

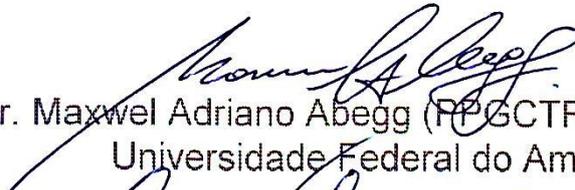
Contribuições morfoanatômicas, estudo fitoquímico e de potencial alelopático, antioxidante e antibacteriano do extrato alcoólico e frações de folhas de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae).

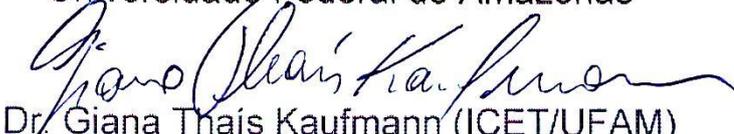
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovado em 12 de agosto de 2019.

BANCA EXAMINADORA


Dr. Ranieri Campos (PPGCTRA-ICET/UFAM) (Presidente)
Universidade Federal do Amazonas


Dr. Maxwell Adriano Abegg (PPGCTRA-ICET/UFAM)
Universidade Federal do Amazonas


Dr. Giana Thais Kaufmann (ICET/UFAM)
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado meu caminho e me dado forças.

Aos meus pais, Maria da Saúde Nunes Pinto e Raimundo Rosário Barbosa Nogueira por me ajudarem a suportar os desafios, pelo carinho e amor, e por sempre acreditarem na minha capacidade. Obrigada pela educação que me deram, por terem transmitido os mais valorosos saberes e compartilhado comigo cada vitória.

Às minhas irmãs Samila Rayana Pinto Nogueira, Suelen Rainanda Pinto Nogueira, Suely Raynara Pinto Nogueira, Déborah Kathlen Nunes dos Santos e sobrinha Isadora Sophie Nogueira Rocha pelos momentos de alegria, mensagens de apoio, companheirismo, por todo amor e incentivo.

Ao meu namorado José Aduino Lima de Souza Júnior, pela paciência e amor, pelos conselhos valorosos, por ter estado ao meu lado em todos os momentos e por se fazer presente mesmo distante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ranieri Campos, pela confiança, pelos ensinamentos, conselhos, por todo apoio e profissionalismo, por participar do meu crescimento profissional durante os últimos dois anos e pela oportunidade de ter desenvolvido esse trabalho sob sua orientação. Muito obrigada!

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Paulo José de Sousa Maia pelo esforço para a construção deste trabalho, pela orientação e ajuda durante o Estágio de Docência.

À Prof.^a Dr.^a Isabel Reis Guesdon, por ter me apresentado tão maravilhosamente a botânica, por todo esforço, ensinamento e orientação durante as análises morfoanatômicas e histoquímicas.

Ao Prof. MSc. Nicanor Tiago Bueno Antunes, por todo ensinamento, esforço, paciência e orientação na interpretação das análises estatísticas. Por toda ajuda concedida no decorrer desses dois anos de mestrado.

Agradeço também a todos os membros do Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em especial Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Gáspari Dias, Prof.^a Dr.^a Cristiane da Silva Paula, Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Warumby Zanin, Prof.^a Dr.^a Marilis Dalarmi Miguel, por disponibilizarem o laboratório para execução de nossas análises, pela parceria e feliz recepção durante nossa estadia em Curitiba-PR.

À Dr.^a Maria da Graça Teixeira de Toledo, responsável pela Central Analítica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) por ter dedicado seu tempo e disposição durante as análises cromatográficas.

À Prof.^a Dr.^a Cristina Peitz de Lima e Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia P. dos Santos por todo ensinamento, responsabilidade e ajuda concedida na execução das análises de potencial antibacteriano realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UNIBRASIL).

Ao meu Amigo, irmão de coração e parceiro de laboratório Jander Savedra Nunes, pela amizade, ajuda na execução dos experimentos, pelos inúmeros conselhos, pelos momentos de desabafo e por ter me ensinado tanto durante esses dois anos de curso. Em vários momentos difíceis as suas palavras foram essenciais para que eu conseguisse seguir em frente tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal. Não teria chegado até aqui sem sua ajuda. Obrigada!

À Ilze Dourado Campos, Jorgea Tânia Amazonas Barros e Raissa Carvalho de Matos pelos momentos de descontração, por todo auxílio nas coletas botânicas e parte experimental, e por terem se dedicado no desenvolvimento desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa e pelo financiamento da pesquisa a qual esse trabalho está vinculado.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos (PPGCTRA) pela oportunidade.

Muito Obrigada a todos, vocês foram essenciais para que esse trabalho se concretizasse!!!!

A DEUS.

Aos meus pais, Maria da Saúde e Raimundo Rosário.

Ao meu avô (materno) Antônio de Oliveira Pinto

As minhas irmãs, Samila, Suelen, Suely e Déborah.

À minha sobrinha Isadora Sophie.

Ao meu Namorado José Aauto.

Aos meus amigos.

DEDICO

“Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante”.

Albert Schweitzer – Nobel da Paz 1952.

RESUMO

O gênero *Piper* possui importância tanto ecológica quanto econômica e terapêutica. Estudos com extratos de espécies desse grupo têm demonstrado uma diversidade de metabólitos com atividades biológicas marcantes e muitas são tradicionalmente utilizadas na medicina popular. No entanto, devido a grande similaridade morfológica entre as espécies, é comum ocorrerem erros de identificação e coleta. Logo, são necessários estudos taxonômicos aprofundados. *Piper tuberculatum* Jacq. é uma espécie bastante utilizada no tratamento de doenças respiratórias e digestivas. Entre seus constituintes estão compostos fenólicos, flavonoides, amidas, taninos, fitoesteróis, fenilpropanoides e terpenoides, aos quais são atribuídas diversas atividades biológicas. Porém, não há estudos sobre seu potencial alelopático. Este trabalho descreve as características morfoanatômicas e histoquímicas da folha de *P. tuberculatum*, bem como o perfil fitoquímico, potencial alelopático, antioxidante e antibacteriano de seu extrato bruto e frações. Folhas de *P. tuberculatum* foram fixadas, seccionadas transversalmente e submetidas a análises morfoanatômicas e histoquímicas clássicas. O perfil fitoquímico do extrato bruto (EB) e frações hexano (FH), clorofórmio (FC), acetato de etila (FAE) e remanescente (FR) foram analisados por colorimetria e por Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE). O potencial alelopático foi investigado por medidas de germinação e crescimento, a atividade antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio e a atividade antibacteriana por difusão em disco. As folhas de *P. tuberculatum* são simples, com formato elíptico, margem inteira, ápice atenuado-acuminado, venação broquidódroma e lâmina assimétrica, principalmente na base. Características morfológicas semelhantes às registradas no gênero. Foram observados idioblastos subepidérmicos agrupados, distribuídos na superfície da face adaxial e próximos a feixes vasculares. Este padrão de distribuição foi descrito pela primeira vez em *Piper*. Testes histoquímicos mostraram que os compostos fenólicos são produzidos nas camadas subepidérmicas e em células do mesofilo, principalmente parênquima paliádico. Nos testes colorimétricos, quantificaram-se compostos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianidinas e fitoesteróis. Já por CLAE, foi identificado e quantificado o flavonoide vitexina. O EB e suas frações apresentaram comprovada atividade alelopática, principalmente para EB, FC e FAE nas concentrações de 500 µg/mL, que diminuiriam significativamente o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e o crescimento das espécies testadas. Esse efeito pode estar associado à vitexina. Nenhuma das amostras exibiu atividade antioxidante igual ou superior ao padrão de ácido ascórbico. Somente a FAE a 100 mg/mL exibiu atividade antibacteriana. Este trabalho pode agregar valor significativo para futuros estudos com *P. tuberculatum* e servir de base para a taxonomia, fitoquímica e demais potenciais biológicos associados ao gênero *Piper*. Principalmente em relação ao potencial alelopático e algumas características taxonômicas que foram aqui descritos pela primeira vez.

Palavras-chaves: Aleloquímicos; Compostos Fenólicos; Germinação e Crescimento; Histoquímica; Idioblastos Secretores.

ABSTRACT

The genus *Piper* has ecological, economic and therapeutic importance. Studies of species extracts from this group have shown a diversity of metabolites with remarkable biological activities and many are traditionally used in folk medicine. However, due to the great morphological similarity between species, identification and collection errors are common. Therefore, in-depth taxonomic studies are required. *Piper tuberculatum* Jacq. It is a species widely used in the treatment of respiratory and digestive diseases. Among its constituents are phenolic compounds, flavonoids, amides, tannins, phytosterols, phenylpropanoids and terpenoids, to which various biological activities are attributed. However, there are no studies on its allelopathic potential. This paper describes the morphoanatomic and histochemical characteristics of *P. tuberculatum* leaf, as well as the phytochemical profile, allelopathic, antioxidant and antibacterial potential of its crude extract and fractions. Leaves of *P. tuberculatum* were fixed, cross-sectioned and subjected to classical morphoanatomic and histochemical analyzes. The phytochemical profile of crude extract (EB) and hexane (FH), chloroform (FC), ethyl acetate (FAE) and remnant (FR) fractions were analyzed by colorimetry and high performance liquid chromatography (HPLC). Allelopathic potential was investigated by germination and growth measures, antioxidant activity by phosphomolybdenum complex reduction method and antibacterial activity by disk diffusion. The leaf of *P. tuberculatum* are simple, with elliptic shaped, entire margin, attenuated-acuminate apex, brochidodrome venation and asymmetric blade, mainly at the base. Morphological characteristics similar to those recorded in the genus. Grouped subepidermal idioblasts distributed on the surface of the adaxial face and close to vascular bundles were observed. This pattern of distribution was first described in *Piper*. Histochemical tests have shown that phenolic compounds are produced in the subepidermal layers and mesophyll cells, mainly palisade parenchyma. In colorimetric tests, phenolic compounds, flavonoids, tannins, anthocyanidins and phytosterols were quantified. Already by HPLC, the flavonoid vitexin was identified and quantified. The EB and its fractions showed proven allelopathic activity, mainly for EB, FC and FAE at concentrations of 500 µg / mL, which significantly decreased the Germination Speed Index (GSI) and the growth of the tested species. Such effect may be associated with vitexin. None of the samples exhibited antioxidant activity equal to or greater than ascorbic acid standard. Only FAE at 100 mg / mL showed antibacterial activity. Therefore, this work can add significant value for future studies with *P. tuberculatum* and serve as a basis for taxonomy, phytochemistry and other biological potentials associated with the genus *Piper*. Especially in relation to allelopathic potential and some taxonomic characteristics that were first described here.

Keywords: Allelochemicals; Germination and Growth; Histochemical; Phenolic Compounds; Secretory Idioblasts.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. Piperaceae no Brasil e no mundo	21
2.1.1. <i>Piper</i> sp.....	22
2.1.1.1. <i>P. tuberculatum</i> Jacq.....	23
2.2. Morfoanatomia e Histoquímica	24
2.3. Alelopatia	25
2.3.1. Espécies usadas nos bioensaios de alelopatia.....	27
2.4. Aspectos gerais sobre classes de metabólitos secundários em <i>Piper</i>	27
2.4.1. Compostos fenólicos.....	28
2.4.3. Alcaloides	31
2.5. Potencial antibacteriano de <i>Piper</i>	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos Específicos	36
4. METODOLOGIA	37
4.1. Coleta, herborização e fixação	37
4.2. Reagentes, solventes e equipamentos	38
4.3. Obtenção do extrato bruto e frações	38
4.4. Determinação do teor de umidade das folhas frescas de <i>P. tuberculatum</i>	39
4.5. Determinação de cinzas totais das folhas secas de <i>P. tuberculatum</i>	40
4.6. Análise do perfil químico do extrato bruto e frações	40
4.6.1. Quantificação do conteúdo total de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , e carotenoides.....	40
4.6.2. Quantificação do conteúdo total de compostos fenólicos.....	41

4.6.3.	Quantificação do conteúdo total de flavonoides.....	42
4.6.4.	Quantificação do conteúdo total de taninos.....	42
4.6.5.	Quantificação do conteúdo total de antocianidinas	43
4.6.6.	Quantificação do conteúdo total de fitoesteroides.....	43
4.6.7.	Cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE).....	44
4.7.	Investigação morfoanatômica e histoquímica das folhas de <i>P. tuberculatum</i>	45
4.7.1.	Estudo Anatômico e Histoquímico.....	45
4.7.2.	Análises histoquímicas	45
4.8.	Teste do potencial alelopático	46
4.8.1.	Germinação e crescimento.....	47
4.9.	Avaliação de atividade biológica	47
4.9.1.	Potencial antioxidante.....	47
4.9.1.1.	Avaliação do poder redutor frente ao complexo do fosfomolibdênio.....	47
4.9.2.	Teste de potencial antibacteriano.....	48
4.10.	Análise de dados.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1.	Rendimento do processo de extração	50
5.2.	Determinação de umidade das folhas frescas de <i>P. tuberculatum</i>	51
5.3.	Determinação do teor de cinzas totais das folhas secas de <i>P. tuberculatum</i>	52
5.4.	Análises de detecção dos principais grupos de metabólitos secundários.....	52
5.5.	Morfoanatomia e histoquímica das folhas de <i>P. tuberculatum</i>	63
5.6.	Potencial alelopático	68
5.6.1.	Germinação e crescimento.....	68
5.6.1.1.	Teste de crescimento inicial de <i>L. sativa</i> (Alface)	68
5.6.1.2.	Teste de germinação e crescimento inicial de <i>A. cepa</i> (Cebola).....	70
5.7.	Atividades Biológicas.....	74
5.7.1.	Atividade antioxidante (AA)	74

5.7.1.1. Avaliação do poder redutor frente ao complexo do fosfomolibdênio.....	74
5.7.2. Atividade antibacteriana	76
6. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da família Piperaceae.	21
Figura 2 - Distribuição de <i>P. tuberculatum</i> em países da América do Sul, América Central e Sul do México.....	23
Figura 3 - <i>Piper tuberculatum</i> (A), coletadas para extrato (B), coleta para morfoanatomia e histoquímica (C), exsicata (D).....	37
Figura 4 - Folhas em maceração (A) e Extrato Bruto de <i>P. tuberculatum</i> (B).....	38
Figura 5 - Sistema de eluição em gradiente: Metanol (fase A) e solução de ácido fosfórico 1% (fase B).....	45
Figura 6 - Soluções de extrato bruto e frações de <i>P. tuberculatum</i> para análise de Clorofila (<i>a</i> e <i>b</i>) e carotenoides. Concentrações de 1000 µg/mL.....	53
Figura 7 – Soluções padrão de ácido gálico.	54
Figura 8 - Curva de calibração do Ácido Gálico obtida através de espectrofotometria em 760 nm utilizando concentrações de 3,00 µg/mL, 8,06 µg/mL e 16,12 µg/mL.....	55
Figura 9 - Soluções-padrão de Rutina nas concentrações de 10 µg/mL 20 µg/mL 30 µg/mL.....	56
Figura 10 - Curva de calibração da Rutina obtida através de espectrofotometria em 415 nm, em espectrofotômetro utilizando concentrações de 10, 20 e 30 µg/mL.	56
Figura 11 - Teste de tanino para EB e frações FH, FC, FAE e FR. A coloração verde indica resultado positivo para presença de tanino nas frações.	58
Figura 12 - Teste para conteúdo total de fitosteroides. Amostras com coloração amarelo-esverdeado e solução branco.	59
Figura 13 - Curva de calibração do Colesterol obtida através da espectrofotometria em 640 nm utilizando concentrações de 95, 173, 239, 295e 343 µg/mL.	59
Figura 14 - Estrutura química do flavonoide (flavona) vitexina.	60
Figura 15 - Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Espectros de Ultravioleta (UV) do padrão de vitexina na cor verde e das amostras nas cores azul, preta e vermelha (A), curva de calibração do padrão de vitexina (B) e cromatogramas das amostras (C).....	61
Figura 16 – Folhas inteiras de <i>P. tuberculatum</i> completamente desenvolvidas, cortes transversais e paradérmicos dos fragmentos da base, meio e ápice para análise morfoanatômica e histoquímica.....	66
Figura 17 - Resultados histoquímicos dos tecidos secretores foliares em <i>P. tuberculatum</i>	67

Figura 18 - Plântulas de alface submetidas ao tratamento com extrato bruto (EB) nas concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, comparadas entre si e ao controle negativo (CN).	68
Figura 19 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (A), Comprimento Total (B), Comprimento do Hipocótilo (C) e Comprimento da Radícula (D) das plântulas de Alface submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações (FH, FC, FAE FR) de <i>P. tuberculatum</i>	70
Figura 20 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (A), Comprimento Total (B), Comprimento do Hipocótilo (C) e Comprimento da Radícula (D) das plântulas de Cebola submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações (FH, FC, FAE FR) de <i>P. tuberculatum</i>	72
Figura 21 - Plântulas cebola submetidas ao tratamento com a fração clorofórmio (FC) nas concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, comparadas entre si e ao controle negativo (CN).	72
Figura 22 - Ensaio da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de folhas de <i>P. tuberculatum</i> frente ao complexo fosfomolibdênio. Coloração verde indica reação.	75
Figura 23 - Resultados obtidos no ensaio do poder redutor pelo método do Fosfomolibdênio, expressos como média e desvio padrão.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns metabólitos isolados de espécies de <i>Piper</i>	32
Tabela 2 - Rendimento do extrato bruto e frações de <i>P. tuberculatum</i> , Piperaceae.....	50
Tabela 3 - Conteúdo total dos metabólitos detectados no extrato bruto e frações de <i>P. tuberculatum</i> (Piperaceae) de acordo com as médias e desvio padrão.....	53
Tabela 4 - Concentração de vitexina por amostra avaliada, determinada por CLAE.....	62
Tabela 5 - Resultado dos testes histoquímicos para as folhas de <i>P. tuberculatum</i> fixadas em formalina tamponada (FNT).	67
Tabela 6 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o EB e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de <i>P. tuberculatum</i> para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, Comprimento Total, Comprimento do Hipocótilo e Comprimento da Radícula das plântulas de alface.	69
Tabela 7 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o EB e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de <i>P. tuberculatum</i> para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, Comprimento Total, Comprimento do Hipocótilo e Comprimento da Radícula das plântulas de cebola.	71
Tabela 8 - Média dos halos (cm) de inibição do EB e frações obtidas das folhas frescas de <i>P. tuberculatum</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°	grau
°C	grau Celsius
μ	Micro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μg	Micrograma
β	Beta
A653	Absorbância em 653 nm
A666	Absorbância em 666 nm
AA	Atividade antioxidante
Abs	Absorbância
AMTR	Amostra
ANOVA	Análise de variância
AnthoT	Antocianidinas totais
ATCC	American Type Culture Collection
AVC	Acidente Vascular Cerebral
Carot	Carotenoides
ChloA	Clorofila <i>a</i>
ChloB	Clorofila <i>b</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
D.P	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Equivalente em ácido gálico
EB (FEB)	Extrato bruto
F	Varieções entre médias da amostra/ variação dentro das amostras
FAA	Formalina, Ácido Acético, Etanol
FAE	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmio

FH	Fração hexano
Flavo	Flavonoides
FNT	Formalina Neutra Tamponada
FR	Fração remanescente
g	grama
°GL	Grau Gay-Lussac
HBI	<i>Brain-Heart Infusion</i> (infusão cérebro-coração)
HCl	Ácido clorídrico
hip	Hipocótilo
IVG	Índice de velocidade de germinação
LC/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
M	Molar
mg	Miligrama
mg/g	miligrama por grama
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	Mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina
NADI	Reagente NADI (Método original: David & Carde, 1964)
NaHSO ₃	Bissulfito de sódio
NAOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
<i>p</i>	Probabilidade de significância
Ph	potencial Hidrogeniônico
PAS	Reagente de Schiff/ ácido periódico
PhenT	Compostos fenólicos totais
q.s.p	Quantidade suficiente para...
R	Software R estatístico
Rad	Radícula
RMN	Ressonância magnética nuclear
SFF	Sulfato ferroso e formalina
TMS	Tetrametilsilano
TTanC	Taninos totais
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFV	Universidade Federal de Viçosa

UV	Ultravioleta
var.	Variedade
ΔOD	Absorbância teórica

1. INTRODUÇÃO

A incansável busca pela compreensão da natureza e o desafio de transpor a barreira da sobrevivência levou ao surgimento da química de produtos naturais ou fitoquímica, área responsável pela investigação, isolamento, purificação, e caracterização dos constituintes de interesse químico e farmacológico presentes em plantas, fungos, animais e organismos marinhos (CHAVES, 2008).

No entanto, muito antes do surgimento de qualquer forma de escrita, o homem já fazia uso das plantas como alimento e/ou como remédio caseiro para tratamento de doenças (TOMAZZONI *et al.*, 2006). A procura por alívio de dores e cura de doenças pelo consumo de ervas, folhas e raízes possivelmente tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (SIMÕES *et al.*, 2007; FIRMO *et al.*, 2011; BARREIRO; VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

Com o passar do tempo e o surgimento de novas tecnologias, as plantas passaram a ser utilizadas como fontes de metabólitos secundários biologicamente ativos de grande valor agregado, devido às suas aplicações em medicamentos, fitoterápicos, cosméticos, alimentos, agroquímicos e, portanto, possuem importante papel na saúde mundial (BARREIRO; BOLZANI, 2009; MORAIS *et al.*, 2016; VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010; ANSELMO; LIMA, 2014).

Ressalta-se ainda que o Brasil abriga de 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial e está intimamente ligado ao comércio de produtos naturais (BARREIRO; BOLZANI, 2009; BARREIRO; VIEGAS JR; BOLZANI, 2006). Investigações apontam que aproximadamente 55 mil espécies de plantas estão presentes no território brasileiro, muitas destas são desconhecidas e frequentemente são apontadas pelas indústrias farmacêuticas e pesquisadores como possíveis fontes de produtos naturais com potencial terapêutico (BARREIRO; BOLZANI, 2009; KLOSS *et al.*, 2016).

As espécies da família Piperaceae, especialmente do gênero *Piper*, possuem propriedades terapêuticas bastante diversificadas e são popularmente utilizadas para fins medicinais (MESQUITA *et al.*, 2005; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Algumas espécies como *Piper aduncum* L, *Piper tuberculatum* Jacq., *Piper guineense*, *Piper cubeba* L. f. , *Piper dennissi* Trel., *Piper mikanianum* (Kunth) Steudl., *Piper boehmeriifolium* Wall. e *Piper umbellatum* L., são usadas na medicina popular devido a suas propriedades analgésicas, sedativas, alelopáticas, antimalárica, antileishmasiose, antirreumáticas, anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica, e também são utilizadas no combate de distúrbios digestivos,

reumatismo, febre, antidiuréticos, sífilis, dermatoses e infecções gerais (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017; GUZMAN; BRÚ, 2016; FACUNDO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014; BORELLA *et al.*, 2012; NAVICKIENE *et al.*, 2003).

Vale ressaltar que as propriedades terapêuticas citadas anteriormente são atribuídas a constituintes químicos como os compostos fenólicos, amidas, flavonoides, terpenos, taninos e alcaloides presentes em espécies de *Piper* (ALVES *et al.*, 2010; MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017; FIGUEIREDO *et al.*, 2013; BAY-HURTADO *et al.*, 2016).

Embora as espécies de *Piper* possuam atividades terapêuticas reconhecidas, a grande similaridade e complexidade entre as espécies podem ocasionar erros de identificação ou troca, tendo em vista que algumas destas espécies são vendidas e consumidas como fitoterápicos, como *P. tuberculatum*, por exemplo (SILVA *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2017). Por isso, é importante que além dos estudos fitoquímicos, também sejam desenvolvidas pesquisas relacionadas à caracterização morfoanatômica das espécies do grupo, e que visem fornecer parâmetros de autenticidade botânica e grau de pureza para controle de qualidade dessas espécies (MACHADO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016).

P. tuberculatum não possui registros a respeito de estudos alelopáticos do extrato de suas partes aéreas, assim como também não há informações aprofundadas sobre a taxonomia foliar. Dessa forma, o presente trabalho visa analisar o perfil fitoquímico do extrato alcoólico e frações de folhas de *P. tuberculatum* para busca de substâncias bioativas que possam ser utilizadas por suas propriedades farmacêuticas, investigar detalhadamente as características morfoanatômicas e histoquímicas, bem como avaliar os potenciais alelopático, antioxidante e antibacteriano dessa espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Piperaceae no Brasil e no mundo

A família Piperaceae pertence à ordem Piperales, que inclui as diversas variedades de pimentas e abrange aproximadamente 2515 espécies que estão distribuídas em 8 gêneros, dos quais *Piper* L. e *Peperomia* Ruiz e Pav. são os mais representativos (SILVA; BASTOS, 2007; NASCIMENTO, 2011; GOGOSZ *et al.*, 2012). A família possui ampla distribuição pelo mundo, em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Figura 1) (QUEIROZ; GUIMARÃES; BARROS, 2014). O Brasil possui cerca de 450 a 500 espécies divididas em 5 gêneros (*Ottonia*, *Piper*, *Piperomia*, *Pothomorphe* e *Sarcochachis*), distribuídas de norte a sul do país, principalmente nas regiões de mata Atlântica e da floresta Amazônica (GOGOZS *et al.*, 2012; MEIRELLES, 2014).

Figura 1 - Distribuição geográfica da família Piperaceae.



Nota: Os pontos em amarelo e alaranjado representam a distribuição de espécies pertencentes à família Piperaceae em regiões de clima tropical, subtropical e temperado como América do Sul, América Central, algumas cidade da América do Norte, Centro-Sul da África e Sul da Ásia.

Fonte: Missouri Botanical Garden - MOBOT (2018).

Em toda a América, as espécies de *Piper* possuem hábitos variados e podem ser encontradas em forma arbustos, ervas, cipós, arvoretas, subarbustos, lianas e epífitas, ocupando na maioria das vezes locais sombreados (GOGOSZ *et al.*, 2012; CARVALHO-OKANO; ALVES, 1998). Tais espécies possuem caules sedosos, folhas alternas, com formas e tamanhos variados, simples, com margem inteira peciolada, com ou sem estípulas, espigas opostas as folhas e flores (GOGOSZ *et al.*, 2012).

Muitas das propriedades terapêuticas dessas espécies são atribuídas aos constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário, que incluem classes de compostos como os compostos fenólicos, amidas, flavonoides, terpenos, taninos, alcaloides e outras que fazem parte de diferentes categorias de produtos naturais. Muitos estudos têm sido feitos para investigação do perfil químico dessas espécies, principalmente as que se enquadram no gênero *Piper* (ALVES *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2013; BAY-HURTADO *et al.*, 2016).

2.1.1. *Piper* sp.

Piper é um gênero botânico que possui valor tanto econômico quanto ecológico, incluindo uma variedade de espécies de grande importância na compreensão da evolução das plantas (DYER; PALMER, 2004).

Esse gênero possui em torno de 700 a 1200 espécies distribuídas pelo mundo, fazendo deste o maior gênero das angiospermas basais (SILVA; BASTOS, 2007). Dentre estas, aproximadamente 500 espécies ocorrem no Brasil e estão distribuídas de Norte a Sul (GUIMARÃES *et al.*, 2015). São popularmente conhecidas como pimenteiras ou falsos-jaborandis/beltres e possuem de 2 a 5 metros de altura (CHAVES, 2008). Essas espécies apresentam infrutescências que aparecem no final das estações chuvosas e ficam expostas verticalmente acima na copa da planta (CHAVES, 2008).

Do ponto de vista etnofarmacológico, pode-se dizer que as espécies de *Piper* têm sido usadas há séculos na medicina tradicional (NAVICKIENE *et al.*, 2006; FELIPE, 2009). Em geral, utilizam-se folhas, caules e raízes dessas espécies em forma de infusões, chás e pastas para o tratamento de doenças ginecológicas, distúrbios intestinais, efeitos psicotrópicos, antimicrobianos, antioxidantes, citotóxicos e outras finalidades. (MOREIRA *et al.*, 1998; CREMASCO; BRAGA, 2010; NAVICKIENE *et al.*, 2006; FELIPE, 2009). Daí o aumento considerável no interesse relacionado ao perfil fitoquímico dessas espécies para descoberta de produtos naturais biologicamente ativos, que possam ser utilizados como protótipos para produção de novos fármacos, bem como bioinseticidas para o controle de pragas agrícolas (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que diversas espécies de *Piper* da Amazônia já foram estudadas devido à ação terapêutica e tiveram o óleo essencial caracterizado quimicamente, como exemplo têm-se *Piper betle* L., *Piper nigrum* L., *Piper amapaense* Yunck, *Piper duckei* C. DC., *Piper bartlingianum* (Miq.) C. DC., *Piper arboreum* Aubl., *Piper marginatum* Jacq., *Piper*

hispidinervium C. DC., *Piper aduncum*, *P. tuberculatum* e *P. umbellatum* (BAY-HURTADO *et al.*, 2016; MGBEAHbURUIKE *et al.*, 2017; POTZERNHEIM *et al.*, 2012; SILVA; BASTOS, 2007).

Plantas do gênero *Piper* apresentam valor comercial relacionado à produção de óleo essencial, que incluem basicamente monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, aldeídos, cetonas e álcoois de cadeia longa (SILVA *et al.*, 2014). Análises fitoquímicas de espécies de *Piper* também demonstraram a ocorrência de metabólitos secundários com potenciais efeitos biológicos (FELIPE, 2009). No entanto, poucas são analisadas quanto ao potencial alelopático de seus extratos. Dessa forma, ainda existe uma grande variedade de espécies desse gênero que necessitam de investigações aprofundadas para traçar suas características taxonômicas e perfil fitoquímico.

2.1.1.1. *P. tuberculatum* Jacq.

P. tuberculatum é popularmente conhecida como pimenta-de-macaco, pimenta longa ou pimenta-d'Arda e encontra-se distribuída em países na América do Sul, América Central e Região Sul do México (Figura 2) (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; FACUNDO *et al.*, 2008). As investigações fitoquímicas realizadas para essa espécie verificaram acúmulo de amidas (alcaloides) como metabólito secundário, além da presença de mono e sesquiterpenos no óleo essencial (COTINGUIBA *et al.*, 2018; NAVICKIENE *et al.*, 2006).

Figura 2 - Distribuição de *P. tuberculatum* em países da América do Sul, América Central e Sul do México.



Fonte: Royal Botanic Gardens Kew Science (2019).

Essa espécie possui diversas atividades biológicas já registradas, como analgésica, sedativa, estimulante, tripanocida, antileishmaniose, antiplasmódico, anticâncer, anti-inflamatória, antileucêmica, anti-helmíntica, antimicrobiana, antifúngica e inseticida, as quais estão associadas aos seus constituintes químicos, principalmente amidas que estão presentes em suas folhas, frutos e caules (SILVA *et al.*, 2016; SALES *et al.*, 2017; MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018; COTINGUIBA *et al.*, 2018; NAVICKIENE *et al.*, 2003, 2006). As folhas e caules jovens de *P. tuberculatum* são tradicionalmente utilizados para o tratamento de doenças respiratórias (bronquite, asma e tosse) e digestivas (dores abdominais e diarreia), além de serem aplicadas para outros fins medicinais (SILVA *et al.*, 2016; SALES *et al.*, 2017).

2.2. Morfoanatomia e Histoquímica

Piper (Piperaceae) é um gênero megadiverso com espécies de difícil distinção taxonômica devida a uma estreita similaridade estrutural, sendo necessárias ferramentas que auxiliem a identificação interespecífica por meio de comparação com material herborizado (SILVA *et al.*, 2014; GARCIA, 2005). Estudos citogenéticos também têm sido reconhecidos como uma ferramenta relevante para a elucidação de problemas taxonômicos e filogenéticos de plantas, como os identificados na família Piperaceae, que é considerada um grupo taxonômico confuso (NUNES *et al.*, 2007).

De acordo com Albiero *et al.* (2005b) e Pereira *et al.* (2008), a grande similaridade morfológica entre as espécies do gênero *Piper* contribui para o surgimento de problemas de identificação, troca ou até mesmo falsificação quando as espécies são coletadas e comercializadas como medicinais. Logo, é importante detectar caracteres estruturais que auxiliem na identificação e avaliação dessas espécies (ALBIERO *et al.*, 2005b).

De modo geral, as folhas dessas espécies apresentam considerável variação de formas (na mesma planta) e isso dificulta a identificação e propicia o aumento dos sinônimos (RUSCHEL, 2004). Atualmente, muitos são os estudos voltados para descrição taxonômica de espécies da família Piperaceae, em geral do gênero *Piper*. Segundo as pesquisas realizadas por Albiero *et al.* (2005a, 2005b, 2006), foram relatadas características e peculiaridades encontradas em folhas de *Piper crassinervium*, *Piper gaudichaudianum* Kuntze e *Piper hispidum* L. Do mesmo modo, registros publicados por Iwazaki, Oliveira e Souza (2008) descreveram sobre a morfoanatomia comparativa de estruturas de reprodução de *P. arboreum* e *P. gaudichaudianum*.

Por conseguinte, estudos realizados por Pereira *et al.* (2008) descreveram as características anatômicas do limbo foliar de *P. aduncum* L. Já as investigações executadas por Silva *et al.* (2017) analisaram os perfis morfoanatômicos de folhas e galhos de *Piper callosum* com o intuito de estabelecer parâmetros de autenticação botânica e grau de pureza para controle de qualidade de folhas e caules.

Dessa forma, é necessário que se façam estudos aprofundados sobre as características de *P. tuberculatum*, uma vez que as investigações morfológicas, anatômicas e histoquímicas têm um importante papel e visam fornecer elementos para a taxonomia, para controle de qualidade de drogas a fim de evitar falsificações, bem como ajudar na identificação microscópica e microscópica (composição da estrutura vegetal) tanto dessa espécie quanto de outras plantas de interesse medicinal (CARVALHO; RIBEIRO, 2005; DOUSSEAU, 2009; DÔRES, 2007).

2.3. Alelopatia

A palavra alelopatia deriva do grego, da junção das palavras *allélon* e *pathos*, significando mútuo e prejuízo, respectivamente (SILVA, 2012). A alelopatia é definida como os efeitos benéficos ou prejudiciais de uma planta sobre a outra mediada por metabólitos secundários liberados no ambiente denominados aleloquímicos (SILVA, 2012; LUSTOSA *et al.*, 2007; WANDSCHEER; PASTORINI, 2008).

Os aleloquímicos são produzidos naturalmente pela planta e podem contribuir para sua sobrevivência e/ou desenvolvimento de mecanismos de defesa, proteção contra ervas daninhas, ataques de micro-organismos, insetos, agentes patogênicos, predadores naturais, além de influenciar no crescimento (acelerar ou retardar) de receptores de outras plantas (GOMAA *et al.*, 2014; BORELLA; PASTORINI, 2009; SANTORE, 2013).

Os aleloquímicos são liberados das plantas por meio de exsudação, lixiviação ou pela decomposição e decaimento dos tecidos vegetais (ALVES *et al.*, 2003; BORELLA; PASTORINI, 2009; CÂNDIDO *et al.*, 2010). Estes compostos podem penetrar em outra planta de forma direta, quando os aleloquímicos ligam-se às membranas da planta receptora ou penetram nas células ou indiretamente pelos efeitos dos aleloquímicos em micro-organismos do solo, que sejam promotores de crescimento de patógenos (MACÍAS *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2013).

Em geral, os efeitos dos aleloquímicos têm sido investigados por diversos pesquisadores em todo o mundo com o intuito de verificar o potencial alelopático de espécies

pertencentes tanto à família Piperaceae quanto a outras famílias do reino vegetal. Assim, investigações feitas por Alves *et al.* (2003) comprovaram atividade alelopática da fração rica em alcaloides obtida de *Solanum crinitum* Lam. sobre *Lactuca sativa* L. Já Cunico *et al.* (2006) verificaram efeito inibitório de amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. também sobre a germinação e crescimento das radículas das plântulas de alface.

Um estudo efetuado por Borella e Pastorini (2009) foi observado efeito alelopático do extrato de *Phytolacca dioica* L. preparado em diferentes concentrações sobre germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. Lorensi *et al.* (2017) avaliaram a atividade alelopática de extratos de *Plectranthus barbatus* (boldo brasileiro) e *Aloe vera* (babosa) também sobre germinação e crescimento inicial do tomateiro e constataram que o extrato de babosa estimula a germinação e crescimento enquanto que o extrato de boldo interfere na germinação e crescimento das plântulas de tomate.

Em outra análise feita por Borella *et al.* (2010) foi verificado que os extratos aquosos de folhas de *Rollinia sylvatica* apresentaram ação alelopática e reduziram significativamente a porcentagem de germinação de rabanete em todas as concentrações testadas. Formagio *et al.* (2010) utilizaram extratos de folhas e caules de cinco espécies de Annonaceae (*Annona crassiflora* Mart., *A. coriácea* Mart., *A. dioica* St. Hill., *A. sylvatica* St. Hill. e *Duguetia furfuracea* St. Hill) e confirmaram atividade alelopática sobre o germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface.

Com relação a pesquisas relacionadas às espécies do gênero *Piper*, muitas têm sido realizadas para testar o potencial alelopático do óleo essencial, como as análises feitas por Souza Filho *et al.* (2009) que determinaram a atividade alelopática do óleo essencial de *P. hispidinervium* sobre plantas daninhas.

No entanto, poucos são os estudos feitos para analisar o efeito alelopático do extrato dessas espécies. Com isso, Lustosa *et al.* (2007) pesquisaram e observaram efeitos alelopáticos significativos exibidos pelo extrato aquoso de *P. aduncum* e *Piper tectoniifolium* Kunth sobre a germinação e crescimento inicial de alface e apuraram que esses efeitos eram semelhantes e possivelmente poderiam apresentar compostos químicos similares. Portanto, há um leque de possibilidades para novas pesquisas voltadas para a investigação do potencial alelopático de extratos de espécies do gênero *Piper*.

Cabe ainda salientar, que apesar de existirem pesquisas publicadas quanto ao potencial terapêutico de alcaloides isolados de extratos de frutos e caule de *P. tuberculatum* e dos constituintes químicos de seu óleo essencial (BRAZ FILHO; SOUZA; MATTOS, 1981;

ARAÚJO-JÚNIOR *et al.*, 1997; NAVICKIENE *et al.*, 2006), não existem registros na literatura a respeito de estudos voltados para investigação do potencial alelopático do extrato de folhas dessa espécie.

2.3.1. Espécies usadas nos bioensaios de alelopatia

Os bioensaios alelopáticos consistem em testes que utilizam espécies vegetais de interesse terapêutico, que podem fornecer informações a respeito da fitotoxicidade dessa espécie frente a uma espécie teste/piloto, tais testes devem ser facilmente replicados e mostrar respostas consistentes (MACÍAS *et al.*, 2005).

Por conseguinte, para que uma espécie seja selecionada como planta de teste, é necessário que esta apresente germinação rápida e homogênea, e um grau de sensibilidade que permita expressar os resultados mesmo sob baixas concentrações das substâncias alelopáticas (fitotoxinas / aleloquímicos) (GABOR; VEATCH, 1981). A resistência ou tolerância aos aleloquímicos é descrita como uma característica espécie-específica, tendo algumas espécies sensíveis como *L. sativa* (alface), *Lycopersicon esculentum* Miller (tomate), *Cucumis sativus* L. (pepino) e *Raphanus sativus* L. (rabanete), consideradas como indicadoras de atividade alelopática (LUSTOSA *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2004).

2.4. Aspectos gerais sobre classes de metabólitos secundários em *Piper*

As plantas são um dos principais biossintetizadores de vários tipos de estruturas moleculares, ocasionando a produção de componentes orgânicos que são divididos em metabólitos primários e secundários (BRAZ FILHO, 2010). O metabolismo secundário das plantas produz substâncias químicas caracterizadas em sua maioria como princípio ativo, e tem sua função relacionada com a atuação desta com o meio ambiente que a envolve (SANDIM, 2014).

Os metabólitos secundários apresentam importante atividade ecológica, pois atuam como protetores da ação dos raios ultravioletas, principalmente os compostos fenólicos, bem como defesa contra predadores, vírus e patógenos (SIMÕES *et al.*, 2007). A diversidade estrutural dos metabólitos secundários é originada por modificações na cadeia carbônica principal da estrutura e essas modificações podem alterar a atividade biológica do composto derivado em relação a sua estrutura inicial (KLIEBENSTEIN, 2004).

De acordo com a rota biossintética, os metabólitos secundários são classificados em três grandes famílias: substâncias fenólicas, terpenos/esteroides e alcaloides (BOURGAUD, 2001). Essas substâncias têm despertado o interesse de muitos pesquisadores devido às suas inúmeras propriedades terapêuticas, tais como anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, antimicrobiana, anestésica, anticancerígena, dentre outras (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Assim, muitas espécies de plantas são investigadas quanto ao potencial para produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, como *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) que se destaca pela produção dos alcaloides vincristina e vimblastina, os dois mais importantes agentes quimioterapêuticos de uso clínico corrente contra o câncer (BRAZ FILHO, 2010). Ainda podem citar-se a lactona sesquiterpênica artemisinina, princípio ativo extraído de *Artemisia annua* L. (Asteraceae), conhecido como um potente agente antimalárico natural (BRAZ FILHO, 2010) e as folhas de *Andropogon leucostachys* H.B.K (Poaceae) que são conhecidas por possuírem ação antitérmica e analgésica comprovadas cientificamente (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Diversas são as espécies de plantas que têm sido investigadas quanto ao conteúdo e potencial de seus metabólitos. Em estudos realizados com Piperaceae brasileiras foram observadas ocorrência de fenilpropanóides, polifenóis (flanovoides), pironas, terpenos, alcaloides, lignóides, amidas, esteroides e cromenos, constituintes que apresentam propriedades inseticidas, antifúngicas, anticancerígenas, anti-hipertensiva, antioxidante, anti-lipêmica, ansiolítica, antidepressiva e anti-inflamatória (CREMASCO; BRAGA, 2010; NAVICKIENE *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2002; ROVANI *et al.*, 2013).

Dentre as atividades biológicas já descritas na literatura para o gênero *Piper*, destacam-se as propriedades antitumorais de espécies (MESQUITA *et al.*, 2005) como *P. tuberculatum* Jacq. (BEZERRA *et al.*, 2015), *P. chaba* Hunter (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2002) *P. longum* L. (LEE *et al.*, 2013), *P. guineense* Schumach. & Thonn. (SCOTT *et al.*, 2005), *P. boehmeriaefolium* (Miq.) C. DC. (TANG *et al.*, 2010) e *P. arborescens* Roxb. (TSAI *et al.*, 2005), por exemplo.

2.4.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem uma classe importante de metabólitos vegetal comuns no ecossistema, consistindo de um grupo hidroxila (-OH) ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático (LI *et al.*, 2010). Além disso, esses metabólitos têm sido alvo

constante de estudos químicos, biológicos, agrícolas e medicinais devido a suas propriedades terapêuticas (SANTOS *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos de plantas são classificados e agrupados em categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido cinâmico e benzoico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA *et al.*, 2007). Esses compostos, juntamente com os terpenoides, são responsáveis por grande parte das atividades alelopáticas, antioxidantes e anti-inflamatórias já identificados (SANTOS *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010; NISHIDA *et al.*, 2005). Dentre os 40 fármacos anti-inflamatórios aprovados entre os anos de 1983 e 1994, doze foram derivados ou baseados em polifenóis/compostos fenólicos de origem natural (COUTINHO *et al.*, 2009).

Entre a grande variedade de compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, por estarem relacionados com as propriedades antioxidantes, atuando como sequestradores de radicais livres e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos, na função protetora e no tratamento de doenças degenerativas mediadas pelo estresse oxidativo (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008; DORNAS *et al.*, 2007). Esses compostos representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, sendo amplamente distribuídos pela natureza e, por diversas vezes, suas várias ações biológicas lhes conferem um grande potencial farmacológico/terapêutico (COUTINHO *et al.*, 2009).

A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano (núcleo padrão C6-C3-C6) e, dependendo das modificações no anel central dessas substâncias (diferenciação), podem ser enquadrados em outros seis subgrupos: flavonas, flavononóis, catequinas ou flavonóis, flavanonas, antocianinas e isoflavonas (SILVA, 2006; HOFFMANN-RIBANI; RODRIGUEZ-DELIA, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009).

A presença de flavonoides (C-glicosil) em Piperaceae foi observada pela primeira vez em 1972 (TILLEQUIN *et al.*, 1978). Posteriormente, em pesquisas realizadas a partir do extrato e frações de folhas de *P. marginatum* Jacq. foram identificados e isolados os flavonoides vitexina e marginatosideo (TILLEQUIN *et al.*, 1978). Mais tarde, em estudo realizado por Quílez *et al.* (2010) para o extrato de folhas de *P. carpunya* Ruiz & Pav. também foi identificado o flavonoide Vitexina, seguido de Isovitexina e isoembigenina.

Em outras pesquisas com extrato de folhas de *P. callosum* Ruiz & Pav. foram identificados e isolados os flavonoides 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavona, 5,7,3',4'-tetrametoxiflavona e 5-hidroxi-7,3',4',5'-tetra-metoxiflavona (FACUNDO; MORAIS; BRAZ

FILHO, 2000). Já Ahmad *et al.* (2014) e Rajudin *et al.* (2010) relataram o isolamento de sete flavonoides a partir do extrato de folhas de *P. porphyrophyllum* NE. Br.: 5,7-dimetoxiflavona, 4',5,7-trimetoxi-flavona, 3',4',5,7-tetrametoxiflavona, 4'-hidroxi-3',5,7-trometoxiflavona, 5-hidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona, 4',5-di-hidroxi-3',7-dimetoxiflaona e 5-hidroxi-7-metoxiflavona, algumas destas tiveram atividade antibacteriana e antiinflamatória comprovadas por ensaios *in vitro*. Assim, desde a descoberta de flavonoides em *Piper* até os dias atuais, inúmeros estudos têm buscado identificar e isolar esses metabólitos devido ao grande interesse em suas propriedades biológicas.

2.4.2. Fenilpropanoides

Os fenilpropanóides são uma classe de metabólitos secundários que estão presentes na composição do óleo essencial tanto de espécies de *Piper* quanto de outras espécies do reino vegetal. Em investigações realizadas com o óleo essencial obtido de folhas de *P. divaricatum*, *P. hispidinervium* e *P. callosum*, respectivamente, foram observadas altas concentrações de safrol (98%, 91% e 70%), substância que apresenta propriedades antibacteriana e inseticida (RAMOS *et al.*, 2012; CREMASCO; BRAGA, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

O safrol é um fenilpropanoide que possui valor comercial, sendo utilizado pelas indústrias como matéria-prima (CREMASCO; BRAGA, 2010). Para isso, o safrol é isomerizado para obtenção do isosafrol, seu correspondente mais estável, que é empregado na manufatura de piperonal, uma substância fixadora de fragrância, e butóxido de piperonila, um inseticida sinergista (CREMASCO; BRAGA, 2010).

Em outros estudos com o óleo essencial dos frutos e talos finos de *P. tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H.B.K. foram identificados como constituintes majoritários o óxido de cariofileno e (*E*)-cariofileno, ambos em diferentes porcentagens para *P. tuberculatum* e, para *P. hispidum* foram identificados o dilapiol (57,5%), a elemicina (24,5%) e o apiol (10,2%) (FACUNDO *et al.*, 2008). O dilapiol também é um fenilpropanoide ao qual é atribuída a atividade inseticida, larvicida, fungicida, bactericida e acaricida, tal substância também já foi identificada em *P. aduncum* e pode ser encontrada em outras espécies do gênero (PEREIRA *et al.*, 2008).

Em pesquisas recentes realizadas na Universidade Federal do Amazonas, foram isolados e testados 15 constituintes químicos ativos de *P. aduncum* (entre eles o dilapiol). Para isso, algumas moléculas foram modificadas e transformadas em derivados semissintéticos para aumentar a forma de ação e, cinco destas substâncias apresentaram

efeitos potencialmente efetivos sobre larvas e mosquito adulto *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (SOUZA, 2017). Posteriormente, foram elaboradas formulações derivadas de *P. aduncum* como cremes repelentes, spray para ambiente e um produto larvicida, tais produtos encontram-se em fase de testes (SOUZA, 2017; PEREIRA *et al.*, 2008).

2.4.3. Alcaloides

As espécies da família Piperaceae também são conhecidas por apresentarem e acumularem uma série de alcaloides, tais como amidas, que possuem uma elevada atividade biológica, sendo mais frequente a piperina (NAVICKIENE *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2002). A piperina (1-piperoyliperidine) é um dos principais constituintes dos frutos de *P. nigrum* L. à qual está associada a vários efeitos farmacológicos como antidiurético, hepatoprotetor, anti-inflamatório, analgésico, alta atividade antioxidante, além de ser aplicada no tratamento da doença de Alzheimer (ZARAI *et al.*, 2013; MAHMOOD *et al.*, 2014). Essa amida também pode ser encontrada em espécies como *P. longun* Linn., *P. guineense* e *P. tuberculatum* Jacq. (SANTOSH *et al.*, 2005; UPADHYAY *et al.*, 2013; SCOTT *et al.*, 2005).

Todavia, em pesquisas voltadas para investigação do extrato de frutos de *P. tuberculatum*, foram isoladas as amidas piplartina e dihidroplartina (FACUNDO *et al.*, 2008; BEZERRA *et al.*, 2007). Enquanto, que em outros estudos com extratos de *Piper* foram identificadas e isoladas as amidas piperlonguminina, guineensina, chabamida, pelitorina e piperidina (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017). Na Tabela 1 estão dispostos alguns dos metabólitos isolados de espécies do gênero *Piper*, bem como as principais propriedades biológicas atribuídas a estas substâncias.

Tabela 1 - Alguns metabólitos isolados de espécies de *Piper*.

Classe	Composto	Atividade	Ocorrência	Referências
	Piperolactama	Citotóxica	<i>P. acutisleginum</i> <i>P. arborens</i> <i>P. argyrophyllum</i> <i>P.</i> <i>boehmeriaefolium</i> <i>var. tonkinense</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i>	Olsen <i>et al.</i> , 1993; Singh <i>et al.</i> , 1996; Chen <i>et al.</i> , 2004; Xiao <i>et al.</i> , 2005; Chaves <i>et al.</i> , 2006; Marques <i>et</i> <i>al.</i> , 2007; Ee <i>et</i> <i>al.</i> , 2008;
	Stigmalactama	Citotóxica	<i>P.</i> <i>boehmeriaefolium</i>	(Xiao <i>et al.</i> , 2005).
	Cefaradiona A	Citotóxica Danificação de ADN	<i>P. argyrophyllum</i> <i>P. lolot</i> <i>P. caninum</i>	(Gupta <i>et</i> <i>al.</i> , 1999; Ma <i>et</i> <i>al.</i> , 2004b; Li <i>et</i> <i>al.</i> , 2007).
	Dímero de Piplartina A	Citotóxica	<i>P. arborescens</i> <i>P. rugosum</i> <i>P. tuberculatum</i> (fruto) <i>P. puberullum</i>	(Braz Filho <i>et al.</i> , 1981; Duh <i>et al.</i> , 1990; Maxwell e Rampersad, 1991; Lee <i>et al.</i> , 2004; Marques, 2009; Lago; Ito <i>et al.</i> , 2012).
Alcaloides				
	Chavicine	Intensificador de memória	<i>P. nigrum</i>	(Xin <i>et al.</i> , 2016; Iqbal <i>et al.</i> , 2016.)
	Piperina	Antipirética Antimicrobiana Anti-inflamatória Analgésica Citotóxica Antioxidante Hepatoprotetora Antimiótica	<i>P. longun</i> Linn. <i>P. nigum</i> Linn. <i>P. guineense</i> <i>P. tuberculatum</i> (fruto)	(Santosh <i>et al.</i> , 2005; Upadhyay <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2017; Scott <i>et al.</i> , 2005; Bezerra <i>et al.</i> , 2005; Mgbeahuruike <i>et</i> <i>al.</i> , 2019).
	Piperilina	NI	<i>P. guineense</i>	(Mgbeahuruike <i>et</i> <i>al.</i> , 2019)
	Piplartina	Citotóxica Antimiótica Antitumoral Antileucêmico Antifúngica Ansiolítica Antidepressiva Antiagregantes plaquetários Antileishmania	<i>P. tuberculatum</i> (frutos)	(Facundo <i>et al.</i> , 2008; Bezerra <i>et</i> <i>al.</i> , 2005, 2007, 2012).

(Continua)

(Continuação)

Classe	Compostos	Atividade	Ocorrência	Referência
Fenilpropanoides	Dilapiol	Inseticida Antimicrobiano	<i>P. aduncum</i> <i>P. obriquum</i> <i>P. hispidinervum</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. regnellii</i>	(Ramos <i>et al.</i> , 1986; Orjala <i>et al.</i> , 1993; Benevides <i>et al.</i> , 1999; Estrela <i>et al.</i> , 2006; Rafael <i>et al.</i> , 2008; Guerrini <i>et al.</i> , 2009).
	Elemicina	Antimicrobiana	<i>P. bankisii</i> <i>P. futokadsura</i> <i>P. guineense</i> <i>P. lanceaefolium</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. hispidum</i>	(Loder e Neam, 1972; Ramos <i>et al.</i> , 1986; Ekundayo <i>et al.</i> , 1988; Mundina <i>et al.</i> , 2001; Jirovetz <i>et al.</i> , 2002; Konishi <i>et al.</i> , 2009; Facundo <i>et al.</i> , 2008).
	Safrol	Antimicrobiana Antioxidante Antineoplásica	<i>P. cubeba</i> <i>P. sylvaticum</i> <i>P. retractorum</i> <i>P. aduncum</i> <i>P. auritum</i> <i>P. betle</i> <i>P. guineense</i> <i>P. hispidinervi</i> <i>P. marginatum</i> <i>P. obliquum</i> <i>P. divaricatum</i> <i>P. callosum</i> <i>P. hispidum</i>	(Banerji; Dhara, 1974; Bodiwala <i>et al.</i> , 2007; Marques, 2009; Cremasco; Braga, 2010; Ramos, C., <i>et al.</i> , 2012).
	(<i>E</i>)-cariofileno			(Facundo <i>et al.</i> , 2008)
Terpenos	Limoneno	Antifúngica Antibacteriano	<i>P. nigrum</i> <i>P. tuberculatum</i> (óleo essencial)	(Musenga; Madrioli <i>et al.</i> , 2007; Facundo <i>et al.</i> , 2008).
	α-pineno / β-pineno	Antifúngica Antibacteriano	<i>P. nigrum</i> <i>P. tuberculatum</i> (óleo essencial)	(Musenga; Madrioli <i>et al.</i> , 2007; Facundo <i>et al.</i> , 2008).
Lignanas e neolignanas	Sesamina	Antituberculose Antioxidante Nefroprotetora Antileishmania Antihipertensivo	<i>P. cubeba</i> <i>P. refractorum</i> <i>P. sylvaticum</i>	(Marques, 2009; Pamar e Jain, 1997).
	(-) – grandisina	Tripanomicida Larvicida Inseticida	<i>P. solmsianum</i>	(Leite <i>et al.</i> , 2012; Marques, 2009).
	(-) – cubebina	Antifúngica Antihistamínica Antiinflamatória Tripanomicida Antineoplásica	<i>P. cernuum</i> <i>P. clusii</i> <i>P. cubeba</i> <i>P. nigrum</i> <i>P. trichostachyon</i>	(Marques, 2009; Niwa <i>et al.</i> , 2013).

(Continua)

(Conclusão)

Classe	Compostos	Atividade	Ocorrência	Referência
Compostos Fenólicos/ Chalconas / Flavonoide	Flavokavaina B	Antifúngica Leishmanicida Citotóxica Anticâncer	<i>P. dilatatum</i> <i>P. rusbui</i> <i>P. methylsticum</i>	(Dos Santos <i>et al.</i> , 2013; Flores <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2014).
	Adunchalcona	Leishmanicida	<i>P. aduncum</i>	(Dal Picolo <i>et al.</i> , 2014).
	Vitexina	Anti-inflamatórios, Anticâncer, Antiespasmódicos, Antimicrobianos, Antioxidantes, Antitireoidianos, Antiarterioscleróticos Prevenção de doenças Cardíacas	<i>P. marginatum</i> <i>P. carpunya</i> <i>P. amalago</i>	(Tillequin <i>et al.</i> , 1978; Gu <i>et al.</i> , 2017; Santos <i>et al.</i> , 2015; Rovani <i>et al.</i> , 2013).
	Marginatosideo	NI	<i>P. marginatum</i>	(Tillequin <i>et al.</i> , 1978; Brú; Guzman, 2016).
Esteroides	Estigmasterol	Antifúngica	<i>P. chimonantifolium</i> <i>P. renitens</i> <i>P. dilatatum</i> <i>P. tuberculatum</i> (frutos) <i>P. carniconnectivum</i> <i>P. gaudichaudianum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2012; Facundo <i>et al.</i> , 2012; Facundo <i>et al.</i> , 2008; Alves <i>et al.</i> , 2010; Bardelli, Kirizawa e Sousa, 2008).
	β-Sitosterol	Antifúngica	<i>P. chimonantifolium</i> <i>P. renitens</i> <i>P. dilatatum</i> <i>P. tuberculatum</i> (frutos) <i>P. gaudichaudianum</i>	(Lago <i>et al.</i> , 2012; Facundo <i>et al.</i> , 2012; Facundo <i>et al.</i> , 2008; Bardelli; Kirizawa; Sousa, 2008).
		Analgésica Anti-inflamatória	<i>P. gaudichaudianum</i>	

Nota: Em negrito estão destacados os metabólitos isolados de *P. tuberculatum*. Atividade Não Informada (NI).

Fonte: Adaptado de Santosh *et al.* (2005); Upadhyay *et al.* (2013); Fokoue (2014); Brú e Guzman (2016); Mgbahuruike *et al.* (2017, 2019); Bezerra *et al.* (2005, 2007, 2012); Facundo *et al.* (2008).

2.5. Potencial antibacteriano de *Piper*

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente ou serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (COUTINHO *et al.*, 2009). Assim, ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao

surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo (CUNICO *et al.*, 2004).

No entanto, o consumo elevado de antibióticos desencadeou o aumento da resistência bacteriana e limitou as opções terapêuticas dos processos infecciosos, causando assim um sério problema de saúde pública (CUNICO *et al.*, 2004, 2006; ANTUNES *et al.*, 2006; SANTOS, 2004)

Todavia, os produtos naturais surgem como uma possibilidade à resistência bacteriana à terapia antibacteriana usual, visto que são fontes importantes no desenvolvimento de novos fármacos (DUARTE *et al.*, 2006; KALEGARI, 2012). A utilidade de extratos vegetais para a terapia antimicrobiana e para o combate de outros tipos de doenças tem sido promissora desde os tempos antigos (MARMITT, *et al.*, 2015).

Algumas espécies de *Piper* como *P. guineense* Schumach. & Thonn., *P. longum* L., *P. nigrum*, *P. capense* L. f., *P. betle*, *P. tuberculatum* Jacq., *P. retrofractum* Vahl são ricas em compostos bioativos como: amidas, alcaloides, flavonoides, taninos, glicosídeos, terpenoides e compostos fenólicos. Esses compostos bioativos servem como um reservatório para descoberta de drogas e têm sido amplamente relatados como presentes nas sementes, folhas e casca do caule de espécies de *Piper*, estas substâncias têm demonstrado enorme potencial antimicrobiano (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017; FACUNDO *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar as características morfoanatômicas, analisar o perfil fitoquímico, potencial alelopático, antioxidante e antibacteriano do extrato alcoólico e frações obtidas de folhas de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae).

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar o teor de sólidos e rendimento do extrato bruto e frações;
- Determinar o teor de cinzas e umidade das folhas de *P. tuberculatum* Jacq.;
- Avaliar o perfil fitoquímico do extrato bruto e frações por métodos espectrofotométricos clássicos em fitoquímica, bem como analisar as amostras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Investigar as características morfoanatômicas e histoquímicas de folhas de *P. tuberculatum*;
- Verificar o potencial alelopático do extrato bruto e frações frente às sementes de *Lactuca sativa* var. *crispa* (alface) e *Allium cepa* var. *write creole* (cebola) por ensaios de germinação e crescimento;
- Analisar o potencial antioxidante pelo método de redução do complexo fosfomolibdênio;
- Avaliar o potencial antibacteriano do extrato bruto e frações de *P. tuberculatum* Jacq.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta, herborização e fixação.

A coleta das folhas frescas de *P. tuberculatum* Jacq. (Figura 3A) foi realizada nas dependências do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET) (3°08'33.4"S 58°25'53.7" W) pertencente à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizado no município de Itacoatiara/AM a 176 km (em linha reta) a leste de Manaus, capital do estado.

Figura 3 - *Piper tuberculatum* (A), coletadas para extrato (B), coleta para morfoanatomia e histoquímica (C), exsiccata (D).



Fonte: Nogueira (2017).

Foi realizada coleta de folhas frescas (Figura 3B) para a preparação do extrato alcoólico. Realizou-se também uma coleta específica de folhas íntegras (Figura 3C), completamente desenvolvidas e expandidas para a caracterização morfoanatômica e histoquímica e adotou-se a classificação Hickey (1974) para análise da morfologia foliar.

Uma exsiccata do referido material (Figura 3D) foi confeccionada e depositada no HERBIT, herbário pertencente ao Centro de Estudos Superiores de Itacoatiara – CESIT, da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, sob registro nº 0033. A identificação da espécie foi realizada por meio de análise de coleções amazônicas e confirmada por especialista na família Piperaceae.

4.2. Reagentes, solventes e equipamentos

Os reagentes e solventes que foram utilizados neste trabalho foram de grau analítico (P.A) de origem Merck®, Vetec® e Sigma-Aldrich® e para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado solventes grau HPLC de origem Merck®, com exceção do álcool 70% que foi preparado a partir do álcool comercial (95°GL).

As análises de determinação e quantificação dos metabólitos presentes no extrato bruto e frações foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 e espectrofotômetro de varredura Shimadzu® modelo UV-1601. Cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência (CLAE-UV) tipo detector de ultravioleta, Varian® modelo Pro Star, coluna C18 fase reversa. Para as análises morfoanatômica e histoquímica foi utilizado Microscópio Óptico Leica® DM500.

4.3. Obtenção do extrato bruto e frações

O material vegetal coletado foi limpo e picotado com tesoura esterilizada com álcool 95°GL. Em um béquer foram pesados 550g das folhas frescas picotadas e a este adicionado volume de álcool 70% suficiente para cobrir a amostra e deixado em maceração por sete dias consecutivos em temperatura ambiente (Figura 4A). Decorrido esse período, o extrato alcoólico foi filtrado por algodão e transferido para outro recipiente previamente limpo, seco, pesado e identificado, e em seguida foi submetido à secagem em banho-maria (50°C) para obtenção do extrato bruto concentrado (EB) (Figura 4B). Após secagem, o recipiente contendo o extrato foi pesado e o valor anotado. Cerca de 3g desse extrato foi reservado para ser usado em outras análises.

Figura 4 - Folhas em maceração (A) e Extrato Bruto de *P. tuberculatum* (B).



Fonte: Nogueira (2017).

O extrato bruto (EB) foi submetido ao processo partição sólido-líquido com volumes de 50 mL (por 3x) de solventes em ordem crescente de polaridade. Dessa forma foram adquiridas 4 frações: Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e a Fração Remanescente (FR). A partir das massas do extrato bruto e frações foram calculados os teores de sólidos e rendimentos. A equação 1 foi utilizada para calcular o rendimento do EB e a equação 2 para calcular o rendimento das frações:

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Teor de sólidos (g)}}{\text{Massa do material fresco (g)}} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{massa da fração (g)}}{\text{Massa do EB (g)}} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

O extrato bruto EB e as frações FH, FC, FAE e FR obtidos foram utilizados como amostras para a determinação e quantificação dos principais grupos de metabólitos secundários, testes de potencial alelopático e potencial antibacteriano, bem como caracterização dos constituintes químicos presentes.

4.4. Determinação do teor de umidade das folhas frescas de *P. tuberculatum*

A determinação do teor de umidade (teor de água) presente nas folhas de *Piper tuberculatum* foi realizada seguindo o método executado por Braga *et al.* (2007) e pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). Nesse procedimento, foram pesadas embalagens de fôrmas de papel alumínio previamente limpas e dessecadas em estufa (por 30 minutos) e os valores anotados. A estas, foram adicionados 50 g de folhas frescas picotadas. O material vegetal foi distribuído de maneira uniforme sobre as fôrmas. As amostras permaneceram em estufa a 50°C por 24 horas para determinação do teor de água. Em seguida foram resfriadas e pesadas até que obtivessem peso constante.

Posteriormente, a temperatura foi aumentada para 105°C e as amostras permaneceram durante 5 horas em estufa para determinação da umidade, em seguida foram resfriadas em dessecador e pesadas até que obtivessem peso constante. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de água em relação às folhas secas.

4.5. Determinação de cinzas totais das folhas secas de *P. tuberculatum*

O teste de cinzas totais foi realizado de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010) e consistiu em pesar aproximadamente 2 g das folhas secas de *Piper tuberculatum*, em cápsulas de porcelana previamente limpas, secas e pesadas. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada em mufla (Zezimeq TC4S) a 550 °C de modo a não ultrapassar 600°C. As cápsulas foram resfriadas em dessecador e posteriormente pesadas até obter valor constante. Os resultados de porcentagens de cinzas foram expressos em relação às folhas secas. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.6. Análise do perfil químico do extrato bruto e frações

As análises de identificação e quantificação de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides, taninos e antocianidinas foram realizadas no Laboratório de Farmacotécnica do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET/UFAM). Já as análises para compostos fenólicos, flavonoides, fitoesteroides e atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob responsabilidade do Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel, Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Warumby Zanin, Prof.^a Dr.^a Marilis Dalarmi Miguel, Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Gáspari Dias. As análises cromatográficas em Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas na Central Analítica também pertencente ao departamento de Farmácia da UFPR sob responsabilidade da Dr.^a Maria da Graça Teixeira de Toledo.

4.6.1. Quantificação do conteúdo total de clorofila *a* e *b*, e carotenoides

Para avaliação do teor de clorofila total *a* (ChloA) e *b* (ChloB), e carotenoides (CAROT) foram preparadas soluções em álcool 95°GL com concentração de 1000µg/mL a partir do extrato bruto e frações, conforme descrito por Dere, Günes e Sivaci (1998).

Os valores de absorbâncias das amostras foram determinados em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800 a 666, 653 e 470 nm, contra uma solução branco de álcool 96% e os conteúdos totais foram calculados de acordo com as equações 3, 4 e 5 e as concentrações dos metabolitos foram expressos em mg/g.

$$\text{ChloA} = (15.65 \times A_{666}) - (7.340 \times A_{653}) \quad \text{Equação 3}$$

$$\text{ChloB} = (27,05 \times A653) - (11,21 \times A666) \quad \text{Equação 4}$$

$$\text{CAROT} = (1000 \times A470) - (2,860 \times \text{ChloA}) - (129,2 \times \left[\frac{\text{ChloB}}{245} \right]) \quad \text{Equação 5}$$

4.6.2. Quantificação do conteúdo total de compostos fenólicos

A determinação da concentração total de compostos fenólicos no (EB) e frações (FH, FC, FA, FR) foi baseada nos estudos de Folin e Dennis (1915), adaptada por Singleton e Rossi (1965).

A análise consistiu na preparação de soluções do extrato bruto e das frações na concentração de 1mg/mL em metanol. Posteriormente procedeu-se à preparação em metanol da solução-mãe de ácido gálico na concentração de 1mg/mL. A partir da qual foram transferidos volumes de 50, 100 e 150 μL para tubos de ensaios. Em seguida foram adicionados 150, 100 e 50 μL de metanol aos tubos, respectivamente. Logo após, foram adicionados 0,4 mL do reagente Folin-Ciocalteu® (Sigma). As soluções foram mantidas em temperatura ambiente durante 5 minutos e em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 20% (m/v) obtendo a curva padrão nas concentrações de 3,00 $\mu\text{g/mL}$, 8,06 $\mu\text{g/mL}$ e 16,12 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo procedimento foi realizado, sendo desta vez foi utilizado 100 μL das amostras e mais 100 μL de metanol, ao invés das soluções-padrão. A solução-branco foi preparada de modo a conter todas as soluções preparadas anteriormente, menos às amostras, que foram substituídas por metanol.

Após esse processo, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 40 °C por 20 minutos e posteriormente resfriadas em banho de gelo. Os valores de absorbância das amostras foram determinados por espectrofotometria a 760 nm. As concentrações de compostos fenólicos totais foram calculadas através da equação de regressão linear obtida a partir da curva de calibração das soluções padrões e as concentrações foram expressas em mg./g.

O método empregado para detecção de compostos fenólicos utiliza a redução pelos fenóis, em meio alcalino, do fosfomolibdato-fosfotungstato a oxido de molibdênio e se forma um complexo molibdênio-tungstênio cuja coloração é azul (SILVA *et al.*, 2010).

4.6.3. Quantificação do conteúdo total de flavonoides

Para proceder a quantificação do teor total de flavonoides, foi utilizada metodologia baseada nos estudos de Chang *et al.* (2002), conhecido como método do tricloreto de alumínio, no qual a rutina foi utilizada como substância de referência. As amostras (EB e frações) foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em metanol.

Uma solução-estoque de rutina foi preparada na concentração de 1 mg/mL. Volumes de 50, 100 e 150 μL da solução-estoque foram transferidos para tubos de ensaios e completados com volumes de 150, 100 e 50 μL de metanol, respectivamente, obtendo-se volumes de 200 μL nos tubos. A 200 μL de cada solução foram adicionados 400 μL de uma solução de cloreto de alumínio a 2% e 4,4 mL de metanol. Dessa forma, foi obtida a curva de calibração da rutina nas concentrações de 10, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo procedimento foi empregado para as amostras e utilizou-se 200 μL destas ao invés de utilizar o padrão de rutina. Os valores de absorbâncias foram determinados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 415 nm.

A equação de regressão linear obtida pela curva de calibração da rutina foi utilizada para efetuar o cálculo da concentração de flavonoides totais nas amostras de EB e frações FH, FC, FAE e FR, que foram expressas mg/g.

4.6.4. Quantificação do conteúdo total de taninos

Para proceder a quantificação do conteúdo total de taninos a metodologia empregada foi baseada nos estudos de Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), onde foram preparados dois tubos-teste codificados (1 e 2) para cada amostra (EB e frações) na concentração de 0,5 mg/mL preparadas em álcool 95°GL. Nos tubos de ensaio foram adicionados 1 mL das amostras, acrescidas de 3 mL de HCl concentrado e 1 mL de água destilada.

Os tubos-teste 1 foram aquecidos em banho-maria a 100 °C durante 30 minutos, e aos tubos-teste 2 foram adicionados 0,5 mL de álcool 95°GL. Os valores de absorbância (ΔOD) dos tubos-teste 1 foram determinados em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 470, 520 e 570 nm, e os tubos-teste 2 de cada amostra foram utilizados como solução branco.

As equações 6 e 7 foram utilizadas para efetuar o cálculo de dois novos valores de absorbância calculada (ΔOD 520).

$$\Delta OD 520 = 1,10 \Delta OD 470 \quad \text{Equação 6}$$

$$\Delta OD 520 = 1,54 \Delta OD 570 \quad \text{Equação 7}$$

O conteúdo de taninos totais foi calculado com base na equação 8 na qual foi utilizada o menor valor de absorvância, seja ela determinada experimentalmente ou calculada e a concentração foi expressa em mg/g.

$$TTanC = 15,7 \Delta OD 520 \quad \text{Equação 8}$$

4.6.5. Quantificação do conteúdo total de antocianidinas

A análise do teor total de antocianidinas foi realizada de acordo com Ribéreau-Gayon *et al.* (2006), em duplicata, do EB e das frações, na concentração de 0,5 mg/mL preparados em álcool 96%. Nos tubos de ensaio foram adicionados 1 mL das amostras, acrescidas de 0,5 mL de HCl 0,1% em álcool 95°GL e 10 mL de HCl 2% aquoso.

Como as análises foram efetuadas em duplicata, as primeiras amostras foram diluídas com 4 mL de água destilada e as segundas foram tratadas com 4 mL de bissulfito de sódio (NaHSO₃) 13% aquoso. As amostras foram então diluídas ao dobro do seu volume original pela adição de álcool 95°GL. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 520 nm, contra as amostras não tratadas com bissulfito de sódio que serviram como soluções-branco.

Os valores de absorvância encontrados foram multiplicados pelo fator 875, que fornece as concentrações de antocianidinas totais, foram expressas em mg/g.

4.6.6. Quantificação do conteúdo total de fitoesteroides

Para a quantificação do teor total de fitoesteroides foi empregada metodologia de Daksha *et al.* (2010). Inicialmente foi construída uma curva de calibração com colesterol em concentrações de 95, 173, 239, 295 e 343 µg/mL, partindo de uma solução-mãe de 1mg/mL em clorofórmio. Em seguida, 1 mL do reagente Lieberman-Burchardt foi adicionado a cada concentração, com exceção do branco e logo após foram adicionados 4,5 mL de clorofórmio.

As amostras de EB e frações foram preparadas nas concentrações de 10 mg/mL. Em tubos de ensaios foram adicionados 200 µL das amostras, 1 mL do reagente Lieberman-

Burchardt e 4,5 mL de clorofórmio. As amostras foram acondicionadas em temperatura ambiente ao abrigo de luz durante 15 minutos. Decorrido esse tempo, estas foram submetidas a determinação de absorbância em 640 nm e os cálculos das concentrações de fitoesteroides foram determinados a partir da equação de regressão linear obtida pela curva de calibração do colesterol e expressas em mg/g.

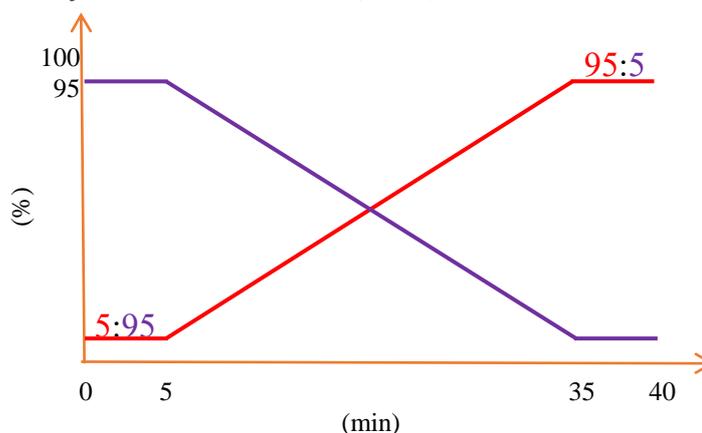
4.6.7. Cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE)

O método utilizado para análise das amostras por cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE) foi descrito por Paula (2014a). Para a verificação do perfil das amostras (EB e frações) foi utilizado cromatógrafo à Líquido de Alta Eficiência (CLAE-UV) tipo detector de ultravioleta, Varian® modelo Pro Star, foi utilizada coluna de fase reversa C18 (Waters 4,6x150 mm) com *loop* de 20 µL, à temperatura de 25 °C, numa taxa de fluxo de 1 mL/min e detecção por varredura de espectro de 200 nm a 400 nm para verificar o perfil das amostras. As amostras foram preparadas em metanol grau CLAE nas concentrações de 5 mg/mL (EB) e 2,5 mg/mL (frações) e foi utilizada solução padrão de vitexina (Aldrich 99% de pureza) a 10 µg/mL.

O sistema de eluição em gradiente para separação dos constituintes das amostras foi composto por uma mistura de metanol (Fase A) e ácido fosfórico aquoso a 1% (Fase B). No tempo zero do método, o eluente empregado foi uma mistura de 5% (Fase A) e 95% (Fase B), que permaneceu constante até 5 minutos de análise. De 5 aos 35min houve aumento da porcentagem de fase A e diminuição da porcentagem de fase B. Aos 35 minutos a condição experimental foi alterada e estabelecida em 95% (Fase A) e 5% (Fase B), com manutenção dessas concentrações até os 40 minutos de análise (Figura 5)

O sinal do composto principal de cada amostra foi avaliado comparando o seu espectro de absorção ultravioleta (UV) com padrões disponíveis no banco de dados para identificação e coeluído as amostras com o padrão que apresentou similaridade de pelo menos 99% entre os espectros de absorção em UV. A quantificação do composto majoritário foi realizada pela utilização da curva de calibração construída com injeções de 5 concentrações, em triplicata (5µg/mL a 50 µg/mL) do padrão de Vitexina. O resultado foi comparado com o banco de dados disponíveis na literatura.

Figura 5 - Sistema de eluição em gradiente: Metanol (fase A) e solução de ácido fosfórico 1% (fase B).



Nota: O esquema ilustra o sistema de eluição em gradiente. Observa-se o aumento da porcentagem de fase A (em vermelho) e diminuição da porcentagem de fase B (em azul) no intervalo de 5 a 35 min.

Fonte: Nunes (2019).

4.7. Investigação morfoanatômica e histoquímica das folhas de *P. tuberculatum*

Folhas inteiras e fragmentos da base, meio e ápice foram fixadas em FAA (Formalina, ácido acético e 50% de etanol; volumes 1:1:18) e formalina tamponada neutra (FNT) por 48 horas e posteriormente estocadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). Alguns fragmentos das amostras também foram fixados em sulfato ferroso (SFF) para detecção de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940).

4.7.1. Estudo Anatômico e Histoquímico

Folhas inteiras e fragmentos da base, meio e ápice foram submetidas à técnica da diafanização por meio de hidróxido de sódio (NaOH) a 5% até total despigmentação (SASS, 1951) e clarificadas em hipoclorito de sódio (NaClO) 10% (VASCO *et al.*, 2014). Após lavagem e estocagem em álcool 70% o material foi corado em violeta cristal 1% e fucsina básica e posteriormente montados em gelatina, conforme Roeser (1972).

4.7.2. Análises histoquímicas

Fragmentos das amostras fixadas foram embebidos em metacrilato de resina (Historesina Leica; Microsistema Leica, Heidelberg, Alemanha). Com auxílio de micrótomo

rotativo (Leica RM2155, Deefield. EUA) foram obtidas secções transversais e paradérmicas com 5 µm de espessura. As secções foram coradas com azul de toluidina pH 4,7 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964).

As amostras fixadas em (FNT) também foram seccionadas transversalmente à mão livre com auxílio de embaúba (*Cecropia* sp.) e micrótomo de mesa. As secções foram submetidas a coração com azul de toluidina para descrição geral do padrão anatômico (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964) e testes histoquímicos para investigação das principais classes de metabólitos secundários: azul de Coomassie (FISHER, 1968) para detecção de proteínas totais, PAS (Reagente de Schiff/ ácido periódico) para polissacarídeos de cadeia longa (O'BRIEN; MCCULLY, 1981; McMANUS, 1948) Sudan Red para lipídios totais (PEARSE, 1980) e NADI - Reagente NADI (DAVID; CARDE, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas. Para detecção de compostos fenólicos o material fixado em SFF foi seccionado e analisado (JOHANSEN, 1940).

Os procedimentos de microscopia de luz foram realizados no laboratório de botânica do ICET/UFAM e no laboratório de Anatomia vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio óptico (Leica® DM500) equipado com uma câmera digital (Nikon A100). O tratamento das imagens e a montagem da prancha foram realizados com o auxílio dos programas Inkscape® versão 0.92.3, *software* livre.

4.8. Teste do potencial alelopático

O teste do potencial alelopático do extrato bruto e frações de *Piper tuberculatum* foi feito em sementes de *L. sativa* (alface) e de *A. cepa* (cebola) de acordo com a metodologia descrita por Macías *et al.* (2005). Dessa forma, 50 sementes das plantas de teste *L. sativa* (alface) e 25 de *A. cepa* (cebola) foram colocadas em placas de petri com papel filtro e 5 mL das amostras (extrato bruto e frações) preparadas em concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL para cada amostra. Os testes foram feitos em quadruplicata para cada concentração, seguido de incubação em câmara de germinação a temperatura controlada. Para o teste de controle (testemunha) foi utilizada água destilada ao invés das amostras.

4.8.1. Germinação e crescimento

Os bioensaios de germinação e crescimento foram empregados de acordo com a metodologia descrita por Barnes e Putnam (1987) e Macías *et al.* (2005) e realizados no laboratório de Farmácia do ICET/UFAM. A germinação, geralmente definida como emergência de radículas, foi monitorada no decorrer do processo e o critério adotado foi a protrusão radicular com no mínimo 2 mm de comprimento. As sementes germinadas de alface foram contadas no intervalo de 24h durante 7 dias e as sementes germinadas de cebola no intervalo de 24 h durante 14 dias, em sistema de fotoperíodo de 12h. O ensaio foi interrompido quando o número de sementes germinadas manteve-se estável por 3 dias seguidos.

O índice de velocidade de germinação das plântulas foi calculado pela equação 9, como segue:

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \frac{G3}{N3} + \frac{G4}{N4} \dots \frac{Gn}{Nn} \quad \text{Equação 9}$$

Em que G1, G2, G3, G4 ... Gn é o número de sementes germinadas e N1, N2, N3, N4 ... Nn é o número de dias após a semeadura.

O teste de crescimento foi realizado após o período de germinação cessar e consistiu na medição do comprimento da radícula/hipocótilo de 10 plântulas de cada tratamento, utilizando papel milimetrado.

4.9. Avaliação de atividade biológica

4.9.1. Potencial antioxidante

4.9.1.1. Avaliação do poder redutor frente ao complexo do fosfomolibdênio

Este método foi executado com base em Prieto, Pineda e Aguilar (1999). O complexo fosfomolibdênio é formado pela reação da solução de fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL), ácido sulfúrico 3M (20 mL) e água destilada (q.s.p 100 mL), preparado no momento do uso. As amostras de EB e frações foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol.

Em tubos de ensaios foram adicionados 300 μ L das soluções das amostras preparadas anteriormente (60 μ L das amostras + 240 μ L de metanol), seguida da adição de 3 mL do reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 minutos. Logo após, foram resfriados e as absorvâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 695nm. Como branco da análise foram utilizadas soluções contendo 300 μ L de metanol adicionados a 3 mL do reagente do complexo do fosfomolibdênio. O poder redutor das amostras foi comparado com o padrão ácido ascórbico (200 μ g/mL) cujo poder redutor foi normalizado para 100% (BALESTRIN *et al.*, 2008).

4.9.2. Teste de potencial antibacteriano

A análise do potencial antibacteriano foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Autônomo do Brasil (UNIBRASIL), sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Cristina Peitz de Lima e Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia P. dos Santos.

Para a avaliação da atividade antibacteriana do (EB) e frações das folhas de *Piper tuberculatum* foi utilizado o método de difusão em disco adaptado de Salvagnini *et al.* (2008) e Ostrosky *et al.* (2008).

Os extratos foram preparados na concentração de 100 mg/mL em álcool 70%. Volumes de 10 μ L das soluções-amostras foram impregnados em discos (10 mm de diâmetro) de papel estéril com auxílio de micropipeta e secos em estufa a 35 °C. As cepas de bactérias usadas neste estudo foram *Escherichia coli* (ATCC 1229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1239), *Salmonella thyphimurium* (ATCC 1243), *Staphylococcus aureus* (ATCC 1248) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 1251).

Primeiramente as cepas foram repicadas em caldo nutritivo *Brain-Heart Infusion* (BHI) e incubadas em estufa a 35 ° C por 24 horas até atingir o crescimento exponencial. Decorrido esse tempo, uma alíquota foi semeada em Ágar Mueller Hinton e incubada novamente em estufa a 35 °C por mais 24 horas. Em seguida, foram preparados 2 mL de soluções de salina estéril 0,9% com as referidas bactérias, utilizando como comparação de turbidez o tubo número 0,5 da escala de MacFarland ($1-3 \times 10^8$ UFC/mL, unidades formadoras de colônia). O repique foi realizado em placas contendo Ágar Mueller Hinton com auxílio de uma alça de platina esterilizada.

Depois de realizada a impregnação do EB e frações em discos de papel estéril, os mesmos foram distribuídos nas placas inoculadas. Estas placas foram incubadas invertidas em

estufa a 35 °C por 24 horas. Após esse período, as placas foram retiradas e os halos de inibição foram medidos.

Foram realizados três controles: o controle positivo de inibição com cloranfenicol 30 µg, controle negativo do disco de papel estéril impregnado com o solvente utilizado para diluir as amostras e o controle de esterilidade do meio, no qual duas placas foram incubadas sob mesmas condições do ensaio para as amostras. O teste foi realizado em duplicata.

4.10. Análise de dados

Para as determinações das concentrações dos metabólitos secundários os resultados foram obtidos por análise em Excel[®] e foram expressos como valores de média±desvio padrão.

Para a análise de dados do potencial alelopático foram consideradas como variáveis independentes as frações e concentrações e avaliados o efeito sobre as variáveis dependentes comprimento, hipocótilo, radícula e IVG das plântulas. Para isso, foi utilizada análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA), seguido pelo teste *post hoc* Tukey's HSD a 5% de significância, quando necessário. Com os resultados obtidos no teste de Tukey, foram gerados gráficos de comparação entre as interações das frações e as concentrações sobre as variáveis dependentes. As análises foram feitas como o software estatístico R, versão 3.5.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016) através do pacote Vegan (OKSANEN *et al.*, 2013) e do pacote *agricolae* (MENDIBURU, 2017).

Para o teste do potencial antioxidante foram definidas como variáveis as frações em função do poder redutor do complexo fosfomolibdênio. O teste foi realizado pelo método de análise de variância de uma única via (*one-way* ANOVA). O gráfico foi construído utilizando-se o programa estatístico *GraphPad Prism 5.0*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento do processo de extração

Após processo de extração e particionamento sólido-líquido do extrato bruto (EB) das folhas frescas de *Piper tuberculatum*, o rendimento total dos metabólitos foi calculado pela equação 1 para o (EB) e os rendimentos de cada fração foram calculados utilizando a equação 2. Os resultados para os rendimentos do EB e frações estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Rendimento do extrato bruto e frações de *P. tuberculatum*, Piperaceae.

EB	Rendimento Extração (%)
	5,41
Rendimento Frações (%)	
FH	17,71
FC	1,03
FAE	4,29
FR	71,57

Nota: Amostras do Extrato Bruto (EB) das folhas de *P. tuberculatum*, Piperaceae; Fração Hexano (FH); Fração Clorofórmio (FC); Fração Acetato de Etila (FAE); Fração Remanescente (FR).

Fonte: Nogueira (2018).

Conforme descrito na Tabela 2, o EB obteve rendimento total de 5,41 %, que também corresponde ao conteúdo de sólidos extraído do material vegetal fresco. O EB possui coloração escura, de aspecto pegajoso, amarelo-amarronzado quando disposto em solução.

O rendimento da FH foi de 17,71% e esta fração pode ser caracterizada como um sólido pegajoso e pastoso e de coloração amarela-amarronzada quando em solução. Segundo Morais *et al.* (2016), nesta fração concentram-se substâncias de baixa polaridade como: clorofilas, carotenoides, os terpenoides, triterpenos, esteroides e compostos de baixa massa molecular.

A FC teve rendimento de 1,03% e foi caracterizada como um sólido de coloração escura, verde-amarronzada quando em solução. De acordo com Cechinel Filho e Yunes (1998), a partição com clorofórmio arrasta substâncias de média/baixa polaridade como: terpenoides, ligninas e lignonas, flavonoides, flavona, alcaloides pouco polares, cumarinas e antraquinonas (agliconas).

A FAE teve 4,29% de rendimento do conteúdo em massa e possui coloração escura e amarelo-esverdeada quando em solução. Cechinel Filho e Yunes (1998) afirma que na (FAE)

em geral, concentram-se grupos de metabólitos de média/alta polaridade como: flavonoides (monoglicosilado), saponinas, alcaloides mais polares, cumarinas (glicosídicas) e antraquinona (glicosídica).

Ao resíduo final do processo de partição foi atribuído o código FR, que por sua vez, apresentou rendimento correspondente a 71,57% em massa. Esta fração foi caracterizada como um sólido pastoso e de alta viscosidade, de coloração marrom-claro-amarelado quando em solução. Na FR normalmente concentram-se os carboidratos (mono e dissacarídeos), taninos hidrolisáveis e condensados e, as cianidinas (CECHINEL FILHO; YUNES 1998).

5.2. Determinação de umidade das folhas frescas de *P. tuberculatum*

Para esta análise foi verificado que as folhas tiveram teor de água de $73,5\% \pm 4,1$ enquanto que para umidade foi obtido teor de $4,6\% \pm 0,04$. Em estudos realizados por Silva *et al.* (2016), *P. tuberculatum* apresentou teor de umidade de $6,60 \pm 0,26$ e os valores foram descritos como dentro dos padrões oficiais permitidos, tendo em vista que para a umidade o limite máximo permitido é 14%. Segundo Brasil (2010) o teor máximo de umidade estipulado pelas farmacopeias varia entre 8 e 14%, com poucas exceções especificadas.

As folhas de *P. tuberculatum* analisadas possuem baixo teor de umidade, e devido a este fator, pouco permite o desenvolvimento de bactérias e fungos ou a ação enzimática, desse modo evitam a deterioração das folhas, conforme descrito por Braga *et al.* (2007). É importante frisar que a presença de água (umidade) é a principal responsável pelo aumento de atividades metabólicas, mudanças químicas e físicas que ocorrem no produto durante o armazenamento (GONELI, 2014). Por isso, é necessário evitar processos de secagem inadequados para que não ocorra a degradação dos constituintes químicos, além de propiciar o crescimento de fungos e bactérias (SIMÕES *et al.*, 2007; PAULA, 2014a).

Ressalta-se ainda, que as plantas medicinais e aromáticas em grande escala são as principais matérias-primas para indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas (GONELI, 2014). Ao considerarem-se os benefícios da utilização dessas plantas e uma vez que estas são coletadas com elevado teor de água, é necessário realizar o processo de secagem como parâmetro para obter melhor manutenção e controle de qualidade do material vegetal (BRAGA *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2007), conforme descrito neste trabalho e em outros disponíveis na literatura.

5.3. Determinação do teor de cinzas totais das folhas secas de *P. tuberculatum*

Verificou-se que o teor de cinzas para as folhas de *P. tuberculatum* foi igual a 10,64% (0,274 g) \pm 0,19. Em outro estudo feito por Silva *et al.* (2016) para *P. tuberculatum*, foi obtido teor de cinzas totais igual a 14,20% \pm 0,01, valor acima do encontrado no presente trabalho. De acordo com Brasil (2010), na Farmacopeia Brasileira não há um limite máximo estabelecido para o teor de cinzas totais. No entanto, a Farmacopeia Britânica estabelece limite máximo de 15% (British Herbal Phamacopeia, 1990). Logo, os resultados do presente trabalho estão de acordo com o estabelecido pela Farmacopeia Britânica.

Tanto em *P. tuberculatum* quanto em outras espécies de *Piper*, a determinação de cinzas permite a quantificação de substâncias residuais não voláteis possivelmente presentes nas folhas como contaminantes (BRAGA *et al.*, 2007). Com isso, os interesses em pesquisas voltadas para a composição química dos constituintes orgânicos e inorgânicos presentes em plantas têm crescido bastante nos últimos anos (DELAPORTE *et al.*, 2005).

Esses compostos podem ser de origem intrínseca da planta como carbonatos, fosfatos, cloretos e óxidos: silício, potássio, alumínio, magnésio, ferro e sódio ou podem ser componentes inorgânicos de origem externa (pedra, gesso, areia, terra), que de acordo com a origem do material podem ter sido adicionados durante o processo de coleta, má preparação ou manuseio das amostras, falsificações, adulterações ou características de manejo inadequado (PAULA, 2014a). Dessa forma, pode-se afirmar que a determinação de cinzas totais estabelece um controle de qualidade de substância residual não volátil no processo de incineração (DELAPORTE *et al.*, 2005; SIMÕES *et al.*, 2007). Portanto, é essencial para o controle de qualidade de *P. tuberculatum*.

5.4. Análises de detecção dos principais grupos de metabólitos secundários

Os resultados para clorofilas, carotenoides, compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos, antocianidinas e fitoesteroides, do EB e frações estão listados na Tabela 3.

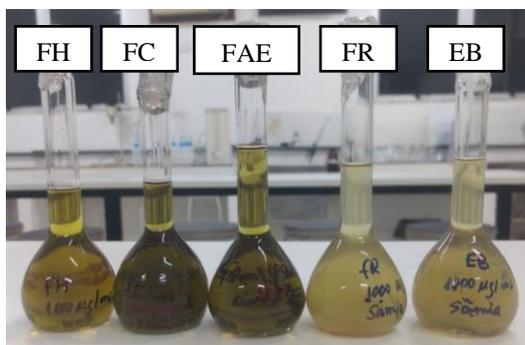
Tabela 3 - Conteúdo total dos metabólitos detectados no extrato bruto e frações de *P. tuberculatum* (Piperaceae) de acordo com as médias e desvio padrão.

AMTR	ChloA mg/g	ChloB mg/g	Carot mg/g	PhenT mg/g	Phytoste mg/g	Flavo mg/g	TTanC mg/g	AnthoT mg/g
FH	10,17±0,04	4,30±0,06	710,9±2,8	49,31±0,21	269,04±5,6	23,5±1,46	0,12±0,04	5,25±1,75
FC	n.d	n.d	n.d	38,08±2,44	284,4±3,85	48,51±1,17	0,30±0,16	6,71±1,82
FAE	n.d	n.d	n.d	44,57±3,68	295,3±6,18	27,64±1,46	0,06±0,04	3,21±0,51
FR	5,29±0,22	6,58±0,16	430,06±1,9	135,97±7,46	248,5±2,22	36,60±0,10	0,21±0,07	9,63±2,32
EB	4,49±0,04	4,99±0,04	333,5±2,03	135,62±2,74	261,3±3,85	36,05±0,29	0,91±0,03	5,54±1,82

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão das amostras de EB e frações de *P. tuberculatum* (Piperaceae). (AMTR) Amostras; (EB) Extrato Bruto; (FH) Fração Hexano; (FC) Fração Clorofórmio; (FAE) Fração Acetato de Etila; (FR) Fração Remanescente; (ChloA) Clorofila *a*; (ChloB) Clorofila *b*; (Carot) Carotenoides; (PhenT) Compostos fenólicos Totais; (Phytoste) Fitoesteroides; (Flavo) Flavonoides; (TTanC) Taninos Totais; (AnthoT) Antocianidinas Totais; (D.P) Desvio Padrão; (n.d) não detectado.
Fonte: Nogueira (2018).

Após a análise das soluções (Figura 6), foi observado que o conteúdo total de clorofilas e carotenoides concentrou-se principalmente na FH, fração menos polar. A FH expressou teor de 14,47 mg/g de clorofila total e 710,9 mg/g de carotenoides. Estes pigmentos também foram quantificados no EB e na FR, com teor de 9,48 mg/g e 11,87 mg/g para clorofilas, e 333,5 mg/g e 430,06 mg/g para carotenoides, respectivamente. Pesquisas realizadas com uma grande variedade de plantas, entre elas espécies de *Piper* como *P. aduncum*, *P. amalago* L., *P. arboreum*, *P. cernuum* Vell e *P. hispidum*, demonstraram que os pigmentos clorofilianos para estas espécies são os mesmos (ALBIERO *et al.*, 2006; STREIT *et al.*, 2005), sendo similares aos pigmentos encontrados em *P. tuberculatum*.

Figura 6 - Soluções de extrato bruto e frações de *P. tuberculatum* para análise de Clorofila (*a* e *b*) e carotenoides. Concentrações de 1000 µg/mL.



Nota: Fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR) e Extrato bruto.

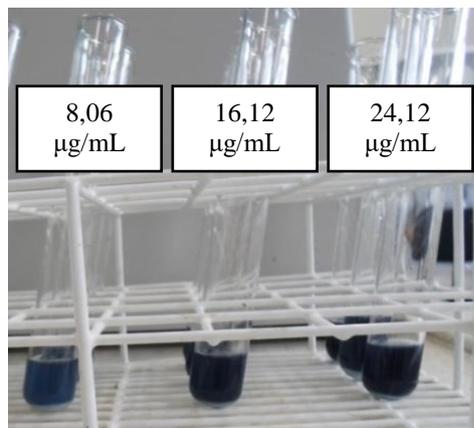
Fonte: Nogueira (2018).

Em estudos com *P. aduncum* (sob diferentes formas de cultivo) foram obtidas concentrações de clorofilas variando de 20,63 mg/g a 32,08 mg/g (PINTON, 2016). No entanto, no presente trabalho, *P. tuberculatum* possui menor concentração de clorofilas quando comparada com *P. aduncum*. Isto ocorre, porque a proporção, teor total e coloração desses pigmentos fotossintéticos variam de uma planta/espécie para outra devido à presença e distribuição de outros pigmentos associados, como os carotenoides (responsáveis pela atividade antioxidante), os quais sempre acompanham as clorofilas e também em função da intensidade e qualidade luminosa absorvida pela planta (STREIT *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2010; MALDOVAN *et al.*, 2009).

Por isso, é importante quantificar os teores de clorofilas e carotenoides em *P. tuberculatum*, visto que esses pigmentos estão ligados à eficiência fotossintética e, conseqüentemente, ao crescimento e adaptabilidade de plantas a diversos ambientes, além de serem utilizados comercialmente como corantes e antioxidantes (STREIT *et al.*, 2005)

Entre as classes investidas estão os compostos fenólicos. Os quais foram observados (Figura 7) e quantificados a partir equação de regressão linear da curva de calibração de ácido gálico (Figura 8). Foram observadas maiores concentrações de compostos fenólicos no EB e FR, com 135,62 mg/g e 135,97 mg/g, respectivamente.

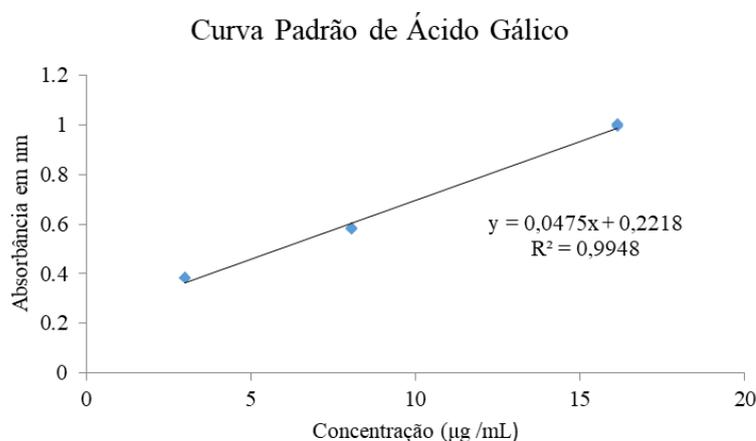
Figura 7 – Soluções padrão de ácido gálico.



Nota: Os três primeiros tubos correspondem a triplicata das soluções padrão de ácido gálico na concentração de 8,06 µg/mL, os tubos do meio correspondem à concentração de 16,12 µg/mL e os três últimos à concentração de 24,12 µg/mL.

Fonte: Nogueira (2018).

Figura 8 - Curva de calibração do Ácido Gálico obtida através de espectrofotometria em 760 nm utilizando concentrações de 3,00 µg/mL, 8,06 µg/mL e 16,12 µg/mL.



Nota: No eixo y estão dispostos os valores de absorvância das soluções-padrão *versus* a concentração em µg/mL, onde R^2 é o coeficiente de correlação linear.

Fonte: Nogueira (2018).

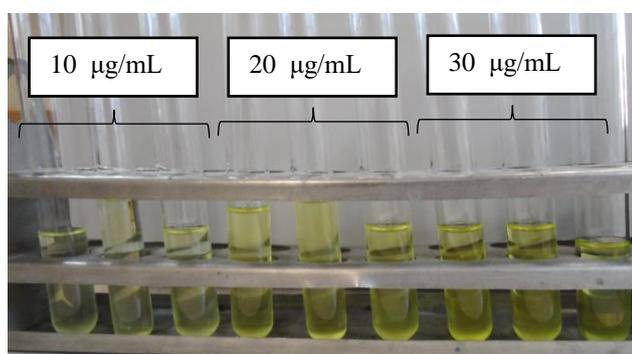
Os valores encontrados estão de acordo com o descrito por Zarai *et al.* (2013) que detectaram elevada concentração de fenólicos no extrato etanólico de *P. nigrum*. A quantidade de compostos fenólicos totais nas plantas pode ser classificada em quatro classes: alta (>50 mg.EAG.g⁻¹), média/alta (30-50 mg.EAG.g⁻¹), média /baixa (10-30 mg.EAG.g⁻¹) e baixa (<10 mg.EAG.g⁻¹), no qual mg.EAG.g⁻¹ é descrito como equivalente em ácido gálico (CHEW *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos para o presente estudo demonstraram que *P. tuberculatum* possui elevada concentração de compostos fenólicos. Em outras espécies do gênero, como *P. carniconnectvum* C. DC., *P. nigrum* (GU *et al.*, 2018a, 2018b), *P. betle* (ALI *et al.*, 2018), *P. arboreum* (REGASINI *et al.*, 2008), *P. lateripilosum*, Yuncker, *P. montealegreanum* Yunck, *P. mollicomum* Kunth (PINTO, 2012) por exemplo, também foram detectadas concentrações variadas de compostos fenólicos.

A presença de substâncias fenólicas como observada neste trabalho, tem sido bastante estudada pelo fato destas apresentarem diversas atividades farmacológicas e por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (PINTO, 2012; SOUSA *et al.*, 2007). Além dessas funções, os compostos fenólicos têm aplicações alelopáticas substanciais na agricultura e silvicultura como herbicidas, inseticidas e fungicidas (LI *et al.*, 2010). O interesse recente em compostos fenólicos (em especial flavonoides) decorre do seu potencial papel protetor, contra danos oxidativos causados por doenças, tais como doenças cardíacas coronárias, acidente vascular cerebral (AVC) e cânceres (LI *et al.*, 2010).

Entre algumas das classes de compostos fenólicos avaliadas neste trabalho estão os flavonoides. Os quais foram observados (Figura 9) e quantificados a partir equação de regressão linear da curva de calibração de rutina (Figura 10). O conteúdo total de flavonoides nas amostras foi observado na fração FC, com teor de 48,51 mg/g e em menores concentrações no (EB) e nas frações (FH), (FAE), (FR), os resultados estão de acordo com os estudos de Zarai *et al.* (2013), que relataram maior concentração de flavonoides na fração clorofórmio de *P. nigrum*.

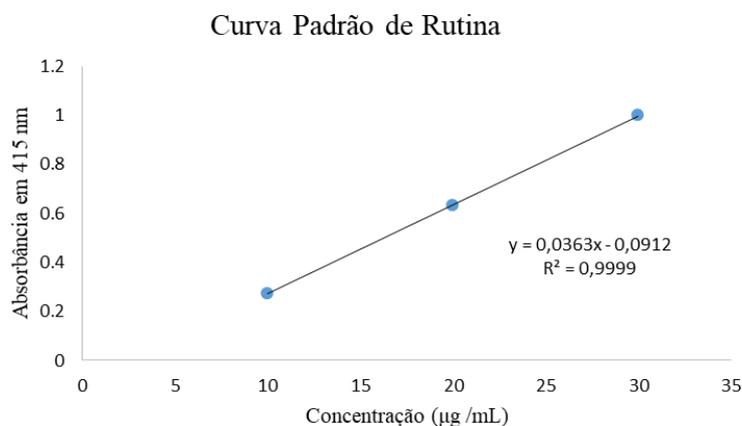
Figura 9 - Soluções-padrão de Rutina nas concentrações de 10 µg/mL 20 µg/mL 30 µg/mL.



Nota: os três primeiros tubos correspondem a triplicata das soluções de rutina na concentração de 10 µg/mL, os do meio correspondem as soluções de 20 µg/mL e os três últimos correspondem as soluções na concentração de 30 µg/mL.

Fonte: Nogueira (2018).

Figura 10 - Curva de calibração da Rutina obtida através de espectrofotometria em 415 nm, em espectrofotômetro utilizando concentrações de 10, 20 e 30 µg/mL.



Nota: No eixo y estão dispostos os valores de absorvância das soluções-padrão *versus* a concentração em µg/mL, onde R^2 é o coeficiente de correlação linear.

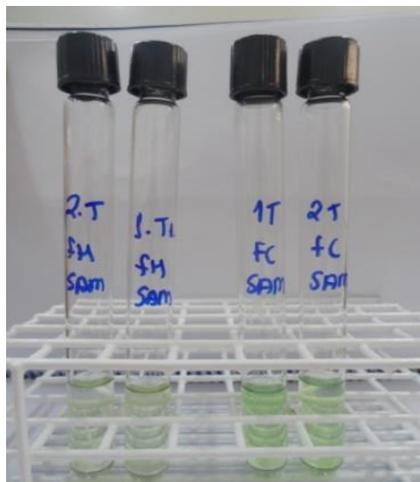
Fonte: Nogueira (2018).

Os resultados obtidos para *P. tuberculatum* também estão de acordo com os resultados fitoquímicos observados em outras espécies como em *P. umbellata* (BALDOQUI *et al.*, 2009), *P. glandulosissimum* Yuncker, *P. carniconectivum* C. D.C (SANTOS *et al.*, 2015; ALVES, 2010), *P. callosum* (LIMA, 2015) nas quais também foram identificados acúmulo de flavonoides.

Dentre as diversas classes de produtos naturais bioativos, os flavonoides têm sido estudados por constituírem um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, sendo conhecidas mais de 8000 variedades de flavonoides (LIMA, 2015; COUTINHO *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2007; SANTOS; RODRIGUES, 2017; DORNAS *et al.*, 2007). Essas substâncias desempenham papel importante no metabolismo de plantas e também estão associados a diversas atividades biológicas comprovadas, como antioxidantes (SANTOS *et al.*, 2015), antitumoral, antimicrobiana e anti-inflamatória (LIMA, 2015; COUTINHO *et al.*, 2009). Além disso, os flavonoides representam uma alternativa promissora frente aos processos inflamatórios (COUTINHO *et al.*, 2009).

Já para classe de taninos, também analisada nesse estudo, a coloração verde (Figura 11) evidenciou a presença desse metabolito no extrato bruto e frações. A maior concentração de taninos foi observada no EB com 0,91 mg/g, seguido pela FC e FR com 0,30 mg/g e 0,21 mg/g, respectivamente. Estudos realizados por Aires e Lima (2014), também indicaram presença de tanino em *P. aduncum*. Os taninos, além de serem importantes no controle de insetos, fungos e bactérias (ação bactericida e fungicida), também são responsáveis por atividades antioxidantes (SIMÕES *et al.*, 2007). Assim, plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de doenças como hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais e demais enfermidades (SIMÕES *et al.*, 2007).

Figura 11 - Teste de tanino para EB e frações FH, FC, FAE e FR. A coloração verde indica resultado positivo para presença de tanino nas frações.



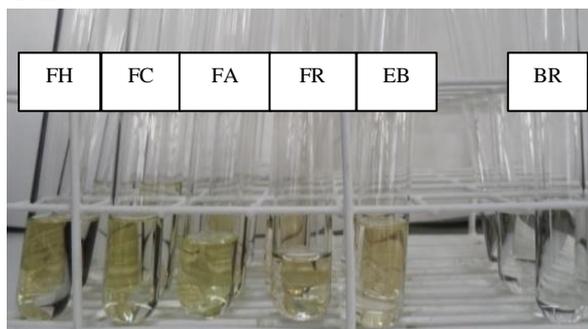
Nota: Pode-se observar que a coloração verde da fração FC é mais intensa que a da FH, e portanto possui maior concentração de tanino. EB: Extrato Bruto, FH: Fração hexano, FC: Fração clorofórmio, FAE: Fração Acetato de Etila, FR: Fração Remanescente.
Fonte: Nogueira (2018).

O teste para antocianidinas indicou presença dessa classe no EB e frações. A FR teve maior concentração de 9,63 mg/g, seguida pela FC com 6,71 mg/g. As antocianidinas (antocianinas) são fenólicos que pertencem ao grupo dos flavonoides, conhecidos como pigmentos vegetais que atribuem cores a inúmeros frutos, legumes, algumas folhas, caules e raízes de plantas e podem ser encontradas em numerosas famílias de plantas cultivadas como Leguminosae, Rosaceae, Vitaceae, entre outras (CASTAÑEDA, 2009; DORNAS *et al.*, 2007). Estes pigmentos apresentam importância na saúde humana, para prevenir/tratar doenças cardiovasculares e cânceres neurodegenerativos devido o seu poder antioxidante, pela atuação contra radicais livres, e dessa forma, apresentam propriedades farmacológicas muito interessantes (LIMA *et al.*, 2002).

O presente trabalho também analisou a concentração de fitoesteroides, a partir das soluções-padrão (Figura 12) e equação de regressão linear da curva de calibração de colesterol (Figura 13). Foi observada elevada concentração dessa classe de metabólito nas mostras, consistindo de 258,3 mg/g no EB, 272,4 mg/g na FH, 281,3 mg/g na FC, 292,2 mg/g na FAE e 245 mg/g na FR. Para fitoesteroides, não é comum haver concentração desse metabólito na

fração FAE. Para fim de verificação, um teste preliminar para saponina foi realizado e o resultado foi positivo. No presente estudo, esta fração provavelmente abriga saponinas esteroidais, conforme descrito por Simões *et al.* (2007).

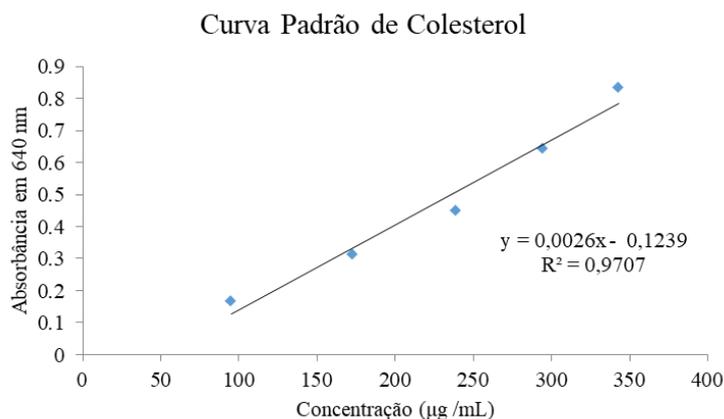
Figura 12 - Teste para conteúdo total de fitosteroides. Amostras com coloração amarelo-esverdeado e solução branco.



Nota: Fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR) e Extrato bruto.

Fonte: Nogueira (2018).

Figura 13 - Curva de calibração do Colesterol obtida através da espectrofotometria em 640 nm utilizando concentrações de 95, 173, 239, 295 e 343 $\mu\text{g/mL}$.



Nota: No eixo y estão dispostos os valores de absorbância das soluções-padrão *versus* a concentração em $\mu\text{g/mL}$, onde R^2 é o coeficiente de correlação linear.

Fonte: Nogueira (2018).

Os fitosteróis ou fitosteroides são moléculas semelhantes ao colesterol, que auxiliam na diminuição dos níveis de colesterol e ajudam na manutenção da saúde cardiovascular (DAKSHA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2017). Mais de 200 tipos de fitosteróis foram relatados em espécies de plantas, como o β -sitosterol, substância que exibe propriedade anti-inflamatória e antitumoral e o estigmasterol, encontrados no extrato dos frutos de *P.*

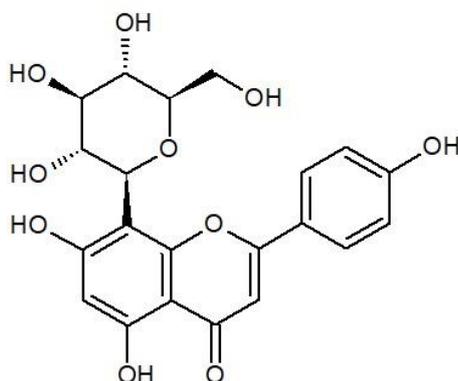
tuberculatum (GOTOR *et al.*, 2007; MOREAU; WHITAKER; HICKS, 2002; FACUNDO *et al.*, 2008).

A identificação de metabólitos secundários em *P. tuberculatum* revela que esta pode ser uma fonte de grande interesse terapêutico, com potencial para aplicação em estudos que envolvam a saúde humana.

5.4.1. Cromatografia à líquido de alta eficiência (CLAE)

A análise por CLAE das amostras revelou a presença do flavonoide vitexina (apigenina-8-C-glucosídeo) (Figura 14). Estudos fitoquímicos de espécies de Piperaceae têm mostrado o acúmulo de flavonoides, especialmente com o anel B não substituído. No entanto, a presença de flavonoides C-glicosilados é rara (BALDOQUI *et al.*, 2009).

Figura 14 - Estrutura química do flavonoide (flavona) vitexina.

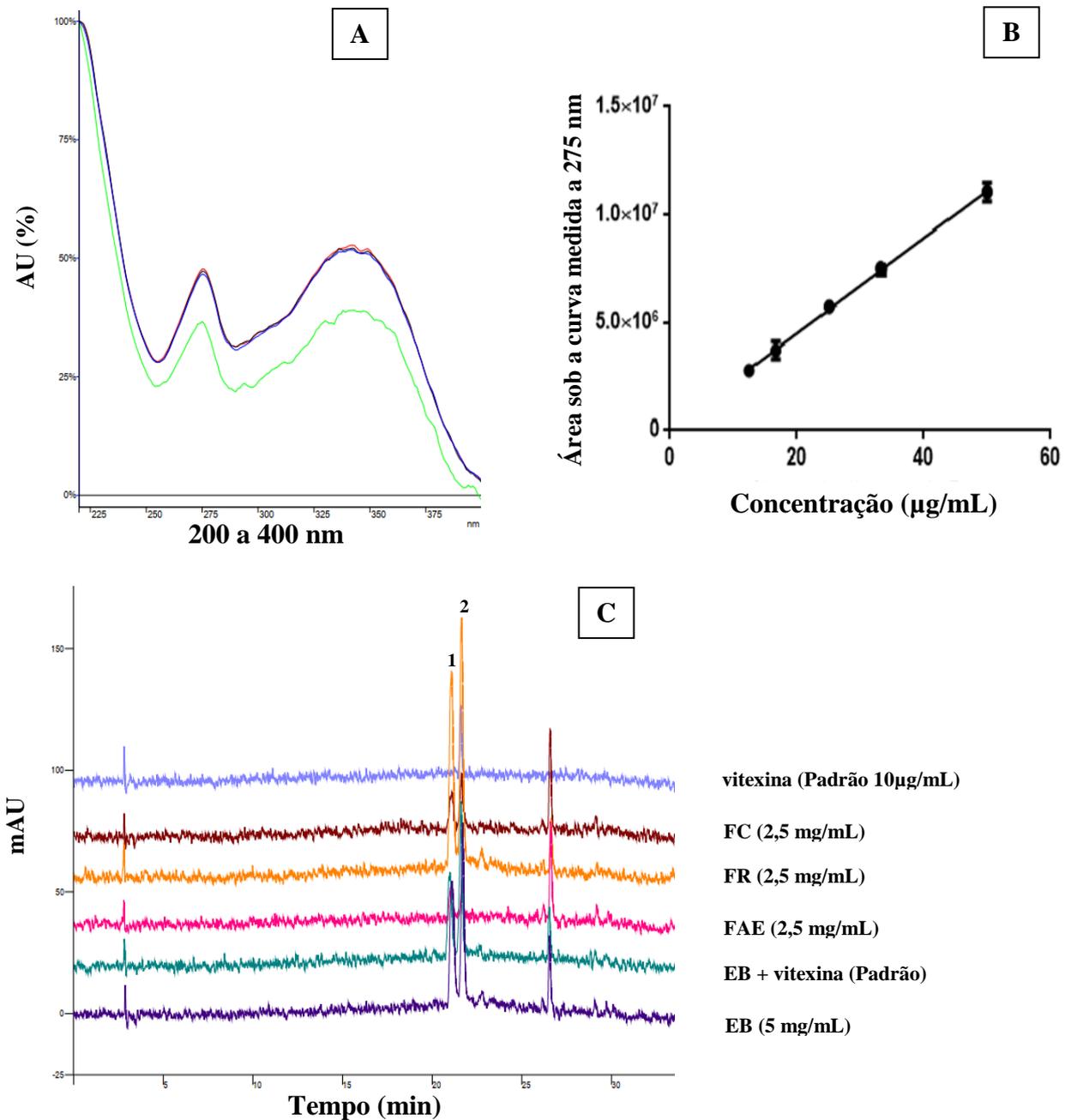


Fonte: Rovani *et al.* (2013); Hirota (2011).

O sinal (2) detectado em 21,65 min (DP 0,11) corresponde ao flavonoide vitexina e foi confirmado comparando-se os espectros de UV com solução padrão de vitexina e obtido mais de 99% de similaridade. Os espectros de ultravioleta (UV) para classe de flavonoides consistem tipicamente em duas bandas de absorção (Figura 15A) (FERREIRA *et al.*, 2016). Na Tabela 4 estão dispostos os resultados da quantificação de vitexina.

Já o primeiro sinal (1) detectado (Figura 15C) pode supostamente corresponder a isovitexina (apigenina-6-C-glucosídeo), um isômero da vitexina que também exibe propriedades biológicas diversas (ELE *et al.*, 2016). Entretanto, para que fosse confirmada presença deste isômero, seria necessária comparação com o padrão de isovitexina.

Figura 15 - Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Espectros de Ultravioleta (UV) do padrão de vitexina na cor verde e das amostras nas cores azul, preta e vermelha (A), curva de calibração do padrão de vitexina (B) e cromatogramas das amostras (C).



Nota: **A**: Para a classe de flavonoides, os espectros de ultravioleta (UV) possuem duas bandas características como observada na Figura. **C**: Cromatogramas. Padrão de vitexina na concentração de 10 µg/mL (azul claro); Fração Clorofórmio (FC) cor vinho; Fração Remanescente (FR) cor alaranjada; Fração Acetato de Etila (FAE) cor rosa; Coeluição extrato bruto (EB) + Padrão de vitexina (10 µg/mL) cor verde escuro; Extrato bruto (EB) cor azul escuro. O primeiro sinal (1) nos cromatogramas provavelmente corresponde ao flavonoide isovitexina enquanto que o segundo sinal (2) corresponde ao flavonoide vitexina.

Fonte: Nogueira (2019).

Tabela 4 - Concentração de vitexina por amostra avaliada, determinada por CLAE.

Amostra	µg/g (Vitexina)	Desvio Padrão
EB	14,22	0,46
FR	20,56	0,56
FAE	1,63	0,23
FC	4,09	0,42

Dados da curva de calibração

Equação	$Y=221673X + 53159$
R quadrado	0,9912

Nota: Extrato Bruto (EB); Fração Hexano (FH); Fração Clorofórmio (FC); Acetato de Etila (FAE); Fração Remanescente (FR); Coeficiente de correlação linear (R quadrado).

Fonte: Nogueira (2019).

Ao comparar os resultados dispostos na Tabela 3 com o teor de vitexina nas frações de *P. tuberculatum* na Tabela 4, verifica-se que a vitexina foi identificada em maior quantidade na fração FR. No entanto, a FR não foi a amostra que teve atividade mais pronunciada em alelopátia, com um menor efeito no desenvolvimento de plântulas do que o apresentado por frações menos polares, como FAE e FC. A vitexina detectada no presente trabalho é um flavonoide que apresenta efeitos anti-inflamatórios, anticâncer, antiespasmódicos, antimicrobianos, antioxidantes, neuroprotetores, antitireoidianos, antiarterioscleróticos e também é utilizado para prevenção de doenças cardíacas (GU *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2016; ELE *et al.*, 2016).

Embora algumas propriedades sejam descritos na literatura, não há estudos que relacionem atividade alelopática da vitexina. No entanto, o precursor metabólico da Vitexina é o flavonoide apigenina que tem sido descrito como um potencial agente alelopático (CIPOLLINI *et al.*, 2008). A apigenina é um flavonoide não glicosilado e, portanto, se acumularia nas frações FC e FAE, que foram os resultados mais significativos na redução de plântulas germinadas, como discutido acima. Cipollini *et al.* (2008) determinaram que a apigenina apresentou potencial alelopático em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. diminuindo significativamente a germinação desta espécie. Além disso, Putnam (1988) em seu trabalho de revisão descreveu que a vitexina e a isovitexina são flavonoides com maior concentração em exsudados de sementes.

Além de *P. tuberculatum*, a vitexina também foi observada em espécies como *P. carpunya* (QUÍLEZ *et al.*, 2010), *P. marginatum* (TILLEQUIN *et al.*, 1978; SEQUEDA-CASTAÑEDA *et al.*, 2015) e *P. amalago* (ROVANI *et al.*, 2013). Ressalta-se ainda que alguns derivados C-glicosilados de vitexina foram descritos para *Piper methysticum* G. Forst.

Tais como: vitexina-C- α -L-ramiose-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosídeo, vitexina-C- α -L-arabinosídeo e vitexina-C- β -glucopiranosídeo (BALDOQUI *et al.*, 2009).

5.5. Morfoanatomia e histoquímica das folhas de *P. tuberculatum*

As folhas de *P. tuberculatum* são alternas, simples, de formato elíptico, margem inteira, peciolada, ápice atenuado-acuminado e base e limbo assimétricos (Figura 16A, B). A lâmina foliar madura mede aproximadamente 13-18 cm de comprimento x 7,5-9 cm de largura e possui venação broquidódroma (Figura 16A, B). A superfície adaxial é intensamente verde e esverdeada abaxialmente. Foi observado um padrão de coloração típico nas amostras armazenadas em solução etanólica, quando estas foram analisadas por estereomicroscopia (Figura 16A). O pecíolo varia de 1,3 a 2,9 cm e está associado ao caule nas gemas vegetativas, enquanto nas folhas maduras a porção livre da bainha é circinada e uma porção curta contínua envolve o caule na base, característica também observada por Machado *et al.* (2017).

Os caracteres morfológicos registrados neste estudo estão de acordo com os descritos por Silva *et al.* (2016) para *P. tuberculatum*, com exceção da presença facultativa de projeções não-secretoras na base da bainha (Figura 16B), que também foi observada através dos entrenós de tronco, tricomas tectores distribuídos na nervura e um padrão diferente de vascularização de margem. Além disso, alguns desses caracteres morfológicos foliares, como simetria de base, venação e padrões de bainha foram importantes para distinguir as espécies de *Piper* (ALBIERO *et al.*, 2005a, 2005b; 2006; SILVA *et al.*, 2016, 2017). Frente à alta similaridade do complexo de variedades *P. tuberculatum*, ressalta-se que os registros morfoanatômicos fornecem importantes caracteres taxonômicos de acordo com Silva *et al.* (2016).

A seção transversal do meio da nervura mediana mostra um número variável de feixes vasculares colaterais. Projeções colenquimatosas ocorrem na superfície abaxial (Figura 16C), dado o aspecto estriado, conforme apontado por Silva *et al.* (2016). Os tricomas glandulares têm sido frequentemente descritos no gênero *Piper* (ALBIERO *et al.*, 2005a, 2005b; 2006, SOUZA; MOSCHETA; OLIVEIRA, 2004; GOGOSZ *et al.*, 2012; MACIEL *et al.*, 2014). No entanto, neste estudo, apenas tricomas tectores multicelulares foram observados através das nervuras (Figura 16C). Em contraste, Machado *et al.* (2017) registraram tricomas glandulares em *P. tuberculatum* var. *tuberculatum*.

Anatomicamente, em visão transversal, a epiderme da lâmina foliar é composta por células tabulares transversal (Figura 16D) e foi observada uma única camada subepidérmica de células grandes em ambas as superfícies (Figura 16D). A ontogenia da hipoderme foi registrada no *P. umbellatum* L. (MARINHO *et al.*, 2011), *P. aduncum* L., *P. aff. hispidinervum* e *P. hispidinervum* C. DC. (NAKAMURA *et al.*, 2015), mostrando sua origem meristêmica. Camada subepidérmica semelhante foi descrita em *P. crassinervium* H.B. & K., *P. gaudichaudianum* Kuntze (ALBIERO *et al.*, 2005a, 2005b), *P. diospyrifolium* Kunth (SOUZA; MOSCHETA; OLIVEIRA, 2004), *P. arboreum* Aubl. (SOUZA *et al.*, 2009), *P. umbellatum* e *P. solmsianum* C. DC. (GOGOSZ *et al.*, 2012), *P. amalago* L. e *P. caldense* C. DC. (SANTOS *et al.*, 2015, 2018), *P. callosum* Ruiz & Pav. (SILVA *et al.*, 2017), *P. ragnellii* (Miq.) C. DC. var. *Pallescens* (C. DC.) Yunck (PESSINI *et al.*, 2003), *P. tuberculatum* var. *tuberculatum* e *P. arboreum* (MACHADO *et al.*, 2017). Assim, sugere que tais células subepidérmicas são, provavelmente, uma verdadeira hipoderme. No entanto, estudos ontogênicos são essenciais para esclarecer essa questão.

Especialmente na superfície adaxial, esta camada subepidérmica é composta por células desenvolvidas, algumas delas de cor verde pela reação com azul de toluidina (Figura 16D). *P. tuberculatum* possui mesofilo dorsiventral, com parênquima em paliçada de duas camadas e número variável de camadas de parênquima esponjoso (Figura 16D), como descrito por Machado *et al.* (2017). As células do parênquima paliçádico também possuem coloração tipicamente verde pelo azul de toluidina (Figura 16D). As folhas da espécie estudada são hipoestomáticas (Figura 16D) e os estômatos são tetra e cicloclíticos, tipicamente encontrados em espécies de Piperaceae (METCALFE; CHALK, 1965). Ráfides, drusas e cristais prismáticos foram observados em células de parênquima paliçádico e esponjoso, bem como associados a feixes vasculares. Da mesma forma, características anatômicas semelhantes foram registradas em outras nove espécies de *Piper* descritas por Albiero *et al.* (2005a, 2005b; 2006), Gogosz *et al.* (2012), Maciel *et al.* (2014) e Souza, Moscheta e Oliveira (2004).

Na lâmina foliar foram registradas células secretoras conspícuas imersas no mesofilo, próximas aos feixes vasculares (Figura 16E, F). Na visão transversal (Figura 16F), longitudinal (Figura 16G) ou paradérmica (Figura 16H, I), essas células são esféricas a ovais, sendo axialmente idioblastos secretórios. Machado *et al.* (2017) descreveram idioblastos secretores em *P. tuberculatum* var. *tuberculatum*, distribuído no mesofilo. A posição idioblástica fornece importante evidência taxonômica, uma vez que varia de epidérmica (MARINHO *et al.* 2011), subepidérmica (ALBIERO *et al.*, 2006) ou espalhada no mesofilo

(GOGOSZ *et al.*, 2012). Neste estudo, um novo padrão é descrito, cujos idioblastos são tipicamente associados a feixes vasculares (Figura 16E-I).

As células subepidérmicas e as células do parênquima paliçádico são preenchidas por compostos fenólicos (Figura 16D, J), como foi destacado por Machado *et al.* (2017). Na visão paradérmica, as células fenólicas subepidérmicas são tipicamente agrupadas (Figura 18K), uma característica descrita pela primeira vez em *P. tuberculatum*, sendo um potencial caráter diagnóstico, que é facilmente observado nessa espécie.

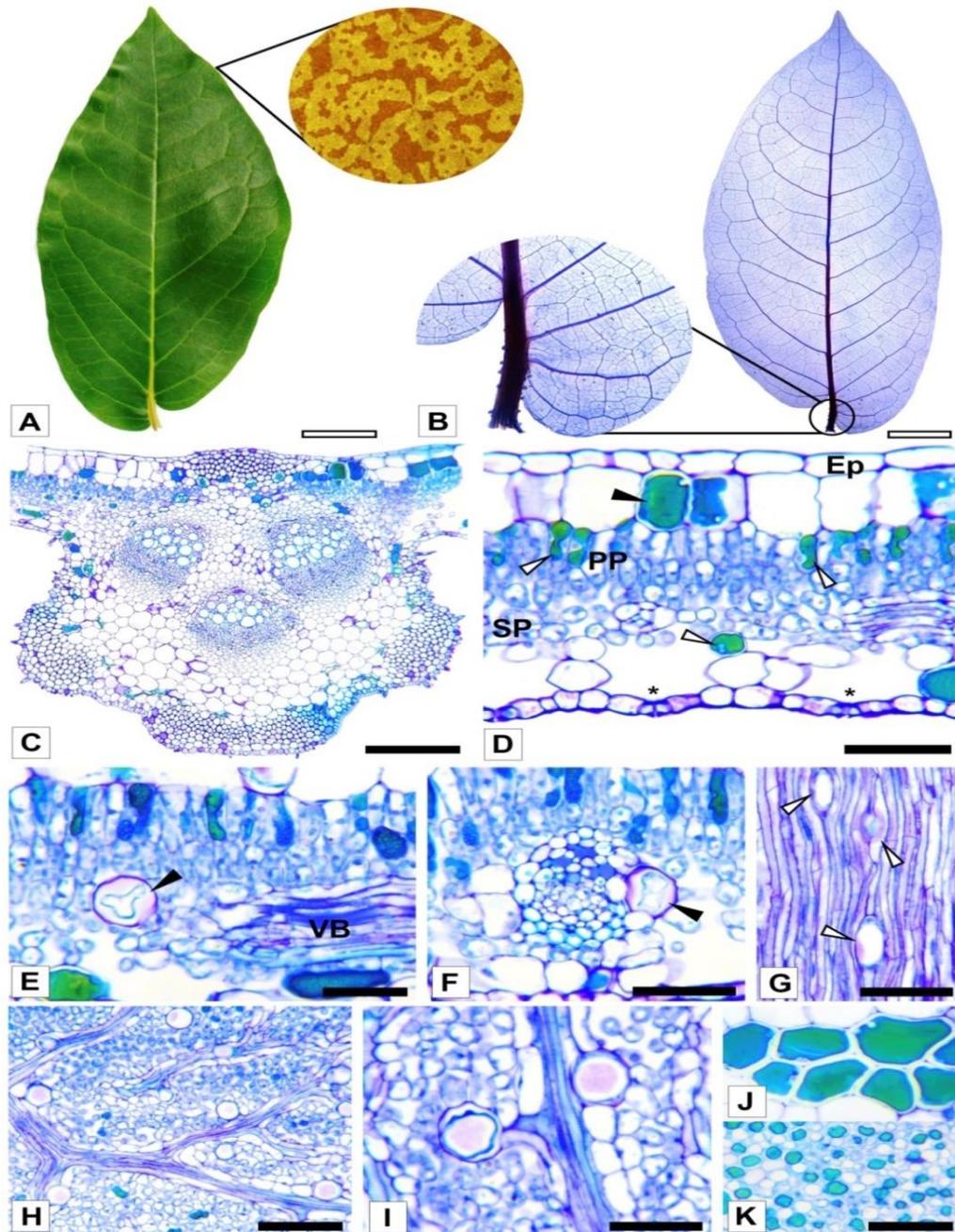
A secreção produzida pelos idioblastos em *P. umbellatum* é caracterizada como uma mistura de compostos hidrofílicos (fenólicos e alcaloides) e hidrofóbicos (oleorresinas), indicada pela coloração avermelhada frente à reação NADI (MARINHO *et al.*, 2011). Em contraste, *P. tuberculatum* apresenta idioblastos fenólicos e oleíferos.

Os idioblastos fenólicos agrupados na camada subepidérmica e no parênquima paliçádico foram observados de acordo com a cor preta na seção de amostras fixas de SFF (Figura 17A, B). Os resultados para a reação de PAS foram positivos apenas para polissacarídeos estruturais e a presença de compostos fenólicos também é corroborada pela cor amarela (Figura 17C), bem como pela coloração verde no azul de toluidina (Figura 16). Machado *et al.* (2017) registraram idioblastos fenólicos em *P. arboreum* e *P. tuberculatum* var. *tuberculatum* só na camada subepidérmica.

Os idioblastos oleíferos distribuídos próximo ao feixe vascular associado em *P. tuberculatum* produzem uma coloração azul na reação NADI (Figura 17D), o que fornece evidências da produção de óleo essencial. Além disso, foram observadas gotas de óleo no paliçádico e nas células do parênquima esponjoso, adquirindo cor azul pelo teste NADI (Figura 17E, F). O óleo essencial de *P. tuberculatum* é composto principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos, cuja composição química varia de acordo com a idade foliar da planta e fatores ambientais (FACUNDO *et al.*, 2008; NAVICKIENE *et al.*, 2006; SOBREIRA; HERNANDEZ; SOUZA, 2017).

Do mesmo modo observado em *P. tuberculatum*, a produção de óleo essencial foi registrada em idioblastos secretórios em *P. callosum* (SILVA *et al.*, 2017) e *P. umbellatum* (MARINHO *et al.*, 2011). Os compostos lipofílicos nas células do mesofilo também foram registrados em *P. regnelli* (Miq.) C. DC. var. *regnelli* (SALATINO; SILVA, 1975) pelo teste do Sudan. No entanto, o resultado do teste NADI de *P. tuberculatum* é o primeiro registro histoquímico em *Piper* de produção de óleo essencial fora dos idioblastos secretores.

Figura 16 – Folhas inteiras de *P. tuberculatum* completamente desenvolvidas, cortes transversais e paradérmicos dos fragmentos da base, meio e ápice para análise morfoanatômica e histoquímica.



Nota: **A-B**: Morfologia foliar de *P. tuberculatum*. **A**: Visão geral da folha fresca, aspecto superficial adaxial de amostras armazenadas em estereomicroscopia. **B**: folha limpa, mostrando vascularização broquidódromo. Em detalhe, a base assimétrica e projeções típicas no pecíolo. **C-K**: Anatomia foliar de *P. tuberculatum*. **C**: Visão transversal ou seção mediana, observe os feixes vasculares e projeções colenquimatosas. **D**: Mesofilo dorsiventral, composto por epiderme (ep), camada subepidérmica com células grandes (cabeça da seta preta), parênquima paliçádico (pp), parênquima esponjoso (sp) e estômatos na superfície abaxial (*). Observe as células de cor verde pelo azul de toluidina (ponta de seta branca). **E-I**: Idioblastos secretórios associados a feixes vasculares (ponta de flecha preta e branca). **E-F**: Visão transversal. **G-H**: Visão paradérmica, observe a abundância de idioblastos. **I**: Detalhe de dois idioblastos secretores, observe a secreção no interior da célula. **J-K**: Idioblastos de cor verde pelo azul de toluidina, em vista paradérmica. **J**: Idioblastos agrupados na camada subepidérmica. **K**: Idioblastos no parênquima paliçádico. **Barras de escala**: A-B = 2,5 cm; C = 400 μm ; D = 200 μm ; E, F, I-K = 100 μm ; G = 150 μm ; H = 250 μm .

Fonte: Nogueira (2019).

Na Tabela 5 estão dispostos os resultados obtidos para os testes histoquímicos para as folhas de *P. tuberculatum*.

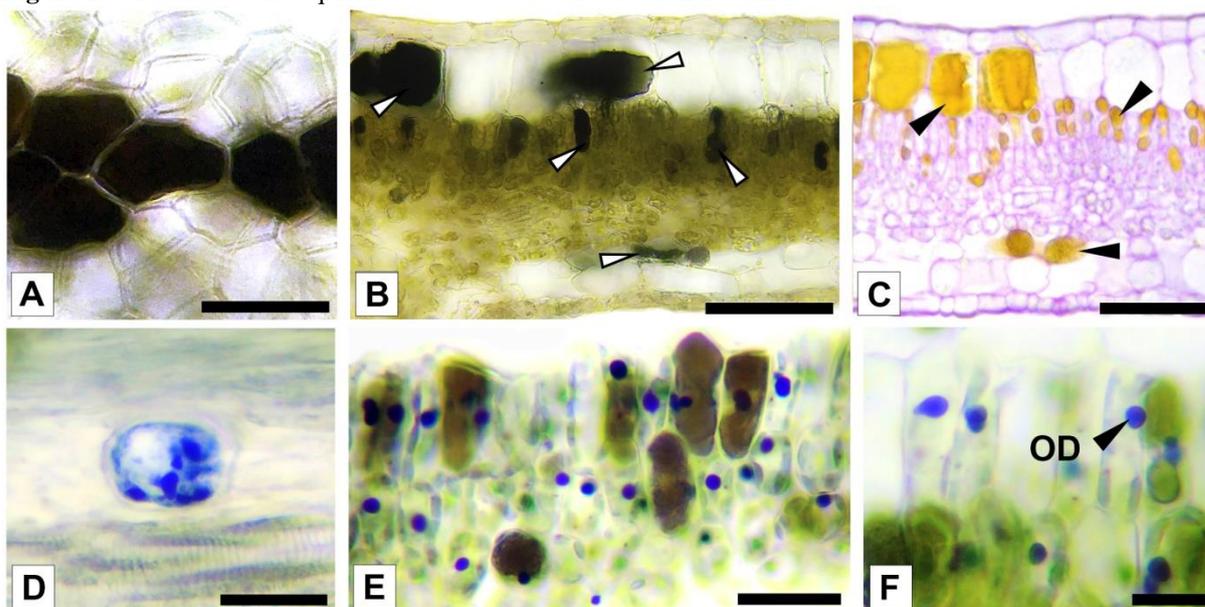
Tabela 5 - Resultado dos testes histoquímicos para as folhas de *P. tuberculatum* fixadas em formalina tamponada (FNT).

Testes	Reações	<i>P. tuberculatum</i>
Compostos Fenólicos	SFF	+
Proteínas	Azul de Coomassie	-
Polissacarídeos de cadeia longa	PAS	+
Lipídeos Totais / Óleos essenciais	Sudam Red / NADI	+

Nota: (-) negativo (+) positivo; (SFF) Sulfato ferroso; (PAS) Ácido Periódico/Reagente de Schiff – (O'Brien e McCully, 1981); (NADI) α -naftol e cloridrato de dimetilparafenileno diamina (método original: David & Carde, 1964).

Fonte: Nogueira (2019).

Figura 17 - Resultados histoquímicos dos tecidos secretores foliares em *P. tuberculatum*.



Nota: **A-B:** Compostos fenólicos corados em preto usando o teste de amostras fixadas SFF. **A:** Idioblastos fenólicos agrupados em camada subepidérmica em vista paradérmica. **B:** visão transversal apontando idioblastos fenólicos (setas brancas) distribuídos nas camadas subepidérmicas e mesofilo, principalmente parênquima paliçádico. **C:** Coloração magenta Ácido periódico / reagente de Schiff (PAS) confirma os polissacarídeos estruturais nas paredes celulares, a cor amarela indica compostos fenólicos. **D-F:** reação NADI, cor azul indica a produção de óleo essencial. **D:** Idioblasto secretor associado a feixes vasculares. **E:** Gotas de óleo produzidas por paliçada e células de parênquima esponjoso. **F:** Detalhe de gotas de óleo (ponta de seta preta). Barras de escala: **A, D, E** = 100 µm; **B, C** = 200 µm; 50 µm.

Fonte: Nogueira (2019).

Os metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos, como observado em *P. tuberculatum*, são descritos na literatura como substâncias utilizadas pelas plantas como mecanismo de ação e defesa contra predadores herbívoros, atração de polinizadores,

proteção contra patógenos (fitoalexinas), microrganismos, além de constituírem importantes absorventes de radiação ultravioleta, que previnem danos sérios à planta (BOURGAUD *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2017).

Os resultados histoquímicos descritos para *P. tuberculatum* corroboram os testes fitoquímicos realizados neste trabalho. Principalmente em relação à alta concentração de compostos fenólicos, evidenciados tanto no teste de SFF no tecido vegetal quanto na detecção e quantificação dos constituintes do extrato e frações por espectrofotometria de ultravioleta.

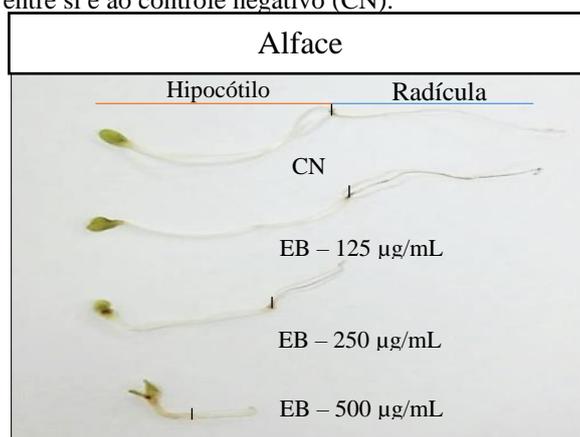
5.6. Potencial alelopático

5.6.1. Germinação e crescimento

5.6.1.1. Teste de crescimento inicial de *L. sativa* (Alface)

As frações (FEB, FH, FC, FAE e FR) e as concentrações (125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL) reduziram o IVG das plântulas de alface (ANOVA (5,48) $F = 156,89$ $p < 0,0001$; ANOVA (2,48) $F = 650,57$ $p < 0,0001$), diminuíram o comprimento total das plântulas de alface (ANOVA(5,48) $F = 23,124$ $p < 0,0001$; ANOVA(2,48) $F = 35,723$ $p < 0,0001$), o alongamento do hipocótilo das plântulas (ANOVA(5,48) $F = 48,58$ $p < 0,0001$; ANOVA(2,48) $F = 41,65$ $p < 0,0001$) e ainda influenciaram no comprimento da radícula das plântulas de alface (ANOVA(5,48) $F = 48,58$ $p < 0,0001$; ANOVA(2,48) $F = 41,65$ $p < 0,0001$), como mostrado na Tabela 6 e Figura 18. Dessa forma, quanto maior for o F, mais significativo é o valor de p (COLLARES, 2012).

Figura 18 - Plântulas de alface submetidas ao tratamento com extrato bruto (EB) nas concentrações de 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, comparadas entre si e ao controle negativo (CN).



Fonte: Nogueira (2017).

Tabela 6 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o IVG e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de *P. tuberculatum* para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, Comprimento Total, Comprimento do Hipocótilo e Comprimento da Radícula das plântulas de alface.

Tratamento	Grau de Liberdade	Valor de F	Valor de <i>p</i>
IVG			
Frações	5	156,89	0,0001 *
Concentrações	2	650,57	0,0001 *
Interação (frac + conc.)	8	36,76	0,0001 *
COMPRIMENTO TOTAL			
Frações	5	23,124	0,0001*
Concentrações	2	35,723	0,0001*
Interação (frac + conc.)	8	6,445	0,0001*
COMPRIMENTO HIPOCÓTILO			
Frações	5	48,58	0,0001*
Concentrações	2	41,65	0,0001*
Interação (frac + conc.)	8	16,19	0,0001*
COMPRIMENTO RADÍCULA			
Frações	5	9,850	0,0001*
Concentrações	2	24,472	0,0001*
Interação (frac + conc.)	8	3,294	0,01*

Nota: *houve diferença significativa; valores mais altos de F indicam correlações mais fortes; Probabilidade de significância (*p*); Índice de Velocidade de Germinação (IVG); frac: Fração; conc: concentrações.
Fonte: Nogueira (2018).

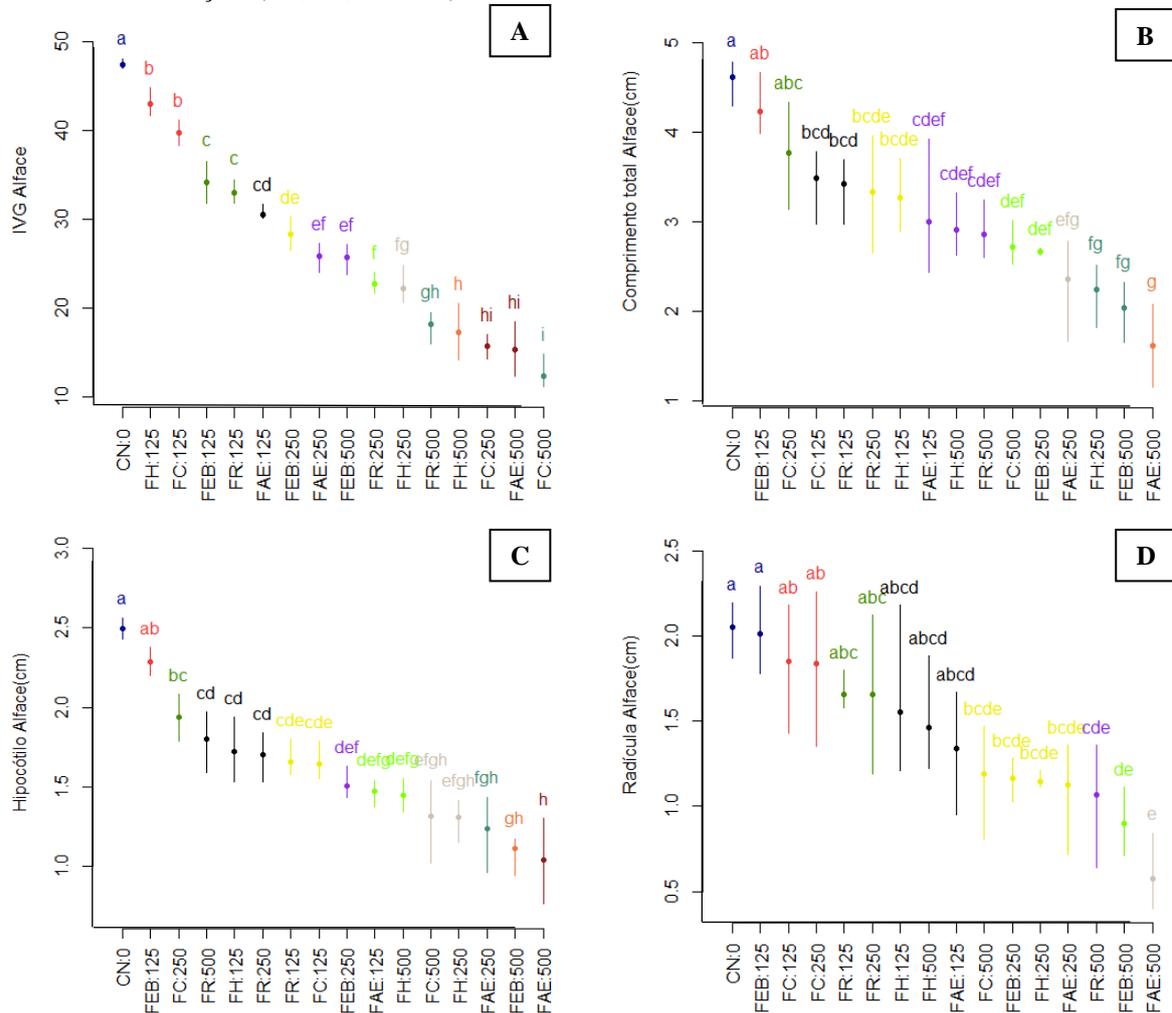
Para o IVG (Figura 19A), é possível notar que todas as frações diminuíram o IVG da alface em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$) e que as frações FC e FAE na concentração de 500 µg/mL exibiram melhor efeito sobre o IVG das plântulas de alface quando comparada ao controle ($p < 0,0001$). Quanto maior for a concentração do extrato e frações, maior o número de sementes não germinadas (LUSTOSA *et al.*, 2007).

De acordo com os resultados para o comprimento total das plântulas de alface (Figura 19B), observa-se que o FEB 500 µg/mL, e as frações FH (250 µg/mL) e FAE (500 µg/mL) exerceram maior efeito alelopático quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$) e reduziram o comprimento total das plântulas de alface.

Para o hipocótilo (Figura 19C), as frações FAE de 500 µg/mL, FEB de 500 µg/mL e FAE de 250 µg/mL, exibiram maior efeito alelopático e diminuíram o alongamento do hipocótilo das plântulas de alface quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$).

Já para as radículas (Figura 19D), é possível notar que FR de 500 µg/mL, FEB de 500 µg/mL e (FAE) 500 µg/mL tiveram melhor desempenho e diminuíram o comprimento das radículas das plântulas de alface quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$).

Figura 19 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (A), Comprimento Total (B), Comprimento do Hipocótilo (C) e Comprimento da Radícula (D) das plântulas de Alface submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações (FH, FC, FAE FR) de *P. tuberculatum*.



Nota: IVG: índice de velocidade de germinação; EB: extrato bruto; CN: controle negativo – água destilada; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; 0, 125, 250 e 500: concentrações em $\mu\text{g/mL}$; a-i e cores: agrupamento por significância; barra vertical: valores máximos e mínimos; ponto: valor médio; médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5.6.1.2. Teste de germinação e crescimento inicial de *A. cepa* (Cebola)

As frações (FEB, FH, FC, FAE e FR) e as concentrações (125 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$) diminuíram o IVG das plântulas de cebola (ANOVA(5,48) $F = 16,478$ $p < 0,0001$; ANOVA(2,48) $F = 17,221$ $p < 0,0001$). A interação entre as frações com as concentrações não teve diferença significativa. As amostras também reduziram o comprimento total das plântulas (ANOVA(5,2) $F = 142,522$ $p < 0,0001$; ANOVA(2,48) $F = 261,410$ $p < 0,0001$), o comprimento do hipocótilo (ANOVA(5,48) $F = 106,40$ $p < 0,0001$; ANOVA(2,48) $F = 271,82$ $p < 0,0001$) e o comprimento da radícula das plântulas de cebola (ANOVA(5,2) $F = 132,855$

$p < 0,0001$; ANOVA(2,48) $F = 97,464$ $p < 0,0001$) respectivamente, como mostrado na Tabela 7. Quanto maior o F, mais significativo é o valor de p (COLLARES, 2012).

Tabela 7 - Resultados da análise de variância (ANOVA) para o EB e frações (FH, FC, FAE, FR) das folhas de *P. tuberculatum* para o modelo com uso das variáveis Frações e Concentrações sobre o IVG, Comprimento Total, Comprimento do Hipocótilo e Comprimento da Radícula das plântulas de cebola.

Tratamento	Grau de Liberdade	Valor de F	Valor de p
IVG			
Frações	5	16,478	0,0001*
Concentrações	2	17,221	0,0001*
Interação (frac + conc.)	8	2,081	> 0,05
COMPRIEENTO TOTAL			
Frações	5	142,522	0,0001*
Concentrações	2	261,410	0,0001*
Interação (frac + conc.)	8	9,743	0,0001*
COMPRIENTO HIPOCÓTILO			
Frações	5	106,40	0,0001*
Concentrações	2	271,82	0,0001*
Interação (frac + conc.)	8	11,91	0,0001*
COMPRIENTO RADÍCULA			
Frações	5	132,855	0,0001*
Concentrações	2	97,464	0,0001*
Interação (frac + conc.)	8	3,622	0,01*

Nota: *houve diferença significativa; valores mais altos de F indicam correlações mais fortes; Probabilidade de significância (p); Índice de Velocidade de Germinação (IVG); frac: Fração; conc: concentrações.
Fonte: Nogueira (2018).

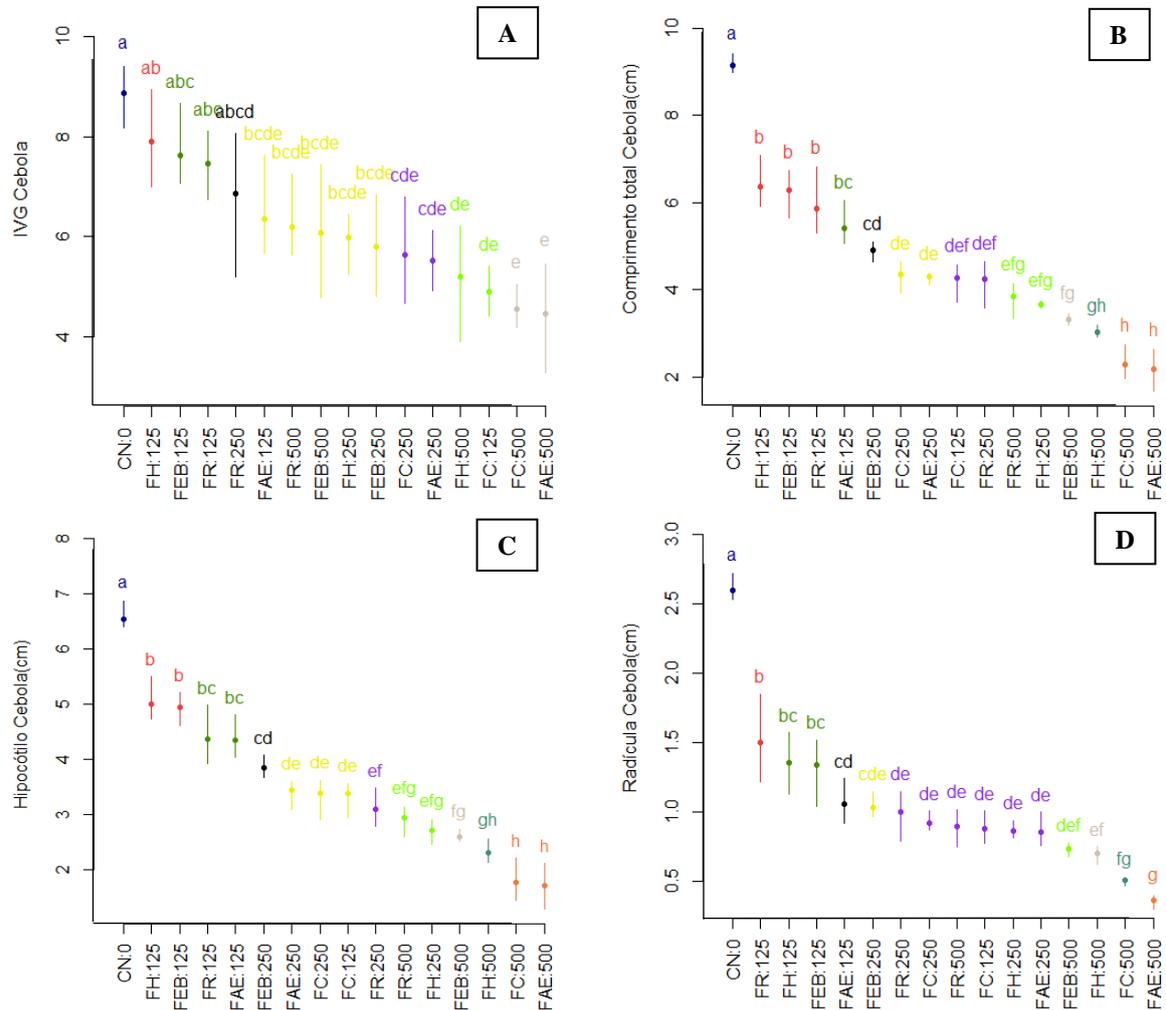
É possível observar na Figura 20A, que as frações FAE e FC de 125 $\mu\text{g/mL}$, FC de 500 $\mu\text{g/mL}$ e de FAE 500 $\mu\text{g/mL}$ foram mais eficazes e reduziram o IVG da cebola quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$).

Na Figura 20B foi observado que todas as frações reduziram o comprimento das plântulas de cebola quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$). No entanto, as frações que tiveram melhor resultado foram a FC de 500 $\mu\text{g/mL}$ e a FAE de 500 $\mu\text{g/mL}$.

A Figura 20C mostra a influência das frações sobre o alongamento do hipocótilo, assim, foi verificado que a FC e FAE de 500 $\mu\text{g/mL}$ exerceram maior influência e reduziram o alongamento do hipocótilo quando comparados ao controle ($p < 0,0001$).

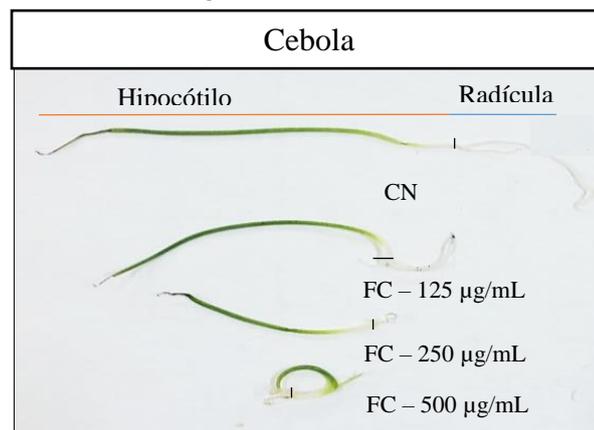
Conforme a Figura 20D, todas as concentrações analisadas reduziram o comprimento da radícula das plântulas de cebola quando comparadas ao controle ($p < 0,0001$) e as frações FC e FAE de 500 $\mu\text{g/mL}$ obtiveram melhor resultado. Os efeitos também são observados nas plântulas tratadas com a FC (Figura 21).

Figura 20 - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (A), Comprimento Total (B), Comprimento do Hipocótilo (C) e Comprimento da Radícula (D) das plântulas de Cebola submetidas a diferentes concentrações do extrato bruto e frações (FH, FC, FAE FR) de *P. tuberculatum*.



Nota: IVG: índice de velocidade de germinação; EB: extrato bruto; CN: controle negativo – água destilada; FH: fração hexano; FC: fração clorofórmio; FA: fração acetato de etila; FR: fração remanescente; 0, 125, 250 e 500: concentrações em $\mu\text{g/mL}$; a-h e cores: agrupamento por significância; barra vertical: valores máximos e mínimos; ponto: valor médio; médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 21 - Plântulas cebola submetidas ao tratamento com a fração clorofórmio (FC) nas concentrações de 125 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, comparadas entre si e ao controle negativo (CN).



Fonte: Nogueira (2017).

De modo geral, os resultados demonstraram que o EB e todas as frações testadas tiveram efeito alelopático, em especial as frações FAE 500 µg/mL, FC 500 µg/mL e EB 500 µg/mL que tiveram melhor desempenho sobre as plantas de teste.

Pode-se notar uma relação dose dependente entre IVG, crescimento, EB e frações, uma vez que, ao aumentar a concentração das amostras ocorreu redução significativa do IVG das sementes, efeito semelhante foi observado por Lima *et al.* (2017) ao testar o potencial alelopático do extrato de folhas de *P. aduncum* sobre sementes de alface. Também foi observado que ocorreu diminuição significativa do crescimento inicial das plântulas *L. Sativa* (alface) e *A. Cepa* (cebola) para os parâmetros testados (comprimento, hipocótilo e radícula), conforme relatado nos estudos de Lustosa *et al.* (2007) para os extratos de *P. aduncum* e *P. tectoniifolium*.

A intensidade do efeito alelopático varia potencialmente em função da concentração do extrato da planta de interesse e da planta receptora analisada e que depende do tipo de tecido usado para a extração e da concentração dos aleloquímicos que estão diretamente relacionados à espécie investigada (SOUZA FILHO *et al.*, 2009; BORELLA *et al.*, 2012; FORMAGIO *et al.* 2010) e também está de acordo com os dados obtidos para *P. tuberculatum*. Vale ressaltar que normalmente, a atividade alelopática pode afetar toda a fisiologia da planta (SILVA *et al.*, 2009).

Outras pesquisas, como as conduzidas por Lustosa *et al.* (2007), Agra Neto *et al.* (2015), Ramos (2016) e Pukclai e Kato-Noguchi (2011) constataram atividade alelopática para os extratos de *P. aduncum*, *P. tectoniifolium*, *Piper corcovadensis* (Miq) C. DC., *P. umbellatum* e *Piper sarmentosum* Roxb e o mesmo efeito foi observado em *P. tuberculatum*.

Para o extrato de *P. mikanianum* (Kunth) Steudl. também foi observado efeito alelopático significativo sobre a germinação e crescimento inicial de sementes de rabanete, para este teste foi verificado que o extrato diminuiu severamente o IVG e o crescimento (hipocótilo e radícula) das plântulas (BORELLA *et al.* (2012) e os resultados obtidos para os testes realizados com o EB e frações de *P. tuberculatum* estão de acordo com os trabalhos dos autores citados anteriormente.

Em estudos alelopáticos de espécies da família Leguminosae, o padrão observado é a maior sensibilidade das radículas aos efeitos dos extratos quando comparadas ao hipocótilo, independentemente da espécie receptora e da fonte do extrato (MOURÃO JÚNIOR; SOUZA FILHO, 2010), o mesmo efeito foi observado neste trabalho para as radículas de alface e cebola submetidas aos extratos de folhas de *P. tuberculatum*.

Os efeitos alelopáticos causados nas plantas são mediados por substâncias pertencentes a diversos grupos de compostos secundários já identificados, como os compostos fenólicos (ácidos fenólicos), fenóis, cumarinas, taninos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, flavonoides e terpenpinodes (BORELLA *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014; NISHIDA *et al.*, 2005). Mas, raramente essa atividade é resultados de uma única substância, sendo mais comum um conjunto metabólitos secundários apresentar essa atividade (SILVA *et al.*, 2009).

No presente estudo, algumas classes desses metabolitos foram quantificadas no EB e frações de *P. tuberculatum* e, podendo estar associadas à atividade alelopática exibida pelas amostras. Em vista disso, *P. tuberculatum* pode ser uma potencial fonte de substâncias ativas que possam ser testadas frente a linhagens de células cancerígenas em estudos futuros, a fim de identificar substâncias/moléculas ativas para o tratamento contra o câncer (quimioterápicos).

5.7. Atividades Biológicas

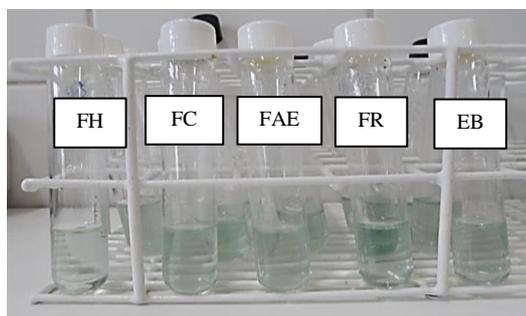
5.7.1. Atividade antioxidante (AA)

5.7.1.1. Avaliação do poder redutor frente ao complexo do fosfomolibdênio

Conforme os resultados, quanto à atividade antioxidante (AA) do extrato e frações avaliadas, observou-se que as amostras adquiriram a coloração verde característica (Figura 22) que evidenciaram o poder redutor frente ao complexo fosfomolibdênio, conforme descrito por Paula *et al.* (2014b). As médias do EB e das frações foram obtidos ($p < 0,05$) e o padrão ácido ascórbico foi estimado como tendo 100% de poder redutor, a partir do qual foi calculado o potencial redutor das amostras.

O EB obteve 28,17% do poder redutor quando comparado ao ácido ascórbico na concentração de 200 µg/mL. As frações FC e FAE tiveram resultados de 24,39% e 24,00% de poder redutor, respectivamente. As frações FH com 19,06% de poder redutor e FR com poder redutor de 22,67% encerram essa etapa.

Figura 22 - Ensaio da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de folhas de *P. tuberculatum* frente ao complexo fosfomolibdênio. Coloração verde indica reação.

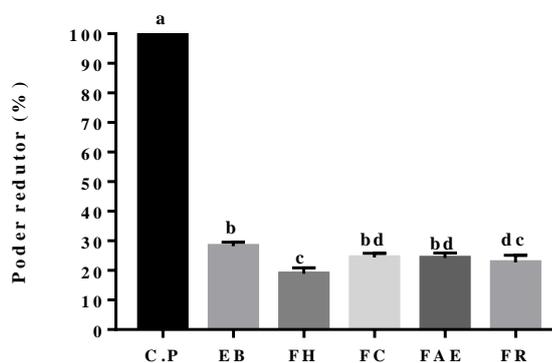


Nota: Fração hexano (FH), fração clorofórmio (FC), fração acetato de etila (FAE), fração remanescente (FR), extrato bruto (EB).

Fonte: Nogueira (2018).

Ao comparar as amostras ao padrão de ácido ascórbico é possível notar que nenhuma amostra obteve atividade superior ou similar a este padrão, apresentando diferentes graus de atividade antioxidante (Figura 23). O poder redutor demonstrado pelas amostras de *P. tuberculatum* pode estar relacionado ao conteúdo de compostos fenólicos, em especial os flavonoides, visto que estas substâncias já tiveram atividade antioxidante comprovada em espécies do gênero *Piper* (ORLANDA; VALE, 2015; SANTOS *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2016; PAULA *et al.*, 2014b; ZARAI *et al.*, 2013).

Figura 23 - Resultados obtidos no ensaio do poder redutor pelo método do Fosfomolibdênio, expressos como média e desvio padrão.



Nota: cada coluna representa a média \pm desvio padrão das amostras. Controle Positivo (C.P); Extrato bruto (EB); Fração hexano (FH); Fração clorofórmio (FC); Fração acetato de etila (FAE); Fração remanescente (FR). As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).
Fonte: Nogueira (2018).

Os resultados obtidos na análise fitoquímica e histoquímica ressaltam a elevada concentração de compostos fenólicos nas amostras de *P. tuberculatum*. Vale salientar que em plantas os compostos fenólicos têm papel importante, pois, atuam no mecanismo de defesa e também como antioxidantes, não somente por sua habilidade em doar hidrogênios ou elétrons (propriedades redutoras) e estrutura química, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de lipídeos, por exemplo, (SILVA *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2007; ZARAI *et al.*, 2013). Com isso, a Vitexina quantificada em *P. tuberculatum*, juntamente com outras substâncias fenólicas, pode ter contribuído para a atividade antioxidante exibida pelas amostras, especialmente o EB, sendo que esta substância já teve propriedade antioxidante comprovada (GU *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2015).

5.7.2. Atividade antibacteriana

Os resultados dos testes antibacterianos realizados com o EB e frações das folhas de *P. tuberculatum* estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Média dos halos (cm) de inibição do EB e frações obtidas das folhas frescas de *P. tuberculatum*.

Bactérias	Produto testado / concentração / diâmetro do halo (cm)						
	EB 100 mg/mL	FH 100 mg/mL	FC 100 mg/mL	FAE 100 mg/mL	FR 100 mg/mL	Cloranfenicol (CP) 30 µg/mL	(CN) Álcool 70%
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	1,0	-	4,2	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	1,8	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	3,2	-
<i>S. thyphimurium</i>	-	-	-	-	-	3,1	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	3,1	-

Nota: (-) não apresentou halo de inibição. Amostras do Extrato Bruto (EB) das folhas de *P. tuberculatum*, Piperaceae; Fração Hexano (FH); Fração Clorofórmio (FC); Fração Acetato de Etila (FAE); Fração Remanescente (FR), Controle Positivo (CP) e Controle Negativo (CN).

Fonte: Nogueira (2018).

Conforme tabela 8, o EB e as frações FH, FC e FR não exibiram atividade antibacteriana enquanto que a FAE foi ativa contra o *Staphylococcus epidermidis*. A atividade antibacteriana da fração FAE pode estar relacionada com a vitexina, substância detectada em outras espécies pertencentes ao gênero *Piper* como *P. amalago*, *P. methysticum*, *P. umbellata*, *P. peltatum* L. *P. carpunya* (SANTOS *et al.*, 2010; BALDOQUI *et al.*, 2009; QUÍLEZ *et al.*, 2010) e que também está presente em *P. tuberculatum*, conforme observado nas análises

cromatográficas do presente estudo . Além disso, de acordo com Gu *et al.* (2017) a vitexina pode estar relacionada a outras propriedades terapêuticas demonstradas por espécies de *Piper*, como a atividade antimicrobiana, por exemplo.

Estudos dirigidos por Lima *et al.* (2018) empregaram o método de difusão em Ágar e constataram atividade antibacteriana para os extratos obtidos de folhas, talos finos e frutos de *P. tuberculatum* sobre *S. aureus* e *S. aureus* resistente à Meticilina (MRSA), o mais patogênico dos estafilococos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), enquanto no presente trabalho as amostras não exibiram atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco.

Já Pinto, Lana e Lima (2016) investigaram o potencial antibacteriano do extrato de folhas, talos finos e frutos de *P. tuberculatum* sobre diferentes linhagens de cepas de *E. coli* e não observaram atividade antibacteriana de nenhuma das amostras pelo método de difusão em disco. Por outro lado, Da Silva Matos *et al.* (2016), também testaram o extrato dos talos finos (cascas) e verificaram atividade bactericida sobre *E. coli*, o microrganismo gram-negativo considerado um dos maiores causadores de infecções no trato urinário dos seres humanos, enquanto o EB e frações do presente trabalho não apresentaram tal atividade.

Embora a FAE tenha exibido atividade sobre *S. epidermidis*, foi observado que o EB e frações de *P. tuberculatum* não tiveram ou apresentaram baixa atividade antibacteriana quando comparadas aos resultados disponíveis na literatura. Logo, o resultado obtido não foi considerado significativo, visto que *S. epidermidis* é uma bactéria gram-positiva e, portanto, é mais sensível e mais suscetível aos extratos de *P. tuberculatum* quando comparado às outras cepas avaliadas neste trabalho. Vale ressaltar ainda, que as frações de *P. tuberculatum* ainda não haviam sido testadas por difusão em disco.

6. CONCLUSÃO

O Processo de extração apresentou resultados efetivos, com rendimento de 5,41% de EB, correspondentes ao teor de sólidos extraído do material vegetal fresco. As frações tiveram rendimentos iguais a 17,71 % (FH), 1,03% (FC), 4,29% (FAE) e 71,57% (FR).

O EB e as frações FR e FH apresentaram grupos de metabólitos como compostos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianidinas e fitoesteroides. Clorofilas *a* e *b* e carotenoides foram identificados no EB e frações FH e FR. As frações FC e FAE exibiram em sua composição todos os compostos citados anteriormente, exceto clorofilas e carotenoides.

As análises por CLAE revelaram a presença do flavonoide vitexina tanto no EB quanto nas frações FC, FAE e FR. Este composto pode ser um dos responsáveis pela atividade alelopática, juntamente com seu precursor metabólico Apigenina.

A análise histoquímica das folhas de *P. tuberculatum* comprovou a produção de metabólitos com potencial interesse terapêutico e está correlacionada com o perfil fitoquímico avaliado neste estudo. Além disso, algumas características morfoanatômicas foram descritas pela primeira vez, fornecendo dados taxonômicos e potenciais para o controle de qualidade.

Todas as frações exibiram potencial alelopático frente *L. sativa* e *A. cepa* em todos os parâmetros testados. As frações FAE e FC foram significativamente mais expressivas quando comparadas ao controle (CN) e as frações FEB, FR e FH.

O teste de atividade antioxidante frente à redução do complexo fosfomolibdênio mostrou que nenhuma amostra apresentou poder redutor superior ou similar ao exibido pelo padrão de ácido ascórbico.

A fração FAE apresentou atividade antibacteriana frente *Staphylococcus epidermidis* pelo método de difusão em disco.

Ressalta-se, que ainda existem dados em processamento referentes ao presente trabalho, como Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas (LC/MS), cujos resultados serão compilados e publicados em um próximo trabalho de pesquisa do grupo.

Este trabalho contribui consideravelmente para a taxonomia, pois as características descritas servem como parâmetro de autenticidade e potencial diagnóstico para o controle de qualidade de *P. tuberculatum*. Além disso, fornece dados significativos sobre fitoquímica e alelopatia que podem ser explorados em estudos futuros.

Adicionalmente pode agregar valor econômico à espécie e contribuir para desenvolvimento de futuros produtos agrônômicos, cosméticos e farmacêuticos.

REFERÊNCIAS

- AGRA NETO, A. C.; BARBOSA, U. N.; MONTEIRO, A. L. B. Avaliação do potencial alelopático de *Piper corcovadensis* sobre a germinação de *Lactuca sativa*. **Arrudes**, Recife, v. 1, nº 1, p. 19-22, 2015.
- AHMAD, F. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Piper porphyrophyllum* (Farm. Piperaceae). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, p. 1031-1033, 2014.
- AIRES, I. C. S.; LIMA, R. A. Potencial fungicida do extrato etanólico dos talos de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Candida albicans in vitro*. **REB**, v. 7, nº 1, p. 270-280, 2014.
- ALBIERO, A. L. M. *et al.* Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, nº 4, p. 550-554, 2005b.
- ALBIERO, A. L. M. *et al.* Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, nº 2, p. 305-312, 2005a.
- ALBIERO, A. L. M. *et al.* Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, nº 3, p. 379-391, 2006.
- ALI, A. *et al.* Impact of Storage Conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried *Piper betle* Extracts. **Molecules**, v. 23, p.84, 2018.
- ALVES, C. C. F. *et al.* Atividade alelopática de alcaloides glicosilados de *Solanum crinitum* Lam. **Floresta e Ambiente**, v. 10, nº 1, p. 93-97, 2003.
- ALVES, H. S. *et al.* Flavonoides de *Piper carniconnectivum* C.D.C. Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, ISSN- 0102-695X, v. 20, nº 2, p. 160-164, 2010.
- ALVES, M. C. S. *et al.* Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no crescimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, nº 11, p. 1083-1086, 2004.
- ANSELMO, J. A; LIMA, R.A. Identificação de classes de metabólitos secundários no extrato das folhas de *Solanum jamaicense* (Solanaceae) e seu potencial fungicida sobre *Candida albicans in vitro*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, REF - ISSN 1808 – 0804, v. 11, nº 1, p. 11-20, 2014.
- ANTUNES, R. M. P. *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, nº 4, p. 517-524, 2006.
- ARAÚJO-JÚNIOR, J. X. *et al.* Piperidine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, nº 3, p. 559-561, 1997.

BALDOQUI, D. C. *et al.* Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 32, nº 5, p. 1107-1109, 2009.

BALESTRIN, L. *et al.* Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, nº 2, p. 230-235, 2008.

BARNES, J. P; PUTNAM, A. R. Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L). **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, nº 4, p. 889-890, 1987.

BARREIRO, E. J; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para descoberta de fármacos. **Revista Química Nova**, v. 32, nº 3, p. 679 -688, 2009.

BARREIRO, E. J.; VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, nº 2, p. 326-337, 2006.

BAY-HURTADO, F. *et al.* Atividade Antioxidante e caracterização do óleo essencial das raízes de *Piper marginatum* Jacq. **Ciência e Natura**, Porto velho – RO, v. 38, nº 3, p. 1504-1511, 2016.

BEZERRA, D. P. *et al.* Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, nº 1, p. 1-8, 2007.

BEZERRA, D. P. *et al.* Sensitive method for determination of pipartine, an alkaloid amide from *Piper* species, in rat plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Química Nova**, v. 35, nº 3, p. 460-465, 2012.

BEZERRA, D. P. *et al.* Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from *Piper* species. **Zeitschrift für Naturforschung. Section C**, v. 60, p. 539–543, 2005.

BEZERRA, D. P. *et al.* Antitumour efficacy of *Piper tuberculatum* and pipartine based on the hollow fiber assay. **Planta Medica**, v.81, 15–19, 2015.

BORELLA, J. *et al.* Atividade alelopática de extratos aquosos de folhas de *Rollinia sylvatica* sobre a germinação e crescimento inicial do rabanete. **Revista Biociências, UNITAU**, v. 16, nº 2, p. 94-101, 2010.

BORELLA, J. *et al.* Respostas na germinação e no crescimento inicial de rabanete sob ação de extrato aquoso de *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, nº 2, p. 415-420, 2012.

BORELLA, J.; PASTORINI, L. H. Influência alelopática de *Phytolacca dioica* L. na germinação e crescimento inicial de tomate e picão-preto. **Biotemas**, v. 22, nº 3, p. 67-75, 2009.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.

BRAGA, T. V. *et al.* Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, nº 3, p. 287-290, 2007.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, volume 1.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ª ed. Brasília: Anvisa, 2010.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 33, nº. 1, p. 229-239, 2010.

BRAZ FILHO, R.; SOUZA, M. P.; MATTOS, M. E. O. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 345-346, 1981.

BRITISH Herbal Pharmacopeia. 1ª ed. British Herbal Medicine Association, Bournemouth, 107 p, 1990.

BRÚ, J.; GUZMAN, J. D. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, p. 767-779, 2016.

CÂNDIDO, A. C. S. *et al.* Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduíche. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, nº 3, p. 268-272, jul./set. 2010.

CARVALHO, S. M. F.; RIBEIRO, D. G. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* l.f. (Amaranthaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, nº 2, p. 377-390, 2005.

CARVALHO-OKANO, R. M.; ALVES, S. A. M. Piperaceae C. Agardh da estação experimental mata do paraíso, Viçosa, MG. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, nº 3, p. 497-513, 1998.

CASTAÑEDA, L. M. F. Antocininas: o que são? Onde estão? Como atuam?. **Seminário apresentado em 20/11/2009**, disciplina FIT 00001. 2009.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, nº 1, p. 99-105, 1998.

CHANG, C. *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHAVES, J.H. **Contribuição ao estudo químico de *Piper divaricatum* e *Schinus terebinthifolius*.** Dr.ª Otília Deusdência Loiola Pessoa. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Centro de Ciências/ Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CHEW, Y. L. *et al.* Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidante and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, 11:12, p. 1-10, 2011.

- CIPOLLINI, D. *et al.* Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. **Journal of Chemical Ecology**, March, 2008.
- COLLARES, C. F. O que quer dizer o F na análise de variância (ANOVA). **Blog do C. F. C.** 04 maio 2012. Disponível em: <<https://bit.ly/2XbG3Mh>>. Acesso em 28 nov. 2018.
- COTINGUIBA, F. *et al.* Proteomic profile of *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n° 1, p. 117-124, 2018.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n° 3, p. 241-256, 2009.
- CREMASCO, M. A.; BRAGA, N. P. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) para obtenção de isosafrol. **Acta Amazonica**, v. 40, n° 4, p. 737-740, 2010.
- CUNICO, M. M. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n° 2, p. 97-103, 2004.
- CUNICO, M. M. *et al.* Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, v. 29, n° 4, p. 746-749, 2006.
- DA SILVA MATOS, G. *et al.* Avaliação antibacteriana do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* sobre *Escherichia coli*. In: Congresso Brasileiro de Química, 56., 2016, Belém-PA. **Anais Eletrônicos** [...], Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química - ABQ, 2016, ref. 9332. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2016/trabalhos/7/9332-18150.html>>. Acesso em 17 Abr. 2019.
- DAKSHA, A. *et al.* Estimation of sterols content in edible oil and ghee samples. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Maharashtra – India, v. 5, n° 21, p. 135-137, 2010.
- DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris**. Série D **258**, p. 1338–1340, 1964.
- DELAPORTE, R.H. *et al.* Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n° 2, p. 133-136, 2005.
- DERE, S; GÜNES, T; SIVACI, R. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. **TR. Journal of botany**, v. 22, p. 13-17, 1998.
- DI STASI, L. C.; HURUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e mata atlântica**. 2ª edição revista ampliada. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DÔRES, R.G.R. **Análise morfológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth)**. Orientador: Dr. Vicente Wagner Dias Casali. 2007. 396 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.

DORNAS, W. V. *et al.* Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, nº3, p. 241-249, 2007.

DOUSSEAU, S. **Propagação, características fotossintéticas, estruturais, fitoquímicas e crescimento inicial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae)**. Orientador: Dr. Amauri Alves de Alvarenga. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, Brasil, 2009.

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

DYER, L.A; PALMER, A.D.N. **Piper: a model genus for studies phytochemistry, ecology, and evolution**. e-Book, Nova Iorque, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-0-387-30599-8.pdf>>. Acesso em 19 Out. 2018.

ELE, M. *et al.* A review on the pharmacological effects of vitexina and isovitexin. **Fitoterapia**, v. 115, p. 74-85, 2016.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ FILHO, R. Flavonoides de *Piper callosum* da Amazônia. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 23., 2000, Poços de Caldas – MG. **Anais Eletrônicos** [...], São Paulo: SBQ, 2000, ref. 0765/2. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/index.html>>. Acesso em 10 Nov. 2018.

FACUNDO, V. A. *et al.* Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazonica**, v. 38, nº 4, p. 733-742, 2008.

FELIPE, C. F. B. **Estudo dos efeitos comportamentais e neurobioquímicos da pipartina, alcaloide isolada de *Piper tuberculatum* Jacq., em camundongos**. Orientador: Dr.^a Glauce Socorro de Barros Viana. 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacognosia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2009.

FERREIRA, R. O. *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de flavonoides isolados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 39, nº 9, p. 1093-1097, 2016.

FIGUEIREDO, P. L. B. *et al.* Composição química e toxicidade preliminar dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de *Piper divaricatum* Meyer. In: Congresso Brasileiro de Química, 53., 2013, Rio de Janeiro-RJ. **Anais Eletrônicos** [...], Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química - ABQ, 2013, ref. 2997. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/7/2997-15622.html>>. Acesso em 31 jul. 2017.

FIRMO, W. C. A. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 18, nº especial, 2011.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

FOKOUÉ, H. H. **Síntese, atividades biológicas e estudo de relação estrutura-atividade de piperamidas**. Orientador: Dr. Massuo Jorge Kato. Coorientador: Dr. Marcus Tullius Scotti. 2014. 337 f. Tese (Doutorado em Química (Química Orgânica)) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo - SP, 2014.

FOLIN, O; DENIS, W. A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 22, nº 2, p. 305-308, 1915.

FORMAGIO, A. S. N. *et al.* Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, nº 4, p. 349-354, 2010.

GABOR, W. E.; VEATCH, C. Isolation of phytotoxin from quackgrass (*Agropyron repens*) rhizomes. **Weed Science**, v. 29, nº 2, p. 155-159, 1981.

GARCIA, A. R. M. **Distribuição e abundância de arbustos do gênero Piper (Piperaceae), na reserva florestal Adolpho Ducke – Manaus, Amazonas – Brasil**. Orientador: Dr. ^a Flávia Capelotto Costa. 2005. 50 f. Dissertação (Mestrado em Biologia (Ecologia)) – Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas – INPA, Manaus – AM, 2005.

GOGOSZ, A. M. *et al.* Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, nº 2, p. 405-417, 2012.

GOMAA, N. H. *et al.* Allelopathic effects of *Sonchus oleraceus* L. on the germination and seedling growth of crop and weed species. **Acta Botanica Brasilica**, v. 38, nº 3, p. 408-416, 2014.

GONELI, A. L. D. *et al.* Modelagem matemática e difusividade efetiva de folhas de aroeira durante a secagem. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, nº 1, p. 56-64, 2014.

GOTOR, A. A. *et al.* Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 525-530, 2007.

GU, C. *et al.* Preparation of Vitexina nanoparticles by combining the antisolvent precipitation and high pressure homogenization approaches followed by lyophilization for dissolution rate enhancement. **Molecules**, 22, 2038, p. 1-13, 2017.

GU, F. *et al.* Contribution of Polyphenol Oxidation, Chlorophyll and Vitamin C Degradation to the Blackening of *Piper nigrum* L. **Molecules**, 23, 370, p. 1-12, 2018 a.

GU, F. *et al.* Nontargeted Metabolomics for Phenolic and Polyhydroxy Compounds Profile of Pepper (*Piper nigrum* L.) Products Based on LC-MS/MS Analysis. **Molecules**, 23, 1985, 2018 b.

GUIMARÃES, E. F. *et al.* Piperaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: < <https://bit.ly/2Kf21rR>>. Acesso em 17 out. 2018.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, nº 84, p. 21-46, 2004.

GUZMAN, J. D.; BRÚ, J. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Barraquilla, Colômbia, v. 26, p. 767-779, 2016.

HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitetura de las hojas de dicotiledoneas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Buenos Aires, v. 16, n. 1-2, p. 1-26, 1974.

HIROTA, B. C. K. **Estudo fitoquímico e das propriedades biológicas de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae)**. Orientador: Dr. Obdúlio Gomes Miguel. Coorientadora: Dr.^a Marilis Dllarmi Miguel. 2011. 149 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2011. 1 imagem.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização de método para determinação de flavonoides e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Química Nova**, v. 31, nº 6, p. 1378-1384, 2008.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquarara, v. 19, nº 1, p. 97-108, 2008.

IWAZAKI, M. C.; OLIVEIRA, J. H. G.; SOUZA, L. A. Morfo-anatomia comparativa das estruturas de reprodução de *Piper arboreum* Aublet e *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). In: Reunião Anual da SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais Eletrônicos** [...], São Paulo: SBPC/UFSC, 2006. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra>>. Acesso em 01 Ago. 2017.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

KALEGARI, M. *et al.* Antibacterial, allelopathic and antioxidant activity of extracts and compounds from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Journal of applied Pharmaceutical Science**, Curitiba – PR, v. 2, nº 9, p. 061 – 066, 2012.

KLIEBENSTEIN, D.J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 675-684, 2004.

KLOSS, L.C. *et al.* Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae). **South American Journal of Basic Education, Technical and technological**, ISSN: 2446-4821, v. 3, nº 2, p. 118-128, 2016.

LEE, W. *et al.* Piperonaline from *Piper longum* Linn. induces ROS-mediated apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, p. 406–412, 2013.

LI, Z. H. *et al.* Phenolics and plants allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.

LIMA, J. S. *et al.* Potencial alelopático de *Piper aduncum* L., visando uso da espécie como bioherbicida. **Cadernos de Agroecologia**, Brasília, - DF, v. 13, nº 1, p. 1-6, jul. 2017.

LIMA, M. F. **Atividade antiedematogênica, antinociceptiva e toxicidade do extrato aquoso de *Piper callosum* Ruiz & Pavon (Piperaceae)**. Orientador: Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal do Oeste do Pará – Santarém-PA, 2015.

LIMA, R. A. *et al.* Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **C&D – Revista Eletrônica da Fainor**, Vitória da Conquista, v. 11, n. 2, p. 316-334, 2018.

LIMA, V. L. A. *et al.* Polpa congelada de acerola: efeito da temperatura sobre os teores de Antocianinas e flavonóis totais. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 669-670, 2002.

LORENSI, C. A. *et al.* Alelopatia de extratos vegetais na germinação e crescimento inicial do tomateiro. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 14, nº 25, p. 185-195, 2017.

LUSTOSA, F. L. F; OLIVEIRA, S. C. C; ROMEIRO, L. A. Efeito alelopático de extrato aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 849-851, 2007.

MACHADO, N. S. O. *et al.* Morfoanatomia das folhas de *Piper arboreum* Aubl. E *Piper tuberculatum* Jacq. **Iheringia**, Série Botânica, v. 72, nº 1, p. 106-113, 2017.

MACÍAS, F. A. *et al.* **Allelopathy : chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press, 2005.

MACIEL, A. A. *et al.* Anatomia comparada de folhas de pimenta longa (*Piper hispidivervum* C. DC.) e pimenta de macaco (*Piper aduncum* L) cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*. **Biotemas**, v. 27, nº 4, p. 11-19, 2014.

MAHMOOD, Z. A. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, nº 1, p. 461 – 468, 2014.

MALDOVAN, C. *et al.* Influence of chlorophyll content from onion (*Allium cepa*) after selenium and zinc adding. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 15, nº 3, p. 437-440, 2009.

MARINHO, C. R.; ZACARO, A. A; VENTRELLA, M. C. Secretory cells in *Piper umbellatum* (Piperaceae) leaves: a new example for the development of idioblasts. **Flora**, v. 206, p. 1052-1062, 2011.

MARMIT, D. J. *et al.* Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Revista Saúde Pública**, Florianópolis - SC, v. 8, nº 2, p. 135-152, 2015.

- MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948.
- MEIRELLES, E. N. **Influência os metabólitos secundários de *Piper divaricatum* da região amazônica no controle de *Fusarium solani* f. sp. *Pipers* causador da fusariose em pimenta do reino**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará – Belém, 2014.
- MENDIBURU, F. Package ‘*agricolae*’, **Statistical Procedures for Agricultural Research**. R package version 1.2-8, 2017.
- MESQUITA, J. M. O. *et al.* Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, nº 1, p. 6-12, 2005.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. 1965. **Anatomy of the dicotyledons: leaves stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press.1500 p.
- MGBEAHURUIKE, E. E. *et al.* Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69, 2017.
- MGBEAHURUIKE, E. E. *et al.* An ethnobotanical survey and antifungal activity of *Piper guineense* used for the treatment of fungal infections in West-African traditional medicine. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v. 229, p. 157-166, 2019.
- MOBOT. **Tropicos.org. Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/42000020?tab=maps>>. Acesso em 17 Out. 2018. 1 imagem, color.
- MORAIS, N. R. L. *et al.* Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Cnidocolus phyllacanthus* (müll. Arg.) Pax & k.hoffm. Oriundo de apodi – RN. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v. 18, n. 1, p. 180-185, 2016.
- MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 457-500, 2002.
- MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. A chromenum from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v. 48, nº 6, p. 1075-1077, 1998.
- MOURA, G. S. *et al.* Potencial alelopático do óleo essencial de plantas medicinais sobre a germinação e desenvolvimento inicial de picão-preto e pimentão. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n.2, p. 51-62, 2013.
- MOURÃO JÚNIOR, M.; SOUZA FILHO, A. P. S. Diferenças no padrão da atividade alelopática em espécies da família Leguminosae. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 28, nº especial, p. 939-951, 2010.
- NAKAMURA, A. T. *et al.* Origin of the subepidermal tissue in *Piper* L. leaves. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, nº 2, p. 368-371, 2015.

- NASCIMENTO, K. M. **Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Piper* frente a cepas de *Candida* SPP.** Orientador: Dr.^a Selene Maia de Moraes. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.
- NAVICKIENE, H. M. D. *et al.* Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n° 3, p. 467-470, 2006.
- NAVICKIENE, H. M. D. *et al.* Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 14, p. 281-284, 2003.
- NISHIDA, N. *et al.* Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n° 5, p. 1187-1203, 2005.
- NOGUEIRA, S. R. P. **Coletânea de fotografias dos objetos de análise: *P. tuberculatum* e plântulas de alface e cebola.** 2017-2019. 20 imagens ou fotografias, color.
- NOGUEIRA, S. R. P. **Coletânea de tabelas dos objetos de análise: *P. tuberculatum*.** 2018-2019. 6 Tabelas.
- NUNES, J. D. *et al.* Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n° 7, p. 1049-1052, 2007.
- NUNES, J. S. **Sistema de eluição em gradiente: metanol (fase A) e solução de ácido fosfórico 1% (fase B).** 2019. 1 imagem, color.
- O'BRIEN, T. P.; MCCYLLY, M. E. **'The study of plant structure: principles and selected methods'**. Termarcarphi PTY. LTD: Melbourne, 1981.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protop**, v. 59, p. 368–373, 1964.
- OKSANEN, J. *et al.* **Vegan: Community Ecology Package.** R package version 2.0-10, 2013.
- OLIVEIRA, A. K. M. *et al.* Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 41 – 47, 2014.
- OLIVEIRA, F. A. S. *et al.* Antiplasmodial and antileishmanial activities of compounds from *Piper tuberculatum* Jacq. fruits. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n° 3, p. 382-386, 2018.
- OLIVEIRA, K. A. M. *et al.* Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semana: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n° 2, p. 211-222, 2012.

ORLANDA, J. F. F.; VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorblaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n° 4, su pl. L, p. 730-736, 2015.

OSTROSKY, E. A. 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.

PAULA, C. S. **Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de *Bauhinia unguolata* L., Fabaceae**. Orientadora: Dr.^a Marilis D. Miguel. Coorientador: Dr. Obdúlio G. Miguel. 2014. 229 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná – Curitiba-PR, 2014a.

PAULA, C. S. *et al.* Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n° 2, p. 189-195, 2014b.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. 4^a ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1980.

PEREIRA, V. B. *et al.* Descrição anatômica do limbo foliar de *Piper aduncum* L. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. S3860-S3864, 2008.

PESSINI, G. L.; ALBIERO, A. L. M.; MOURÃO, K. S. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G. Análise Farmacognóstica de *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck: Aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. **Latim American Journal Pharmacy**, v. 22, n° 3, p. 209-216, 2003.

PINTO, D. S. **Estudo fitoquímico de Piperaceas do Norte e Nordeste brasileiro: *Piper lateripilosum* Yuncker, *Piper mollicomum* Kunth e *Piper montealegreanum* Yuncker**. Orientadora: Dr.^a Maria Célia de Oliveira Chaves. Coorientador: Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha. 2012. 298 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Área de concentração Farmacoquímica) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2012.

PINTO, E. G.; LANA, A. J. D.; LIMA, R. A. Estudo fitoquímico do extrato etanólico e *Piper tuberculatum* Jacq. sobre cepas de *Escherichia coli* in vitro. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technoloical**, v. 3, n° 2, p. 27-36, 2016.

PINTON, L. P. Produção de mudas de *Piper aduncum* L. em diferentes condições de luz, substratos e procedências. Orientadora: Dr.^a Maria de Fátima Barbosa Coelho. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Faculdade de Agronomia e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, 2016.

POTZERNHEIM, M. C. L. *et al.* Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 25-31, 2012.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

- PUKCLAI, P.; KATO-NOGUCHI, H. Allelopathic activity of *Piper sarmentosum* Roxb. **Asian Journal of Plant Sciences**, p. 1- 6, 2011.
- PUTNAM, A. R. Allelochemicals from plants as herbicides. **Weed Technology**, v. 2, p. 510-518, 1988.
- QUEIROZ, G. A.; GUIMARÃES, E. F.; BARROS, A. A. M. O gênero *Pereromia* Ruiz & Pav. (Piperaceae) na Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, Rio de Janeiro, v. 1, n° 2, p. 5-14, 2014.
- QUÍLEZ, A. *et al.* Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*helicocacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 583-589, 2010.
- R DEVELOPMENT core team. 2016. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org> . Acesso em 13 out. 2018.
- RAJUDIN, E. *et al.* Chemical constituents from tiger's betel, *Piper porphyrophyllum* N. E. Br. (Fam. Piperaceae). **Natural Product Research**, v. 24, issue ° 4, p. 387-390, 2010.
- RAMOS, C. S. *et al.* Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. **Química Nova**, v. 35, n° 9, p. 1806-1808, 2012.
- RAMOS, J. S. **Respostas alelopáticas de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae) em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.)**. Orientadora: Fernanda Regis Leone. 2016. 12 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Estudos Superiores de Tefé – Universidade do Estado do Amazonas, Tefé-AM, 2016.
- REGASINI, L. O. *et al.* Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n ° 6, p. 900-903, 2008.
- RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* **Handbook of Enology**. (2nd ed.). Chinchester: John Wiley & Sons Ltd, 2006.
- ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v.6, p. 33–36, 1972.
- ROVANI, G. T. *et al.* Ivestigação fitoquímica e antioxidante de partes vegetativas de *Piper amalago* L. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v. 2, p. 164-177, 2013. 1 imagem.
- ROYAL BOTANIC GARDENS KEW SCIENCE. ***P. tuberculatum*: distribuição**. Disponível em: <<https://bit.ly/2F5tnw4>>. Acesso em: 20 abr. 2019. 1 imagem, color.
- RUKACHAISIRIKUL, T. *et al.* Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. **Planta Medica**, v. 68, p.853–855, 2002.

- RUSCHEL, D. **O gênero *Piper* (Piperaceae) no Rio Grande do Sul**. Orientador: Dr. Jore Luiz Waechter. 2004. 144f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2004.
- SALATINO, A.; SILVA, J. B. Anatomia e óleo essencial das folhas de *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. var. *regnelli*. **Bol. Botânica, Univ. S. Paulo**, v. 3, p. 95-106, 1975.
- SALES, V. S. *et al.* Modulação *in vitro* da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *P. tuberculatum* Jacq. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, nº 1, 2017.
- SALVAGNINI, L. E. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, nº 2, p. 241-244, 2008.
- SANDIM, T. A. **Análise fitoquímica e avaliação do efeito antioxidante do extrato metanólico das flores de *Alternanthera paronichioides***. Orientador: Dr. Cristiano Marcelo Espinola de Carvalho. Coorientadora: Dr.^a Mami Yano. 2014. 58 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS, 2014.
- SANTORE, T. **Atividade alelopática de extratos de plantas medicinais sobre a germinação de corda-de-viola (*Ipomoea nil* (L.) Roth.)**. Orientadora: Dr.^a Patrícia da Costa Zonetti. 2013. 28f. Monografia (Graduação em Tecnologia em Biotecnologia) – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2013.
- SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M.M.F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, nº 3, p. 29-35, 2017.
- SANTOS, F. P. *et al.* Flavonoides de *Piper glandulosissimum* Yunker (Piperaceae). **Química Nova**, v. 38, nº 2, p. 1672 – 177, 2015.
- SANTOS, M. S. *et al.* Análise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de *Piper amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, p. 65-71, 2010.
- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, nº especial, p. 64-70, 2004.
- SANTOS, S. *et al.* Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. **Eclética Química**, v. 36, nº 2, p. 51-68, 2011.
- SANTOS, V. L. P. *et al.* Anatomy and microscopy of *Piper caldense*, a folk medicinal plant from Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.28, p. 9-15, 2018.
- SANTOS, V. L. P. *et al.* Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 85-91, 2015.
- SANTOSH, M. K. *et al.* RP-HPLC method for determination of Piperine from *Piper longum* Linn. And *Piper nigrum* Linn. **E-Journal of Chemistry**, v. 2, nº 2, p. 131-135, 2005.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. Dress, Ames: Iowa Stat College, 1951. 228 p.

SCOTT, I. M. *et al.* Analysis of Piperaceae germoplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, nº 6, p. 1907-1913, 2005.

SEQUEDA-CASTAÑEDA, L.G. *et al.* *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae): phytochemical, therapeutic, botanical insecticidal and phytosanitary uses. **Pharmacology online**, v. 3, p. 136-145, 2015.

SILVA, C. B. *et al.* Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* LAM (Araliaceae). **Química Nova**, v. 32, nº 9, p. 2373-2376, 2009.

SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, nº 2, p. 143-145, 2007.

SILVA, J. A. *et al.* Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Campinas, v. 16, nº 3, supl, p. 700-706, 2014.

SILVA, J. K. R. *et al.* Essencial oil composition, antioxidante capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. **Natural Product Communications**, v. 5, nº 3, p. 477-480, 2010.

SILVA, M. L. C. *et al.* Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semana : Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, nº 3, p. 669-683, 2010.

SILVA, P. S. S. Atuação dos aleloquímicos no organismo vegetal e formas de utilização da alelopatia na agronomia. **Biotemas**, v. 25, nº 3, p. 65-74, 2012.

SILVA, R. V. *et al.* Antigunal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.

SILVA, R. J. F. *et al.* Caracterização farmacognóstica de *Piper arboreum* var. *arboreum* e *P. tuberculatum* (Piperaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, nº 2, p. 195-206, 2016.

SILVA, R. J. F. *et al.* Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: valuable assessment for its quality control. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 20-33, 2017.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; MENDONÇA, M. S. Rosetas e concrecências cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v. 44, nº 4, p. 435-446, 2014.

SILVA, R. Z. **Estudo fitoquímico e biológico da *Piper solmsianum* C. DC. variedade *solmsianum* (Piperaceae)**. Orientador: Dr. Rosendo Augusto Yunes. Coorientadora: Dr^a. Vilma Edith. F. Heintz. 2006. 252 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2006.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição, Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOBREIRA, P. H. M.; HERNANDEZ, A. E. F.; SOUZA, A. C. R. Inventário das espécies de Piperaceae ocorrentes em três áreas de Porto Velho – RO e caracterização dos óleos essenciais de *Piper tuberculatum* Jacq. Com potencial ação de controle de fitopatógenos. **Saber Científico**, v. 6, n° 1, p. 20-26, 2017.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n° 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA FILHO, A.P.S. *et al.* Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervium* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazonica**, v. 39, n° 2, p. 389-396, 2009.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; OLIVEIRA, J. H. G. Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii* C. DC., *Ottonia martiana* Miq. And *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae). **Gayana Botanica**, v. 6. n° 1, p. 6-17, 2004.

SOUZA, L.A. *et al.* Estudo Morfoanatômico da Folha e do Caule de *Piper arboreum* Aubl. (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy** . v. 28, p. 103-107. 2009.

SOUZA, S. Planta da Amazônia é testada no combate ao mosquito *Aedes aegypti*. **Embrapa**, 2017. Disponível em: <<https://bit.ly/2WyWL3X>>. Acesso em 03 abr. 2019.

STREIT, N. M. *et al.* As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n° 3, p. 748-755, 2005.

TANG, G. *et al.* Cytotoxic amide alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. **Journal of Natural Products**, v.74, p.45–49, 2010.

TILLEQUIN, F. *et al.* Flavonoides de *Piper marginatum*. **Planta Medica**, v. 22, p. 46-52, 1978.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm**, v. 15, n° 1, p. 115 – 121, Florianópolis, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSAI, I. L. *et al.* New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. **Planta Medica**, v.71, p. 535–542, 2005.

UPADHYAY, V. *et al.* Development and validation of rapid RP-HPLC method for estimation of Piperinam in *Piper nigrum* L. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 1, n° 4, p. 6-9, 2013.

VASCO, A. *et al.* Preparation of samples for leaf architecture studies, a method for mounting cleared leaves. **Applications in Plant Sciences**. V. 9, p. 1–4, 2014.

VIZZOTO, M; KROLOW, A.C; WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas-RS, 2010.

WANDSCHEER, A. C. D; PASTORINI, L.H. Interferência alelopática de *Raphanus raphanistrum* L. sobre a germinação de *Lactuca sativa* L. e *Solanum lycopersicon* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, nº 4, p. 949-953, 2008.

WANG, Y. *et al.* Anticancer principles from medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo) plants. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 4, nº 1, p. 8-16, 2014.

ZARAI, Z. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, p. 634-641, 2013.