



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
– REDE BIONORTE

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *Piper permucronatum* NO CONTROLE
DE FITOPATÓGENOS E SOBRE A FUNCIONALIDADE DE
NEUTRÓFILOS HUMANOS**

JESSICA SILVA FELIX BASTOS FREIRE

Porto Velho-RO

2023

JESSICA SILVA FELIX BASTOS FREIRE

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *Piper permucronatum* NO CONTROLE
DE FITOPATÓGENOS E FUNCIONALIDADE DE NEUTRÓFILOS
HUMANOS**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Dra. Juliana Pavan Zuliani

Coorientador: Dr. José Roberto Vieira Junior

Porto Velho-RO

11/2023

Catálogo da Publicação de Tese
Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz

Bastos-Freire, Jessica Silva Felix.

Avaliação de extratos de *Piper permucronatum* no controle de fitopatógenos e funcionalidade de neutrófilos humanos/ Jessica Silva Felix Bastos Freire – Porto Velho, 2023

100f.

Orientadora: Prof^a Dra. Juliana Pavan Zuliani

Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Vieira Junior

Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia(Bionorte).
Fundação Oswaldo Cruz.

JESSICA SILVA FELIX BASTOS FREIRE

AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE *Piper permucronatum* NO CONTROLE DE FITOPATÓGENOS E FUNCIONALIDADE DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Rondônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 24/11/2023

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente



JULIANA PAVAN ZULIANI TRENCH DE SOUZA

Data: 24/01/2024 18:24:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Juliana Pavan Zulini (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz -Rondônia

Documento assinado digitalmente



RODRIGO BARROS ROCHA

Data: 25/01/2024 10:58:46-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Barros Rocha
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Rondônia

Documento assinado digitalmente



RENATO ABREU LIMA

Data: 25/01/2024 17:09:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Renato Abreu Lima
Universidade Federal do Amazonas -UFAM

Documento assinado digitalmente



VICTOR MOUZINHO SPINELLI

Data: 25/01/2024 11:41:00-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Victor Mouzinho Spinelli
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Rondônia

Documento assinado digitalmente



MINELLY AZEVEDO DA SILVA

Data: 25/01/2024 12:26:48-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dra. Minelly Azevedo da Silva
Instituto Federal de Rondônia -IFRO

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, Jessica Silva Felix Bastos Freire, (X) autorizo () não autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “**Avaliação de extratos de *Piper permucronatum* no controle de fitopatógenos e funcionalidade de neutrófilos humanos**”, no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

Porto Velho, 08 de novembro de 2023

Documento assinado digitalmente
 JESSICA SILVA FELIX BASTOS FREIRE
Data: 08/11/2023 17:42:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jessica Silva Felix Bastos Freire

CPF 005.125.882-01

RG:1702969

DEDICATÓRIA

A Deus, “Porque dEle, e por Ele são todas as coisas” (Romanos 11:36).

"Aos meus avós, Dona Maria e Sr. Geraldo que não puderam estudar, pelo amor genuíno e que com tão pouco fizeram tanto pela família, em especial a minha avó, mulher preta, que me inspira pela força e inteligência, e me ensina a ser resistência.”

"Aos meus pais, Zilda e Pedro, que apesar de terem estudado apenas até a 4ª e 8ª série, respectivamente, aprenderam que educação muda o mundo, que estudar é valioso, e ensinaram isso a mim e a minha irmã. Meus primeiros professores. Minha admiração pra sempre”

Ao meu esposo, familiares, amigos e professores.

Dedico com amor

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, e não me abandonar em momentos em que era só eu e Ele, “A Ti toda honra e toda glória”.

A minha mãe Zilda e meu pai Pedro, por me ensinarem valores que levarei para toda a vida, e por sempre acreditarem em mim; amo vocês.

A minha irmã Bruna, pelo incentivo, companheirismo e amizade;

Aos meus sobrinhos Maria Eduarda, Davi Lucas e Maria Fernanda por me encherem de carinho e amor da forma mais pura que já conheci;

Ao meu esposo Thiago Freire pelo apoio e incentivo que ainda não sei como agradecer. Ter você ao meu lado foi crucial para concluir essa etapa. Eu te Amo.

A minha orientadora Dra. Juliana Zuliani, por me aceitar novamente em seu grupo de pesquisa, por me apresentar a pesquisa quando eu ainda era uma aluna “desastrada” de iniciação científica. Seu amor, dedicação e trabalho árduo pela pesquisa é inspirador.

Ao meu co-orientador Dr. José Roberto por me orientar nessa jornada, por contribuir com esse trabalho de uma forma genial, e por acreditar no meu trabalho;

Aos professores Dr. Cleberson Fernandes e Dr. Rodrigo Barros pela disponibilidade em sempre poder contribuir com esse trabalho, pela paciência e por sempre ajudar nos momentos em que precisei.

Ao senhor Domingos (*in memoriam*) por me ensinar as técnicas de isolamento de uma maneira tão gentil que jamais vou esquecer.

Ao senhor Miranda pelo apoio, e grande ajuda nos cultivos em casa de vegetação;

A minha amiga Aline Souza, pelo companheirismo, amizade, incentivo e lealdade. Que a nossa amizade dure para sempre.

A equipe do laboratório de Fitopatologia da Embrapa Rondônia: Tamiris, Simone, Karen, Vaneide, Renata e Francisco, pela ajuda nos trabalhos, conversas e incentivo.

A equipe do laboratório de Imunologia Celular Aplicada a Saúde da Fiocruz Rondônia: Nery, Sula, Cristina, Valdisson, Ortência, Jéssica, Charles, Mauro, Yoda, Alex, Milena, Hallisson, pela ajuda e colaboração nos trabalhos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária–CPAFRO e a Fundação Oswaldo Cruz pela oportunidade de estágio e pelo suporte físico e material no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde – CEBio, em especial a professora Dra. Geisa e ao Anderson por se disponibilizarem em ajudar a caracterizar os extratos e no processo de secagem das amostras.

Ao Programa de Pós- Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte (PPG-BIONORTE).

Aos professores da rede Bionorte pela dedicação ao programa e ensinamentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia – Fapero, pela concessão de recursos que permitiram a realização dessa pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

“No caminho da sabedoria, te ensinei e, pelas
carreiras direitas, te fiz andar. Por elas andando,
não se embaraçarão os teus passos; e se correres,
não tropeçarás”

(Provérbios 4:11-12)

BASTOS-FREIRE, Jessica Silva Felix. **Avaliação de extratos de *Piper permucronatum* no controle de fitopatógenos e funcionalidade de neutrófilos humanos**. 2023. 96f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, 2023.

RESUMO

O Brasil está entre os maiores produtores agrícolas do mundo, entretanto a produção do país tende a ser limitada pela ocorrência de doenças que acometem as lavouras. Esse fato tem impulsionado o uso indiscriminado de agrotóxicos no país, que é o maior consumidor desses produtos no mundo, embora sejam considerados eficientes, esses produtos podem desencadear resistência de microrganismos além de ocasionar sérios danos para o meio ambiente e para a saúde humana. Extratos vegetais, com potencial microbida, se destacam como um método alternativo no controle de fitopatógenos, nessa perspectiva, extratos de espécies do gênero *Piper* são alvo de pesquisas no controle microrganismos. O objetivo deste trabalho foi realizar a triagem fitoquímica e avaliar o potencial de extratos da espécie *Piper permucronatum* e suas frações, no controle dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e das bactérias *Xanthomonas axonopodis* pathovar vesicatoria e *Ralstonia pseudosolanacearum*, e identificar o perfil citotóxico dos extratos utilizando as seguintes funcionalidades dos neutrófilos humanos: viabilidade celular e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Para isso foram preparados extratos aquosos e alcoólicos (50 mg/ml extrato bruto) a partir das folhas, talos e inflorescências da planta, e frações orgânicas, básicas e aquosas de cada extrato, a partir do fracionamento líquido-líquido, totalizando 15 tratamentos. A triagem fitoquímica identificou ausência e presença de nove classes de metabólitos secundários, dentre as quais Cumarinas e Alcaloides foram identificadas nos extratos das três partes da planta estudada. As atividades, antifúngica e antibacteriana, foram testadas por meio de ensaios de antibiograma, onde os extratos foram depositados em meio de cultura BDA para fungos e incorporados ao meio Kado e Heskett para bactérias, nos quais mediram-se os halos de inibição formados. Em ambos os antibiogramas, os extratos alcoólicos provenientes da espécie *P. permucronatum* apresentaram eficiência em inibir o crescimento dos patógenos, Entre as frações obtidas a partir do fracionamento líquido-líquido, as 1ª frações (fase orgânica) de folhas, talos e inflorescências apresentaram halos de inibição no controle dos fungos e bactérias de interesse desse estudo. Destacaram-se de maneira promissora dos demais tratamentos o extrato alcoólico e a 1ª fração provenientes dos talos da planta, que apresentaram médias significativas de inibição tanto para os fungos como para as bactérias. Os extratos e frações de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* não apresentaram toxicidade sobre os neutrófilos humanos e foram capazes de

estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos, sugerindo que os extratos e de *P. permucronatum* não interferem na viabilidade de neutrófilos humanos. Os resultados obtidos nesse estudo indicam o potencial dos extratos da espécie *P. permucronatum*, fonte de moléculas bioativas com potencial contra fungos e bactérias fitopatogênicos, podendo após pesquisas adicionais, torna-se uma estratégia de controle desses microrganismos, que apresente menor impacto à saúde humana quando comparados aos agrotóxicos convencionais.

Palavras-chave: Fitopatógenos; Gênero *Piper*; Extratos vegetais; Sistema imunológico; Neutrófilos.

BASTOS-FREIRE, Jessica Silva Felix. **Evolution of *Piper permucronatum* extracts in the control of phytopathogens and functionality of human neutrophils.** 2023. 96f. Thesis (Doctoral Degree in Biodiversity and Biotechnology) – Federal University of Rondônia, Porto Velho, RO, 2023.

ABSTRACT

Brazil is among the largest agricultural producers in the world, however the country's production tends to be limited by the occurrence of diseases that affect crops. This fact has boosted the indiscriminate use of pesticides in the country, which is the largest consumer of these products in the world, although they are considered efficient, these products can trigger resistance of microorganisms in addition to causing serious damage to the environment and human health. Plant extracts with microbicidal potential stand out as an alternative method in the control of phytopathogens, in this perspective extracts of species of the genus *Piper* are the target of research in the control of microorganisms. The objective of this work was to carry out phytochemical screening and evaluate the potential of extracts of the species *P. permucronatum* and its fractions in controlling the fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* and the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pathovar vesicatoria and *Ralstonia pseudosolanacearum*, and to identify the cytotoxic profile of the extracts using the following functionalities of human neutrophils: cell viability and the production of reactive oxygen species. For this, aqueous and alcoholic extracts (50mg/ml crude extract) were prepared from the leaves, stems and inflorescences of the plant, and organic, basic and aqueous fractions of each extract, from liquid-liquid fractionation, totaling 15 treatments. The phytochemical screening identified the absence and presence of nine classes of secondary metabolites, among which Coumarins and Alkaloids were identified in the extracts of the three parts of the studied plant. The antifungal and antibacterial activities were tested by means of antibiogram assays, where the extracts were deposited in BDA culture medium for fungi and incorporated into Kado and Heskett medium for bacteria, in which the inhibition halos formed were measured. In both antibiograms, alcoholic extracts from the species *P. permucronatum* showed efficiency in inhibiting the growth of pathogens. Among the fractions obtained from the liquid-liquid fractionation, the 1st fractions (organic phase) of leaves, stems and inflorescences showed inhibition halos in the control of fungi and bacteria of interest in this study. The alcoholic extract and the 1st fraction from the plant stems stood out in a promising way from the other treatments, which showed significant means of inhibition for both fungi and bacteria. The extracts of leaves, stems and inflorescences of *P. permucronatum* showed no toxicity on human neutrophils. The extracts were also able to stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) in neutrophils,

suggesting that *P. permucronatum* extracts do not interfere with the viability of human neutrophils. The results obtained in this study indicate the potential of extracts from the species *P. permucronatum*, a source of bioactive molecules with potential against phytopathogenic fungi and bacteria, which, after additional research, could become a control strategy for these microorganisms, which has less impact on human health. when compared to conventional pesticides.

Keywords: Phytopathogens; Genus *Piper*; Plant extracts; Immune system; Neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica mundial das Piperaceae.....	31
Figura 2 - Esquema do fracionamento líquido-líquido.....	37
Figura 3 - Placa de Petri com fungo <i>R. solani</i> e halos de inibição.....	47
Figura 4 - Curva de correlação entre a dose dos extratos de <i>P. permucronatum</i> e inibição do fungo <i>R. solani</i>	50
Figura 5 - Curva de correlação entre a dose dos extratos de <i>P. permucronatum</i> e inibição do fungo <i>S. rolfsii</i>	51
Figura 6 - Placa de Petri com a bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> e halos de inibição.....	52
Figura 7 - Curva de correlação entre a dose dos extratos de <i>P. permucronatum</i> e inibição da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	55
Figura 8 - Curva de correlação entre a dose dos extratos de <i>P. permucronatum</i> e inibição da bactéria <i>R. pseudosolanacearum</i>	56
Figura 9 - Efeito dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a viabilidade de neutrófilos no tempo de incubação de 12 h.....	57
Figura 10 - Efeito dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a viabilidade de neutrófilos no tempo de incubação de 24 h.....	58
Figura 11 - Efeito das 1ª Frações dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a viabilidade de neutrófilos no tempo de incubação de 12h.....	59
Figura 12 - Efeito das 1ª frações dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a viabilidade de neutrófilos no tempo de incubação de 24h.....	60
Figura 13 - Efeito dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a produção de ROS em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 30 minutos.....	61
Figura 14 - Efeito dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a produção de ROS em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 90 minutos.....	62
Figura 15 - Efeito das 1ª frações dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a produção de ROS em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 30 minutos.....	63
Figura 16 - Efeito das 1ª frações dos extratos de <i>P. permucronatum</i> sobre a produção de ROS em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 90 minutos.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Extratos produzidos para testes a partir de partes da planta <i>P. permucronatum</i>	44
Tabela 2 - Triagem fitoquímica para os extratos de folhas de <i>P. permucronatum</i>	45
Tabela 3: Triagem fitoquímica para os extratos de talos de <i>P. permucronatum</i>	46
Tabela 4: Triagem fitoquímica para os extratos de inflorescências de <i>P. permucronatum</i>	46
Tabela 5: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de <i>P. permucronatum</i> no controle do fungo <i>R. solani</i>	48
Tabela 6: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de <i>P. permucronatum</i> no controle do fungo <i>S. rolfsii</i>	49
Tabela 7: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de <i>P. permucronatum</i> no controle da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	53
Tabela 8: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de <i>P. permucronatum</i> no controle da bactéria <i>R. pseudosolanacearum</i>	54

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°C: Graus Celsius

μM: Micromolar

μL: Microlitro

ANOVA: Análise de Variância

BDA: Meio Agar Batata Dextrose

B.O.D. : Demanda Bioquímica de Oxigênio

C₆H₁₂O₆: Glicose

CAAE: Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CEPEM: Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

CIM: Concentração inibitória mínima

CO₂: Dióxido de Carbono

DCFDA: 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína

DMSO : Dimetil sulfóxido

DO: Densidade óptica

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

h: Hora

HBBS: Solução de sais balanceados de Hank's

KCl: Cloreto de potássio

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico

LED: Light Emission Diode

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de magnésio

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: milimolar

MTT: Brometo Tiazolil azul de Tetrazólio

Na₂HPO₄: Fosfato dissódico

NaCl: Cloreto de sódio

NaHCO₃: Bicabornato de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NH₄OH: Hidróxido de Amônio

nm: Nanômetro

pH: potencial hidrogeniônico

PMA: Acetato de Forbol miristato

PMNs: Granulócitos polimorfonucleares

PpFo1^aorg: 1^a Fração do extrato das folhas – fase orgânica

PpFo2^abas: 2^a Fração do extrato das folhas - fase básica

PpFo3^aaq: 3^a Fração do extrato das folhas – fase aquosa

PpFoAl: Extrato Alcoólico das Folhas

PpFoAq: Extrato Aquoso das folhas

PpIn1^aorg: 1^a Fração do extrato das Inflorescências – fase orgânica

PpIn2^abas: 2^a Fração do extrato das Inflorescências - fase básica

PpIn3^aaq: 3^a Fração do extrato das Inflorescências – fase aquosa

PpInfAl: Extrato Alcoólico das Inflorescências

PpInfAq: Extrato Aquoso das Inflorescências

PpTa1^aorg: 1^a Fração do extrato dos Talos – fase orgânica

PpTa2^abas: 2^a Fração do extrato dos Talos - fase básica

PpTa3^aaq: 3^a Fração do extrato dos Talos – fase aquosa

PpTaAl: Extrato Alcoólico dos Talos

PpTaAq: Extrato Aquoso dos Talos

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RPM: Rotação por minuto

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético

UFC: Unidade Formadora de colônias

UV: Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS.....	20
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	20
1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 AGRICULTURA NO BRASIL.....	21
2.1.1 CULTIVO DE FEIJÃO.....	22
2.1.2 CULTIVO DE TOMATE.....	23
2.2 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS	25
2.3 SISTEMA IMUNOLOGICO – NEUTRÓFILOS.....	26
2.4. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS.....	29
2.5 FAMÍLIA PIPERACEAE E GÊNERO <i>Piper</i>	30
2.5.1 <i>Piper permucronatum</i>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 LOCAL DE ENSIOS.....	35
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS.....	35
3.3 FRACIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS EXTRATOS.....	35
3.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE <i>P. permucronatum</i>	37
3.4.1 DETECÇÃO DE SAPONINAS.....	37
3.4.2 DETECÇÃO DE FLAVONOIDES.....	37
3.4.3 REAÇÃO DE CLORETO FÉRRICO (DETECÇÃO DE TANINOS)	38
3.4.4 DETECÇÃO DE CUMARINAS.....	38
3.4.5 REAÇÃO DE SALKOWSKI (DETECÇÃO DE TRITERPENOS)	38
3.4.6 DETECÇÃO DE ALCALOIDES.....	38
3.4.7 DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	38
3.4.8 DETECÇÃO DE ANTRACNONONA.....	39
3.5 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	39
3.6 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS.....	39
3.7 ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA FÚNGICO.....	40
3.8 ANTIBIOGRAMA BACTERIANO.....	40
3.9 DILUIÇÃO SERIADA.....	41
3.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
3.11 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM NEUTRÓFILOS.....	42
3.11.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA.....	42
3.11.2 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS.....	42
3.11.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT.....	42
3.11.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>P. permucronatum</i>	44
4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE <i>P. permucronatum</i>	45
4.3 ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA FÚNGICO.....	46
4.3.1 TESTES FÚNGICOS COM EXTRATOS DILUÍDOS.....	49
4.4 ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA BACTERIANO.....	51
4.4.1 TESTES BACTERIANOS COM EXTRATOS DILUÍDOS.....	54
4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM NEUTRÓFILOS.....	56
4.5.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT.....	56
4.5.2 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)	60

5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	99

1. INTRODUÇÃO

Agricultura é a atividade socioeconômica responsável pela produção de alimentos, que ocupa ao longo da história da humanidade terras férteis dos vales de rios, e que com o avanço das tecnologias passou a ocupar novas áreas a partir de técnicas que tornaram os solos mais produtivos (Lima *et al.*, 2019). Sendo assim, a agricultura é a responsável por gerar alimento para toda a população mundial.

As mudanças climáticas e o aumento significativo da população mundial configuram um desafio para a produção agrícola global (Bernardo *et al.*, 2019). Nesse cenário o Brasil se destaca como um importante produtor agropecuário, responsável por fornecer uma extensa variedade de alimentos e insumos para distintos setores de atividade econômica no mercado nacional e internacional (Araújo; Vieira Filho, 2018).

Apesar da importância da agricultura, Araújo e Oliveira (2017) afirmam que esse aumento da produtividade agrícola do Brasil e do mundo, associado às monoculturas e ao agronegócio de exportação, tem sido responsável por inúmeros impactos socioambientais e à saúde pública, dentre eles destaca-se o uso constante de agroquímicos, em especial agrotóxicos. Entende-se por agroquímicos: os sanitizantes, desinfetantes e caldas, já os agrotóxicos são representados pelos: fungicidas, inseticidas, ascaricidas, feromônios e reguladores de crescimento (EMBRAPA, 2020).

A extensa área de plantio do Brasil, em paralelo a constante incidência de doenças causadas por agentes fitopatogênicos elevou o país ao posto de maior mercado mundial consumidor de agrotóxicos do mundo desde 2008 (ABRASCO, 2012; Pignati *et al.*, 2017). Presentes no mercado de diferentes formas de aplicação, os agrotóxicos atraem os agricultores devido o simples manuseio, economia e a eficácia dos produtos em um curto período de tempo (Belchior *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

Entretanto a utilização de exacerbada de agrotóxicos gera consequências danosas de contaminação ao meio ambiente, tais como rios, solo, lençóis freáticos e ar (Costa *et al.*, 2019). Isso porque, uma grande quantidade dos agrotóxicos aplicados na agricultura tende a escoar nas águas superficiais e subterrâneas e a ficar disperso na atmosfera (Busato *et al.*, 2019). Além disso, pesquisas apontam que o uso indiscriminado desses produtos vem causando um número elevado de intoxicações a saúde humana devido às substâncias que compõem esses produtos (Barbosa *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021).

A presença de substâncias provenientes de agrotóxicos em amostras de sangue humano e no leite materno, aponta a possibilidade de anomalias congênitas, de câncer e doenças mentais relacionadas ao uso de agrotóxicos (Siqueira; Kruse, 2008). Disperso em condições ambientais,

os agrotóxicos podem induzir mudanças significativas no neurodesenvolvimento e em mecanismos do sistema imunológico (Pereira, 2017).

O contato com diferentes substâncias presentes nos agrotóxicos é capaz de causar a toxicidade celular e afetar o funcionamento de diferentes organelas celulares (Goulart, 2014). Análise realizada com o sangue periférico de trabalhadores expostos diretamente ao manuseio desses produtos mostrou danos ao DNA e valores abaixo do normal de neutrófilos (Ramos, 2009).

O sistema imunológico é formado por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, especializados na manutenção da homeostase do corpo humano, sendo esse responsável pela defesa do organismo contra infecções, neutralização de toxinas e reparação de tecidos (Condino-Neto, 2014). Diante a importância desse sistema para a saúde, ressalta-se que indivíduos com respostas imunes irregulares estão suscetíveis a infecções sérias, muitas vezes em que há risco de vida (Abbas *et al.*, 2017).

Os neutrófilos são células polimorfonucleares que integram o sistema imunológico, especializadas no combate a infecções através da fagocitose do patógeno (Da-Silva; Finotti, 2019). Como as células mais abundantes do sistema imune, cerca de 50% dos leucócitos, os neutrófilos compõem a principal barreira do sistema imune inato contra microrganismos (Bauer *et al.*, 2015; Silva, 2015).

Os neutrófilos, células altamente inflamatórias, são as primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção, constituindo dessa forma a primeira linha de defesa do organismo (Camicia; Larrañaga, 2013). Essas células utilizam diversos mecanismos para a eliminação de patógenos, como a fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), liberação de enzimas presentes em seus grânulos e a formação de armadilhas extracelulares – NETs (Segal, 2005; Kaplan; Radic, 2012).

A deficiência dessas células ou irregularidade de suas funções, podem gerar problemas para a saúde do indivíduo, uma vez que elas são importantes para que ocorra a contenção de microrganismos no processo inflamatório (Da-Silva; Finotti, 2019). Novato-Silva *et al.* (2021) afirmam que a exposição a agrotóxicos causa danos às células imunes, o que tende a diminuir a resistência a infecções.

Os impactos ao meio ambiente e a saúde humana causados pelo uso excessivo de agrotóxicos na agricultura, impulsionam pesquisas por novos métodos alternativos no controle de pragas que acometem as lavouras, com o intuito de uma agricultura menos degradante e mais sustentável (Da Silva *et al.*, 2021). Dentre as alternativas estudadas, os extratos de plantas no

controle de fungos e bactérias vem se tornando um potencial agrícola de interesse biotecnológico.

Por serem seres complexos, as plantas apresentam um metabolismo capaz de produzir inúmeras substâncias químicas variáveis, algumas que são essenciais para o crescimento da planta denominadas metabólitos primários, e os metabólitos secundários que são responsáveis pela proteção da planta (Santos; Silva, 2015). Os metabólitos secundários são compostos por uma ampla variedade de substâncias com princípios ativos com potencial bioativo (De Sá-Filho *et al.*, 2021).

A diversidade de metabólitos existentes nas plantas gera grande possibilidade destas serem utilizadas no desenvolvimento de novos produtos com atividade microbica (Pereira *et al.*, 2022). Estudos apontam a descoberta de novas moléculas provenientes de plantas nativas com potente atividade antimicrobica no controle de agentes fitopatogênicos (Silva *et al.*, 2017). Por serem ricas em metabólitos secundários, espécies da família Piperaceae são consideradas uma importante fonte de substâncias com potencial bioativo (Simmonds *et al.*, 2021).

Descrita por Paul Dietrich Giseke a família Piperaceae é composta por ervas terrestres, subarbustos, árvores e arvoretas ou trepadeiras a família apresenta aproximadamente 3.615 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais (Joly, 1993; Christ *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2013). No Brasil a família está representada por quatro gêneros: *Manekia*, *Ottonia*, *Peperomia* e *Piper* (Guimarães *et al.*, 2015).

O gênero *Piper* é o que apresenta maior número de espécies da família Piperaceae, aproximadamente 2.000, podendo ser encontradas nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo (Quijano – Abril *et al.*, 2006). Amplamente distribuído em território brasileiro, o gênero *Piper* é considerado o quinto gênero mais diverso em números de espécies no país, aproximadamente 291, com maior riqueza de domínio Amazônico (BFG, 2015).

Espécies do gênero *Piper* vem sendo utilizadas na medicina popular ao longo dos anos em diversas partes do mundo, ao tempo em que são descritas por produzirem compostos com propriedades biológicas e farmacológicas diversas (Santos *et al.*, 2012). Inúmeros metabólitos secundários já foram descritos em espécies do gênero *Piper*, como alcaloides, flavonoides, terpenos, compostos fenólicos e ácido benzoico, o que relaciona as piperáceas com um grande potencial biológico que vem sendo amplamente investigado (Pereira *et al.*, 2020).

Os compostos presentes em espécies do gênero *Piper* despertam o interesse por essas plantas tanto na área farmacológica quanto na área agrônoma (Freire *et al.*, 2022). Espécies de *Piper* são descritas na literatura por apresentarem propriedades inseticidas (Scopel *et al.*,

2018), acaricida (Braga *et al.*, 2018), antimicrobiana, antioxidante, antimalárica e anti-inflamatória (Mgbeahuruike *et al.*, 2017).

O potencial bioativo relatados em espécies do gênero *Piper* no controle de microrganismos nos propõe à eficiência de substâncias proveniente de extratos dessas espécies, no controle de fitopatógenos importantes para a agricultura, o que se relaciona com a necessidade de serem desenvolvidos novos produtos, menos tóxicos, com base natural, que possam substituir agrotóxicos comerciais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de extratos de *P. permucronatum* e suas frações no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas, e o perfil citotóxico frente a neutrófilos humanos.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem fitoquímica preliminar dos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências de *Piper permucronatum*;
- Fracionar os extratos folhas, talos e inflorescências de *Piper permucronatum*;
- Avaliar *in vitro* a atividade fungitóxica e bactericida dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *Piper permucronatum* e suas frações, no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas;
- Avaliar o efeito dos extratos e frações obtidas sobre a viabilidade celular de neutrófilos humanos;
- Avaliar o efeito dos extratos e frações obtidas sobre a produção das espécies reativas de oxigênio – ROS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGRICULTURA NO BRASIL

O atual cenário da agricultura brasileira é resultado de importantes transformações que ocorreram no país desde a década de 1960, ao longo desses anos o Brasil deixou de ser importador líquido de alimentos para se tornar um dos maiores exportadores mundiais (Vieira Filho; Gasques, 2016). Decorrencia da disponibilidade de insumos modernos, maquinaria, instrumentos de política agrícola e o apoio fundamental da ciência, que possibilitou o aumento significativo da produtividade da terra, do trabalho e do capital (Alves *et al.*, 2008).

Com uma área territorial de aproximadamente 852 milhões de hectares e um clima favorável, o Brasil está entre os principais produtores agrícolas globais (Hubbard *et al.*, 2017). De acordo com Ferraz e Skorupa (2017) o Brasil entrou de forma definitiva no mercado dos grandes produtores mundiais de grãos, cereais e oleaginosas e com isso novos ciclos agroeconômicos se desenvolveram.

Nas últimas cinco décadas, o Brasil passou de importador para um dos mais importantes produtores e exportadores mundiais, o que atende uma média de 1,5 bilhão de pessoas no mundo (EMBRAPA, 2018). Um resultado promissor de investimentos com ciência e tecnologia, que auxiliaram no crescimento da produtividade no setor agropecuário brasileiro (Alves; Vieira Filho, 2023).

Atualmente o Brasil é o terceiro maior exportador mundial de produtos agropecuários, atrás apenas dos EUA e União Europeia (FAOSTAT, 2022). O país terminou o ano de 2022 com crescimento de 32,0% no valor das exportações do agronegócio, e fechou janeiro de 2023 com uma alta de 16,4% em relação ao mesmo mês do ano passado, atingindo um recorde de US\$10,22 bilhões para o mês (Kreter *et al.*, 2023).

Luna e Klein (2019) enfatizam que a consolidação do Brasil no mercado de exportação de produtos agrícolas ocorreu simultaneamente com o crescimento da produção e produtividade das culturas alimentares tradicionais, o que permitiu suprir o mercado interno e consequentemente gerou uma queda nos preços internos dos alimentos que compõem a cesta básica.

Dentre a variedade de produtos agrícolas produzidos no país, destaca-se nesse estudo o cultivo de feijão e tomate, assim como doenças importantes para essas cultivares e os métodos comumente utilizados para o controle de pragas.

2.1.1 CULTIVO DE FEIJÃO

Entre as cultivares produzidas no Brasil destaca-se o cultivo do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L), sendo o país o terceiro maior produtor do mundo (Bezerra, 2023). Com uma área plantada de 2.923,3 mil ha e a produtividade de 977 kg/ha, o Brasil possui três épocas distintas de plantio de feijão, dividido em primeira safra (agosto a dezembro), segunda safra (janeiro a abril) e terceira safra (maio a julho), o que favorece uma oferta constante do produto (Conab, 2021). Presente em praticamente todos os estados brasileiros, durante a temporada 2020/2021 o estado de Rondônia colheu aproximadamente 3,3 mil hectares da cultura de feijão na segunda safra (Conab, 2021).

Classificado no grupo dos “pulses” - leguminosas secas, o feijão, assim como as demais leguminosas dessa categoria, é rico em fibras, proteínas, vitaminas e aminoácidos (BRASIL, 2018). De acordo com Mudryj *et al.*, (2014) constituído de forma significativa por vitaminas e minerais como ferro, zinco, folato e magnésio, consumir meia xícara de feijão por dia melhora a qualidade da dieta do indivíduo.

Entre os fatores que limitam a produtividade do feijão destacam-se as doenças que acometem as culturas. No Brasil são descritas mais de 20 doenças de origem bióticas que afetam de maneira considerável o cultivo de feijão (Beladeli *et al.*, 2021). Dentre as doenças do feijoeiro, as causadas por fungos são de grande importância econômica para o país, uma vez que acarretam em perdas de até 100%.

A mela do feijoeiro ou murcha da teia micélica causada pelo fungo *Thanatephorus cucumeris* (anamorfo *Rhizoctonia solani* Kuhn) é considerada uma das doenças do feijoeiro com maiores índices de perdas da região amazônica devido ao clima quente e úmido (Fernandes *et al.*, 2020). O patógeno *T. cucumeris* é um basidiomiceto que habita no solo e apresenta uma grande capacidade saprofítica e competitiva e produz escleródios como estruturas de resistência (Wendland *et al.*, 2018).

Os sintomas da doença se caracterizam por típica infecção que inicia nas folhas, como manchas encharcadas de forma circular e irregular, sob alta umidade as manchas podem atingir o caule e as vagens formando uma teia micélica, o que afeta toda a planta e plantas vizinhas (Wendland *et al.*, 2018).

No Brasil a infecção por *Rhizoctonia solani* Kuhn acomete várias importantes lavouras (Costa *et al.*, 2017) e não somente a do feijoeiro comum, o fungo causa danos ao se hospedar em diversas culturas como: Mogno-africano (*Khaya ivorensis* A. Chev.) (Schurt *et al.*, 2019), na soja (*Glycine max*) (Gabardo *et al.*, 2020), feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) (Sousa

et al., 2017), é o responsável por causar o mal do braquiário (Vieira Junior *et al.*, 2015) e no plantio de arroz (*Oryza sativa* L.) (Schurt *et al.*, 2013).

A podridão do colo ou murcha de esclerótium também é uma doença importante para a cultura do feijão. Causada pelo fungo basidiomiceto *Sclerotium rolfsii* Sacc (anamorfo *Aetholia rolfsii* (Curzi) Tu e Kimbr, a podridão do colo ocorre em regiões de clima tropical e subtropical, em condições de temperatura e umidade elevadas, seguidas por períodos secos (Blum *et al.*, 2003).

Os sintomas da doença se caracterizam por lesões de coloração marrom e aquosas que iniciam do colo da planta, mas que rapidamente avançam causando a podridão do colo (Canale *et al.*, 2020). Sob ambiente favorável ao avanço da infecção, a doença pode matar as plantas em qualquer fase do seu ciclo (Wendland *et al.*, 2018).

O patógeno *S. rolfsii* é denominado polígrafo, ou seja, assim como o *T. cucumeris*, o *S. rolfsii* também consegue hospedar uma grande variedade de espécies de plantas (Canale *et al.*, 2020). A literatura aponta danos causados por esse fungo em meloeiro (Nogueira *et al.* 2019), soja (Queiroz *et al.*, 2020), feijão-caupi (Sobrinho; Santos, 2021) e na cultura de girassol (Araújo *et al.*, 2014).

2.1.2 CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

O tomate (*Solanum lycopersicum*) está entre as hortaliças mais produzidas no mundo, nesse cenário o Brasil se destaca na produção por apresentar condições climáticas favoráveis ao seu cultivo que é realizado em praticamente todos os estados do país (Filgueira, 2013). Atualmente o Brasil ocupa a oitava posição no ranking mundial de produtores de tomate, com uma produção em torno de 4 milhões de toneladas (Pedó *et al.*, 2022).

O tomate está presente na mesa da população tanto *in natura* como na forma industrializada, sua importância alimentar e nutricional está caracterizada pela alta concentração de licopeno, um antioxidante que atua no organismo contra radicais livres, até mesmo, o câncer (Conab, 2019). Além disso, o tomate é rico em proteínas, compostos bioativos e carboidratos, e vitamina C (Martins Filho *et al.*, 2022).

Apesar da elevada produtividade observada pela tomaticultura nacional alguns fatores limitam a sua produtividade, dentre os quais destaca-se a alta suscetibilidade a doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus, o que pode levar a perdas de até 100% da produção (Domingues *et al.*, 2017; Mendonça *et al.*, 2018). Dentre as doenças que acometem a cultura de tomate, as de origem bacteriana são as que se apresentam com maiores dificuldades de

manejo, das quais destacam-se a Mancha-bacteriana e a Murcha-bacteriana (Pereira *et al.*, 2013).

A mancha-bacteriana causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* pode causar perdas significativas em lavouras de tomate. Em condições climáticas favoráveis à doença (altas temperaturas, chuvas e ventos) ou em caso de plantio de cultivares suscetíveis, pode ocorrer a redução acima de 50% da produtividade (Quezado-Duval; Lopes, 2010).

A bactéria consegue infectar a planta pelos estômatos ou por meio de feridas e aberturas naturais do tecido (Hassan; Zyton, 2017). Os sintomas da Mancha-bacteriana caracterizam-se por manchas nas folhas mais velhas, de formato irregular e encharcadas que se tornam necróticas. Os frutos também apresentam manchas grandes e profundas (Pereira *et al.*, 2013).

A bactéria *X. axonopodis vesicatoria* sobrevive por dias a semanas no solo, geralmente em restos de culturas doentes ou infectadas (Fonseca, 2018) o que dificulta o controle da doença. Segundo Lopes e Quezado-Duval (2005) a doença afeta a comercialização do tomate tanto *in natura*, devido as manchas no fruto, como para a industrialização, uma vez que a doença provoca a insolação direta no fruto e com isso a redução do teor de açúcar (brix), o que resulta na desvalorização do produto.

A Murcha-bacteriana causada pela bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum*, é umas das principais doenças que acometem as solanáceas, historicamente é uma doença limitante da produção de tomate em climas tropicais o que reflete de maneira significativa os cultivos na região Norte do Brasil (Lopes *et al.*, 2015).

Os sintomas da doença progridem de maneira rápida, iniciando com a murcha das folhas e posterior a murcha total da planta de cima para baixo de maneira irreversível, resultado da interrupção parcial ou total do fluxo de água desde as raízes até o topo (Pereira *et al.*, 2013; LOPES, 2009). A doença se manifesta em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, mas é mais comum que ocorra na formação do primeiro cacho de frutos (Lopes, 2009).

A *R. pseudosolanacearum*, é uma bactéria gram negativa, aeróbica da família das Pseudomonadaceae (Tejera *et al.*, 2016). Considerada de extrema importância para a agricultura, a bactéria *R. pseudosolanacearum* tem a capacidade de sobreviver no solo por muitos anos, o que inviabiliza o cultivo de solanáceas em áreas infestadas por muito tempo (Lopes, 2009).

Adaptadas às diferentes condições ambientais e versáteis em termos de metabolismo, as fitobactérias associadas ao solo, são patógenos causais de doenças de difícil controle, o que resulta em prejuízos econômicos relevantes, e que requer várias estratégias de prática de manejo (Lanna Filho, 2015; Lopes; Mendonça, 2016).

2.2 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

O controle das doenças do feijoeiro causadas por fungos é comumente realizado com a utilização de fungicidas específicos. Fernandes *et al.*, (2005) afirmaram que no estado de Rondônia o uso do fungicida Azoxystrobin, permitiu durante anos a diminuição de danos causados pela mela e outras doenças fúngicas no cultivo de feijão, mas alertaram a falta de registro desse produto no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -MAPA, para o controle dessa doença. Já o controle de doenças causadas por bactérias no cultivo de tomate é tradicionalmente realizado com o uso de fungicidas e produtos à base de cobre (Nascimento *et al.*, 2013).

Não somente nas culturas de feijão e tomate, mas o controle de doenças que acometem as culturas agrícolas vem sendo realizado com a aplicação de agroquímicos ou agrotóxicos a anos (Nava, 2020). Introduzidos na agricultura na década de 1940, a utilização desses produtos ocasionou, no início, impactos positivos na produção (Rembischevski; Caldas, 2018).

Entretanto, o uso intensivo e indiscriminado de produtos químicos a longo prazo, tem despertado a preocupação da sociedade devido aos crescentes problemas ambientais e a saúde humana, como a contaminação de águas, solos, animais e alimentos e a intoxicação de agricultores (Macêdo *et al.*, 2018). No Brasil, por exemplo, a utilização constante de agrotóxicos tem gerado intensos debates nas últimas décadas (Sousa; Gorri, 2019).

De acordo com De Moraes (2019) a partir da década de 1990 a utilização de agrotóxicos nas lavouras do Brasil cresceu de forma abrupta, e apesar do aumento ter sido proporcional aos demais países do Mercosul, foi superior à de outros grandes produtores agrícolas. Em 2008 o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos no mundo, entre 2007 e 2017 a comercialização desses produtos no país passou a marca de 500 mil toneladas por ano (Tavares *et al.*, 2020).

Estudos apontam que o aumento da utilização de agrotóxicos resulta na contaminação do meio ambiente, com efeitos tóxicos para a fauna, flora e para a saúde humana (Aguiar *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2022). No Brasil, Pignati *et al.*, (2018) afirmaram que o uso intenso de agrotóxicos na produção agrícola do país, gera pressões negativas no ambiente, na saúde dos trabalhadores rurais, na contaminação dos alimentos e consequentemente efeitos deletérios à saúde humana.

O número de casos de intoxicação, devido ao uso e disseminação desses produtos, tem aumentado de maneira considerável e preocupante no Brasil (Queiroz *et al.*, 2019). Dados

apontam que anualmente ocorrem mais de 200 mil mortes devido a problemas gerados pelo uso inadequado de agrotóxicos (Da Silva Moraes *et al.*, 2018).

As intoxicações por agrotóxicos podem provocar distímias (alterações de humor), distúrbios de comportamentos (surto psicóticos), insônia, impotência sexual masculina, alterações da pressão arterial, cefaléia e diminuição das defesas do sistema imunológico (Levigard; Rozemberg, 2004).

O uso intensivo de agrotóxicos tem sido relatado na literatura como responsável por prejuízos agudos e crônicos na saúde da população (Garcia; De Lara, 2020). Compostos químicos presentes em agrotóxicos são imunotóxicos para animais e humanos, sendo o sistema imunológico altamente vulnerável aos efeitos destes compostos (Schaalan *et al.*, 2011).

Ao agir nas células que formam o sistema imunológico, os agrotóxicos podem afetar todos os sistemas biológicos de um corpo, além de induzir alterações nos mecanismos das células imune, e como resultado dessa ação, modifica a função do sistema imunológico (Helali *et al.*, 2016). Dessa forma os agrotóxicos têm sido relacionados às doenças associadas às alterações da resposta imune, como reações de hipersensibilidade, algumas doenças autoimunes e cânceres (Corsini *et al.*, 2013).

2.3 SISTEMA IMUNOLÓGICO - NEUTRÓFILOS

O sistema imune é o conjunto de células, tecidos e moléculas que medeiam a resistência a infecções (Abbas *et al.*, 2017). Esse sistema é responsável por combater infecções e agentes tóxicos causados por patógenos, sendo suas respostas conhecidas como respostas imunes (Nogueira, Lima, 2018; Murphy, 2014).

A resposta imunológica está dividida em resposta adaptativa e resposta inata, sendo a primeira composta principalmente por linfócitos T e B e seus produtos, citocinas e anticorpos respectivamente (Terra *et al.*, 2012). Já a resposta inata consiste em barreiras físicas (ex. pele), químicas (ex. lágrima) e a participação de células como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células natural killers (NK), além de moléculas microbidas como o óxido nítrico (NO) e ânion superóxido (O_2^-) (Totsch; Sorge, 2017).

Os neutrófilos estão entre as principais células que compõem a imunidade inata, responsáveis pela primeira linha de defesa contra microrganismos invasores, e desempenham um papel importante na modulação da resposta inflamatória (Zuliani *et al.*, 2020). Essas células se desenvolvem na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas em um processo denominado “granulopoiese” (Kruger *et al.*, 2015).

Também chamados de granulócitos polimorfonucleares (PMNs), por não possuírem núcleo segmentado e diferentes tipos de grânulos, os neutrófilos representam a maior fração de leucócitos no sangue periférico (Setúbal *et al.*, 2020). Essenciais para que os neutrófilos consigam cumprir seu papel, os grânulos são subdivididos em primários ou azurófilos, secundários ou específicos e terciários ou de gelatinase, além de vesículas secretoras (Cowland; Borregaard, 2016). Esses grânulos são compostos por proteínas antimicrobianas mobilizáveis, que permitem aos neutrófilos respostas rápidas e eficientes (Yin; Heit, 2018).

O sistema imunológico é caracterizado por um rápido fluxo de neutrófilos para os tecidos afetados, sendo sua principal função eliminar detritos e infecções (Leliefeld *et al.*, 2015). Isso ocorre porque essas células são recrutadas para os tecidos ou locais de infecção com a ajuda de distintas substâncias quimiotáticas, estas por sua vez são derivadas de microrganismos, componentes teciduais alterados ou mediadores inflamatórios (Reis; Duarte, 2018).

Além disso, Scapini e Cassatella (2014) afirmam que os neutrófilos são capazes de influenciar os circuitos reguladores nas respostas inata e adaptativa, uma vez que, recrutados para os tecidos inflamados, os neutrófilos são envolvidos em interações bidirecionais complexas com outras células do sistema imunológico. Uma pesquisa recente revela que essas células são capazes de regular com precisão a liberação de suas enzimas granulares por fluxos iônicos, podendo liberar citocinas e quimiocinas imunomoduladoras que interagem com componentes do sistema imunológico (Delgado-Rizo *et al.*, 2017).

Uma característica importante dos neutrófilos é a sua resposta a estímulos com um aumento no consumo de oxigênio, processo que requer energia (Abbas *et al.*, 2017). Esse mecanismo oxidativo emprega espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), que são geradas a partir do ânion superóxido produzido pelo complexo NADPHoxidase (Santos, 2007). Além de desempenharem papel importante na eliminação de patógenos, as ROS são moléculas de sinalização chave, regulando o crescimento e adesão celular, diferenciação, senescência e apoptose (Mittal *et al.*, 2014).

Como descrito, o sistema imunológico exerce grande importância na homeostasia do organismo, e é esse o sistema mais sensível a agentes xenobióticos (Silverio; Pinheiro, 2019). Nesse sentido, Pereira (2021) afirma que o sistema imunológico é o que mais apresenta efeitos deletérios pela exposição a agrotóxicos.

Estudos apontam os efeitos nocivos causados nas células pelo contato excessivo de agrotóxicos na agricultura, e o contato direto com esses produtos (Souza *et al.*, 2021; Cestonaro,

2022). Lee *et al.*, (1979) afirmaram que compostos presentes em agrotóxicos, como a parationa metílica foi responsável pela inibição de quimiotaxia de neutrófilos humanos.

O pesticida organofosforado amplamente utilizado da década de 90, ao ser estudado na resposta imune, diminuiu de forma significativa a quantidade de neutrófilos, além de interferir em sua capacidade fagocitária (Siwicki *et al.*, 1990). Em um estudo mais recente, Mitra *et al.*, (2019), ao investigarem os organofosforados relataram que estes induzem efeitos imunomoduladores em vertebrados, alterando as funções dos neutrófilos e a produção de macrófagos.

Testes citotóxicos *in vitro* identificaram a alta toxicidade do glifosato, um herbicida amplamente utilizado na agricultura, e de seus derivados comerciais, frente a células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (Martínez *et al.*, 2007). Produtos provenientes de glifosato também agiram de maneira significativa na morfologia de PBMCs, indicando alteração na granularidade celular e no tamanho dessas células (Kwiatkowaska *et al.*, 2016).

Ao avaliarem os possíveis danos hematológicos em trabalhadores agrícolas expostos ao contato direto com agrotóxicos, Payán-Rentería *et al.*, (2012) identificaram nesse grupo, amostras com fragmentos de DNA livres no plasma, além de alteração em volume plaquetário médio (VPM), em comparação com os dados de trabalhadores rurais não expostos. Dalbô *et al.*, (2019) relataram variações na quantidade de leucócitos e neutrófilos nas amostras sanguíneas de trabalhadores rurais, e afirmaram que a exposição aos agrotóxicos pode aumentar a quantidade dessas células.

Outra importante problemática, apontada por Carneiro *et al.*, (2015) diz respeito aos profissionais e serviços de saúde não estarem devidamente capacitados para diagnosticar os efeitos relacionados com a exposição aos agrotóxicos, tais como neuropatias, imunotoxicidade, alterações do sistema reprodutor, entre outros danos à saúde. Os autores apontam ainda que, sem o diagnóstico adequado, enfermidades ligadas aos agrotóxicos são ocultadas dos dados públicos.

Esses fatos corroboram com a necessidade de métodos alternativos de menor impacto à saúde humana e ao meio ambiente, que resulte em produtos alimentícios mais saudáveis, o que tem se tornando um desafio para a agricultura moderna (Garcia *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2014).

A busca por métodos alternativos para o controle de fitopatógenos, a partir de produtos naturais extraídos de plantas, é bastante promissora frente à resistência apresentada pelos produtos sintéticos (Da Silva *et al.*, 2020).

2.4. MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

A utilização exacerbada de agrotóxicos e suas consequências danosas para o meio ambiente e a saúde humana, vem levantando sérios debates e fazendo com que a sociedade busque por alternativas para diminuir a utilização de agrotóxicos na produção de alimentos (Miorin *et al.*, 2016). No documento publicado na Conferência das Nações Unidas sobre Comércio e Desenvolvimento realizado em 2010, há a recomendação que governos encorajem o uso de várias formas de agricultura com baixo uso de insumos externos para o controle de pragas, que minimize o uso de agrotóxicos nas lavouras (Londres, 2012).

Nesse sentido, o Brasil enfrenta grandes desafios, uma vez que o modelo de agronegócio brasileiro é baseado na utilização constante de agrotóxicos nas culturas, o que reflete além de questões econômicas, mas também de sustentabilidade, social e ambiental, o que acentua a necessidade de novas práticas agrícolas (Izolani; Tybusch, 2020). Borsoi *et al.*, (2014) ao revisarem o impacto dos agrotóxicos na sociedade, apresentaram técnicas de cultivos sustentáveis, as quais citaram a utilização de defensivos naturais, que podem resultar em uma produção mais limpa.

Os defensivos naturais são produtos preparados a partir de substâncias que tendem a ser menos nocivas ao meio ambiente e a saúde humana, incluem-se nessa categoria os agentes de biocontrole, os biofertilizantes líquidos, as caldas, os feromônios, os óleos essenciais e extratos de plantas (Ayres *et al.*, 2020). Óleos essenciais ou extratos vegetais se apresentam como uma alternativa promissora sobre o controle importantes patógenos da agricultura.

Isso porque, as plantas produzem uma variedade de produtos químicos classificados como metabolitos primários e metabolitos secundários (Borges; Amorim, 2020). Define-se como metabólitos primários os processos comuns a maioria dos vegetais ligados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, e que levam à síntese de carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Rezende *et al.*, 2016).

Já os metabólitos secundários das plantas são caracterizados como os compostos que não tem funções reconhecidas na manutenção de processos vitais basais (crescimento, desenvolvimento e reprodução), mas que desempenham um papel essencial da interação da planta com seu meio ambiente (Souza *et al.*, 2019). Os metabolitos secundários são altamente específicos, e atuam nas plantas como atrativos ou repelentes de polinizadores, dissuasores de herbivoria, na proteção contra radiação UV e poluição, estresse hídrico e na alelopatia (Borges; Amorim, 2020; Rezende *et al.* 2016).

Dessa forma, extratos vegetais, amplamente empregados na agricultura no século XIX, ressurgem como uma opção promissora para o manejo integrado em proteção de plantas contra microrganismos (Santos *et al.*, 2013). Extratos obtidos a partir de plantas medicinais da flora nativa, têm apresentado eficiência no controle de microrganismos fitopatogênicos (Schwan-Estrada *et al.*, 2000).

O potencial de extratos vegetais no controle de fitopatógenos vem sendo descrito na literatura por apresentarem ação fungicida (Bernardo *et al.*, 2015; Domingos *et al.*, 2021), bactericida (Silva *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2018), inseticida (Migliorini *et al.*, 2010; Neri *et al.*, 2020); acaricida (Da Silva *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2022) e nematocida (Guimarães *et al.*, 2021; Daniel *et al.*, 2022).

Da Silva *et al.*, (2022) obtiveram resultados satisfatórios ao avaliarem diferentes extratos vegetais, no controle do crescimento micelial e esporulação de importantes fungos que acometem o cultivo de feijão. Extratos de plantas nativas também foram eficientes em inibir o crescimento da bactéria *R pseudosolanacearum* em testes *in vitro*, e reduzir a severidade da doença em testes *in vivo* (Silva *et al.*, 2020). Estudos que apontam a utilização de extratos como método alternativo no controle de pragas no cultivo de feijão e tomate.

Nesse sentido, extratos de espécies pertencentes ao gênero *Piper* se destacam por apresentarem resultados promissores na área de química e prospecção biotecnológica, tanto para o ramo da saúde como da agricultura, (De Oliveira; Rodrigues, 2021).

2.5 FAMÍLIA PIPERACEAE E GÊNERO *Piper*

Pertencente a ordem Piperales, a família Piperaceae é uma das famílias mais primitivas de Angiospermas, sendo predominantemente de clima tropical (Bay-Hurtado *et al.*, 2016). Conforme Yuncker (1972) a família foi descrita por Linnaeus no século XVIII, que lhe conferiu na época quatro gêneros, sendo *Piper* descrito em 1737.

A família Piperaceae compreende aproximadamente 3.700 espécies (Christenhusz; Byng, 2016). De distribuição Pantropical, a família pode ser encontrada principalmente na América Latina (Yuncker, 1958) (Figura 1). No Brasil a família é bastante comum em suas formações florestais (Souza; Lorenzi, 2012).

Figura 1: Distribuição geográfica mundial das Piperaceae.



Nota: Presença de Piperaceae: cores nas tonalidades variando de amarelo a vermelho. Fonte: Missouri Botanical Garden – MOBOT (2018).

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies dessa família, cerca de 459 espécies (De Queiroz; Guimarães, 2020), agrupadas em 5 principais gêneros, sendo eles: *Macropiper*, *Zippelia*, *Manekia*., *Peperomia* Ruiz e Pav., e *Piper* L, e estão amplamente distribuídas nas florestas Amazônica e na Mata Atlântica (Nascimento *et al.*, 2022).

Com grande importância econômico e medicinal, destacam-se na família Piperaceae os gêneros *Peperomia*, que apresenta espécies cultivadas com finalidades ornamentais e medicinais (Mora-Vivas *et al.*, 2016) e o gênero *Piper* que é composto por espécies utilizadas de modo empírico por diferentes populações ao longo dos anos, sendo este o gênero mais estudado e conhecido do ponto de vista químico (Nascimento; Lima, 2023).

Da família Piperaceae o gênero *Piper* é o maior e mais representativo em número de espécies aproximadamente 2.000 (BFG, 2015). As espécies que compõem o gênero *Piper* possuem características aromáticas e são amplamente conhecidas por serem utilizadas popularmente durante décadas como plantas alimentícias, como a *Piper nigrum* (Judd *et al.*, 2009) e medicinais (Salehi *et al.*, 2019).

Conforme a classificação taxonômica de Cronquist (1981), o gênero *Piper* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae, ordem Piperales, família Piperaceae. O gênero é composto por subarbustos, arbustos ou arvoretas, variando entre 1-10m de altura (Guimarães; Giordano, 2004). Suas folhas são alternas inteiras de tamanhos variados; as flores são reunidas em inflorescências do tipo espiga ou em racemos solitários opostos às

folhas; aclamídeas, andrógenas ou bissexuadas e seus frutos são do tipo drupa com pericarpo delgado, com estigma persistente (Bardelli *et al.* 2008; De Oliveira Machado *et al.*, 2017).

No Brasil o gênero *Piper* abriga cerca de 289 espécies, das quais 183 são endêmicas e distribuídas em todas as regiões do país, sendo a região norte a detentora do maior número de espécies 184, destas 22 podem ser encontradas no estado do Tocantins, 41 em Roraima, 47 no Amapá, 66 em Rondônia, 83 no Acre, 106 no Pará, e a pluralidade das espécies identificadas no Brasil são encontradas no estado do Amazonas 140 espécies (Guimarães *et al.*, 2022).

Inúmeras espécies de *Piper* apresentam odor característico do gênero, o que é relacionado à presença de óleos essenciais nas plantas, principalmente nas folhas e nos frutos (Vieira *et al.*, 2016). A presença de conteúdo oleífero nas estruturas de espécies do gênero *Piper* explica o fato dessas plantas serem utilizadas na medicina popular e apresentarem grande importância econômica (Gogosz *et al.*, 2012).

Espécies do gênero *Piper* vem sendo descritas na literatura por apresentarem em sua composição moléculas com ação antimicrobiana (Bohatch Junior *et al.*, 2016), inseticida (Braga *et al.*, 2017) nematocida (Sangi *et al.*, 2018), fungicida (Gusmão *et al.*, 2020) e bactericida (Soares, 2020). Mgbeahuruike *et al.*, (2017) apontam a eficiência de extratos brutos de diferentes espécies de *Piper* em inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas além de potencial larvicida e fungicida.

Um estudo para avaliar o potencial dos extratos das espécies *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*, identificou a eficiência destes em controlar o crescimento micelial dos fungos *Rizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* (Freire, 2015). O potencial bactericida do gênero *Piper* foi evidenciado por Lemos *et al.*, (2011) ao apontarem a eficiência de extratos da espécie *Piper regnelli* em controlar o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

As propriedades medicinais e microbicidas atribuídas as espécies do gênero *Piper* estão relacionadas aos metabólitos secundários produzidos por essas plantas que apresentam importantes efeitos na saúde (Salehi *et al.*, 2019). Metabólitos secundários vegetais são formados por compostos orgânicos com potencial atividade biológica (Cunha *et al.*, 2016).

Dessa forma, a utilização de extratos provenientes de espécies do gênero *Piper* vem se tornando uma importante fonte de pesquisa, com resultados promissores e com potencial biotecnológico para a busca de novos fármacos para a saúde humana e animal, e também de para novos insumos agrícolas menos agressivos ao meio ambiente. Entre as espécies promissoras, destaca-se nesse estudo a espécie *Piper permucronatum*.

2.5.1 *Piper permucronatum*

A espécie *Piper permucronatum* foi descrita por Yuncher em 1966 (Monteiro; Guimarães, 2009). É composta por arbustos com até 2m de altura, ramos glabrosos, bainha curta; folha com pecíolo 1 -1,5cm, lâmina simétrica; espiga ereta quando em fruto; flor com 4 estames não apresentando glândulas, não pedicelada, bráctea floral triangular; frutas não pediceladas, globosas, glabra (Christ *et al.*, 2016).

A espécie *P. permucronatum* é nativa da Amazônia tropical, encontrada predominantemente nos estados do norte do país, mas também já foi identificada nos estados da Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Distrito Federal (Santos *et al.*, 2016; Guimaraes; Carvalho-Silva, 2012).

Conhecida popularmente como “elixir paregórico”, a espécie *P. permucronatum* apresenta arbustos aromáticos, cujas folhas são tradicionalmente utilizadas para preparação de chás contra cólicas menstruais e intestinais, problema digestivo, diarreia, dor no estômago, hemorragia e náuseas (Anjos Junior, 2007).

A utilização dessa espécie de maneira medicinal desperta o interesse científico sobre sua composição e possível potencial no controle de microrganismos. Torquillo *et al.*, (1999) identificou um total de 33 compostos presentes no óleo essencial de *P. permucronatum*, entre os quais os autores destacaram a predominância de sesquiterpenos e uma pequena porcentagem de monoterpenos, sendo o componente majoritário o δ -cadineno (12,7%).

A partir de óleo essencial da espécie, foram identificados também os constituintes químicos asaricina (8,55%), miristicina (25, 61%), elimicina (9,92%) e dilapiol (54, 70%) (Anjos Junior, 2007). Componentes também identificados por De Moraes *et al.*, (2007), que enfatizaram sobre a predominância destes, no óleo essencial da espécie *P. permucronatum*.

A identificação fitoquímica de compostos presentes na espécie *P. permucronatum* ainda é limitada na literatura, sobretudo estudos que investiguem a composição de extratos vegetais provenientes dessa espécie. Nesse sentido, Lemeszenski (2013) ao realizar uma pesquisa sobre a espécie *P. permucronatum*, identificou a partir de extratos da planta uma flavona e uma flavanona, mas novas pesquisas se fazem necessárias.

A capacidade bioativa de *P. permucronatum* vem sendo descrita na literatura, De Moraes *et al.*, (2007) destacaram a eficiência dos óleos essenciais dessa espécie contra as larvas de *Aedes aegypti*; Anjos Junior (2007) evidenciou a eficácia do extrato hexânico no controle da *Leishmania amazonensis* e *Artemia salina*. Extratos de folhas, talos e inflorescências dessa espécie também apresentaram resultados promissores no controle de fitopatógenos, com

funções nematicidas (Sangi *et al.*, 2018), fungicida (Bastos *et al.*, 2018) e bactericida (Bastos, 2018).

Assim, novas pesquisas que investiguem o potencial microbicida dessa espécie de *Piper*, além da triagem de substâncias a compõem, se fazem de grande importância para a busca de novos produtos biotecnológicos, que possam contribuir com o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. Para isso se fazem necessários também, estudos que avaliem a capacidade citotóxica de produtos derivados de plantas, a fim de informações para a saúde humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DOS ENSAIOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Rondônia e no Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde da Fiocruz, ambos localizados no município de Porto Velho-RO. Os testes *in vitro* foram realizados utilizando extratos alcoólicos e aquosos de folhas, talos e inflorescências de *Piper permucronatum* (permissão de acesso para coleta e análises - SisGen No A088959).

A espécie foi coletada no campo experimental da Embrapa Rondônia (S 08° 48' 56.0" W 063° 50' 46.1") em junho de 2019 em temperatura média diária de 25 °C e 32 mm de chuva no período. Após a coleta, o material vegetal foi encaminhado para o laboratório de fitopatologia onde foram separados folhas, talos e inflorescências. A confirmação botânica foi realizada com o depósito no Herbário Dr. Ary Tupinambá Penna Pinheiro, localizado no Centro Universitário São Lucas, Porto Velho – RO, sob o número de registro 7761.

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Os materiais vegetais (folhas, talos e inflorescências) foram levados à estufa com circulação de ar forçada para secarem (65 ± 2 °C), por aproximadamente 72 horas. Em seguida foram triturados separadamente em moinho de facas até a obtenção de um pó fino. Para preparo das soluções de extração, promoveu-se a adição 1 g do material triturado seco para 10 mL do solvente. Como extratores optou-se pelo uso de água mineral estéril para a obtenção de extratos aquosos e de álcool etílico 96% para produção de extratos alcoólicos. As suspensões macerado-extractor foram acondicionadas em Erlenmeyer de 100 mL, levadas à agitação em incubadora orbital, tipo Shaker (4 °C, 100 RPM, 24 h). Logo após, os extratos foram filtrados em gaze e tecido de nylon, evaporados e, em seguida, concentrados em rotaevaporador (70 °C) e armazenados a -2 °C até sua utilização, conforme metodologia adaptada de Ferris e Zheng, 1999. A concentração final observada foi de 0,1 g.mL⁻¹. Para a realização dos testes os extratos obtidos foram diluídos à concentração de 50 mg.mL⁻¹.

3.3 FRACIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS EXTRATOS

Para a realização do fracionamento foram preparados extratos utilizando-se 100 g do material vegetal em 200 mL de álcool 96%. A mistura foi agitada em incubadora orbital, tipo Shaker (4 °C, 100 RPM, 24 h). Em seguida, o material foi filtrado em gaze e tecido de nylon,

evaporados e, em seguida, concentrados em rotaevaporador (70 °C), sob vácuo constante (-1.5 Bar) para obtenção do extrato.

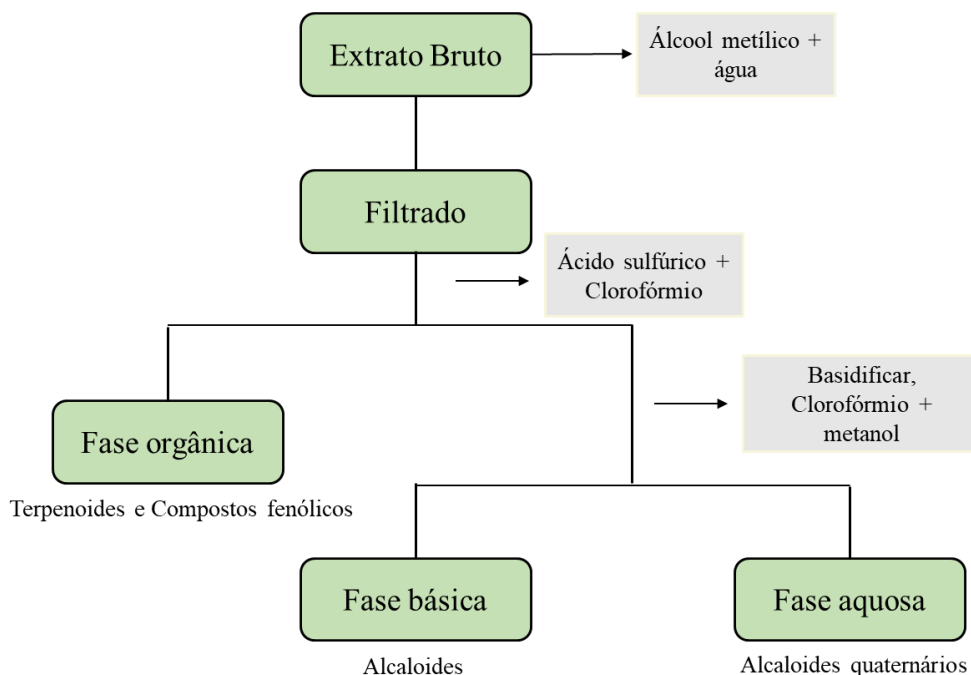
A esse extrato bruto seco foi adicionado 16 mL de álcool metílico e 4 mL de água destilada, e submetido ao aparelho banho ultrassônico por 20 minutos para solubilização. Posteriormente, a solução permaneceu em repouso por 30 minutos, na qual foram adicionados 20 mL de metanol e água (4:1; v:v). A solução foi novamente homogeneizada em banho ultrassom por 10 minutos. Após repouso de 30 minutos, a solução foi filtrada em papel de filtro comum e funil de Büchner e duas frações foram obtidas (Soares *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009).

O filtrado foi concentrado a um décimo do volume em rotaevaporador (70 °C). Em seguida, a solução foi acidificada com ácido sulfúrico concentrado, transferida para um funil de separação onde foram adicionados 10 mL de clorofórmio e agitada manualmente. O processo foi repetido por três vezes, separando a fase orgânica da fração básica e polar (Soares *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009) (Figura 2).

A fração básica e polar foi separada adicionando hidróxido de amônio concentrado a solução até obter pH 10. Em seguida foram adicionados 20 mL de clorofórmio e metanol (3:1; v:v) agitada manualmente e acrescentado 20mL clorofórmio. Primeiro foi recolhida à fase básica (alcaloides) e, em seguida, a fração polar (alcaloides quaternários, N-óxidos) (Figura 2).

As frações orgânica, básica e aquosa foram evaporadas e concentradas em rotaevaporador (70 °C), armazenadas em frascos âmbar, mantidas a temperatura ambiente até atingirem massas constantes. Para a realização dos testes as frações obtidas foram diluídas à concentração de 50 mg.mL⁻¹.

Figura 2: Esquema do fracionamento líquido-líquido.



3.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE *P. permucronatum*

Foram realizados testes fitoquímicos para verificar a possível presença ou ausência de determinadas classes de metabólitos secundários dos extratos de folhas, talos e inflorescência de *P. permucronatum* de acordo com protocolos e metodologia de Kloss *et al.*, (2016), Matsumoto *et al.*, (2009) e Gonçalves e Lima (2016).

3.4.1 DETECÇÃO DE SAPONINAS

Neste ensaio, a 2 mL de cada extrato foram adicionados 5,0 mL de água na temperatura de 100 °C. Após resfriamento, a solução foi agitada vigorosamente por 5 minutos, e deixada em repouso por 20 minutos. A presença de espumas na solução indica a presença de saponinas.

3.4.2 DETECÇÃO DE FLAVONOIDES

A pesquisa de detecção de flavonoides baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide na presença de ácido. Dessa forma colocou-se em um tubo de ensaio 2,0 mL do extrato e adicionou-se 2 gotas de acetato de chumbo a 10%. A presença de um precipitado corado indica a positividade da reação.

3.4.3 REAÇÃO DE CLORETO FÉRRICO (DETECÇÃO DE TANINOS)

Foram adicionados 10 mL de água destilada a 2,0 mL de extrato. Em seguida a mistura foi filtrada e adicionou-se 2 gotas da solução de cloreto férrico a 10%. Coloração azul escura indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto que coloração verde é indicativo de taninos condensados.

3.4.4 DETECÇÃO DE CUMARINAS

Para a realização desse teste foram adicionados 2,0 mL de extratos em um tubo de ensaio, este foi tampado com papel filtro impregnado em solução 10% de NaOH e levado a banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida removeu-se o papel de filtro e examinou-se sob câmara de luz ultravioleta (UV). A fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

3.4.5 REAÇÃO DE SALKOWSKI (DETECÇÃO DE TRITERPENOS)

Para a realização deste ensaio, a 1 mL de cada extrato foram adicionados 2,5 mL de clorofórmio, em seguida essa solução foi filtrada e transferida para um tubo de ensaio e adicionado o reagente de Salkowski. A mudança de coloração ocorre de acordo com a natureza da substância: cor estável azul, violeta ou vermelho é indicativo de triterpenos na solução.

3.4.6 DETECÇÃO DE ALCALOIDES

Foram adicionados 2mL de ácido clorídrico (10%) em 2mL de cada extrato, a mistura foi aquecida em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Após o resfriamento pipetou-se 1,3 ul da solução em um tubo de ensaio e com o auxílio de uma pipeta Pasteur adicionou-se oito gotas do Reativo de Dragendorff, a formação de precipitado de coloração laranja a vermelho indica a presença de alcaloides.

3.4.7 DETECÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Para a realização desse teste 5 gotas do extrato alcoólico foram adicionadas em placas de toque com 5 gotas de cloreto férrico. O teste apresenta resultado positivo para compostos fenólicos com o surgimento de coloração verde.

3.4.8 DETECÇÃO DE ANTRACNONONA

Em 100mg de pó do material vegetal foram adicionados 5mL de clorofórmio, a solução foi filtrada. Em seguida adicionou-se 2mL do filtrado com 2mL de NH₄OH (10%). Uma cor rosa brilhante confirma a presença de Antraconona.

3.5 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* utilizados nos experimentos são isolados de folhas e talos de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivados no campo experimental da Embrapa – Rondônia. As folhas e talos com sintomas de mela e mofo respectivamente, foram submetidas à lavagem com água corrente, e em seguida desinfetados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, durante um minuto, depois transferidos para um recipiente com água estéril e por último foi colocado em um papel absorvente para retirar o excesso de umidade.

As partes com as lesões da doença foram repicados em meio de cultura BDA (Batata–Dextrose–Agar) acondicionados em placas de Petri, assepticamente devidamente vedadas com parafilme, e levadas à incubadora em estufa de crescimento (B.O.D.) em temperatura de 25 ± 2 °C, até que a colônia ocupasse completamente a placa 90 mm de diâmetro. Após seu crescimento, realizou-se a repicagem do fungo, em que discos de micélio de 0,5 cm de diâmetro compostos pelas estruturas do fungo, foram realocados no centro de novas placas de Petri contendo meio BDA mantidos em estufa de crescimento para a obtenção de novas colônias fúngicas, as quais foram utilizadas para os experimentos *in vitro* e *in vivo* conforme metodologia adaptada de Vieira Júnior (2005).

3.6 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum* utilizados nos experimentos foram isolados de amostras vegetais advindas de produtores rurais locais, identificadas por testes bioquímicos e tintoriais e encontravam-se preservados em óleo mineral no laboratório de fitopatologia da Embrapa Rondônia. As bactérias foram repicadas em Erlenmeyers contendo meio de cultura 523 de Kado e Heskett (1970) líquido e levadas à agitação por 48 h à 28 °C em incubadora – agitadora tipo Kline para a reativação dos isolados (Costa; Ferreira, 1991). Isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo o mesmo meio sólido e levadas à crescimento (48h, 28 °C) em incubadora tipo B.O.D. Após o crescimento das bactérias foi preparada uma suspensão bacteriana a partir da adição de 20 mL de água mineral,

calibrada em espectrofotômetro, tendo absorvância A540nm ajustada para 0,800, o que corresponde a um inóculo de $2,0 \times 10^6$ UFC/mL para a realização dos testes (Romeiro, 2005).

3.7 ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA FÚNGICO

Os experimentos *in vitro* foram realizados em capela asséptica de fluxo laminar com todos os instrumentais devidamente esterilizados, mantendo a condição de assepsia. Inicialmente os testes foram feitos com os extratos nas concentrações de 50mg/ mL⁻¹.

A atividade antifúngica dos extratos foi testada utilizando o método de difusão em poços, vertendo o meio BDA semissólido em placas de Petri 90 mm x 10 mm, após a sua solidificação foram feitos poços com 0,5 cm de diâmetro equidistantes no meio de cultura e em cada um deles foram adicionados 10 µL do tratamento, em seguida o micélio de 0,5 cm de diâmetro do patógeno foi adicionado no centro da placa conforme metodologia adaptada de Vieira Júnior (2005). As placas foram vedadas e colocadas em incubadora (B.O.D.).

A análise dos resultados ocorreu por meio de observação dos halos de inibição que se formavam no entorno do tratamento eficiente, a partir de 24 horas após a incubação, medindo o diâmetro dos halos no sentido longitudinal e transversal (D1 e D2) utilizando um paquímetro digital.

A observação dos halos de inibição do crescimento micelial com os tratamentos testados foram comparados com o grupo controle, contendo água, álcool 96% e fungicida Azoxistrobina (0,6 g/L) para o fungo *Rhizoctonia solani* e Tiabendazol (2 mL/L) para *Sclerotium rolfsii*.

3.8 ANTIBIOGRAMA BACTERIANO

Os experimentos *in vitro* foram realizados com os extratos na concentração de 50mg/ mL⁻¹. O ensaio de antibiograma foi realizado por meio da técnica de difusão em meio (ROMEIRO, 2005), no que 100 µL da suspensão bacteriana (a 540nm aproximadamente igual à 1×10^8 UFC.mL⁻¹) foram incorporados em 100 mL do meio de cultura 523 de Kado e Heskett semi – sólido fundente e espalhados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Com o auxílio de uma pinça estéril foram depositados sobre a superfície do meio, discos de papel de 6 mm de diâmetro, impregnados com alíquotas de 7 µL dos extratos a serem testados. As placas foram vedadas para impedir qualquer contaminação e armazenadas em incubadora tipo B.O.D. à 28°C.

Os resultados foram analisados por meio da observação da presença de halos de inibição que se formavam ao redor dos discos contendo os tratamentos, a partir de 24 horas após a incubação. O diâmetro dos halos foi medido com auxílio de um paquímetro digital no sentido longitudinal e transversal (D1 e D2 em milímetros). E, os halos de inibição dos extratos testados

foram comparados com os do grupo controle, contendo água (mineral estéril), álcool etílico (96 GL) e antibiótico Amoxicilina (0,5 mg mL⁻¹).

3.9 DILUIÇÃO SERIADA

Para a identificação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos realizou-se a diluição dos que apresentaram potencial inibitório no controle das fitobactérias na maior concentração. A partir do extrato “bruto” (50 mg mL⁻¹), constituiu uma diluição 1:2 obtendo-se concentrações de 25 mg mL⁻¹; 12,5 mg mL⁻¹; 6 mg mL⁻¹ e 3 mg mL⁻¹. Foram realizados ensaios de antibiograma bacteriano com as concentrações obtidas avaliando a capacidade de inibição, com o objetivo de identificar a menor fração ativa.

3.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados obtidos nos antibiogramas fúngicos e bacterianos foram submetidos a análise de variância– ANOVA, para avaliação de pelo menos um extrato com potencial efeito biológico, mensurado a partir do percentual de inibição de crescimento micelial.

O efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento micelial foi interpretado considerando delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições por tratamento. Para inferir sobre a precisão experimental foi estimado o coeficiente de variação, conforme a notação apresentada por Pimentel Gomes (2000).

$$CV\% = \frac{100\sqrt{QMR}}{x}$$

Em que: *CV%*: coeficiente de variação experimental, *QMR*: quadrado médio do resíduo da análise de variância, *x*: média experimental.

A comparação das médias dos tratamentos foi realizada utilizando o teste de Scott Knot a 1% de probabilidade. O teste de Scott knott pode ser considerado um teste de agrupamento de médias, pois permite a classificação das médias de tratamentos sem a ocorrência de sobreposição entre os grupos (Pimentel Gomes, 2000).

3.11 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM NEUTRÓFILOS

3.11.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM-RO) autorizou este estudo sob o protocolo CAAE 40947320.2.0000.0011. Os indivíduos eram maiores de idade e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas e regulamentos aplicáveis.

3.11.2 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos do sangue periférico foram obtidos de doadores autodeclarados saudáveis (18 a 40 anos de idade) e que não fizeram uso de nenhum medicamento nas últimas 48 horas. O sangue foi coletado em tubos a vácuo contendo heparina e diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS, NaCl 14 mM, NaH₂PO₄H₂O 2 mM, 7 mMNaHPO₄12H₂O), pH 7,4, após assepsia local. Os neutrófilos foram isolados por um método de gradiente de densidade utilizando Histopaque 1077 de acordo com as instruções do fabricante, conforme metodologia adaptada de Setúbal *et al.*, (2013). Em um tubo o sangue foi adicionado cuidadosamente sobre o reagente Histopaque na proporção 1:1 e submetido a centrifugação a 400g por 30 min. Em seguida, os neutrófilos foram coletados do fundo do tubo, juntamente com os eritrócitos e transferidos para outro tubo. A lise das hemácias foi realizada com tampão de lise (0,15 M NH₄ Cl; 0,01 M KHCO₃; 0,0001 M Na₂ EDTA), homogeneizado e submetido à temperatura de -8°C por 5 min, e depois submetido a centrifugação. Os neutrófilos foram lavados com PBS e uma alíquota de neutrófilos isolados foi usada para determinar o número total de células em uma câmara de Neubauer após a coloração das células (1:20, v/v) com solução de Turk (cristal violeta 0,2% em ácido acético 30%).

3.11.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A citotoxicidade dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* foram determinadas por um ensaio de MTT (brometo tiazolil azul tetrazólio). Para isso os neutrófilos obtidos como descrito no item 3.11.2 foram suspensos em meio de cultura RPMI 1640 (meio sintético complexo) suplementado com gentamicina (100 µg/ mL), L-glutamina (2mM) e 10% de soro fetal bovino, obtendo-se 2x10⁵ células/mL. As células foram incubadas em placas de 96 poços com os extratos em diferentes concentrações (31,5; 62,5; 125; 250 e 500

µg/mL) em um volume final de 200 µL, por 12 e 24h a 37° C em atmosfera umidificada (5% CO₂).

Após o tempo de incubação 10 µL de MTT (5 mg/mL em PBS) e 90 µL de RPMI foram adicionados em cada poço, seguidos de incubação a 37 °C e 5% de CO₂ por 2h. Posteriormente retirou-se 100 µL do sobrenadante de cada poço e adicionou-se 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan produzidos pelas células viáveis. O grau de redução de MTT para formazan foi quantificado pela medição da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 540 nm. As análises dos dados foram realizadas com o software GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos em DO, comparando-se com ao controle.

3.11.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada com a utilização do fluoróforo DCFDA (2',7'-diacetato de diclorofluoresceína, 10 µM) que ao penetrar na célula, é oxidada pelo H₂O₂ intracelular emitindo fluorescência verde.

Para esse ensaio, neutrófilos obtidos como descrito no item 3.11.2 foram suspensos em solução de Hanks (CaCl₂ 1,26 mM; KCl 5,33 mM; KH₂PO₄ 0,44 Mm; MgCl 0,50 mM; MgSO₄ 0,41 mM; NaCl 138 mM; NaHCO₃ 4,0 mM; Na₂HPO₄ 0,30 Mm; C₆H₁₂O₆ 5,60 Mm, vermelho de fenol 0,03 mM) obtendo-se 2x10⁵ células/mL. A solução de células foi incubada nos tempos de 30 e 90 minutos, em placas pretas de 96 poços, com os extratos hidroalcóolicos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* em diferentes concentrações (500, 250, 125, 62,5 e 31,5 µg/mL), com o grupo controle, solução de Hanks (controle negativo) e PMA (phorbol-12-miristato-13-acetato; 500 ng/mL - controle positivo). Após o período de incubação foram adicionados 100 µL de uma solução contendo o fluoróforo DCFDA, diluído em solução de Hanks, seguida de nova incubação por 30 minutos a 37°C, ao abrigo de luz. Em seguida, a fluorescência foi determinada em espectrofotômetro Sinergy HT (Biotek) com excitação de 485 nm e emissão de 528 nm. Os dados foram expressos em fluorescência. As análises dos dados foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.

4. RESULTADOS

4.1 EXTRATOS E FRAÇÕES DE *P. permucronatum*

Extratos aquosos e alcoólicos de *P. permucronatum* foram preparados a partir de folhas, talos e inflorescências da planta, dessa forma 6 diferentes extratos foram estudados (Tabela 1). O fracionamento líquido-líquido deu origem a 3 frações de cada parte da planta, sendo a 1ª fração (fase orgânica), 2ª fração (fase básica) e 3ª fração (fase aquosa), sendo 9 frações investigadas (Tabela 1).

Tabela 1: Extratos produzidos para testes a partir de partes da planta *P. permucronatum*

Extrato	Sigla
Extrato Aquoso das folhas	PpFoAq
Extrato Aquoso dos talos	PpTaAq
Extrato Aquoso das inflorescências	PpInfAq
Extrato Alcoólico das folhas	PpFoAl
Extrato Alcoólico dos talos	PpTaAl
Extrato Alcoólico das inflorescências	PpInfAl
Frações	
1ª Fração do extrato das folhas – fase orgânica	PpFo1ªorg
2ª Fração do extrato das folhas - fase básica	PpFo2ªbas
3ª Fração do extrato das folhas – fase aquosa	PpFo3ªaq
1ª Fração do extrato dos talos – fase orgânica	PpTa1ªorg
2ª Fração do extrato dos talos - fase básica	PpTa2ªbas
3ª Fração do extrato dos talos – fase aquosa	PpTa3ªaq
1ª Fração do extrato das inflorescências – fase orgânica	PpIn1ªorg
2ª Fração do extrato das inflorescências - fase básica	PpIn2ªbas
3ª Fração do extrato das inflorescências – fase aquosa	PpIn3ªaq

Os extratos e frações obtidas a partir da espécie *P. permucronatum* foram testadas *in vitro* no controle dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* e das fitobactérias *Xanthomonas axonopodis* pathovar vesicatoria e *Ralstonia pseudosolanacearum*. Foi identificado também, o perfil citotóxico dos extratos e frações da planta em neutrófilos humanos utilizando as seguintes funcionalidades destas células: viabilidade celular e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE *P. permucronatum*

A análise fitoquímica foi realizada por meio de testes colorimétricos para identificação qualitativa, que determinam a presença ou ausência de classes de metabólitos a partir dos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências da espécie *P. permucronatum*, conforme técnicas para: saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenos, alcalóides, compostos fenólicos e antraquinonas.

Observou-se que nos extratos brutos preparados a partir das folhas da planta, foi possível identificar a presença de quatro diferentes classes de metabólitos secundários: taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides e compostos fenólicos (Tabela 2).

Tabela 2: Triagem fitoquímica para os extratos de folhas de *P. permucronatum*

Classe de metabólito analisada	Extrato bruto das folhas	Coloração
Saponinas	-	Sem espuma
Flavonoides	-	-
Taninos hidrolisáveis	+	Azul
Taninos condensados	-	-
Cumarinas	+	Verde
Triterpenos	-	-
Alcaloides	+	Laranja
Compostos fenólicos	+	Verde
Antraquinona	-	-

Nota: “+” representa uma classe de metabólito presente no extrato, de acordo com os testes realizados. “-” representa uma classe de metabólito ausente no extrato de acordo com os testes realizados.

Já nos extratos preparados a partir dos talos da espécie *P. permucronatum* foi possível identificar a presença de um número maior de metabólitos secundários, sendo eles: flavonoides, taninos condensados, cumarinas, triterpenos e alcaloides, como descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Triagem fitoquímica para os extratos de talos de *P. permucronatum*

Classe de metabólito analisada	Extrato bruto das folhas	Coloração
Saponinas	-	Sem espuma
Flavonoides	+	-
Taninos hidrolisáveis	-	Azul
Taninos condensados	+	-
Cumarinas	+	Verde
Triterpenos	+	-
Alcaloides	+	Laranja
Compostos fenólicos	-	Verde
Antraquinona	-	-

Nota: “+” representa uma classe de metabólito presente no extrato, de acordo com os testes realizados. “-” representa uma classe de metabólito ausente no extrato de acordo com os testes realizados.

A triagem fitoquímica realizada com os extratos das inflorescências da planta também identificou a presença de cinco classes de metabólitos secundários: taninos condensados, cumarinas, triterpenos, alcaloides e compostos fenólicos (Tabela 4).

Tabela 4: Triagem fitoquímica para os extratos de inflorescências de *P. permucronatum*

Classe de metabólito analisada	Extrato bruto das folhas	Coloração
Saponinas	-	Sem espuma
Flavonoides	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	Azul
Taninos condensados	+	-
Cumarinas	+	Verde
Triterpenos	+	-
Alcaloides	+	Laranja
Compostos fenólicos	+	Verde
Antraquinona	-	-

Nota: “+” representa uma classe de metabólito presente no extrato, de acordo com os testes realizados. “-” representa uma classe de metabólito ausente no extrato de acordo com os testes realizados.

4.3 ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA FÚNGICO

O efeito dos extratos e das frações foi interpretado considerando sua natureza alcoólica ou aquosa, de diferentes partes da planta (folhas, talos e inflorescências) (Tabela 1) no controle

dos fungos fitopatogênicos *R. solani* e *S. rolfsii*. Resultados foram considerados positivos quando halos de inibição eram observados, conforme a Figura 3. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA, para avaliação dos percentuais de inibição dos diferentes tratamentos avaliados nesse estudo.

Figura 3: Placa de Petri com fungo *R. solani* e halos de inibição.



Nota: Medida realizada no sentido longitudinal e transversal para quantificação do halo de inibição. Fonte: Elaborado pela autora.

No ensaio de antibiograma com o fungo *R. solani* observa-se na Tabela 5 que os extratos alcoólicos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* (PpFoAl, PpTaAl e PpInfAl) foram eficientes ao apresentarem halos de inibição no controle do fungo, destes o extrato PpTaAl se destaca dos demais por apresentar média de inibição superior ao controle com fungicida.

Tabela 5: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de *P. permucronatum* no controle do fungo *R. solani*.

Tratamento	Média de halo de inibição (mm ²)	Grupo
PpTa1 ^a org	650.9	a
PpTaAl	458.9	b
Controle fungicida	455.2	b
PpIn1 ^a org	349.225	c
PpFo1 ^a org	295.5	c
PpInfAl	254.15	d
PpFoAl	226.175	d
Controle água	.05	e
Controle álcool	.05	e
PpIn3 ^a aq	.05	e
PpIn2 ^a bas	.05	e
PpTa3 ^a aq	.05	e
PpInfAq	.05	e
PpFoAq	.05	e
PpTa2 ^a bas	.025	e
PpFo3 ^a aq	.025	e
PpFo2 ^a bas	.025	e
PpTaAq	.025	e

Nota: Valores médios seguidos de mesma letra na coluna não são diferentes, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os extratos preparados com solvente alcoólico de *P. permucronatum* (PpFoAl, PpTaAl e PpInfAl) também foram eficientes ao inibirem de maneira significativa o crescimento do fungo *S. rolfsii* (Tabela 6), sendo que o extrato PpTaAl apresentou halo com média de inibição superior aos demais.

Tabela 6: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de *P. permucronatum* no controle do fungo *S. rolfsii*.

Tratamento	Média de halo de inibição (mm ²)	Grupo
PpTa1 ^a org	490.2	a
PpTaAl	412.475	a
PpFo1 ^a org	324.3	b
PpIn1 ^a org	276.725	b
PpFoAl	255.15	b
PpInfAl	253.575	b
PpTa2 ^a bas	.05	c
PpFo2 ^a bas	.05	c
PpInfAq	.05	c
PpTaAq	.05	c
PpFoAq	.05	c
PpIn3 ^a aq	.025	c
PpIn2 ^a bas	.025	c
PpTa3 ^a aq	.025	c
PpFo3 ^a aq	.025	c
Controle fungicida	.025	c
Controle água	.025	c
Controle álcool	.025	c

Nota: Valores médios seguidos de mesma letra na coluna não são diferentes, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Entre as frações obtidas de *P. permucronatum* as frações PpFo1^aorg, PpTa1^aorg e PpIn1^aorg apresentaram eficiência no controle do crescimento micelial de *R. solani*, quando comparados com os controles negativos (água e álcool) (Tabela 5). O mesmo pode ser observado no teste com o fungo *S. rolfsii* em que as 1^a frações das três partes da planta (folhas, talos e inflorescências) também apresentaram potencial fungicida ao inibirem o crescimento do micélio (Tabela 6).

A 1^a fração de talo (PpTa1^aorg) foi o tratamento mais eficiente com halo de inibição com média superior ao halo de inibição do fungicida no teste com fungo *R. solani* (Tabela 5). No ensaio com *S. rolfsii* também é possível observar o potencial significativo de inibição do fungo da fração PpTa1^aorg frente aos demais tratamentos (Tabela 6).

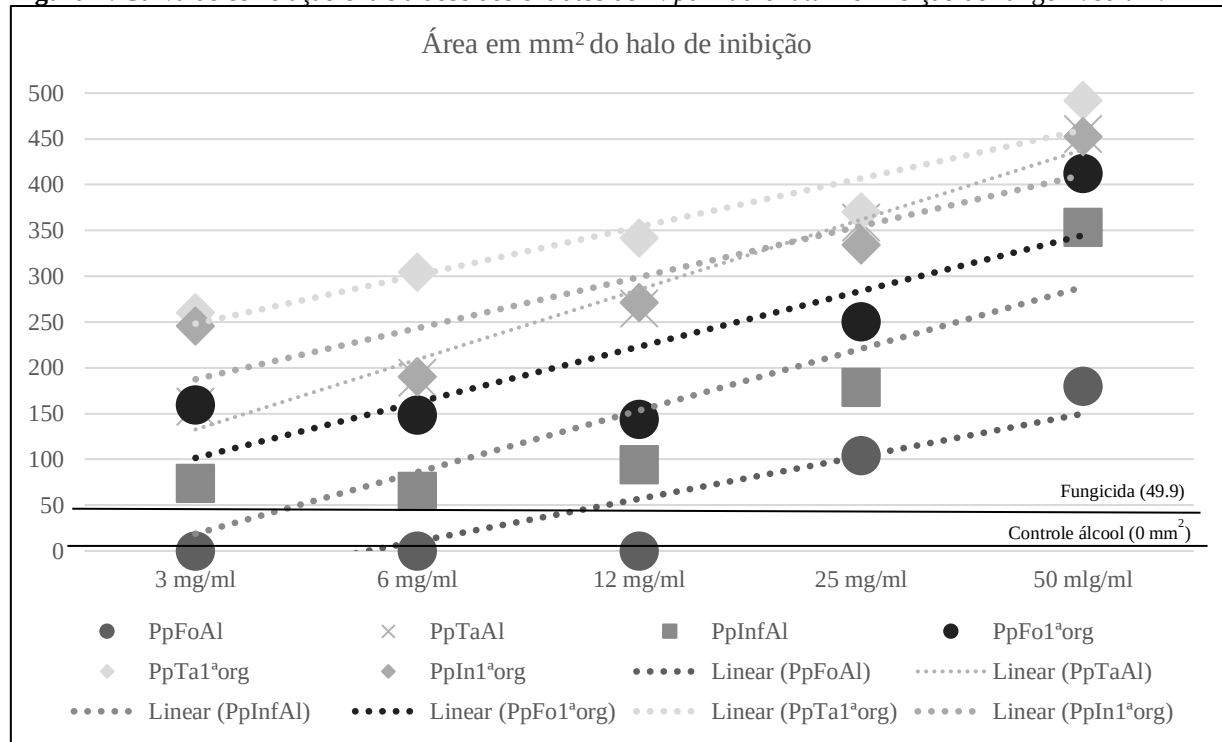
4.3.1 TESTES FÚNGICOS COM EXTRATOS DILUÍDOS

Os extratos e frações que apresentaram potencial inibitório eficientes, foram submetidas a diluição seriada, afim de identificar a menor concentração bioativa no controle dos fungos fitopatogênicos *R. solani* e *S. rolfsii*.

Os extratos alcoólicos de *P. permucronatum* se mostraram eficientes em diferentes concentrações. No teste realizado com o fungo *R. solani* o extrato PpFoAl apresentou halo de

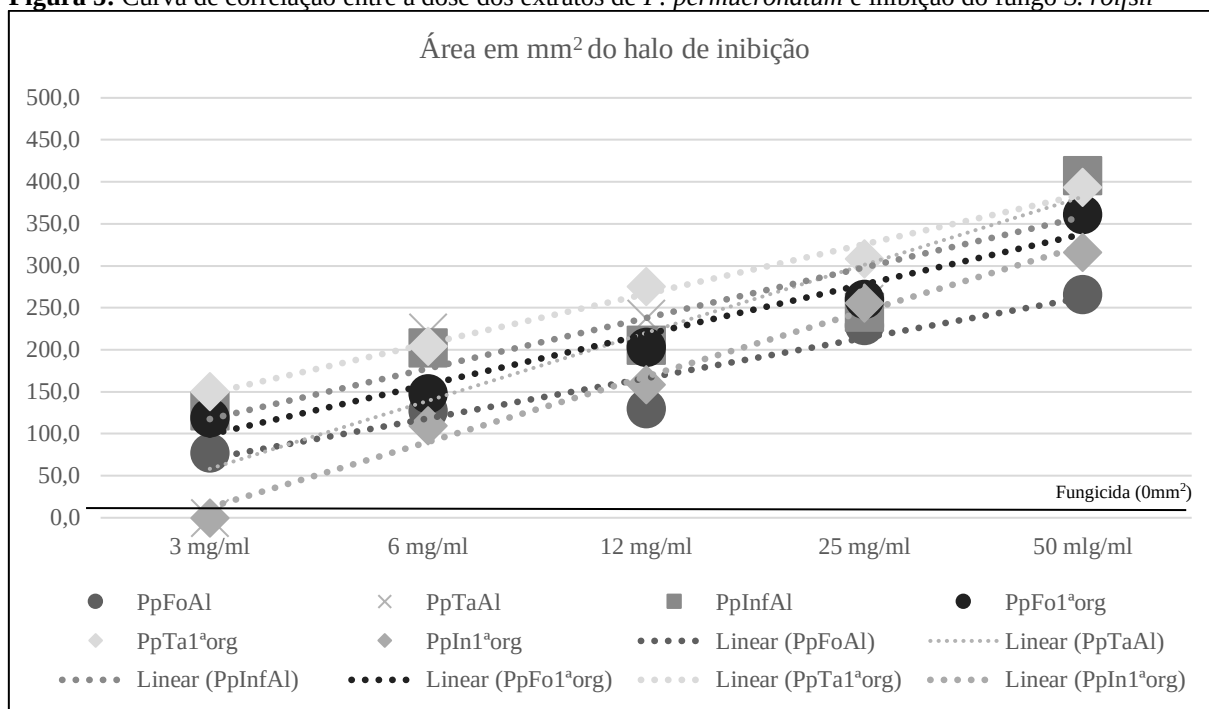
inibição até a concentração 25mg/ml, já os tratamentos PpTaAl e PpInfAl foram eficazes até a última concentração testada (3mg/ml) (Figura 4).

Figura 4: Curva de correlação entre a dose dos extratos de *P. permucronatum* e inibição do fungo *R. solani*.



As 1ª frações das três partes da planta *P. permucronatum* também foram eficazes em diferentes concentrações no controle do fungo *R. solani*, os tratamentos PpFo1ªorg, PpTa1ªorg e PpIn1ªorg foram capazes de inibir o crescimento micelial até a concentração 3mg/ml como mostra o (Figura 4).

De maneira semelhante, no teste de diluição seriada com o fungo *S. rolfsii*, os extratos alcoólicos de Piper apresentaram potencial inibitório em diferentes concentrações. O tratamento PpTaAl foi eficiente até a concentração 6mg/ml, enquanto os extratos PpFoAl, PpInfAl apresentaram potencial fungicida até a concentração 3mg/ml (Figura 5).

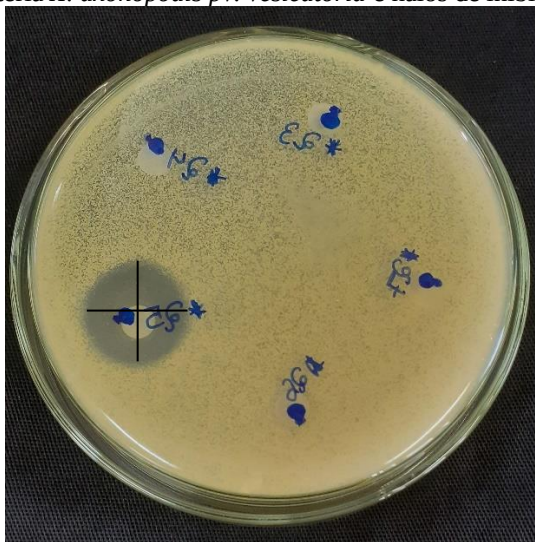
Figura 5: Curva de correlação entre a dose dos extratos de *P. permucronatum* e inibição do fungo *S. rolfsii*

Nos ensaios com o fungo *S. rolfsii* os tratamentos PpFo1^oorg, PpTa1^oorg também apresentaram potencial fungicida até a última concentração estudada (figura 5). Ressalta-se que assim como ocorreu com os extratos, as médias de inibição foram mais significativas nos tratamentos com as maiores concentrações (50mg/ml).

4.4 ENSAIOS DE ANTIBIOGRAMA BACTERIANO

Assim como ocorreu com o antibiograma fúngico, o ensaio bacteriano considerou extratos aquosos e alcoólicos de *P. permucronatum* além de suas frações obtidas pelo método líquido-líquido, totalizando 15 tratamentos conforme a Tabela 1. Resultados foram considerados positivos quando halos de inibição eram observados (Figura 6). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância - ANOVA, para avaliação dos percentuais de inibição dos diferentes tratamentos avaliados nesse estudo.

Figura 6: Placa de Petri com a bactéria *X. axonopodis pv. vesicatoria* e halos de inibição.



Nota: Medida realizada no sentido longitudinal e transversal para quantificação do halo de inibição. Fonte: Elaborado pela autora.

O antibiótico Amoxicilina utilizado como controle positivo apresentou efeito inibitório comparável estatisticamente ao tratamento de melhor desempenho no controle do crescimento dos isolados de *X. axonopodis pv. vesicatoria* (Tabela 7). No entanto, o antibiótico não apresentou efeito na redução do crescimento das colônias de *R. pseudosolanacearum*, nesse isolado a inibição do crescimento foi observada apenas com o uso dos extratos (Tabela 8).

No teste com a bactéria *X. axonopodis pv. vesicatoria*, os extratos alcoólicos de talos (PpTaAl) e inflorescências (PpInfAl) apresentaram potencial bactericida significativos quando comparados com o controle com água e álcool conforme Tabela 7.

Tabela 7: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de *P. permucronatum* no controle da bactéria *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*.

Tratamento	Média de halo de inibição (mm ²)	Grupo
Controle antibiótico	972.9	a
PpTa1 ^a org	838.575	b
PpTaAl	457.35	c
PpIn1 ^a org	214.7	d
PpFo1 ^a org	164.15	d
PpInfAl	139.45	d
PpFoAl	77.525	e
PpIn2 ^a bas	56.575	e
PpFo2 ^a bas	51.375	e
Controle água	.05	e
Controle álcool	.05	e
PpIn3 ^a aq	.05	e
PpTa3 ^a aq	.05	e
PpTa2 ^a bas	.05	e
PpFo3 ^a aq	.05	e
PpInfAq	.05	e
PpTaAq	.05	e
PpFoAq	.05	e

Nota: Valores médios seguidos de mesma letra na coluna não são diferentes, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos com a bactéria *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, foram semelhantes quando comparados com o ensaio com a bactéria *R. pseudosolanacearum*, em que os extratos preparados a base de álcool com as três partes da planta apresentaram halos de inibição significativos no controle da bactéria, quando comparados com os controles negativos com água e álcool (Tabela 8).

Tabela 8: Efeito inibitório dos extratos e fracionados de *P. permucronatum* no controle da bactéria *R. pseudosolanacearum*.

Tratamento	Média de halo de inibição (mm ²)	Grupo
PpTa1 ^a org	109.575	a
PpIn1 ^a org	107.8	a
PpFo1 ^a org	99.2	a
PpFoAl	74.925	b
PpIn2 ^a bas	72.9	b
PpTaAl	71.1	b
PpFo2 ^a bas	65.95	b
PpInfAl	63.8	b
Controle álcool	.05	c
Controle antibiótico	.05	c
PpIn3 ^a aq	.05	c
PpTa3 ^a aq	.05	c
PpTa2 ^a bas	.05	c
PpFo3 ^a aq	.05	c
PpInfAq	.05	c
PpTaAq	.05	c
PpFoAq	.05	c
Controle água	.05	c

Nota: Valores médios seguidos de mesma letra na coluna não são diferentes, de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao testar as frações obtidas no antibiograma bacteriano foi possível observar que as primeiras frações (fase orgânica) das três partes das plantas foram eficientes no controle das bactérias (Tabelas 7 e 8). *In vitro*, 1^a e 2^a frações dos extratos de folhas e inflorescências (PpFo1^aorg, PpIn1^aorg, PpFo2^abas e PpIn2^abas) inibiram o crescimento das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Tabela 7). Entretanto, a 1^a fração do extrato preparado com os talos da planta (PpTa1^aorg) apresentou um resultado ainda mais promissor por apresentar semelhança estatística com o controle com antibiótico.

Resultados semelhantes foram obtidos com a bactéria *R. pseudosolanacearum* (Tabela 8). Neste caso, a inibição do crescimento bacteriano foi significativa com as 1^a frações dos extratos das três partes da planta (PpTa1^aorg, PpFo1^aorg, PpIn1^aorg) sendo esses os melhores tratamento em inibição dessa bactéria, quando comparados com os controles água, álcool e antibiótico.

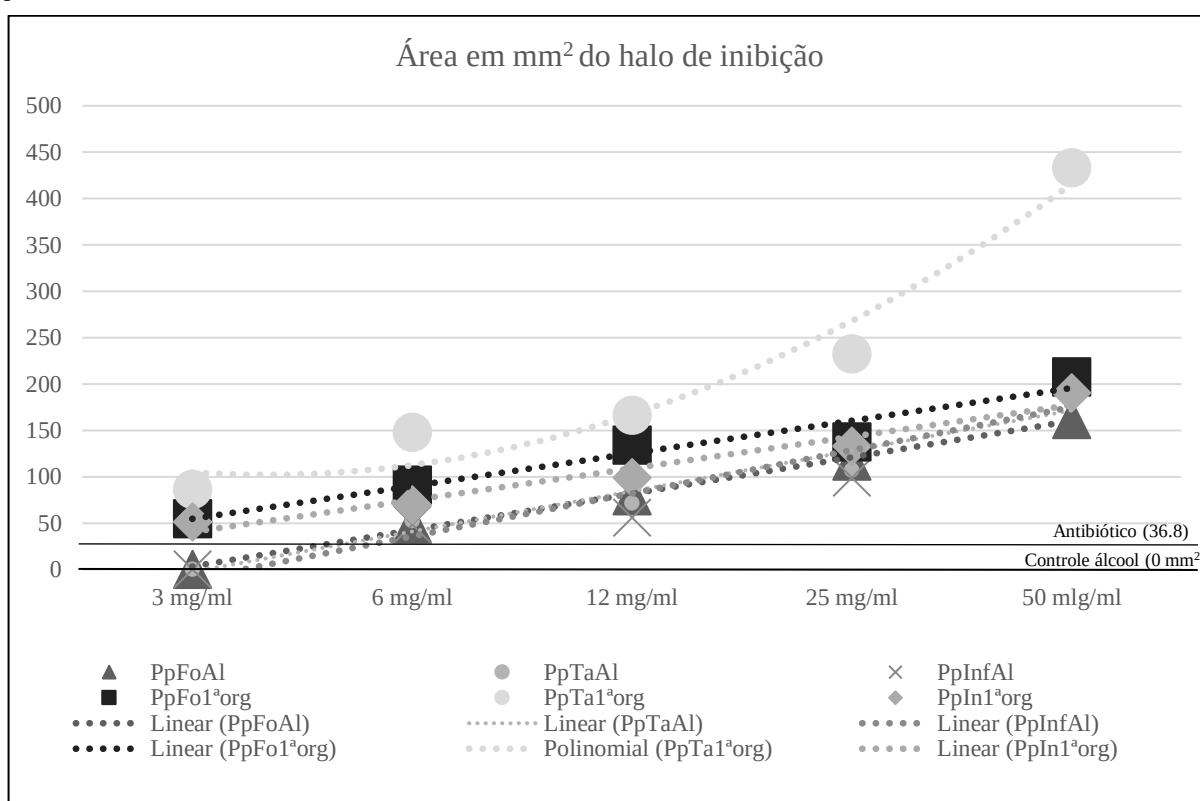
4.4.1 TESTES BACTERIANOS COM EXTRATOS DILUÍDOS

Posteriormente a seleção dos extratos que inibiram o crescimento bacteriano foram realizados ensaios de diluição seriada, visando identificar a menor concentração bioativa dos extratos no controle do crescimento bacteriano de *R. pseudosolanacearum* e *X. axonopodis* pv.

vesicatoria. Apesar dos extratos apresentarem média de halo de inibição maior quando em maiores concentrações, os extratos também apresentaram eficiência em concentrações mais baixas no controle das duas bactérias.

No ensaio com a bactéria *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* observa-se na figura 7 que os extratos alcoólicos de *P. permucronatum* PpFoAl, PpTaAl e PpInfAl apresentaram efeito inibitório em diferentes concentrações, sendo eficientes até a concentração 6mg/ml, não apresentando halos de inibição na menor concentração testada (3mg/ml).

Figura 7: Curva de correlação entre a dose dos extratos de *P. permucronatum* e inibição da bactéria *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*.

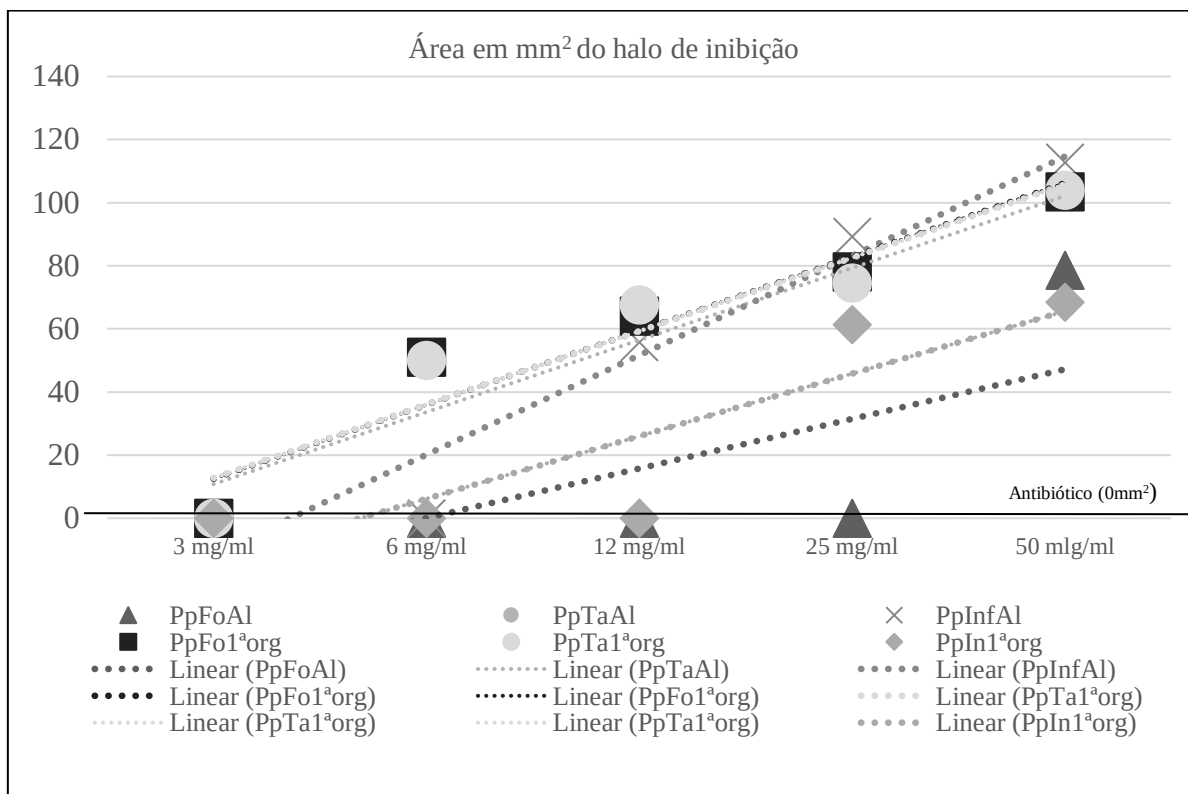


É possível observar na figura 7, que as 1ª frações de talos (PpTa1ªorg), folhas (PpFo1ªorg) e inflorescências (PpIn1ªorg) que apresentaram potencial inibitório no primeiro teste, quando diluídos se mostraram eficientes até a menor concentração testada (3 mg/ml) para o controle de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. o que propõe o potencial desses tratamentos em diferentes concentrações frente a bactéria causadora da Mancha bacteriana.

No teste com a bactéria *R. pseudosolanacearum* os extratos diluídos se comportaram de maneira variada, uma vez que o tratamento PpTaAl apresentou inibição do crescimento bacteriano até a concentração 6mg/ml, o extrato PpInfAl foi eficiente até a concentração

12mg/ml e o extrato de folha se mostrou eficaz apenas na maior concentração (Figura 8).

Figura 8: Curva de correlação entre a dose dos extratos de *P. permucronatum* e inibição da bactéria *R. pseudosolanacearum*.



Observa-se na figura 8 que as frações de folha (PpFo1ªorg) e talos (PpTa1ªorg) foram eficientes em inibir a bactéria *R. pseudosolanacearum* até a concentração 6 mg/ml, resultados que se assemelham aos obtidos com a bactéria *X. axonopodis pv. vesicatoria*, o que comprova a eficiência das 1ª frações obtidas a partir dos extratos de *P. permucronatum* no controle dessas bactérias.

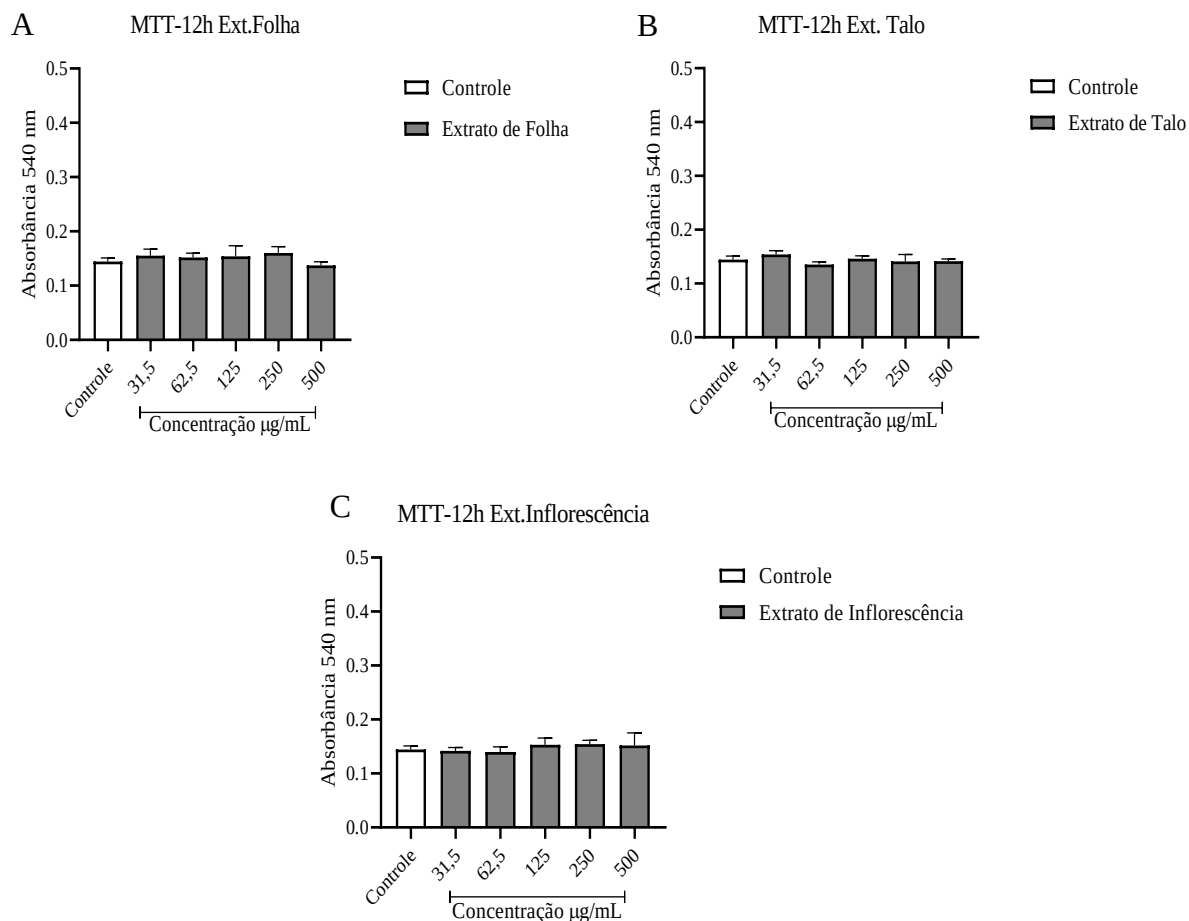
4.5 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM NEUTRÓFILOS

4.5.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT

A viabilidade celular foi avaliada considerando dois tempos de incubação 12 e 24 horas, da suspensão de neutrófilos humanos com os extratos em diferentes concentrações. No tempo de 12 horas de incubação, os extratos de folhas, talos e inflorescências, nas concentrações 31,5, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL, não alteraram a viabilidade dos neutrófilos, quando comparados com o controle negativo (RPMI) (Figura 9). Estas descobertas indicam que os extratos brutos

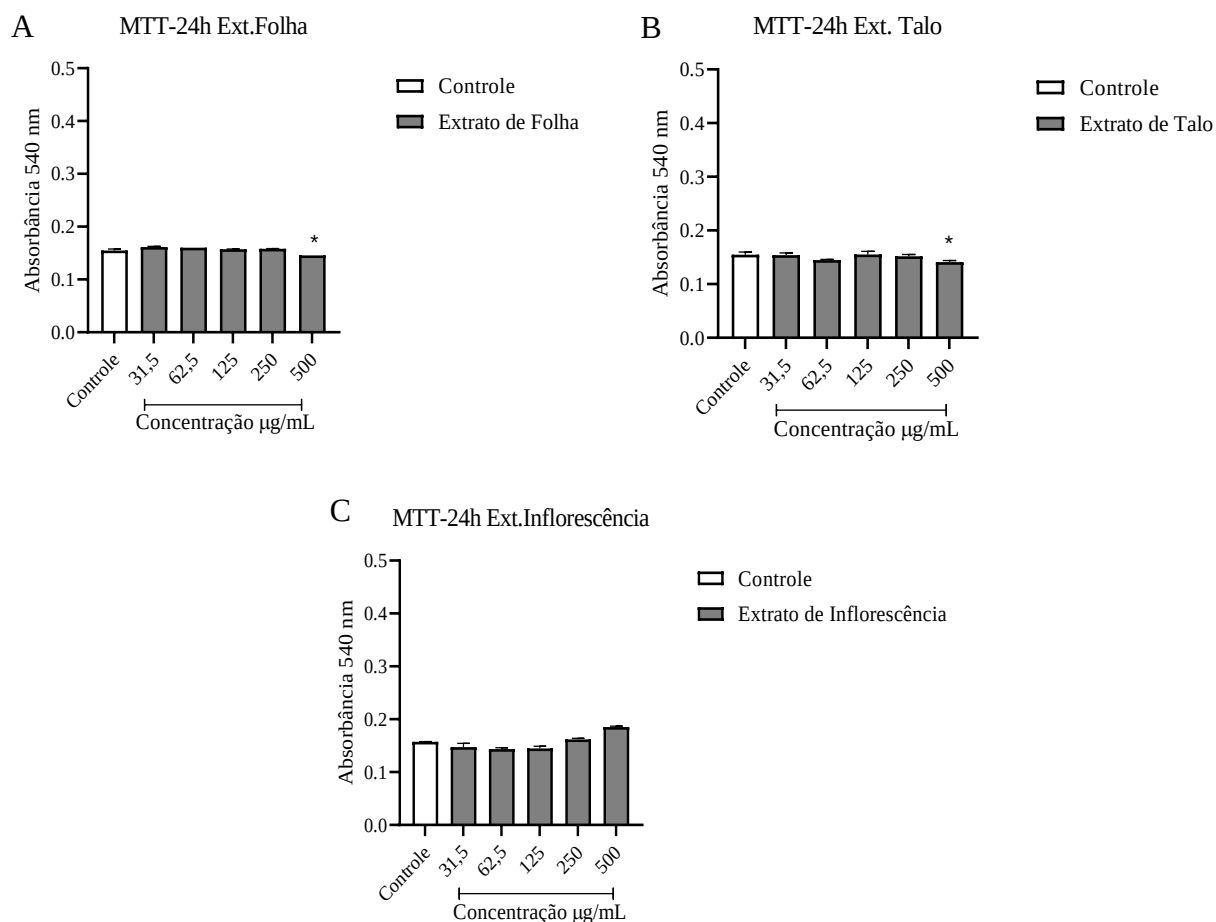
de *P. permucronatum* utilizados nesse estudo, nesse período de tempo e nessas concentrações não são tóxicos para os neutrófilos humanos.

Figura 9: Efeito dos extratos de folhas (Fig.A), talos (Fig.B) e inflorescências (Fig.C) de *P. permucronatum* sobre a viabilidade de neutrófilos pelo método de MTT no tempo de incubação de 12h.



No período de incubação de 24 horas observou-se uma diferença estatística dos extratos de folha e talo na concentração 500 µg/mL quando comparado com o controle negativo (RPMI) (Figura 10), o que pode indicar um perfil tóxico desses extratos em concentrações elevadas, quando expostos por um maior período com as células. Já as demais concentrações desses extratos (31,5 - 250 µg/mL) e o extrato das inflorescências da planta, em todas as concentrações estudadas, não alteraram a viabilidade dos neutrófilos, comparados com o controle (RPMI) (Figura 10).

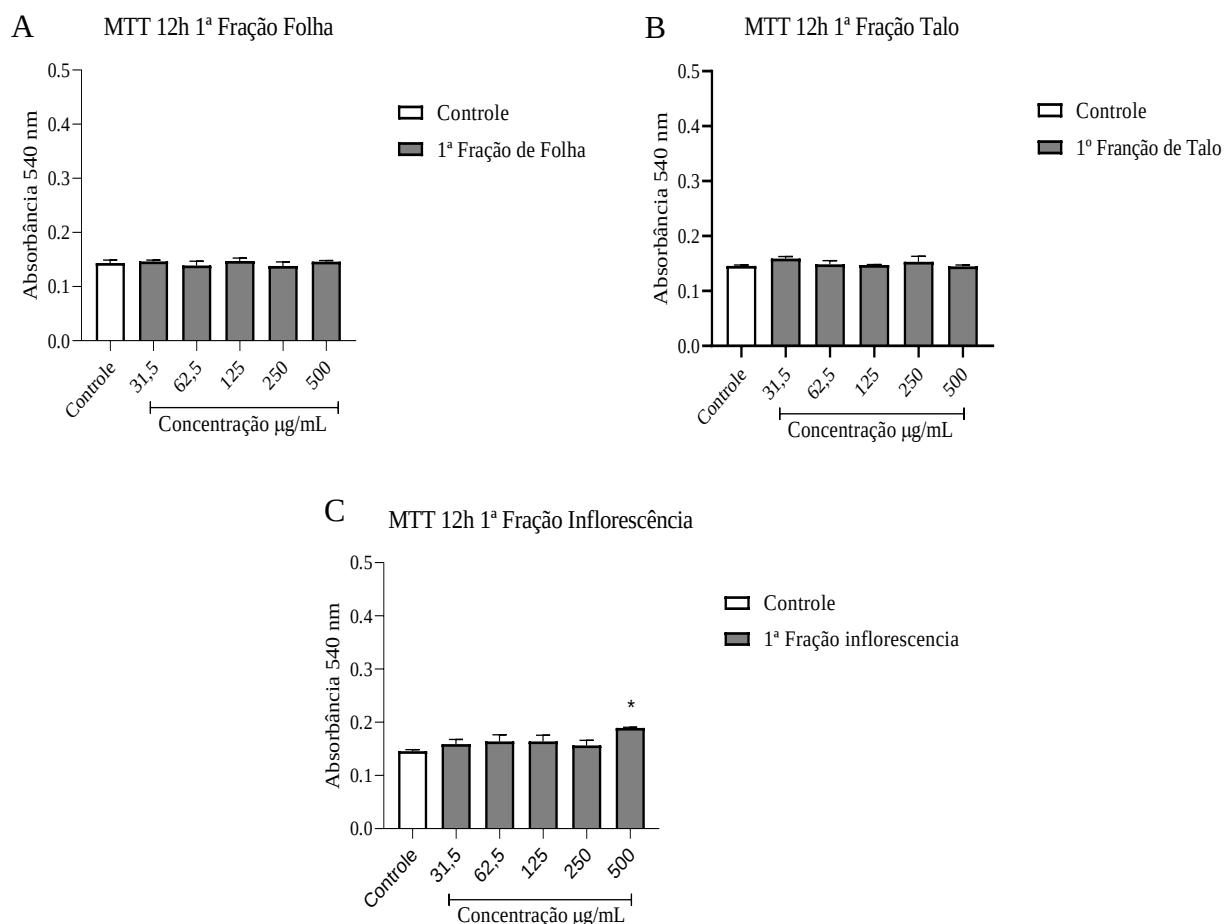
Figura 10: Efeito dos extratos de folhas (Fig.A), talos (Fig.B) e inflorescências (Fig.C) de *P. permucronatum* sobre a viabilidade de neutrófilos pelo método de MTT no tempo de incubação de 24h. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (RPMI).



As 1ª frações (fase orgânica) dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* obtidas pelo método descrito no item 3.4, também foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com neutrófilos humanos, a fim de identificar a ação citotóxica destas, em diferentes concentrações nos tempos de 12 e 24 horas de incubação.

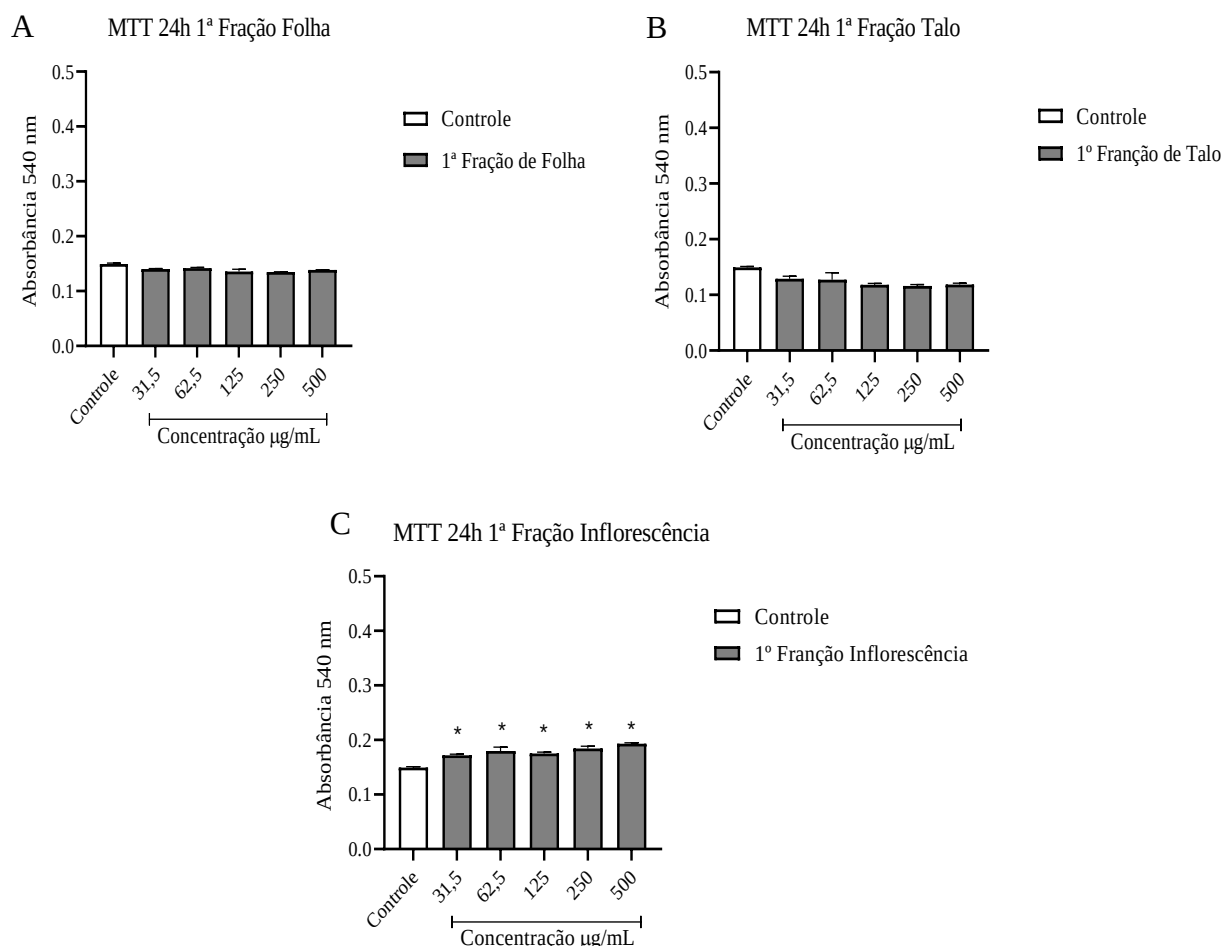
Como mostra a figura 11, a incubação das 1ª frações dos extratos de folhas, talos e inflorescências da espécie, nas concentrações 31,5, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL, não afetaram a viabilidade de neutrófilos humanos no tempo de 12 horas de incubação. Observa-se ainda que, a 1ª fração de inflorescência (Figura 11 – C) na maior concentração estudada permitiu uma melhor metabolização do MTT pelas células viáveis, quando comparado com o controle com RPMI. Dessa forma, assim como ocorreu com os extratos brutos no período de incubação de 12h, as frações estudadas não apresentaram toxicidade celular.

Figura 11: Efeito das 1ª frações dos extratos de folhas (Fig.A), talos (Fig.B) e inflorescências (Fig.C) de *P. permucronatum* sobre a viabilidade de neutrófilos pelo método de MTT no tempo de incubação de 12h. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (RPMI).



Após 24 horas de incubação dos neutrófilos humanos com diferentes concentrações das 1ª frações dos extratos de folha e talo de *P. permucronatum*, foi possível observar que a viabilidade celular não sofreu alteração em nenhuma concentração, quando comparada com o controle negativo (RPMI) (Figura 12). A 1ª fração de inflorescência da planta apresentou diferença estatística do controle com o meio RPMI em todas as concentrações testadas (31,5 - 500 µg/mL, nesse período de incubação com as células, que indica que esse tratamento induziu melhor a metabolização do MTT pelas células viáveis (Figura 12).

Figura 12: Efeito das 1ª frações dos extratos de folhas (Fig.A), talos (Fig.B) e inflorescências (Fig.C) de *P. permucronatum* sobre a viabilidade de neutrófilos pelo método de MTT no tempo de incubação de 24h. * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (RPMI).

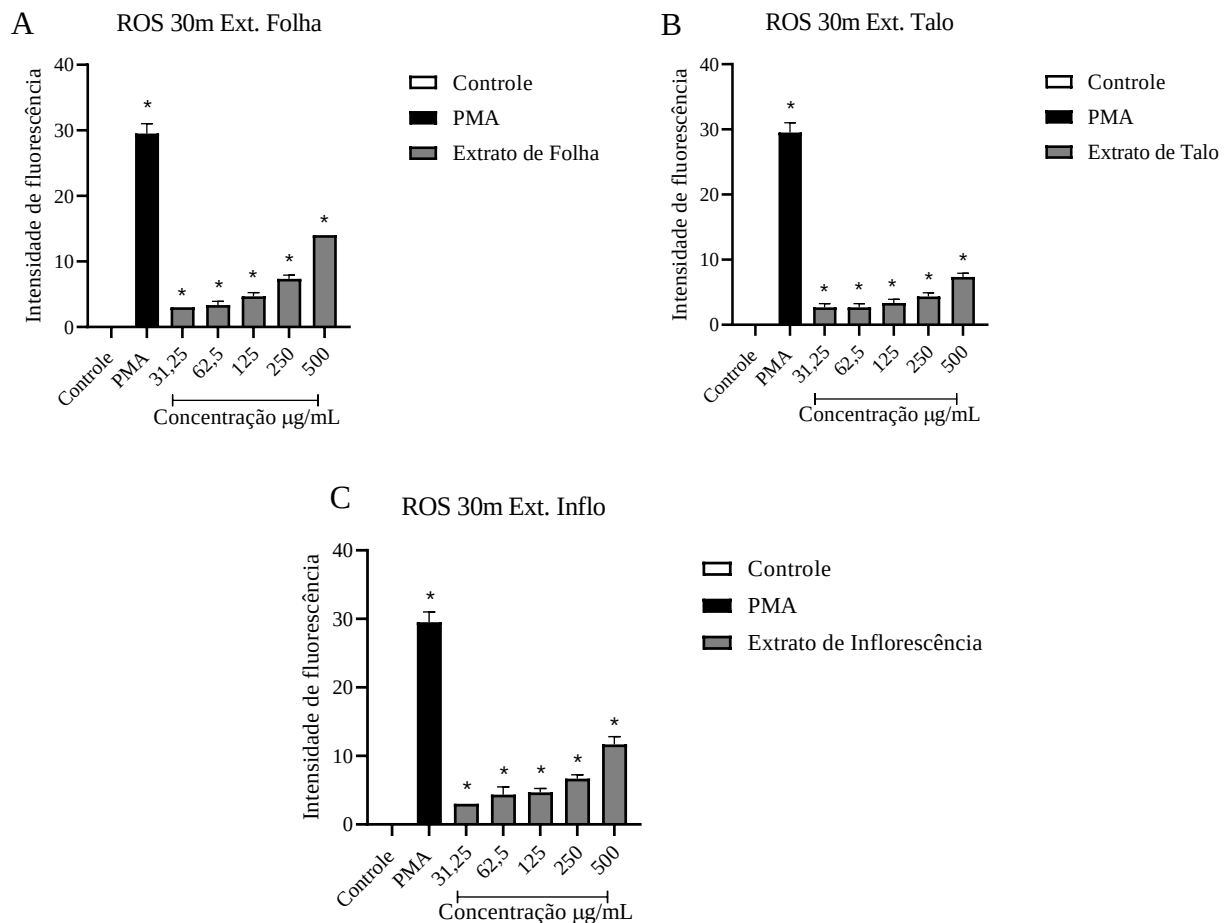


4.5.2 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Foram realizados experimentos para avaliar o efeito dos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* sobre a produção de ROS por neutrófilos humanos. Para isso as células foram incubadas com os extratos nas concentrações 31,5, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL, meio HANKS (controle negativo) ou PMA (controle positivo) nos tempos de 30 e 90 minutos.

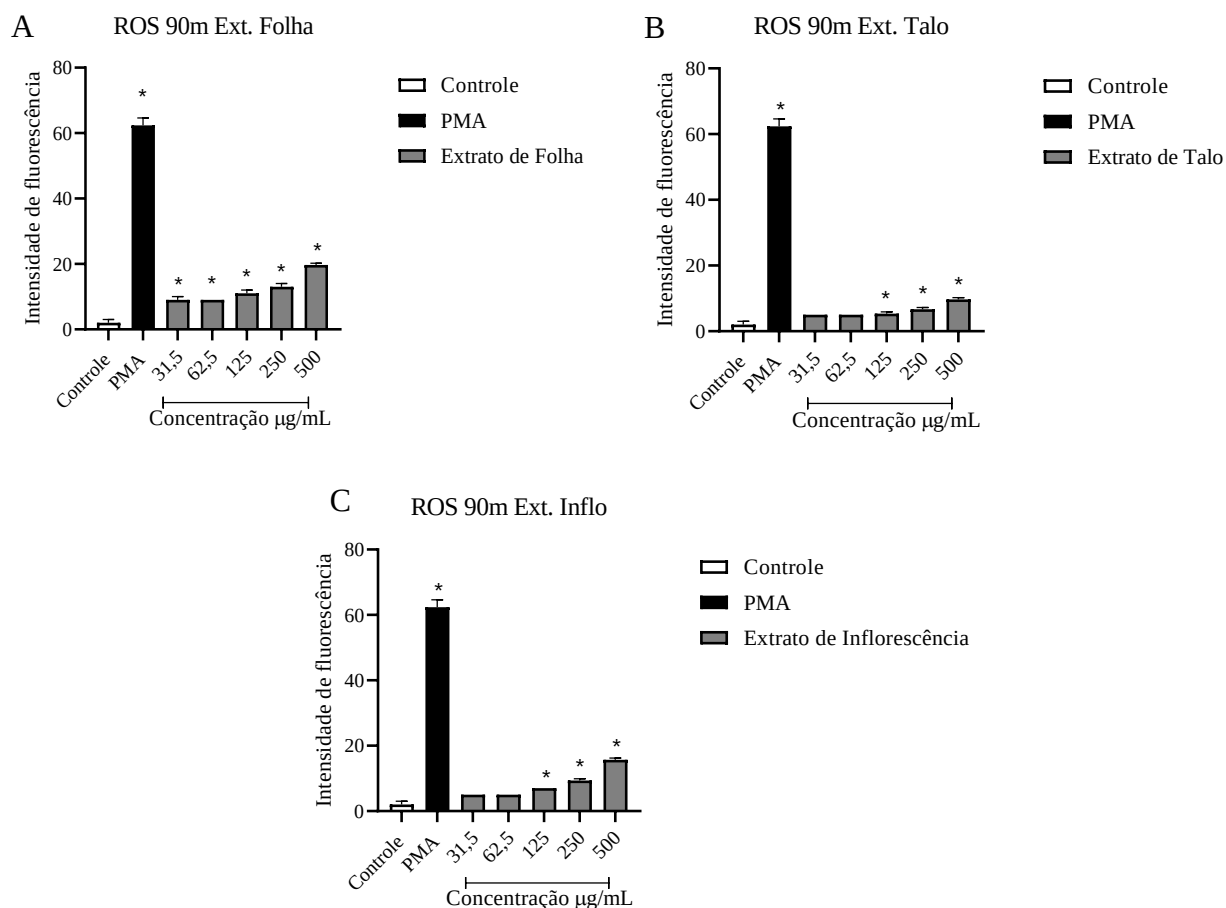
É possível observar na figura 13 que os extratos brutos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* investigados nesse estudo, assim como o controle PMA, induziram de maneira significativa a liberação de ROS em todas as concentrações estudadas, no período de incubação de 30 minutos, comparado com o controle negativo (meio).

Figura 13: Efeito dos extratos de *P. permucronatum* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 30 minutos (Fig. A-extrato de folha; Fig. B-Extrato de talo; Fig. C-Extrato de inflorescência). * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (HANKS).



No tempo de incubação de 90 minutos dos extratos brutos com os neutrófilos, nota-se que a produção de ROS dessas células ocorreu de maneira diferente entre os extratos. Os extratos brutos de talos e inflorescência induziram a produção de ROS apenas nas maiores concentrações (125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), já com os extratos brutos das folhas da planta, a produção de ROS continuou em todas as concentrações além de um aumento significativo em relação ao tempo de 30 minutos de incubação (Figura 14).

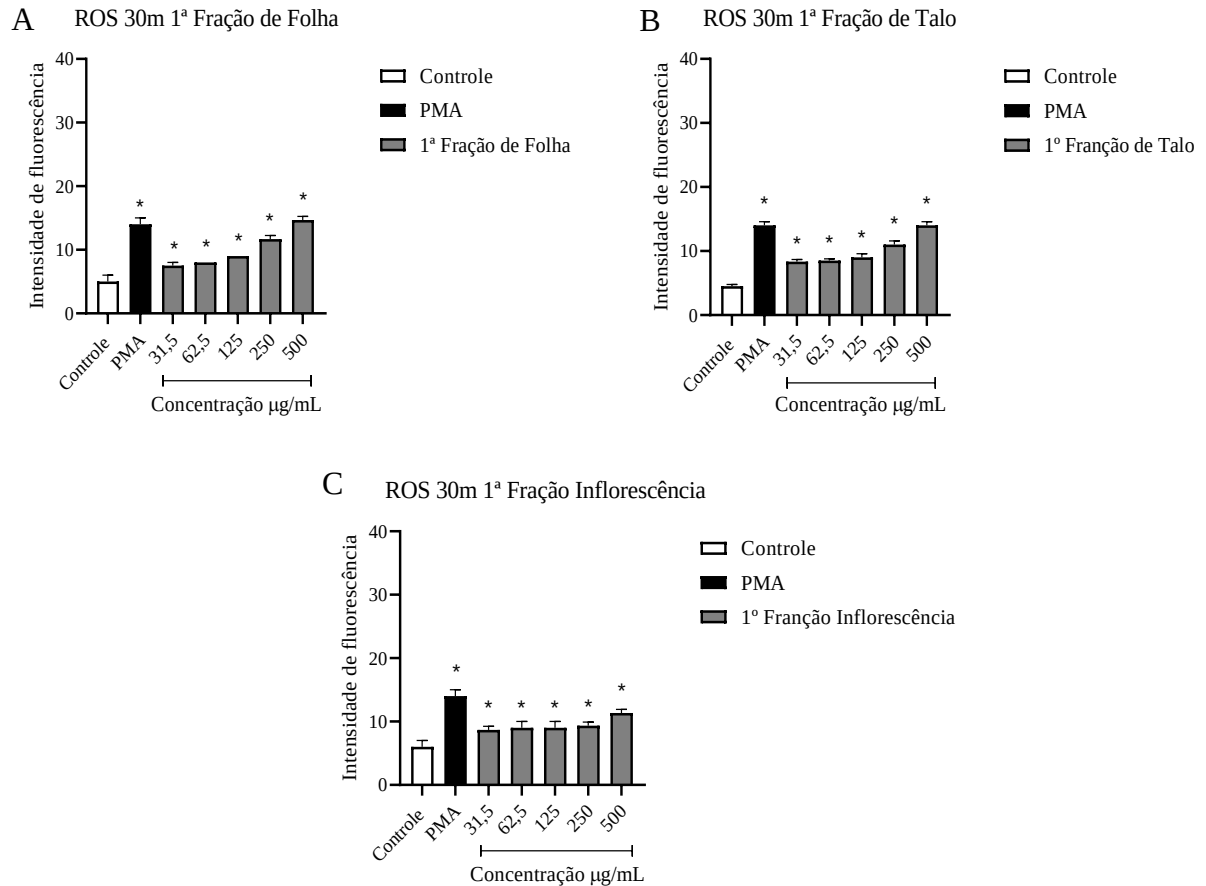
Figura 14: Efeito dos extratos de *P. permucronatum* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 90 minutos (Fig. A-extrato de folha; Fig. B-Extrato de talo; Fig. C-Extrato de inflorescência). * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (HANKS).



Os ensaios de determinação da produção de espécies reativas de oxigênio, também foram realizados com as 1ª frações de cada extrato bruto desse estudo, obtidas a partir do método descrito no item 3.4., afim de avaliar a capacidade dos fracionados em estimular a produção de ROS por neutrófilos humanos. A avaliação foi realizada considerando dois tempos de incubação, 30 e 90 minutos, dos neutrófilos juntamente com as 1ª frações dos extratos de folhas, talos e inflorescências, em diferentes concentrações (31,5, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL), meio HANKS (controle negativo) ou PMA (controle positivo).

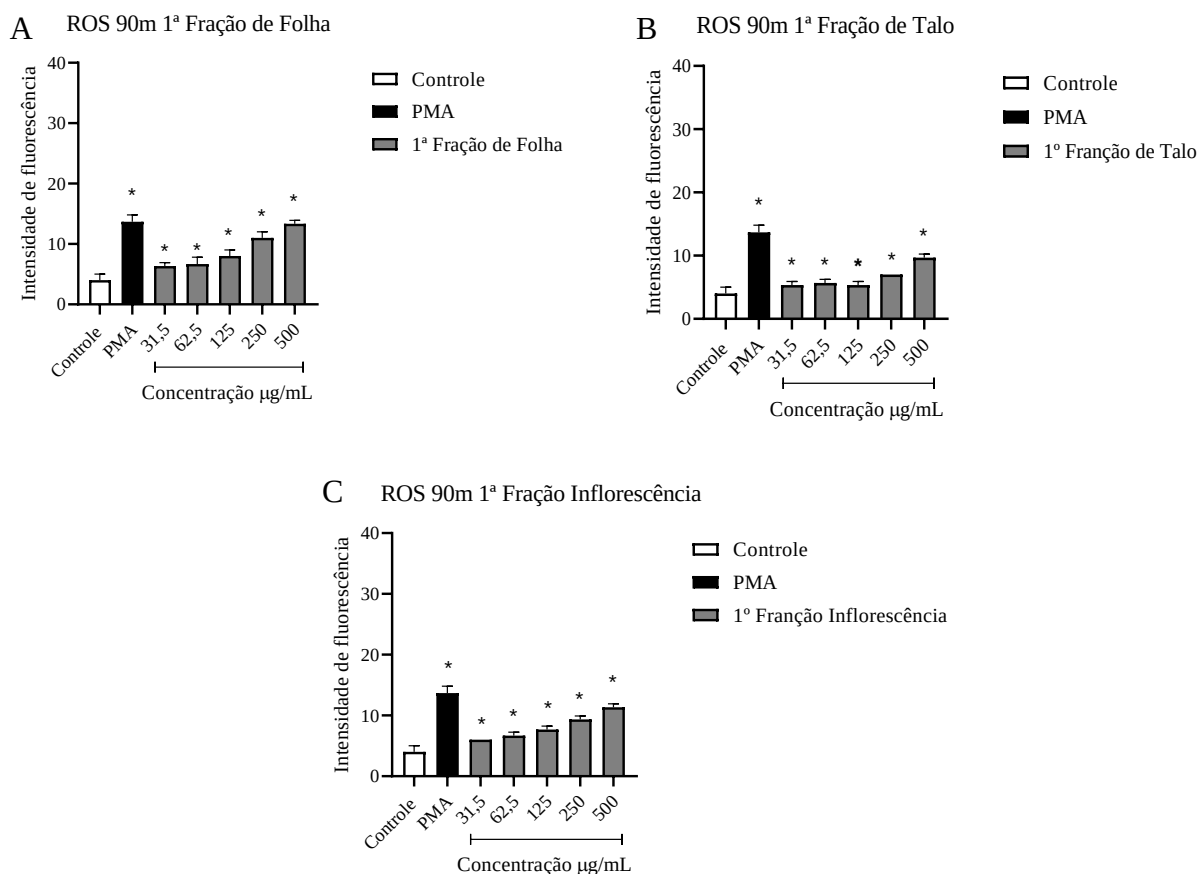
Observa-se que após 30 minutos de incubação, as 1ª frações dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, estimularam os neutrófilos a produzirem ROS de maneira significativa em todas as concentrações estudadas (31,5 – 500 µg/mL), não havendo diferença estatística como o controle positivo (PMA) (Figura 15).

Figura 15: Efeito das 1ª frações dos extratos de *P. permucronatum* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 30 minutos (Fig. A-1ª fração do extrato de folha; Fig. B-1ª fração do extrato de talo; Fig. C-1ª fração do extrato de inflorescência). * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (HANKS).



O efeito das frações da espécie vegetal sobre as células permaneceu no tempo de 90 minutos de incubação, em que é possível observar que houve a produção de espécies reativas de oxigênio em diferentes concentrações, comparado com o controle negativo (meio HANKS). Nesse tempo os tratamentos também não apresentaram diferença significativa em relação ao controle positivo (PMA) (Figura16).

Figura 16: Efeito das 1ª frações dos extratos de *P. permucronatum* sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos humanos no tempo de incubação de 90 minutos (Fig. A-1ª fração do extrato de folha; Fig. B-1ª fração do extrato de talo; Fig. C-1ª fração do extrato de inflorescência). * $p < 0,05$ em comparação com o controle negativo (HANKS).



É possível observar nos gráficos que embora os extratos (figura 13 e 14) e as frações (figuras 15 e 16) tenham induzido a liberação de ROS, não houve diferença estatística quando comparado com o PMA (controle positivo), o que pode indicar a produção não exacerbada de espécies reativas de oxigênio, descartando a possibilidade de toxicidade celular.

5. DISCUSSÃO

Dada a busca por métodos alternativos para o controle de fitopatógenos, que minimize a utilização de agrotóxicos na agricultura do Brasil, o presente trabalho estudou a possibilidade de controlar o crescimento de fungos e bactérias fitopatogênicas, com extratos vegetais alcoólicos e aquosos de folhas, talos e inflorescência da espécie *Piper permucronatum* e suas frações.

O trabalho foi conduzido considerando duas formas para obtenção de extratos, uma vez que existem estudos que demonstram que, tanto extratores aquosos (base polar) quanto alcoólicos (apolar) podem ser utilizados para extrair substâncias com ações inibitórias (Souza *et al.*, 2019; Fonseca *et al.*, 2020).

Dessa forma, extratos aquosos e alcoólicos de *P. permucronatum* foram preparados a partir de folhas, talos e inflorescências da planta, totalizando 6 diferentes extratos (PpFoAq, PpTaAq, PpInfAq, PpFoAl, PpTaAl, PpInfAl). Com a realização do fracionamento líquido-líquido foram obtidas três frações de cada parte da planta: PpFo1^aorg, PpFo2^abas, PpFo3^aaq, PpTa1^aorg, PpTa2^abas, PpTa3^aaq, PpIn1^aorg, PpIn2^abas e PpIn3^aaq. No total 15 tratamentos provenientes da espécie *P. permucronatum* foram estudados.

Espécies vegetais que apresentam propriedades medicinais, antimicrobiana, inseticida, entre outros, possuem em sua composição substâncias bioativas com ação antioxidante denominados metabólitos secundários, que são definidos como compostos naturais produzidos pelas plantas, com capacidade de fornecer proteção a estresses bióticos e abióticos (Pereira; Cardoso 2012; Borges; Amorim 2020). O metabolismo secundário vegetal é formado por compostos orgânicos com potencial atividade biológica (Cunha *et al.*, 2016).

Dada a importância da identificação de metabólitos secundários presentes em espécies promissoras, foi realizado nesse estudo a análise fitoquímica dos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*. A triagem fitoquímica realizada possibilitou identificar a presença dos seguintes metabólitos secundários na planta: flavonoides, taninos hidrolisáveis e condensados, cumarinas, triterpenos, alcaloides e compostos fenólicos.

Os resultados obtidos permitem observar que a espécie *P. permucronatum* possui em sua composição uma especificidade de compostos químicos distintos para cada parte da planta estudada. A diferença de constituintes químicos nos órgãos de espécies do gênero *Piper* já foi descrita na literatura no estudo de Facundo *et al.*, (2008), ao estudarem talos e frutos de *Piper hispidum* e *Piper tuberculatum*.

Observa-se que ao realizar o teste para detectar saponinas, após agitação, aquecimento e resfriamento não foi possível observar a formação de espuma em nenhum dos extratos de *P. permucronatum*. Assim como observado para a classe de metabólito antraquinona.

Os testes para investigar a presença de flavonoides, por meio do teste de Shinoda, indicaram a presença dessa classe de metabólito apenas nos extratos de talos da planta (mudança de cor). Resultados semelhantes foram obtidos por Kloss *et al.*, (2016) ao detectarem a presença de flavonoides nos extratos dos talos de *Piper umbellatum* e a ausência deste composto nos extratos de suas inflorescências.

Os flavonoides são descritos por apresentarem efeitos antimicrobianos, antivirais, citotóxico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, antiinflamatório, antiulcerogênico e antiplaquetário (Machado *et al.*, 2008). Essa classe de metabólitos pode estar associada ao potencial bactericida dos extratos de talos de *P. permucronatum* no controle das bactérias fitopatogênicas *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* patovar *vesicatoria* descrita nos estudos de Bastos (2018).

Os testes de reação de cloreto férrico para identificar taninos resultaram na presença desse composto nos extratos das três partes da planta *P. permucronatum*, sendo que no extrato de folha foram detectados taninos hidrolisáveis (caracterizado pela coloração azul escura), já nos extratos de talos e inflorescências foram identificados taninos condensados (caracterizado pela coloração verde).

A divisão dos taninos ocorre de acordo com sua estrutura química. Os taninos hidrolisáveis possuem em sua composição monômeros de ácido gálico ou ácido elágico, já os taninos condensados são formados pela polimerização de unidades de catequina (Paiva *et al.*, 2002). Tanto os taninos condensados e hidrolisados são descritos na literatura por apresentarem potencial controle a microrganismos (Monteiro *et al.*, 2005).

Com o teste de Salkowski foi possível identificar a mudança de coloração nos extratos provenientes dos talos e inflorescências de *P. permucronatum*, o que indica a presença de Triterpenos na composição destes, o que não foi observado no extrato preparado com as folhas da planta. O mesmo foi analisado no estudo de Freire *et al.*, (2022) ao avaliarem e identificarem a presença de triterpenos nos extratos de talos e inflorescências de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum* e a ausência deste metabólito nos extratos preparados a partir das folhas dessas espécies, o que pode ser uma característica do gênero *Piper*.

Os triterpenos são importantes moléculas que devido a sua complexidade estão fora do alcance da síntese química, e que formam um dos grupos mais numerosos e diversos de produtos naturais vegetais (Thimmappa *et al.*, 2014). A atividade antimicrobiana dos

triterpenos foi descrita por Smania (2003) ao avaliar e constatar a capacidade deste no controle de fungos e bactérias, o que pode indicar o potencial de espécies vegetais que possuem em sua composição essa classe de metabólitos, o que foi identificado em espécies do gênero *Piper*.

O teste para detecção de compostos fenólicos indicou a presença deste nos extratos de folhas e inflorescências de *P. permucronatum* caracterizada pelo surgimento da coloração verde ao contato com o cloreto férrico. Já nos extratos de talos dessa planta foi constatada a ausência dessa classe de metabólito, uma vez que não ocorreu a mudança de cor.

Silva *et al.*, (2010) apontam benefícios à saúde humana a partir dos compostos fenólicos, sendo sua capacidade relacionada a atividade anti-inflamatória, antioxidante e ação de radicais livres no organismo. Esse estudo aponta a capacidade promissora de espécies pertencentes do gênero *Piper*, visto que a presença de compostos fenólicos também foi descrita em folhas, talos e inflorescências de *Piper mollicomum* Aubl. (Almeida *et al.*, 2019), assim como nas folhas e inflorescências de *P. permucronatum*.

A triagem fitoquímica identificou a presença de cumarinas nos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, por meio da fluorescência de cor verde. As cumarinas apresentam ampla atividade biológica como agente anticoagulante, antioxidante, antiviral, antidiabético, antibacteriano e antifúngico (Franco *et al.*, 2021).

A atividade fungicida dessa classe de metabólito secundário foi observada por Sousa *et al.*, (2018) na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum musae* frente a cumarina isolada de óleos de cumaru (*Dipteryx odorata*). O estudo de Souza *et al.*, (2005) destacou o potencial de isolados de cumarinas no controle de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que reforça o potencial destas no controle de microorganismos, assim como o potencial das espécies que compõem em sua composição esse metabólito.

A classe de metabólito dos alcaloides também foi identificada nos extratos estudados, nos quais em contato com o reagente de Dragendorff foi possível detectar a formação de precipitado de cor laranja nos extratos de folhas, talos e inflorescência de *P. permucronatum*, o que caracteriza sua presença. Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que contêm nitrogênio em estado de oxidação negativa, com estrutura variada (Pelletier, 2001).

Existem aproximadamente 5.500 alcaloides descritos atualmente, a classe está entre os compostos de maior interesse econômico e medicinal por apresentarem substâncias altamente eficientes e com potencial microbicida (Roy, 2017). Produzidos por uma variedade de seres vivos, como plantas, bactérias e animais, os alcaloides tem sido utilizados na medicina desde a antiguidade, apresentando potencial antimalárico, antitumorais, antiasmáticos e antibacteriano (Barbieri *et al.*, 2017). Leyva-Acuna *et al.*, (2021) também evidenciaram a atividade fungicida

de alcaloides isolados do extrato de uma variedade de planta na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus*.

A presença de cumarinas e alcaloides nos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* pode indicar uma característica específica do gênero *Piper*, uma vez que Gonçalves e Lima (2016) ao realizarem a triagem fitoquímica dos extratos de folhas e inflorescência de *P. tuberculatum* detectaram a presença de cumarinas e alcaloides em ambos os extratos. Esses metabólitos também foram identificados em extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. mollicomum* (Almeida *et al.*, 2019) e *P. hispidum* (Freire *et al.*, 2022).

Os compostos identificados nos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* se relacionam ao potencial biológico da espécie, ao tempo em que impulsionam novas pesquisas.

Baseado no fato de que piperáceas apresentam em sua composição, moléculas que tem demonstrado ação ovicida (Krinski *et al.*, 2018), larvicida (Macedo *et al.*, 2018), antimicrobiana (Bohatch Junior *et al.*, 2016), inseticida (Braga *et al.*, 2017), entre outros, priorizou-se neste trabalho que a espécie *P. permucronatum* possa apresentar em sua composição substâncias com potencial de inibir fitopatógenos. Efeito dos compostos presentes na espécie *P. permucronatum* em organismos patogênicos indicam o potencial dessa planta para sua futura utilização no controle de pragas e doenças (Santos *et al.*, 2016).

Nesse sentido, foram realizados experimentos com os extratos e frações obtidas da espécie *P. permucronatum* no controle dos fungos fitopatogênicos *R. solani* e *S. rolfsii* e das fitobacterias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum* a fim de identificar o potencial bioativo destes tratamentos.

Nos testes realizados com os fungos fitopatogênicos, foi possível observar que os extratos alcoólicos das folhas (PpFoAl), talos (PpTaAl) e inflorescências (PpInfAl) inibiram de maneira significativa o crescimento dos fungos *R. solani* e *S. rolfsii*, quando comparados com o grupo controle negativo (álcool e água). Os resultados indicam que os extratos de *P. permucronatum* preparados a base de álcool são promissores para a inibição dos fungos estudados.

O potencial fungicida de extratos alcoólicos preparados com espécies de *Piper* vem sendo descrito na literatura, Gusmão *et al.*, (2020) relataram a eficiência de extratos alcoólicos da espécie *Piper umbellatum* sobre o crescimento micelial do fungo *R. solani*. Assim como a capacidade fungicida do gênero *Piper* foi citada no trabalho de Garcia *et al.*, (2012) ao identificarem o potencial da espécie *P. aduncum* frente ao fungo *Sclerotinia sclerotium* (causador do mofo branco na cultura da soja).

Ao comparar os tratamentos PpFoAl (extratos alcoólicos de folhas), PpTaAl (extratos alcoólicos de talos) e PpInAl (extratos alcoólicos de inflorescências), observou-se que os extratos alcoólicos provenientes dos talos de *P. permucronatum*, apresentaram halos com média de inibição superior aos demais tratamentos em ambos antibiogramas fúngicos. Bastos *et al.*, (2018) relataram o potencial em extratos preparados com os talos de diferentes espécies de *Piper* no controle de fungos fitopatogênicos, o que pode estar associado ao conjunto de metabólitos presentes nesse órgão da planta e ausente nos demais.

A fim de identificar quais compostos podem estar presentes e relacionados com o potencial fungicida dos extratos de *P. permucronatum* realizou-se o fracionamento por partição líquido – líquido. Desse fracionamento resultaram três frações sendo: a 1ª fração - fase orgânica (terpenoides e compostos fenólicos), a 2ª fração - fase básica (alcaloides) e a 3ª fração - fase aquosa (alcaloides quaternários, N-óxidos).

Entre as frações obtidas de *P. permucronatum* as 1ª frações, PpFo1ªorg, PpTa1ªorg e PpIn1ªorg, apresentaram eficiência significativa no controle do crescimento micelial dos fungos *R. solani* e *S. rolfsii*, quando comparados com os controles negativos (água e álcool). Destacou-se de maneira promissora das demais, a 1ª fração de talo (PpTa1ªorg), que apresentou halo de inibição com média superior aos demais tratamentos nos dois antibiogramas fúngicos.

A classe dos compostos fenólicos, presentes nas 1ª frações dos extratos, foram caracterizados por Zabka e Pavela (2013) por apresentarem potencial fungitóxico no controle de importantes patógenos como *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides*. Sá *et al.*, (2018) após isolar e identificar compostos químicos da espécie vegetal *Campomanesia adamantium*, identificou o potencial fungicida de terpenos. As características fungicidas de compostos fenólicos e terpenos, já descritas na literatura podem justificar o potencial inibitório das 1ª frações de *P. permucronatum* no controle de *R. solani* e *S. rolfsii*.

O fungicida Azoxistrobina, utilizado como controle positivo nos testes com o fungo *R. solani* apresentou efeito inibitório semelhante ao melhor tratamento estudado PpTa1ªorg, já o fungicida Tiabendazol utilizado como controle positivo nos ensaios com o fungo *S. rolfsii*, não apresentou eficiência nos testes *in vitro*.

Em comparação ao efeito inibitório observado nos extratos alcoólicos, os extratos aquosos de *P. permucronatum* não apresentaram eficiência no controle do crescimento dos fungos. Edwards *et al.*, (2012) ao estudar a ação de extratos vegetais afirmaram que alguns compostos presentes nos extratos são extraídos com água como os ácidos e os açúcares, enquanto que outros como os flavonoides são mais facilmente extraídos com álcool. Os compostos extraídos nos extratos alcoólicos podem estar ligados ao potencial fungicida dos

extratos testados.

O controle de *R. solani* e *S. rolfsii* é comumente realizado por meio de produtos químicos, dos quais os mais frequentes são o Azoxystrobina e Tiabendazol respectivamente (Fernandes *et al.*, 2005). Entretanto, estudos tem comprovado o efeito de extratos vegetais de diferentes espécies no controle de ambos os fungos, como os extratos de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) (Benini *et al.*, 2010); extratos de manjerição (*Ocimum basilicum*), (Bernardo *et al.*, 2013) e extrato de jambu (*Acmella oleracea*) (Raad *et al.*, 2021) que foram eficientes em inibir o fungo *R. solani*, assim como, extratos de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*) (Faria *et al.*, 2009), alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) (Da Silva *et al.*, 2014), pimenta dedo-de-moça (*Capsicum baccatum*) (Fonseca *et al.*, 2020) eficientes frente ao fungo *S. rolfsii*, o que mostra a possibilidade de controle do patógeno além do uso intensivo de agrotóxicos.

Nesse sentido extratos de diferentes espécies do gênero *Piper* apresentam ser uma possibilidade promissora no controle desses fungos e por conseguinte, das doenças mela do feijoeiro e mofo cinzento. O que se comprova nos resultados de Sousa *et al.*, (2018) que evidenciaram a eficiência de extratos de diferentes espécies de *Piper* no controle de *R. solani* e *S. rolfsii*, assim como no trabalho de Bastos (2018) que realizou um screening com extratos de talos, folhas e inflorescências de cinco espécies de *Piper* e identificou a capacidade destes em inibir os fungos e o desenvolvimento das doenças em testes *in vitro* e *in vivo*. Resultados estes que se consolidam com a presente pesquisa, que apresenta dados satisfatórios de inibição dos fungos estudados a partir de extratos alcoólicos da espécie *P. permucronatum*.

Com a finalidade de identificar a menor concentração bioativa dos extratos e frações que foram eficientes frente aos fungos estudados, estes foram submetidos à diluição seriada e novos testes de antibiograma fúngico foram realizados com os tratamentos em diferentes concentrações.

Com os resultados obtidos, observou-se que os extratos alcoólicos e as frações foram eficientes em diferentes concentrações estudadas. Os extratos alcoólicos de talo (PpTaAl) e inflorescência (PpInfAl) foram eficazes até a menor concentração testada (3mg/ml) no controle do fungo *R. solani*. No teste com o fungo *S. rolfsii* o extrato alcoólico de talo (PpTaAl) foi eficiente até a concentração 6mg/ml, enquanto os extratos alcoólicos de folha (PpFoAl) e de inflorescência (PpInfAl) apresentaram potencial fungicida até a concentração 3mg/ml.

As 1ª frações das três partes da planta *P. permucronatum* (PpFo1ªorg, PpTa1ªorg e PpIn1ªorg) apresentaram resultados de inibição significativos em todas as concentrações estudadas, sendo eficientes tanto para o fungo *R. solani* quanto para o fungo *S. rolfsii* até a

menor concentração (3mg/ml). O que mostra o potencial fúngico das 1ª frações obtidas nesse estudo em diferentes concentrações.

Em ambos os testes as maiores médias de inibição de todos os tratamentos ocorreram com estes em maiores concentrações. A correlação com a concentração de extratos e o potencial inibitório destes frente a fungos fitopatógenos já são descrito na literatura, Ferreira *et al.*, (2017) ao avaliarem extratos alcoólicos de *Piper amplum* Kunt em diferentes concentrações, no controle de *R. solani* e *S. rolfsii* constataram maior percentual de inibição do crescimento dos fungos na maior concentração.

De maneira semelhante aos testes com os fungos fitopatogênicos, os antibiogramas bacterianos, permitiram observar que os extratos alcoólicos das folhas (PpFoAl), talos (PpTaAl) e inflorescências (PpInfAl) de *P. permucronatum* apresentaram resultados significativos ao inibirem o crescimento das fitobactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum*, quando comparados com o grupo controle (álcool e água). Os resultados indicaram que os extratos de *P. permucronatum* preparados a base de álcool são promissores para a inibição das bactérias estudadas.

Outros estudos também relatam a capacidade de espécies do gênero *Piper* frente ao controle de outras bactérias. Nesse sentido, Lima *et al.*, (2018) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos de *P. tuberculatum* Jacq e relataram o potencial destes no controle de *S. aureus*. Almeida *et al.*, (2019) realizaram testes com extratos da espécie *P. mollicomum* e também observaram efeito inibitório no crescimento da bactéria *S. aureus*. Nos estudos citados, os extratos de *Piper* eficientes foram preparados à base de álcool a 96% da mesma forma como preparado os extratos da espécie *P. permucronatum* do presente estudo.

Em ambos os antibiogramas, fúngico e bacteriano, os experimentos foram instalados considerando a possibilidade de inibição do álcool residual, que foi considerado nulo, uma vez que tratamentos contendo apenas o álcool não interferiram no crescimento dos patógenos de interesse nesse estudo.

Como já mencionado, compostos arrastados pelo extrator alcoólico, podem ser os responsáveis pelo efeito microbicida destes, sobre os patógenos investigados nesse estudo. Melo e Hubinger (2012), enfatizaram em sua pesquisa que solventes alcoólicos são mais eficientes na extração de moléculas bioativas, o que vem sendo comprovado em estudos que buscam comparar extratos alcoólicos e aquosos (Mamprim, 2011; Sá Junior *et al.*, 2016).

As frações de *P. permucronatum* obtidas a partir do fracionamento líquido-líquido também foram testadas no controle das fitobacterias, no qual os resultados mostram que as 1ª frações (fase orgânica) dos extratos de folhas (PpFo1ªorg), talos (PpTa1ªorg) e inflorescências

(PpIn1^aorg) foram eficientes em inibir o crescimento das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum*. As 2^a frações (fase básica) de folhas (PpFo2^abas) e de inflorescências (PpIn2^abas), apresentaram halos de inibição no controle da bactéria *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Entretanto, a 1^a fração do extrato preparado com os talos da planta (PpTa1^aorg) apresentou um resultado ainda mais promissor por apresentar semelhança estatística com o controle com antibiótico.

Os diferentes compostos presentes em cada fração podem estar relacionados aos efeitos inibitórios causados pelas 1^a e 2^a frações e da ineficiência da 3^a fração no controle das bactérias. Sabe-se que devido ao solvente metanol são arrastados na 1^a fase os terpenoides e compostos fenólicos, estes já descritos na literatura por apresentarem potencial antimicrobiano (Weninger *et al.*, 2005; Singh; Singh, 2003). Betim *et al.*, (2017) afirmam que os terpenoides, compostos fenólicos e flavonoides são eficientes no controle de microorganismos, especialmente em bactérias, por agirem na parede celular destes, dissolvendo a parte lipofílica.

O solvente clorofórmio arrasta na 2^a fração os alcaloides que são considerados tóxicos para inúmeras pragas por interagir com a parede celular e o DNA dos microorganismos (Oliveira e Almeida; 2016; Cowan, 1999), o que explica o potencial inibitório dessas frações dos extratos de *P. permucronatum*, no controle das fitobactérias.

Observa-se que as frações dos extratos, quando eficientes, apresentaram média de halos de inibição igual ou superior ao efeito do extrato bruto. Isso explica que o fracionamento utilizado de fato separa os componentes que tem potencial inibitório para o crescimento das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum* causadoras da mancha e murcha-bacteriana, respectivamente.

O controle de doenças bacterianas no cultivo de tomate é comumente realizado com o uso de antibióticos e produtos à base de cobre (Nascimento *et al.*, 2013). Ainda assim, pesquisas apontam a utilização de extratos vegetais como uma alternativa ao uso excessivo de produtos químicos no controle de fitobactérias, como os extratos de lágrima-de-nossa-senhora (*Coix lacryma-job* L.) (Rosenberger *et al.*, 2020), cúrcuma (*Curcuma longa* L.) (Kuhn, 2003), hortelã (*Menta spicata*) (Boita, 2008), eficientes no controle da bactéria *X. axonopodis*, como também, extratos de gengibre (*Zingiber officinale*) (Amorim *et al.*, 2011), caju (*Anacardium occidentale* L.) (Pereira, 2022) e melão de são caetano (*Mormodica charantia*) (Silva *et al.*, 2020) se mostraram eficientes no controle de *R. pseudosolanacearum*.

Bastos (2018) aponta em seu estudo a eficiência de diferentes extratos de espécies do gênero *Piper* no controle das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum*, logo, o controle das doenças mancha e murcha bacteriana. Com os resultados da presente

pesquisa, observa-se que extratos alcoólicos provenientes da espécie *P. permucronatum* são eficientes no controle *in vitro* dos fitopatógenos estudados, o que sugere uma alternativa promissora, ao uso intensivo de agrotóxicos no controle dessas pragas.

No antibiograma bacteriano com os extratos e frações de *P. permucronatum* diluídos em diferentes concentrações (3, 6, 12, 25 e 50mg/ ml) foi possível observar que estes apresentaram potencial bactericida até as menores concentrações. Os extratos alcoólicos de folhas (PpFoAl), talos (PpTaAl) e inflorescências (PpInfAl) foram eficientes ao inibirem o crescimento das fitobactérias em diferentes concentrações, destacou-se o extrato de talo por apresentar eficiência no controle das bactérias *X. axonopodis pv. vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum* até a concentração 6mg/ml.

As frações que foram eficientes nos primeiros testes também foram submetidas a diluição seriada e novos ensaios foram realizados. As 1ª frações de folhas (PpFo1ªorg), talos (PpTa1ªorg) e inflorescências (PpIn1ªorg) apresentaram potencial bioativo até a menor concentração testada (3mg/ml) para o controle de *X. axonopodis pv. vesicatoria*. No ensaio com a bactéria *R. pseudosolanacearum*, as frações foram eficientes até a concentração 6mg/ml, o que comprova a eficiência das 1ª frações obtidas a partir dos extratos de *P. permucronatum* no controle das duas bactérias.

Com o mesmo objetivo de verificar o potencial bioativo, extratos de quatro espécies de *Piper* em diferentes concentrações foram testados no controle de *S. aureus* nos quais os melhores resultados obtidos foram com extratos com as maiores concentrações (Alves *et al.* 2016). Em ambos os testes com as duas bactérias é possível identificar que os extratos foram mais eficientes quando em maiores concentrações, o que pode indicar um comportamento de dose dependente, isto é quanto maior a concentração maior o potencial inibitório desses extratos, o que também foi identificado com o antibiograma fúngico desse estudo.

Isso fica ainda mais evidente, ao analisar os dois antibiogramas realizados nesse estudo, tanto o fúngico quanto o bacteriano, considerando quatro fitopatógenos estudados, indicam a prevalência de extratos mais eficientes quando em maiores concentrações.

Entretanto, os extratos e frações terem sido eficientes também em baixas concentrações demonstra a promissora utilização destes na agricultura, uma vez que quanto menos concentrado menor o risco de surgirem cepas resistentes, além da redução do custo de aplicação e dos riscos envolvidos em contaminações de produtores rurais e do meio ambiente.

A ação de produtos comumente utilizados na agricultura tem sido descrita na literatura por apresentar ação tóxica para o sistema imune de animais e seres humanos, o que tem causado problemas a saúde (Schaalan *et al.*, 2012). Intoxicações causadas por agrotóxico no sistema

imunológico podem resultar na diminuição da defesa imunológica, anemia, impotência sexual, cefaleia, hipertensão arterial, distimias, distúrbios comportamentais e insônia (Souza *et al.*, 2011).

Diante disso, a busca por métodos alternativos que apresentem eficiência aos problemas enfrentados nas lavouras, como o controle de pragas, necessita estar alinhada aos riscos que podem causar à saúde.

Embora muitos estudos busquem métodos alternativos para o controle exacerbado de agrotóxicos na agricultura, há pouco na literatura sobre a ação de extratos vegetais na saúde humana. Pesquisas sobre o efeito dos extratos na saúde, em especial em células do sistema imunológico, podem ser um indicativo sobre a toxicidade destes sobre a saúde.

Com a finalidade de investigar a ação e efeitos dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* em células humanas, avaliou-se o efeito destes sobre a funcionalidade de neutrófilos humanos, células consideradas componentes chave da imunidade inata e responsáveis pela resposta inicial à infecções.

Para os testes com as células humanas, extratos hidroalcóolicos a 5% de (álcool) foram preparados, para garantir a integridade das células e não interferir no resultado do experimento. A obtenção dos neutrófilos humanos pelo método descrito no item 3.11.2 mostrou-se eficaz e com média de 99% de neutrófilos viáveis para a realização dos testes.

Ensaio de viabilidade celular são classificados como importantes estratégias para quantificar o efeito citotóxico que determinada substância exerce sobre as células. A ação citotóxica dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, foi realizada por meio do método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]). Este ensaio é baseado na absorção do sal, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis, que clivam o anel de tetrazólio, e transformam o composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, denominado cristais de formazan (E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 1,3- diphenylformazan), o que comprova o estado funcional da cadeia respiratória, uma vez que células não viáveis não são capazes de realizar essa conversão (Mosmann, 1993).

Os resultados obtidos permitem traçar um perfil citotóxico dos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências da espécie *P. permucronatum*, em diferentes concentrações, frente a neutrófilos humanos, sendo observado baixa toxicidade neste tipo de célula, considerando dois tempos de incubação 12 e 24 horas, em que apenas no tempo de 24 horas houve o indício de toxicidade na maior concentração estudada (500µg/ml). O efeito de extratos vegetais dessa espécie na viabilidade celular não foi descrito na literatura até o momento.

Na busca por métodos alternativos a serem utilizados na agricultura para o controle de pragas, os ensaios de viabilidade celular com os neutrófilos humanos é eficaz, uma vez que essas células, como já mencionado, apresentam grande importância para o sistema imunológico, a depleção de qualquer uma de suas funções pode acarretar em sérias consequências para o organismo (Gomes, 2018). O que pode indicar o potencial promissor dos extratos brutos utilizados nesse estudo, que não interferiram na viabilidade dos neutrófilos humanos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Freire (2015), ao avaliar o efeito citotóxico de extratos de *P. turberculatum* sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), os quais não apresentaram toxicidade para as células. O que corrobora com o presente estudo sobre a capacidade citotóxica de espécies do gênero *Piper* sobre células humanas.

As 1ª frações (fase orgânica) dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, também foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com neutrófilos humanos, a fim de identificar a ação citotóxica destas, em diferentes concentrações nos tempos de 12 e 24 horas de incubação. As 1ª frações dos extratos foram selecionadas a partir do potencial inibitório identificado nos ensaios de antibiograma fúngico e bacteriano, em que representaram os melhores tratamentos do estudo.

Assim como ocorreu com os extratos brutos, os resultados obtidos permitiram identificar que as 1ª frações de folhas (PpFo1ªorg), talos (PpTa1ªorg) e inflorescências (PpIn1ªorg) da espécie *P. permucronatum* em todas as concentrações estudadas (31,5, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL), não apresentaram toxicidade aos neutrófilos humanos nos dois períodos de incubação (12h e 24h), não interferindo na viabilidade da célula. Dessa forma, os resultados indicam um perfil não tóxico desses fracionados.

As 1ª frações dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, foram os melhores tratamentos para o controle dos fungos *R. solani* e *S. rofsii* e das bactérias *R. pseudosolanacearum* e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, dessa forma os resultados com a avaliação citotóxica das frações sobre a viabilidade de neutrófilos humanos, são importantes para identificar os aspectos destes fracionados no sistema imunológico. As 1ª frações (fase orgânica) obtidas a partir do fracionamento líquido-líquido dos extratos, são compostas principalmente pelos metabólitos secundários terpenoides e compostos fenólicos (Soares *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2009).

Substâncias de isômeros de monoterpenos, pertencentes a classe dos terpenoides, foram avaliados quanto ao efeito citotóxicos em células do sangue periférico (PBMCs) e não

apresentaram efeitos tóxicos às células em diferentes concentrações, com resultados promissores de 100% de viabilidade celular conforme afirmaram os autores da pesquisa (Keesen *et al.*, 2019). O estudo corrobora com as pesquisas a cerca das classes de metabólitos secundários e sua relação saúde humana.

Pereira (2017) ao avaliar a ação de duas variedades de flavonoides em diferentes concentrações sobre neutrófilos humanos, observou que as células mantiveram taxas de viabilidade celular semelhantes ao controle negativo, o que pode indicar que, classes de metabólitos secundários, que podem estar presentes em espécies de plantas, não apresentam características citotóxicas para importantes células do sistema imunológico, como os neutrófilos.

Os neutrófilos são recrutados para os tecidos após a infecção ou dano tecidual, onde exercem atividade microbicida, fagocitose, degranulação, liberação de mediadores inflamatórios e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Zuliani *et al.*, 2020). As ROS são potentes moléculas oxidantes que atuam juntamente com os constituintes dos grânulos para matar e digerir os agentes fagocitados, uma vez que são tóxicos para os microrganismos ingeridos (Zychlinsky *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2017).

Nesse sentido foram realizados experimentos para avaliar o efeito dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* sobre a produção de ROS por neutrófilos humanos. Considerando dois períodos de incubação (30 e 90 minutos) das células com os extratos em diferentes concentrações, foi possível observar que os extratos induziram a produção de ROS nas células de maneira significativa nos dois períodos de incubação em todas as concentrações estudadas (31,5, 62,5, 125, 250 e 500 µg/ml).

Resultados semelhantes foram observados nos ensaios com as 1ª frações dos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, que estimularam os neutrófilos a produzirem ROS de maneira significativa em todas as concentrações estudadas, considerando os dois períodos de incubação, quando comparados com o grupo controle meio HANKS (controle negativo) ou PMA (controle positivo).

Como as primeiras células a serem recrutadas para o tecido inflamado, os neutrófilos desempenham um papel fundamental na imunidade inata, fagocitando e destruindo microrganismos (Setúbal *et al.*, 2020). A eficiência antimicrobiana dessas células está ligada a uma série de respostas coordenadas, entre elas a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mediado por um complexo NAPH – oxidase, que inclui o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

As espécies reativas de oxigênio são definidas como metabólitos de oxigênio parcialmente reduzidos que possuem fortes capacidades oxidantes e que desempenham funções de sinalização complexas (Mittal *et al.*, 2014). As ROS são essenciais para inúmeras atividades biológicas relevantes para a manutenção da homeostase, e como componentes importantes no combate a patógenos (Yang *et al.*, 2013). A ausência ou problemas na sua produção tende a ocasionar a vulnerabilidade do organismo a várias infecções (Tsuji *et al.*, 2014).

A investigação de substâncias sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células que compõem o sistema imune, permite traçar um perfil dos efeitos de compostos sobre a funcionalidade das células. Os extratos brutos e frações de *P. permucronatum*, em diferentes concentrações foram capazes de estimular significativamente os neutrófilos humanos a produzirem ROS. Esses resultados sugerem que os tratamentos investigados nesse estudo não interferem na capacidade dos neutrófilos em desempenharem respostas rápidas e coordenadas como a “explosão respiratória”, que resultam em morte microbiana.

É importante salientar, porém, que embora os ROS sejam imprescindíveis para a atividade microbida dos neutrófilos, a produção acentuada de metabólitos oxidativos por essas células podem levar a efeitos nocivos e danos teciduais importantes (LI *et al.*, 2015). A atividade de forma equilibrada da produção de ROS dos neutrófilos é apontada como forma de atenuar os efeitos da inflamação (Gomes, 2018).

Com os resultados obtidos é possível observar que embora os extratos e as frações tenham induzido a liberação de ROS, não houve diferença estatística quando comparado com o PMA (controle positivo), o que pode indicar a produção não exacerbada de espécies reativas de oxigênio, descartando a possibilidade de toxicidade celular.

A produção de ROS das células, foi mais expressiva quando estas foram incubadas com os extratos e frações em maiores concentrações (250 e 500 µg/mL), o que pode caracterizar um aspecto de dose dependente. Resultados semelhantes foram observados com extrato de *Dysphania ambrosioides* que estimulou a produção de ROS em neutrófilos nas maiores concentrações estudadas (Gom

6. CONCLUSÃO

Os testes fitoquímicos realizados com os extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* indicam a diferença na composição de metabolitos secundários nas diferentes partes da planta, sendo que somente as classes das cumarinas e alcaloides foram identificadas nos três extratos.

Os extratos alcoólicos obtidos das folhas, talos e inflorescências da espécie *P. permucronatum* apresentaram atividade fungicida no controle dos fungos *R. solani* e *S. rolfsii* e bactericida para o controle das bactérias *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* e *R. pseudosolanacearum*. Destes, o extrato de talo foi o que apresentou o melhor resultado em diferentes concentrações para ambas as bactérias.

As 1ª frações obtidas com o fracionamento (líquido-líquido) de folha e inflorescência apresentaram halos de inibição no crescimento dos dois fungos e das duas bactérias de interesse nesse estudo. O melhor resultado com as frações se deu com a 1ª fração do extrato de talos que se mostrou mais eficiente estatisticamente no controle dos patógenos estudados em diferentes concentrações.

Os extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, assim como as 1ª frações não afetaram a viabilidade dos neutrófilos humanos e foram capazes de induzir a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A utilização de extratos de *P. permucronatum* é uma fonte promissora no controle dos fitopatógenos estudados, uma vez que apresenta potencial inibitório significativo, e não altera a funcionalidade células do sistema imunológico, sendo necessários estudos futuros a fim de realizar a caracterização da composição química dos extratos e frações bioativas de *P. permucronatum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. Tradução: Patrícia Dias Fernandes. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- ABRASCO. **Associação Brasileira de Saúde Coletiva** – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde, 2012. Disponível em: <https://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2015/03/Dossie_Abrasco_01.pdf>.
- AGUIAR, A. F.; DA SILVA LOPES, A.; DE OLIVEIRA FILHO, A. A.; GODINHO, A. M. M. Sistema de registro do agrotóxico no Brasil. **Revista Alomorfia**, v. 3, n. 1, p. 49-60, 2019.
- ALMEIDA, D. O. C.; SOUZA, J. T.; MOREIRA, R. F. C. Uso de extratos vegetais na proteção de plantas de inhame contra *Curvularia eragrostides* e *Phyllosticta* sp. **Agrotrópica**, v. 25, n. 3, p. 187-198, 2013.
- ALMEIDA, K. P. C.; BARROS, A. C. V.; PANTOJA, T. M. A.; CAVALCANTE, F. S.; LIMA, R. A. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper mollicomum* kunth (piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Revista Gestão e Sustentabilidade ambiental**, v. 8, n. 3, 2019.
- ALVES, E.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **O que esperar da produção agropecuária no Brasil**. In. O futuro da agricultura brasileira, 10 visões. Embrapa, Superintendência Estratégica, Brasília, 114p., 2023.
- ALVES, E. R. A.; CONTINI, E.; GASQUES, J. G. **Evolução da produção e Produtividade da Agricultura Brasileira**. In: Agricultura Tropical - Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília - DF: EMBRAPA, v. 1, p. 67-99, 2008.
- ALVES, H. S.; ROCHA, W. R. V.; FERNANDES, A. F. C.; NUNES, L. E.; PINTO, D. S.; COSTA, J. I. V.; CHAVES, M. C. O.; CATÃO, R. M. R. Atividade antimicrobiana de produtos obtidos a partir de espécies de *Piper* (Piperaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 2, p. 168-180, 2016.
- AMORIM, E. P. D. R.; DE ANDRADE, F. W. R.; MORAES, E. M. D. S.; DA SILVA, J. C.; LIMA, R. D. S.; DE LEMOS, E. E. P. Antibacterial activity of essential oils and extracts on the development of *Ralstonia solanacearum* in banana seedlings/Atividade antibacteriana de oleos essenciais e extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Ralstonia solanacearum* em mudas de bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n.S1, p. 392-399, 2011.
- ANJOS JUNIOR, J.F.dos. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho. Rondônia, 2007.
- ARAÚJO, I. M. M.; OLIVEIRA, Â. G. R. da C. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 15, p. 117-129, 2017.
- ARAUJO, J. A.; VIEIRA FILHO J. E. R. **Análise dos impactos do Pronaf na agricultura do Brasil no período de 2007 a 2016**. No. 2412. Texto para discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2018.

ARAÚJO, J. L.; OLIVEIRA, E. S.; TEIXEIRA, F. N. Controle alternativo in vitro de *Sclerotium rolfsii* em girassol (*Helianthus annuus* L.) pelo uso de extratos vegetais e *Trichoderma* spp. **Ciências Agrárias**, v. 15, n. 2, p. 25-35, 2014.

AYRES, M. I. D. C.; ALVAREZ PUENTE, R. J.; FERNANDES NETO, J. G.; UGUEN, K.; SENA ALFAIA, S. **Defensivos naturais: manejo alternativo para " pragas" e doenças**. Editora do INPA, 32p. 2020.

BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological research**, v. 196, p. 44-68, 2017.

BARBOSA, R. S.; DE SOUZA, J. P.; DE ALMEIDA, D. J.; DOS SANTOS, J. B.; DOS SANTOS PAIVA, W.; DE JESUS PORTO, M. As possíveis consequências da exposição a agrotóxicos: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, 2020.

BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, p. 553-561, 2008.

BASTOS, J. S. F.; FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; FONSECA, A. S.; FREIRE, T. C.; SANGI, S. C.; OGRODOWCZYK, L.; OLIVEIRA, K. C. C.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S. Potencial de controle de espécies de *Piper* sobre fungos fitopatogênicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 8, p. 260-272, 2018.

BASTOS, J.S.F. **Extrato de Piper no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas**. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Rondônia). Universidade Federal de Rondônia. Rolim de Moura, 2018.

BAUER, C. H.; KEMPER, C.; BAUER, R.; DE LIMA RIBEIRO, P. Variação do número de neutrófilos, em militares, após a realização de um teste de VO2MÁX. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício (RBPFE)**, v. 9, n. 52, p. 141-146, 2015.

BAY-HURTADO, F.; LIMA, R. A.; TEIXEIRA, L. F.; SILVA, I.; BAY, M.; AZEVEDO, M.; FACUNDO, V. Atividade antioxidante e caracterização do óleo essencial das raízes de *Piper marginatum* Jacq. **Ciência e Natura**, v. 38, p. 1504-1511, 2016.

BELADELI, M. N.; DA COSTA, A. C. T.; MISSIO, V. C.; JÚNIOR, J. B. D.; DE SOUZA GÊNERO, J. F. Aplicação de fungicidas e *Trichoderma asperellum* para o manejo de doenças do feijoeiro na safra das águas. **Brazilian Journal of Development**, v. 7; n. 3, p. 25143-25161, 2021.

BELCHIOR, D. C. V.; DE SOUZA SARAIVA, A.; LÓPEZ, A. M. C.; SCHEIDT, G. N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 34, n. 34, p. 135-151, 2014.

BENINI, P. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; KLAIS, E. C.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINI, R. M.; STANGARLIN, J. R.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B. Efeito in vitro do óleo essencial e extrato aquoso de *Ocimum gratissimum* colhido nas quatro estações do ano sobre fitopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 677-683, 2010.

BERNARDO, J. T.; AGUILERA, J. G.; DA SILVA, R. B.; ROGÉRIO, V. I. A. N.; NIELLA, G. R.; ULHOA, C. J.; MEDEIROS, Í. R. E. Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 3, p. 263-270, 2019.

BERNARDO, R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; OLIVEIRA, J. S. B.; CRUZ, M. E. S.; MESQUINI, R. M. Atividade fungitóxica in vitro de extratos vegetais sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 2, p. 89-93, 2015.

BETIM, F. C. M.; SOUZA, S. W.; BERGAMO, R. A. M.; DIAS, J. F. G. Phytochemical study of *Euphorbia tirucalli* L. (aveloz): antimicrobial activity and preliminary in vitro toxicological assays. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, p. 1-7, 2017.

BEZERRA, L. M. C.; FREDO, C. E.; CORREIA, G. G.; SPATTI, A. C.; CHIORATO, A. F. Análise do sistema de produção agrícola de feijão no estado de São Paulo a partir do levantamento das Unidades de Produção Agropecuária (LUPA). **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 61, 2023.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

BLUM, L. E.; AMARANTE, C. V.; ARIOLI, C. J.; GUIMARÃES, L. S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P.; SCHEIDT, F. R. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 96-100, 2003.

BOHATCH JÚNIOR, M. S.; ESMERINO, L. A.; SILVA, R. Z.; VOLPATO, A. M. Efeitos da atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico da *Piper solmsianum* e *Equisetum arvense*. **Electronic Journal of Pharmacy**, v. 13; n. 2, p. 100-106, 2016.

BOITA, D. C. **Efeito inibitório de extratos vegetais aquosos sobre *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* – agente causal da mancha bacteriana do maracujazeiro.** 2008. 40 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Bacharelado em Agronomia) – Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta, 2008.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas secondary plant metabolites. **Agrotecnologia**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54-67, 2020.

BORSOI, A.; DOS SANTOS, P. R. R.; TAFFAREL, L. E.; JÚNIOR, A. C. G. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 86-100, 2014.

BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F. B.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; SANTOS, G. R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônica**, v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.

BRAGA, A. G. S.; SOUZA, K. F. A.; BARBIERI, F. S.; FERNANDES, C. F.; ROCHA, R. B.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; LACERDA, C. L.; CELESTINO, C. O.; FACUNDO, V. A.; BRITO, L. G. Acaricidal activity of extracts from different structures of *Piper tuberculatum* against larvae and adults of *Rhipicephalus microplus*. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 57-62, 2018.

BRASIL. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Plano nacional para o desenvolvimento da cadeia produtiva do feijão e pulses. Brasília, Versão - 02 de fevereiro de 2018.

BUSATO, M. A.; AREZI, B. A.; SOUZA, M. A.; TEO, C. R. P. A.; LUTINSKI, J. A.; FERRAZ, L. Uso e manuseio de agrotóxicos na produção de alimentos da agricultura familiar e sua relação com a saúde e o meio ambiente. **HOLOS**, v. 1, p. 1-9, 2019.

CAMICIA, G.; DE LARRAÑAGA, G. Trampas extracelulares de neutrófilos: un mecanismo de defensa con dos caras. **Medicina clínica**, v. 140, n. 2, p. 70-75, 2013.

CANALE, M. C.; DO PRADO RIBEIRO, L.; CASTLHOS, R. V.; WORDELL FILHO, J. A. Pragas e doenças do feijão: diagnose, danos e estratégias de manejo. **Boletim Técnico**, 197, 2020.

CARNEIRO, F. F. *et al.* (Org). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 624p, 2015.

CESTONARO, L. V. **Avaliação da imunotoxicidade de agrotóxicos em linhagens monocíticas**. 2022. 170f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

CHRIST, J. A.; SARNAGLIA-JUNIOR, V. B.; BARRETO, L. M.; GUIMARÃES, E. F.; GARBIN, M. L.; CARRIJO, T. T. The genus *Piper* (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil. **Rodriguésia**, v. 67, p. 1031-1046, 2016.

CHRISTENHUSZ, M. J.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its anual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3; p. 201-217, 2016.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Tomate: Análise dos Indicadores da Produção e Comercialização no Mercado Mundial, Brasileiro e Catarinense**, Brasília DF, outubro, 2019.

CONAB. Companhia Nacional de abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira Grãos. Safra 2020/2021 12º levantamento**, v. 8, n. 12, 2021.

CONDINO-NETO, A. Susceptibilidade a infecções: imaturidade imunológica ou imunodeficiência?. **Revista de Medicina**, v. 93, n. 2, p. 78 - 82, 2014.

CORSINI, E.; SOKOOTI, M., GALLI, C. L.; MORETTO, A.; COLOSIO, C. Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. **Toxicology**, v. 307, p. 123-135, 2013.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: Revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 3, n. 22, p. 263-268, 1991.

COSTA, D. S.; ROCHA, C. R. M.; YAGUSHI, J. T.; MENTEN, J. O. M.; CRUZ, A. A. Hidratação controlada de sementes de soja: potencial fisiológico e emergência em solo com *Rhizoctonia solani*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 2, p. 27 - 34, 2017.

COSTA, S.; DA COSTA, M. B. B.; HERRMANN, H. Responsabilidade civil diante dos impactos causados por exposição aos agrotóxicos à saúde humana. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 22, n. 2, p. 77-91, 2019.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology**, v. 12, p. 564-582, 1999.

COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. **Immunological reviews**, v. 273, n. 1, p. 11-28, 2016.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, 1260p, 1981.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; DOS SANTOS, A.F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1; n. 2, p. 175-181, 2016.

DA SILVA MORAES, L. G.; DE SOUSA GOMES, A. C.; DA SILVA MORAES, C. R. O uso de agrotóxicos e a saúde do trabalhador rural no Brasil. **ARIGÓ-Revista do Grupo PET e Acadêmicos de Geografia da Ufac**, v. 1, n. 01, p. 53-61, 2018.

DA SILVA, A. G.; DA COSTA VIEIRA, G. H.; DE MELO, T. M. P.; FARIA, G. A.; DA SILVA, E. M. Extratos de *Cedrela fissilis*, *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* em *Polyphagotarsonemus latus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1 -15, 2020.

DA SILVA, F. N. T.; DE LIMA ARAÚJO, J.; DE OLIVEIRA, E. S. Controle alternativo “*in vitro*” de *Sclerotium rolfsii* em girassol (*Helianthus annuus* L.) pelo uso de extratos vegetais e trichoderma spp., Essentia- **Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, 2014.

DA SILVA, L. F.; DA FONSECA MALTEZ, M. A. P.; OLIVEIRA, C. E. A.; GUSMÃO, Y. J. P.; DE SOUZA, M. A.; DO NASCIMENTO, J. A. C.; OLIVEIRA, C. P.; DE BUENO, O. C. Sustentabilidade, agricultura familiar e políticas públicas no Brasil: Uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, 2021.

DA SILVA, R. A. R.; KETTNER, M. G.; DE SOUZA LIMA, M. L.; DE OLIVEIRA, L. G.; ARAÚJO, E. R.; DA COSTA, A. F. Controle alternativo de *Fusarium oxysporum* com a utilização de extratos vegetais. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2022.

DALBÔ, J.; FILGUEIRAS, L. A.; MENDES, A. N. Effects of pesticides on rural workers: haematological parameters and symptomalogical reports. **Ciência e saúde coletiva**, v. 24, p. 2569-2582, 2019.

DANIEL, A. M. I.; DE LIMA, B. V.; DA SILVA, R. V. Extrato vegetal de sucupira controla o nematoide de galhas da canela de velho *Ditylenchus gallaeformans*. **Open Science Research VI**, Editora Científica Digital. v. 6, 2022.

DA-SILVA, J. L. E.; FINOTTI, L. F. T. Armadilhas extracelulares dos neutrófilos: descrição e envolvimento em processos autoimunes. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 3, n. 1, p. 18-24, 2019.

DE MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**, Texto para Discussão, nº. 2506, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), Brasília, 2019.

DE MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; DOS ANJOS JÚNIOR, J. F.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; DE SOUZA NETO, M. A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n.10, p. 670-675, 2007.

DE OLIVEIRA MACHADO, N. S.; PEREIRA, F. G.; DE QUEIROZ, G. A.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. Morfoanatomia comparativa das folhas de *Piper arboreum* Aubl. e *Piper tuberculatum* Jacq, Iheringia, **Série Botânica**, v. 72, n. 1, p. 106-113, 2017.

DE OLIVEIRA, J. A. D. S.; RODRIGUES, D. W. Óleos essenciais de *Piper* L. (Piperaceae) e sua aplicação biotecnológica na agricultura: uma revisão da literatura. **Arquivos do Mudi**, v.25, n.2, p. 100-110, 2021.

DE QUEIROZ, G. A.; GUIMARÃES, E. F. *Piper* L. (Piperaceae) do Leste Metropolitano, RJ, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 93597-93634, 2020.

DE SÁ-FILHO, G. F.; DA SILVA, A. I. B.; DA COSTA, E. M.; NUNES, L. E.; DE FREITAS RIBEIRO, L. H.; DE PAIVA CAVALCANTI, J. R. L.; GUZEN, F. P.; OLIVEIRA, L. C.; DE SOUZA CAVALCANTE, J. Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, society and development**, v. 10, n.13, 2021.

DELGADO-RIZO, V.; MARTÍNEZ-GUZMÁN, M. A.; IÑIGUEZ-GUTIERREZ, L.; GARCÍA-OROZCO, A.; ALVARADO-NAVARRO, A.; FAFUTIS-MORRIS, M. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: an overview. **Frontiers in immunology**, v. 8, n. 81, 2017.

DOMINGOS, M. M.; MELLONI, R.; DOS REIS FERREIRA, G. M. Extratos vegetais no controle do fungo *Fusarium oxysporum* e seu efeito sobre fungos Micorrízicos arbusculares em plantas de milho. **Revista brasileira de agroecologia**, v. 16, n. 2, p. 11-11, 2021.

DOMINGUES, D. P.; SANTOS, C. A.; KOWATA-DRESCH, L. S.; REIS, C. A.; FERNANDES, M. C. A.; CARMO, M. G. F. Sensibilidade de *Stemphylium solani* a extratos vegetais e caldas e controle da doença no tomateiro em estufa. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, 2017.

EDWARDS, J. E.; BROWN, P. N. TALENT, N.; DICKINSON, T. A.; SHIPLEY, P. R. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. **Phytochemistry**, v. 79, p. 5–26, 2012.

EMBRAPA. **Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira**. – Brasília, DF: Embrapa, 2018. 212 p. 2018.

FACUNDO, V. A.; POLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis de talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 4, p. 733-742, 2008.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Database**. [Rome]: FAO, 2022

FARIA, F. A.; BUENO, C. J.; PAPA, M. F. S. Atividade fungitóxica de *Momordica charantia* L. no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Acta Scientiarum, Agronomy**, v. 31, p. 383-389, 2009.

FERNANDES, C. D. F.; SOUZA, F. D. F.; Ramalho, A. R. **Doenças do feijoeiro-comum em Rondônia**. Recomendações Técnicas 93, Embrapa, 2005.

FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; AGUIAR, P. D. N.; SOUZA, M. F.; FREIRE, T. C.; FONSECA, A. S.; ALVES, R. C. Atividade peroxidásica em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Aporé na presença de ácido salicílico e *Thanatephorus cucumeris*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.11, n.1, 2020.

FERRAZ, R. P. D.; SKORUPA, L. A. Intensificação sustentável: desafios e oportunidades para a agricultura brasileira. **Embrapa Solos-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, n. 2, v. 43, p. 37–42, 2017.

FERREIRA, E. F.; JOSÉ, A. R. S.; BONFIM, M. P.; PORTO, J. S.; JESUS, J. S. Uso de extratos vegetais no controle *in vitro* do *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. coletado em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, 2014.

FERREIRA, T. P. S.; SANTOS, G. R.; FERREIRA, T. P. S.; TEIXEIRA, T. S.; BATISTA, R. D.; LUZ, R. B.; GUIMARÃES, L. G. L. Evaluation of the fungitoxic activity of vegetal extracts on the mycelial growth of phytopathogens. **Bioscience jornal**, v. 33, n. 3, p. 566-571, 2017.

FERRIS, H.; ZHENG, L. Plant sourcers of Chinese herbal remedies: effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 31, p. 241-263, 1999.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 421 p., 2013.

FONSECA, A. S.; FERNANDES, C. F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROCHA, R. B.; FREIRE, T. C.; SANGI, S. C.; BASTOS, J. S. F.; ALVES, R. C. Extratos vegetais do gênero *Capsicum* com potencial atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.11, n.1, p. 89-98, 2020.

FONSECA, M. G. **Bioatividade de extratos de fungos da Antártica no combate a bacterioses da mandioca, tomate e pimentão causadas por *Xanthomonas* ssp.** 2018. Dissertação – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São Paulo. 2018.

FRANCO, D. P.; PEREIRA, T. M.; VITORIO, F.; NADUR, N. F.; LACERDA, R. B.; KÜMMERLE, A. E. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, p. 180-197, 2021.

FREIRE, T. C.; SANGI, S. C.; BASTOS, J. S. F.; DA FONSECA, A. S.; DA SILVA, R. R.; JUNIOR, J. R. V.; FERNANDES, C. F. Avaliação fitoquímica de folhas, talos e inflorescência de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, 2022.

FREIRE, T. C. **Extrato vegetal de *Piper* com potencial atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Rondônia). Universidade Federal de Rondônia. Rolim de Moura, 2015.

GABARDO, G.; DALLA PRIA, M.; DA SILVA, H. L.; HARMS, M. G. Método da folha destacada para avaliação da indução de resistência de produtos alternativos a *Phakopsora pachyrhizi*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* em soja. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 43847-43862, 2020.

- GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotium*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012.
- GARCIA, S. D.; DE LARA, T. I. C. O impacto do uso dos agrotóxicos na saúde pública: revisão de literatura. **Saúde e Desenvolvimento Humano**, v. 8, n. 1, p. 85-96, 2020.
- GOGOSZ, A. M.; BOEGER, M. R. T.; NEGRELLE, R. R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, p. 405-417, 2012.
- GOMES, L. N. **Efeito do extrato de *Dysphania ambrosioides* na resposta de neutrófilos humanos**. 2018. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Maranhão. Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2018.
- GONÇALVES, A. P. S.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* JACQ. **South American Journal of Basic Education, Tachical and Technological**. v. 3, n. 2; p. 100-109, 2016.
- GOULART, T. L. S. **Citotoxicidade da associação de agrotóxicos da rizicultura em hepatócitos de zebrafish**. 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais) Universidade Federal do Rio Grande, 2014.
- GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M. **Piperaceae** In: Wanderley, M.G.W.; Shepherd, G.J.; Melhem, T.S.; Giulietti, A.M.; Martins, S.E. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, v. 7, p. 263-320, 2012.
- GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, p. 21-46, 2004.
- GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS, E. V. S. S.; QUEIROZ, G. A. ***Piper* in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12735>>. Acesso em: 18 mai. 2022
- GUIMARÃES, N. N.; SILVA, R. V.; GUIMARÃES, L. N.; SANTOS, A. S.; CAMPOS, I. C. A.; INOUE, T. Y. Potencial de extratos de plantas e manipueira no controle de *Meloidogyne javanica* em jiloeiro. **HOLOS**, v. 8, p. 1–15, 2021.
- GUSMÃO, D. E.; CHAVES, P.; MATIAS, R.; PEDRINHO, D. R.; PEREIRA, S. R.; CORRÊA, B. O. Avaliação do Efeito do Extrato Etanólico de *Piper umbellatum* L. no Controle Alternativo de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 5, p. 516-522, 2020.
- HASSAN, E. O.; ZYTON, M. A. Management of Bacterial Spot of Pepper caused by *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **American Journal of Bioscience and Bioengineering. Science Publishing Group**. v. 5, n. 1, p. 41-49, 2017.
- HELALI, I.; FERCHICHI, S.; MAAOUIA, A.; AOUNI, M.; HARIZI, H. Modulation of macrophage functionality induced in vitro by chlorpyrifos and carbendazim pesticides. **Journal of immunotoxicology**, v. 13, n. 5, p. 745-750, 2016.
- HUBBARD, C.; ALVIM, A. M.; GARROD, G. Brazilian agriculture as a Global Player L'agriculture brésilienne au plan mondial Brasilianische Landwirtschaft als 'Global Player'. Agricultural Economics Society and European Association of Agricultural Economists (EAAE). **EuroChoices**, n. 16, v. 1, p. 3-4, 2017.

IZOLANI, F. I.; TYBUSCH, J. S. Agroecologia como alternativa ao uso indiscriminado de agrotóxicos no agronegócio: desenvolvimento sustentável para além da ideologia. **Researchgate**. 2020.

JOLY, B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. Companhia editora nacional. 11. ed. v. 4. 1993.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Tradução de Simões, A.O., Singer, R.B., Singer, R.F., Chies, T.T.S. 3. ed. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. Editora Artmed, 2009.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-979, 1970.

KAPLAN, M. J., RADIC, M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689-2695, 2012.

KEESEN, T. S. L.; DA SILVA, L. V.; ROCHA, J. C.; ANDRADE, L. N.; LIMA, T. C.; DE SOUSA, D. P. Anti- *Leishmania* and cytotoxic Activities of Perillaldehyde Epoxide Synthetic Positional isomers, **Natural Product Research**, v. 33, n. 17, p. 2536-2540, 2019.

KLOSS, L. C.; ALBINO, A. M.; SOUZA, R. G.; LIMA, R. A. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3; p. 118-128, 2016.

KRETER A. C.; FERREIRA, D.; SERVO, F.; BASTOS FILHO, G. S.; SOUZA JUNIOR, J. R. **Comércio exterior de agronegócio: janeiro de 2023**. Carta de conjuntura, n. 58, Ipea, 2023.

KRINSKI, D.; FOERSTER, L. A.; DESCHAMPS, C. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *Piper* species: controlling *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development. **Acta Scientiarum, Agronomy**, v. 40, 2018.

KRUGER, P.; SAFFARZADEH, M.; WEBER, A. N.; RIEBER, N.; RADSAK, M.; VON BERNUTH, H.; BENARAFIA, C.; ROOS, D.; SKOKOWA, J.; HARTL, D. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLoS pathogens**, v. 11, n.3, 2015.

KUHN, O. J. **Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis***. 2003. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2003.

KWIATKOWSKA, M.; JAROSIEWICZ, P.; MICHAŁOWICZ, J.; KOTER-MICHALAK, M.; HURAS, B.; BUKOWSKA, B. The impact of glyphosate, its metabolites and impurities on viability, ATP level and morphological changes in human peripheral blood mononuclear cells. **PLoS One**, v. 11, n. 6, 2016.

LANNA FILHO, R. **Fitobactérias na cultura da soja. In. Doenças da soja: melhoramento genético e técnicas de manejo**. Campinas: Millennium, p. 81-92, 2015.

LEE, T. P.; MOSCATI, R.; PARK, B. H. Effects of Pesticide on Human Leukocyte Functions. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 597-609. 1979.

LELIEFELD, P. H. C.; KOENDERMAN, L.; PILLAY, J. How neutrophils shape adaptive immune responses. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 471, 2015.

LEMESZENSKI, G. C. F. **Protoflavonoides e meroterpenos de espécies de *Piper***. 2013. 205f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LEMO, C. O. T.; GONÇALVES, R. M.; SIQUEIRA, V. L. D.; FILHO, L. C.; CABRAL, V. F. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de extratos de Pariparoba**. VII EPCC–Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Maringá, 2011.

LEVIGARD, Y. E.; ROZEMBERG, B. A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas de "nervos" no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, p. 1515-1524, 2004.

LEYVA-ACUÑA, M. A.; QUINTANA-OBREGÓN, E. A.; SOTO-LANDEROS, F.; BAEZ-PARRA, K. M.; MONTES-ÁVILA, J.; ANGULO-ESCALANTE, M. A. Actividad antifúngica de alcaloides del extracto metanólico de *Jatropha platyphylla* contra *Aspergillus parasiticus*. **Biotechnia**, v.22, n. 3, p. 100-107, 2021.

LI, L.; TAN, J.; MIAO, Y.; LEI, P.; ZHANG, Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 5, p. 615-621, 2015.

LIMA, A. F.; SILVA, E. G. A.; IWATA, B. F. Agriculturas e agricultura familiar no Brasil: uma revisão de literatura. **Retratos de Assentamentos**, v. 22, n. 1, p. 50-68, 2019.

LIMA, R. A.; BARROS, A. C. V.; ALMEIDA, K. P. C.; PANTOJA, T. M. A. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper tuberculatum* jacq. (piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Revista Eletrônica da FAINOR**, v. 11, n. 2, 2018.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rede Brasileira de Justiça Ambiental. 190p. 2012.

LOPES, C. A. Murcha bacteriana ou murchadeira: uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Embrapa Hortaliças-**Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; ESCHEMBACK, V. Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 125-130, 2015.

LOPES, C. A.; MENDONÇA, J. L. Reação de acessos de jurubeba à murcha bacteriana para uso como porta-enxerto em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 356-360, 2016.

LOPES, C. A.; QUEJADO – DURVAL, A. M. **Doenças bacterianas**. In: Doenças do tomateiro. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa hortaliças. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília. 2. ed. 2005.

LUNA, F. V.; KLEIN, H. S. Transformações da agricultura brasileira desde 1950. **História Econômica & História de Empresas**, v. 22, n. 2, 2019.

MACEDO, A. L.; DUPRAT, R. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; VASCONCELOS, T. R. A.; PINTO, L. C.; MONTENEGRO, R. C.; RATCLIFFE, N. A.; MELLO, C. B.; VALVERDE, A. L. Isolamento de um composto larvicida de *Piper solmsianum* C.DC. (Piperaceae), **Natural Product Research**, p. 32-22, 2018.

MACÊDO, C. G.; DE SOUSA, B. C. M.; FRAGA, S. S.; LOURIDO, K. A.; LUSTOSA, D. C.; DA SILVA, E. O.; CASTRO, K. C. F. Fitoquímica e atividade antifúngica do extrato de folhas de *Piper marginatum* no controle de fitopatógenos. **Revista ibero-americana de ciências ambientais**, v. 9; n. 6, p. 70-77, 2018.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; DE OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuado)**, v. 27, n. 1/2, 2008.

MAMPRIM, A. P. **Efeitos de defensivos agrícolas naturais e extratos vegetais sobre parâmetros biológicos de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Serok**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2011.

MARTÍNEZ, A.; REYES, I.; REYES, N. Cytotoxicity of the herbicide glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells. **Biomedica**, v. 27, n. 4, p. 594-604, 2007.

MARTINS FILHO, J. B.; CREMASCO, C. P.; NORIS, F. J.; DOS SANTOS, R. M.; DOS SANTOS, J. S. P.; DAL PAI, A.; DAL PAI, E. Demanda hídrica do tomate de mesa no município de Paranapuã-SP em diferentes épocas de plantio. **Research, Society and Development**, v.11, n.6, 2022.

MATSUMOTO, R. S.; RIBEIRO, J. P. N.; TAKAO, L. K.; LIMA, M. I. S. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 631-635, 2009.

MELLO, B. C.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science e Technology**, v. 47, n. 12, p. 2510-2518, 2012.

MELO, A.; ARAÚJO, A. A.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Aristolochiaceae e Piperaceae. **Rodriguésia**, v. 64, p. 543-553, 2013.

MENDONÇA, J. L.; LOPES, C. A.; LÜDKE, Í. Enxertia de tomateiro em baquicha (*Solanum stramonifolium* var *inermis* (Dunal) Whalen) para controle de doenças de solo. **Embrapa Hortaliças Brasileira Circular Técnica**, v. 163, n. 15, 2018.

MGBEAHURUIKE, E. E.; YRJONEM, T.; VUORELA, H.; HOLM, Y. Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69, 2017.

MIGLIORINI, P.; LUTINSKI, J. A.; GARCIA, F. R. M. Eficiência de extratos vegetais no controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), em laboratório. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 83-89, 2010.

MIORIN, J. D.; CAMPONAGARA, S.; DIAS, G. L.; SILVA, N. M.; VIERO, C. M. Percepções de agricultores sobre o impacto dos agrotóxicos para a saúde e o meio ambiente. **Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**, v. 6, n. 3, p. 2410-2420, 2016.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN (MOBOT). **Distribuição geográfica da Família Piperaceae**. Missouri:MOBOT, [s.d.]. 1 mapa, color. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/42000020?tab=maps>. Acesso em 09 de jul. 2022.

MITRA, A.; SARKAR, M. CHATTERJE, C. Modulação da resposta imune por pesticidas organofosforados: mamíferos como modelo potencial. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 72, p. 13-24, 2019.

MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants e redox signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional do Itatiaia–Brasil: Manekia e *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 60, p. 999-1024, 2009.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. D.; ARAÚJO, E. D. L.; AMORIM, E. L. C. D. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MORA-VIVAS, F. D.; VELASCO, J.; DÍAZ, T.; ROJAS-FERMÍN, L.; RÍOS-TESCH, N.; CARMONA, J. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Peperomia acuminata* de los Andes venezolanos. **Revista peruana de biología**, v. 23, n. 3, p. 301-304, 2016.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUDRYJ, A. N.; YU, N.; AUKEMA, H. M. Nutritional and health benefits of pulses. *Applied Physiology*, **Nutrition and Metabolism**, v. 39, n. 11, p. 1197-1204, 2014.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. Tradução: Denise C. Machado, Gaby Renard, Lucien Peroni Gualdi. 8. ed., Porto Alegre, Artmed, 2014.

NASCIMENTO, A. D. R.; FERNANDES, P. M.; BORGES, L. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 15-24, 2013.

NASCIMENTO, E. V.; BONILLA, O. H.; DE LUCENA, E. M. P.; DO NASCIMENTO, Y. A. P.; VIEIRA, M. I. C.; FARIAS, I. B. M.; NASCIMENTO, S. F.; DE LIMA, F. R. A. Ocorrências e usos da Família Piperaceae, em especial no Estado do Ceará: Revisão e nova identificação geográfica, **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 183-205, 2022.

NASCIMENTO, L. D. S.; LIMA, R. A. Uma revisão bibliográfica sobre as piperaceae para fins medicinais e econômicos. **Educamazônia - Educação, Sociedade e Meio Ambiente**, v. 16, p. 200-214, 2023.

NAVA, F. F. M. **Controle de fitopatógenos por fungos endofíticos de aroeiração de um isolado de: Diaporthe sobre Fusarium graminearum**. 2020. 99 f. Dissertação (Mestrado em

Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2020.

NERI, D. K. P.; DE FREITAS, M. V. P.; DE GÓES, G. B. Extratos vegetais no controle da mosca-branca em melancia. **HOLOS**, v. 4, p. 1-14, 2020.

NOGUEIRA, G. D. A.; SILVA, S. G. D. A.; LINHARES, C. M. D. S.; AMBRÓSIO, M. M. D. Q.; NUNES, G. H. D. S. Métodos de inoculação de *Fusarium solani* e *Sclerotium rolfsii* em meloeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 45, p. 59-63, 2019.

NOGUEIRA, H. S.; LIMA, W. P. Câncer, sistema imunológico e exercício físico: uma revisão narrativa. **Corpoconsciência**, p. 40-52, 2018.

NOVATO-SILVA, E.; DA SILVA, J. M.; PINHEIRO, T. M. M. Efeitos de agrotóxicos sobre o sistema imune: considerações no contexto da pandemia da COVID-19 no Brasil. **PISTA: Periódico Interdisciplinar [Sociedade Tecnologia Ambiente]**, v. 3, n. 1, p. 8-24, 2021.

OLIVEIRA, C. R. F.; MATOS, C. H. C.; DOS SANTOS FREIRE, A.; DA SILVA SANTOS, I. C.; DO NASCIMENTO, M. D. P. M. Atividade acaricida do extrato de algarobeira sobre o ácaro *Tetranychus bastosi* em *Jatropha curcas*. **Open Science Research IV** - Editora Científica Digital, v. 4, 2022.

OLIVEIRA, L. C.; ISHIDA, A. K. N.; DA SILVA, C. T. B.; MARINHO, P. S. B.; DO ROSARIO MARINHO, A. M. Atividade antibacteriana de extratos de *Morinda citrifolia* L.(noni) contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 23, n. 4, 2018.

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Biota Amazônica**, v. 6, n. 1, 2016.

PAIVA, S. R. D.; HERINGER, A. P.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae. **Floresta e Ambiente**, v. 9, p. 153-157, 2002.

PAYÁN-RENTERÍA, R.; GARIBAY-CHAVEZ, G.; RANGEL-ASCENCIO, R.; PRECIADO-MARTINEZ, V.; MUNOZ-ISLAS, L.; BELTRÁN-MIRANDA, C.; MENA-MUNGUÍA, S.; JAVE-SUÁREZ, L.; FERIA-VELASCO, A.; DE CELIS, R. Effect of chronic pesticide exposure in farm workers of a Mexico Community, **Archives of environmental e occupational health**, v. 67, n. 1, p. 22-30, 2012.

PEDÓ, T.; ROLIM, J. M.; MEDEIROS, L. B.; PETER, M.; DOS SANTOS PEREIRA, L. H.; MARTINAZZO, E. G.; AUMONDE, T. Z.; MAUCH, C. R. Produção de mudas de tomate enxertado no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária**, v. 27, n. 1, 2022.

PELLETIER S. W. **Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives**. 1. ed. v. 15, New York: USA, Willey. Pergamon, p.1-635, 2001.

PEREIRA, C. H. J. **A modulação da resposta imune periférica em agricultores expostos a múltiplos agrotóxicos**. 2021. 135 p. Tese (Doutorado em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, 2021.

PEREIRA, C. H. J. **Avaliação da instabilidade genômica e do estresse oxidativo em agricultores expostos a agrotóxicos em um município do estado de Santa Catarina**. 2017.

121p. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017.

PEREIRA, G. S. **Ação inibitória dos flavonoides quercertina e rutina sobre ativação de neutrófilos humanos**. 2017. 99f. Dissertação (Mestrado em Biociências) Universidade Estadual Paulista. Assis, 2017.

PEREIRA, G. N. **Formulações a base de extratos naturais para o controle de *Ralstonia solanacearum* em plantas cultivadas**. 2022. 28f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Licenciatura Ciências Naturais - Biologia) - Universidade do Maranhão, Pinheiro - Maranhão, 2022.

PEREIRA, L. A.; DOS SANTOS, D. C.; RODRIGUES, P. F. A.; DE AGUIAR ANDRADE, E. H.; GUIMARÃES, E. F. Valor de uso, indicações terapêuticas e perfil farmacológico e etnofarmacológico de duas espécies do gênero *Piper* L. em uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental Brasileira. **Brazilian Journal of Development**, n. 6, v. 7, p. 52027-52039, 2020.

PEREIRA, M. D. S. V.; RIBEIRO, A. D.; JÚNIOR, E. C. F.; FREIRE, J. C. P.; COSTA, M. M. A., PEREIRA, J. V. Estudo sobre métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas medicinais: elucidações e limitações das técnicas. **Brazilian Journal of Development**, n. 8, v. 4, 2022.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; DE CARVALHO, A. D. F. Diagnose e controle alternativo de doenças em tomate, pimentão, curcubitáceas e cenoura. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**. 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PIGNATI, W. Uso de agrotóxicos no Brasil: Perspectiva da saúde do trabalhador e ambiental. **Revista Brasileira de Medicina Do Trabalho**, v. 16, n. 1, p. 37-37, 2018.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. D. S.; LARA, S. S. D.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. D. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 22, p. 3281-3293, 2017.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 14. ed. Piracicaba: Degaspari, 477p. 2000.

QUEIROZ, P. R.; LIMA, K. C.; OLIVEIRA, T. C. D.; SANTOS, M. M. D.; JACOB, J. F.; OLIVEIRA, A. M. B. M. D. Sistema de Informação de Agravos de Notificação e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, 2019.

QUEIROZ, T. N.; PASCUALI, L. C.; DO PRADO SILVA, A. C.; PORTO, A. G.; CARVALHO, J. W. P. Extratos e óleos essenciais como alternativa no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii* isolados de soja (*Glycine max* L.). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 737-753, 2020.

QUEZADO-DUVAL, A. M; LOPES, C. A. Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. **Embrapa Hortaliças-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2010.

QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, v. 33, n.7, p. 1266-1278, 2006.

RAAD, S. M.; RIBEIRO, E. S.; CASTRO, R. J.; CARNEIRO, F. S.; MAESTRI, M.P. Atividade antifúngica do extrato de jambu (*Acmella oleracea*) sobre o crescimento de micelial *Rhizoctonia solani*. **Natural Resources**, v. 11, n.1, p. 21-24, 2021.

RAMOS, M. E. S. P. **Biomonitoramento genético de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas no povoado Vila Bessa, município de Conceição do Jacuípe**. 2009. 139 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Bahia. 2009.

REIS, S. C.; DUARTE, D. A. O papel do exercício físico na ativação de células mononucleares do Sistema Imunológico. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v.1, p. 49-57, 2018.

REMBISCHEVSKI, P.; CALDAS, E. D. Agroquímicos para controle de pragas no Brasil: análise crítica do uso do termo agrotóxico como ferramenta de comunicação de risco. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 6, n. 4, p. 2-12, 2018.

REZENDE, F. M., ROSADO, D., MOREIRA, F. A., DE CARVALHO, W. R. S. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, v. 93, p. 93-104, 2016.

RIBEIRO, S. D. D. M.; SIQUEIRA, M. T. D.; GURGEL, I. G. D.; DINIZ, G. T. N. A comercialização de agrotóxicos e o modelo químico-dependente da agricultura do Brasil. **Saúde em Debate**, v. 46, p. 210-223, 2022.

ROMEIRO, R. da S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa: UFV, 417p. 2005.

ROSENBERGER, M. G.; DE ARAUJO AMATUZI, J. C.; ROSENBERGER, A. G.; DA COSTA ZONETTI, P.; PAULERT, R. Atividade antimicrobiana de extrato de Coix Lacrymajobi sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* e *Fusarium graminearum*, **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 135-148, 2020.

ROY, A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. **International Journal of Plant Biotechnonology**, v. 3, n. 2, p.1-9. 2017.

SÁ JUNIOR, P. F. D.; MUNIZ, E. B.; PEREIRA, N. A.; OLIVEIRA, M. A. S. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Anacardiaceae. **Revista de Ciências Médica e Biológicas**, v. 15, n.1, p. 56-61, 2016.

SÁ, S.; CHAUL, L. T.; ALVES, V. F.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M.; VAZ, B. G.; FERRI, P. H.; BORGES, L. L.; PAULA, J. R. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 303-311, 2018.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T. B.; FIDALGO, L. M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N. *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, 2019.

SANGI, S. C.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; BASTOS, J. S. F.; FONSECA, A. S.; FREIRE, T. C.; OGRODOWCZYK, L.; NUNES, J. D. K.; OLIVEIRA, K. C. C.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S. Extratos de *Piper* no controle alternativo de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* em *Coffea canephora*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 8, p. 212-223, 2018.

SANTOS, C. A. B.; SILVA, A. P. M. Extratos vegetais de plantas daninhas contra o pulgão *Aphis craccivora* koch 1854, no feijão *Vigna unguiculata* Walp. **Revista Ibero – Americana de Ciências Ambientais**, Aquidabã. v. 6, n. 2, p. 69-75, 2015.

SANTOS, I. N.; FERRAZ, I. S.; LIRIO, L. K. S.; DA SILVA, A. S.; DE SOUSA SOTERO, G.; DE ANDRADE RUELA, G. Implicações das intoxicações exógenas por agrotóxicos à saúde do trabalhador: uma revisão integrativa. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 2, p. 16-16, 2021.

SANTOS, K. C. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do Diacilglicerol**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Universidade de Brasília. Brasília, 2007.

SANTOS, M. R. A.; GUIMARÃES, M. C. M.; PAZ, E. S.; MAGALHÃES, G. M. O.; SOUZA, C. A.; SMOZINSKI, C. V.; NOGUEIRA, W. O. Induction and growth pattern of callus from *Piper permucronatum* leaves. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 18, n. 1, p. 142–148, 2016.

SANTOS, P.; PRANDO, M.; MORANDO, R.; PEREIRA, G. V.; KRONKA, A. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17. 2013.

SANTOS, T. G.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; GASPER, A. L.; CRUZ, A. B.; SCHMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SCAPINI, P.; CASSATELLA, M. A. Social networking of human neutrophils within the immune system. Blood, **The Journal of the American Society of Hematology**. v. 124, n. 5, p.710-719, 2014.

SCHAALAN, M. F.; ABDELRAOUF, S. M.; MOHAMED, W. A.; HASSANEIN, F. S. Correlation between maternal milk and infant serum levels of chlorinated pesticides (CP) and the impact of elevated CP on bleeding tendency and immune status in some infants in Egypt. **Journal of immunotoxicology**, v. 9, n. 1, p. 15-24, 2012.

SCHURT, D. A.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Fungos fitopatogênicos na Amazônia. In Conhecimento, conservação e uso de fungos. **Editores Inpa**. 2019.

SCHURT, D. A.; RODRIGUES, F. Á.; CARRÉ – MISSIO, V.; SOARES, N. F. F. Silício alterando compostos derivados de pirólise de bainhas foliares de plantas de arroz infectadas por *Rhizoctonia solani*, **Fitossanidade.Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p. 52-60, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. D. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, v. 30, n. 1, p. 129-137, 2000.

SCOPEL, W.; SCOPEL, E. L.; BOTTEON, V. W.; RAZA-GOMES, M. F. Bioatividade de macerados de *Anthemis* SP., *Coriandrum sativum* e *Piper nigrum* contra *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Evidência**. v. 18, n. 1, p. 95-109, 2018.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SETUBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; BASTOS, J. S. F.; CASTRO, O. B.; PIRES, W. L.; ZAQUEO, K. D.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Effect of Bothrops bilineata snake venom on neutrophil function. **Toxicon**, v. 76, p. 143-149, 2013.

SETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; NERY, N. M.; REGO, C. M.; SANTANA, H. M.; DE LIMA, A. M.; ZULIANI, J. P. Human neutrophils functionality under effect of an Asp49 phospholipase A2 isolated from *Bothrops atrox* venom. **Toxicon: X**, v. 6, 2020.

SILVA, C. P.; RICCI, T. G.; ARRUDA, A. L.; PAGLIOSA, F. M.; MACEDO, M. L. R. Extratos vegetais de espécies de plantas do cerrado Sul-Matogrossense com potencial de Bioherbicida e Bioinseticida. **Uniciências**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017.

SILVA, Í. C. Neutrófilos: aspectos clássicos, plasticidade e novas funções imunorregulatórias. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 7, n. 1, 2015.

SILVA, I. D. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R. D.; CUNHA, M. G. D. Efeito do extrato de sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 109-115, 2005.

SILVA, J. L.; SOUZA, P. E.; MONTEIRO, F. P.; FREITAS, M. L. O.; SILVA JÚNIOR, M. B.; BELAN, L. L. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of *coffee* tree. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n. 3, p. 539-544, 2014.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S., DOS SANTOS SANTANA, A., KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3; p. 669-681, 2010.

SILVA, R. M. D.; SANTOS, W. S. D.; LIMA, E. J. D.; PINTO, K. M. S. Extratos aquosos de plantas nativas com potencial uso no manejo da murcha bacteriana do *tomateiro Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 7, n.17, p. 1271-1282, 2020.

SILVERIO, A. M.; PINHEIRO, P. B. A biociência dos agrotóxicos e seu impacto na saúde. **Revista Ouricuri**, v. 9, n. 2, p. 016-033, 2019.

SIMMONDS, S. E.; SMITH, J. F.; DAVIDSON, C.; BUERKI, S. Phylogenetics and comparative plastome genomics of two of the largest genera of angiosperms, *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 163, 2021.

SINGH B.; SINGH S. Antibacterial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. **Phytotherapy research**, v.7, n.7, p.814-6, 2003.

SIQUEIRA, S. L. D.; KRUSE, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 42, p. 584-590, 2008.

SIWICKI, A. K.; COSSARINI-DUNIER, M.; STUDNICKA, M.; DEMAEL, A. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorophon on immune response of carp (*Cyprinus*

carpio): II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 19, n. 1, p. 99-105, 1990.

SMANIA, E. F. A. **Esteróis e triterpenos isolados de espécies de Ganoderma Karsten e sua atividade antimicrobiana**. 2003.138 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Santa Catarina, 2003.

SOARES, K. V. C. **Estudo da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos das folhas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum***. 2020. 90 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2020.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. **Journal of Separation Science**. v. 32, p. 644-652, 2009.

SOBRINHO, C. A.; SANTOS, A. R. B. **Métodos de inoculação de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijão-caupi**. 2021.

SOUSA, B. C. M.; BARATA, L. E. S.; MACÊDO, C. G.; FRAGA, S. S.; KASPER, A. A. M.; LOURIDO, K. A.; PAULINO, G. S.; ALMEIDA, E. C.; SARTORATTO, A.; LUSTOSA, D. C. Avaliação do teor de Cumarina e atividade antifúngica de frações de Óleo de Cumaru. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 6, p. 63-69, 2018.

SOUSA, I.; FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; SILVA, D.; MENDES, T. L. O.; FREIRE, T. C.; FONSECA, A. S.; SANGI, S. C. Atividade fungitóxica de extratos de *Piper* sp. contra os fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 3, p. 50-56, 2018.

SOUSA, I. A. L.; BENCHIMOL, R. L.; SILVA, C. M.; SANTOS, A. K. A.; PINHEIRO, C. C. C.; CARVALHO, E. A. Potencial de biocontrole de *Rhizoctonia solani* do Feijão- Caupi. **Biota Amazônia**, v. 7, n.1; p. 86–89, 2017.

SOUSA, P. S.; GORRI, A. P. Agrotóxicos no Brasil: Uma visão relacional a partir da articulação Freire-CTS. **Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências**, p. 399-422, 2019.

SOUZA, A. D.; MEDEIROS, A. D. R.; SOUZA, A. C. D.; WINK, M.; SIQUEIRA, I. R.; FERREIRA, M. B. C.; FERNANDES, L.; HIDALGO, M. P. L.; TORRES, I. L. D. S. Avaliação do impacto da exposição a agrotóxicos sobre a saúde de população rural: Vale do Taquari (RS, Brasil). **Ciência e saúde coletiva**, v. 16, p. 3519-3528, 2011.

SOUZA, C. G.; DE MOURA, A. K. B.; DA SILVA, J. N. P.; SOARES, K. O.; DA SILVA, J. V. C.; VASCONCELOS, P. C. Fatores antinutricionais de importância na nutrição animal: Composição e função dos compostos secundários. **Pubvet**, v. 13, p. 1-19, 2019.

SOUZA, E. B. R.; SILVA, R. R.; AFONSO, S.; SCARMINIO, I. S. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. **Journal of Separation Science**. v. 32, p. 4176-4185, 2009.

SOUZA, L. C. B.; CALILI, L. C. C.; ARAÚJO, J. M. P.; DA SILVA TOSATE, T.; SABINO, H. R.; MENEZES, D. S.; REIS, M. B.; MARCOS, V. D.; RESENDE, N. S.; JÚNIOR, A. J. B. Avaliação da percepção da incidência de agrotóxicos e seus possíveis danos genéticos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 11, p. 1156-1165. 2021.

SOUZA, P. G.; ALBINO, A. M.; LIMA, R. A. Identificação de metabolitos secundários no extrato etanólico das inflorescências de *Piper arboreum* AUBL. E seu potencial Candidacida. **Biota Amazônia, Open Journal System**, v. 9, n. 2, 2019.

SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. Baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa, São Paulo, SP. Instituto Plantarum, 2012.

TAVARES, D. C. G.; SHINODA, D. T.; DA COSTA MOREIRA, S. S.; DA CRUZ FERNANDES, A. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Sistemas & Gestão**, v. 15, n. 1, p. 2-10, 2020.

TEJERA, D.; LIMONGI, G.; BERTULHO, M.; CANCELA, M.; *Ralstonia pickettii* bacteremia in hemodialysis patients: a report of two cases. **Revista Brasileira Terapia intensiva**, v. 28, n. 2, 2016.

TERRA, R.; SILVA, S. A. G. D.; PINTO, V. S.; DUTRA, P. M. L. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 18, p. 208-214, 2012.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE, P.; OSBOURN, A. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual review of plant biology**, v. 65; p. 225-257, 2014.

TORQUILHO, H. S.; PINTO, A. C.; GODOY, R. L. O.; GUIMARÃES, E. F. Essential Oil of *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 4, p. 429-430, 1999.

TOTSCH, S. K.; SORGE, R. E. Immune system involvement in specific pain conditions. **Molecular pain**, v. 13, 2017.

TSUJI, S.; KANEKO, K. Genetic disorders and oxidative stress (especially chronic granulomatous disease). **Studies on Pediatric Disorders**, p. 315-327, 2014.

VIEIRA FILHO, J. E. O.; GASQUES, J. G. O. **Agricultura, transformação produtiva e sustentabilidade**. Brasília, DF; Ipea, 2016.

VIEIRA JUNIOR, J. R. **Procariotas residentes do filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. 2005. 146p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; FONSECA, A. S.; SANGI, S. C.; MARCOLAN, A. L.; CARARO, D. C.; OSMARI, E. K.; FREIRE, T. C.; MATOS, S. I. Estudo etiológico e epidemiológico da morte-das pastagens em Rondônia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 76**. Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, 2015.

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIM, L. Espécies de plantas nativas da Flora Brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste. Brasília. **Ministério do Meio Ambiente**, 2016.

WENDLAND, A.; LOBO JUNIOR, M.; de FARIA, J. C. Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro-comum. **Embrapa Arroz e Feijão-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

WENIGER B.; LOBSTEIN A.; UM B.; VONTHORON-SÉNÉCHAU C.; ANTON R.; USUGA N.J.; BASARAN, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytother Research**, n. 19, p. 75 -77, 2005.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory investigation**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

YANG, Y.; BAZHIN, A.V.; WERNER, J.; KARAKHANOVA, S. Reactive oxygen species in the immune system. **International reviews of immunology**, v. 32, n. 3, p. 249-270, 2013.

YIN, C.; HEIT, B. Armed for destruction: formation, function and trafficking of neutrophil granules. **Cell Tissue Research**, v. 371, n. 3, p. 455-471, 2018.

YUNCKER, T. G. **Hoehnea**, v. 2, p. 19-366, 1972.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae - A Family Profile. **Brittonia**, v. 10, p. 1-7, 1958.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p.1051-1056, 2013.

ZULIANI, J. P.; SOARES, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming. **Toxicon**, v. 187, p. 188-197, 2020.

ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Introduction: forum in immunology on neutrophils. **Microbes and infection**, v. 5, n. 14, p. 1, 2003.

ANEXOS



GÊNERO PIPER: ASPECTOS BOTÂNICOS, QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE SUAS ESPÉCIES

ARTIGO DE REVISÃO

BASTOS, Jessica Silva Felix¹, FONSECA, Aline Souza da², FERNANDES, Cleberson de Freitas³, VIEIRA JÚNIOR, José Roberto⁴, ZULIANI, Juliana Pavan⁵

BASTOS, Jessica Silva Felix. **Gênero piper: aspectos botânicos, químicos e biológicos de suas espécies.** Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 08, Ed. 12, Vol. 03, pp. 127-159. Dezembro de 2023. ISSN: 2448-0959, Link de acesso: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/biologia/aspectos-botanicos>, DOI: 10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/biologia/aspectos-botanicos

RESUMO

O gênero Piper é o maior da família piperaceae, com mais de 2.000 espécies descritas. De distribuição pantropical, no Brasil as espécies desse gênero ocorrem em todo o país com destaque nas florestas Amazônica e Atlântica. Sendo amplamente utilizado para as mais diferentes finalidades, o gênero Piper possui grande interesse para a comunidade científica. Dessa forma características botânicas, propriedades químicas e atividades biológicas atribuídas as espécies do gênero Piper são amplamente estudadas. Espécies pertencentes ao gênero são historicamente utilizadas como medicinais, como anti-inflamatório e analgésico, o que pode estar ligado à grande variedade de compostos presentes em suas espécies como apontam estudos, onde majoritariamente são descritos safrol, monoterpenos e sesquiterpenos, além dos metabólitos secundários alcaloides, triterpenos, cumarinas, saponinas, taninos e flavonoides. O gênero ainda se destaca por apresentarem ação antimicrobiana, inseticida, fungicida e bactericida, sendo promissora para futura utilização na indústria farmacêutica e de insumos para a agricultura no controle de pragas. Dessa forma, a importância do levantamento de dados científicos sobre espécies pertencentes ao gênero Piper ficou comprovada.

Palavras-chave: Piperaceae, Espécies nativas, Potencial microbicida.



1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui em sua flora mais de 50.000 espécies, sendo o grupo das Angiospermas o mais diverso em variedade de plantas, com aproximadamente 35.000 espécies descritas no país (Flora e Funga do Brasil, 2023). Entre as importantes famílias que compõem esse grupo, destaca-se a família Piperaceae.

De distribuição Pantropical, a família Piperaceae é encontrada na região neotropical e centro das Américas Central, Sul e do Norte. No Brasil é amplamente distribuída na Amazônia e na Mata Atlântica nas quais ocorrem em torno de 500 espécies agrupadas em 5 principais gêneros: *Macropiper*, *Zippelia*, *Manekia*., *Peperomia* Ruiz e Pav., e *Piper* L. (Nascimento *et al.* 2022).

De grande importância econômica e medicinal, dessa família destacam-se o gênero *Peperomia*, que apresenta espécies cultivadas com finalidades ornamentais e medicinais (Mora-Vivas *et al.* 2016) e o gênero *Piper* formado por espécies empregadas na culinária e espécies utilizadas de modo empírico por diferentes populações no tratamento de doenças, sendo este o gênero mais estudado e conhecido do ponto de vista químico (Nascimento e Lima, 2023).

Da família Piperaceae, o gênero *Piper* é o que apresenta maior número de espécies com aproximadamente 2.000 (BFG, 2015). Aproximadamente 289 espécies deste gênero são encontradas no Brasil, destas 183 são endêmicas e distribuídas em todas as regiões do país, com a região norte abrigando 184 espécies, 22 destas no estado do Tocantins, 41 em Roraima, 47 no Amapá, 66 em Rondônia, 83 no Acre, 106 no Pará, e a pluralidade as espécies identificadas no Brasil são encontradas no estado do Amazonas sendo 140 espécies (Guimarães *et al.* 2022).

Inúmeras espécies do gênero *Piper* possuem odor peculiar, resultado da presença de óleos essenciais nessas plantas, que se concentram principalmente nas folhas e frutos, sendo que esses óleos vêm sendo estudados por apresentarem em sua



composição substâncias químicas com potencial uso comercial, industrial e medicinal (Vieira *et al.*, 2016). Gogosz *et al.* (2012) reforça que a presença de conteúdo oleífero nas estruturas de espécies do gênero *Piper* faz com que essas plantas sejam utilizadas na medicina popular e apresente importância econômica.

O potencial medicinal das espécies do gênero *Piper* está relacionado a capacidade dessas plantas em produzir metabólitos secundários que apresentam importantes efeitos na saúde (Salehi *et al.* 2019). Diante disso, espécies desse gênero vêm sendo amplamente estudadas por apresentarem potencial biotecnológico na produção de novos produtos tanto para a indústria farmacêutica quanto insumos de aplicação agrícolas (De Oliveira e Rodrigues, 2021).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo reunir os principais aspectos botânicos, químicos e biológicos do gênero *Piper*, assim como de suas espécies, publicados na literatura até o momento, afim de compilar a ação dessas espécies.

1.1 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICOS DA FAMÍLIA PIPERACEAE E GÊNERO PIPER

No sistema de Engler a ordem Piperales é considerada como o grupo mais primitivo das Dicotiledôneas (Barroso *et al.* 2002). Espécies pertencentes a essa ordem encontram-se evolutivamente na base das angiospermas (Silva, 2013).

Em relação aos aspectos culturais, econômicos e científicos a família Piperaceae está entre as mais importantes da ordem Piperales. Conforme Yuncker (1972) a família foi descrita por Linnaeus no século XVIII, que lhe conferiu na época quatro gêneros, sendo *Piper* descrito em 1737.

De acordo com a classificação taxonômica de Cronquist (1981), o gênero *Piper* pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae, ordem Piperales, família Piperaceae. Alguns autores consideram as espécies da



família Piperaceae como muito primitivas e derivadas da Ginitales (Barroso *et al.* 2002).

As Piperaceae compreendem ervas terrestres, epífitas, subarbustos, árvores e arvoretas ou trepadeiras, com caules nodosos e articulados, folhas alternas, opostas com formatos variáveis, suas inflorescências podem ser em racemos ou espigas e flores aclamídeas, bissexuais ou unissexuadas, protegidas por bractéolas glabras ou pilosas (Melo *et al.* 2013). As pequenas flores de Piperaceae são, possivelmente, polinizadas por insetos (Judd *et al.* 2009).

Sendo predominantemente tropical, a família Piperaceae é bastante comum nas formações florestais brasileiras, principalmente na Mata Atlântica, onde espécies de *Piper* são facilmente encontradas e reconhecidas pela presença de nós foliares geniculados e folhas com base assimétrica (Souza e Lorenzi, 2012).

De origem nativa, o gênero *Piper* está entre os principais gêneros da família (Judd *et al.* 2009). O gênero é composto por arbustos ou arvoretas que variam de 1 a 10 metros de altura, com caules habitualmente nodosos. As folhas desse gênero são alternas, lâminas com base assimétrica, glabra ou pilosa, glandulífera e pecíolo vaginado-sulcado na base ou até a ápice, já as inflorescências são opostas às folhas em formato de espiga (Bardelli *et al.* 2008).

Espécies pertencentes a este gênero são utilizadas como medicinais, como o jaborandi-falso (*Piper amalago*) utilizado como anti-inflamatório e analgésico (Barros *et al.* 2015), a pariparoba ou caapeba (*Piper umbellatum*) utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios gástricos (Silva-Júnior *et al.* 2016). Outra espécie de grande importância econômica é a *Piper nigrum*, seus frutos fornecem a pimenta-do-reino, uma das especiarias mais antigas (Judd *et al.* 2009).



1.2 PROPRIEDADES QUÍMICAS DAS ESPÉCIES DO GÊNERO PIPER

Os compostos químicos presentes nas espécies pertencentes ao gênero *Piper* vêm sendo descritos na literatura com a finalidade de identificar substâncias correlacionadas ao potencial medicinal ou tóxico de cada espécie (Tabela 1). Alguns estudos com essa finalidade são descritos a seguir.

Tabela 1: Constituintes químicos identificados em espécies do gênero *Piper*

Espécie	Parte da planta estudada	Componente majoritário	Referência
<i>Piper tuberculatum</i>	Raiz	Pipltartina- dímero A	Braz Filho <i>et al.</i> (1981)
	Folhas	Sesquiterpenos Monoterpenos germacreno D (11,81%) (E)- cariofileno (37,78%)	Cysne <i>et al.</i> (2005)
	Folhas, talos, inflorescências	Alcaloides glucosídeos cardiotônicos, cumarinas e taninos	Gonçalves e Lima (2016)
	Folhas, talos, inflorescências	Alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas e triterpenos	Freire <i>et al.</i> 2022
<i>Piper aduncum</i>	Frutos	Ácido benzoico e derivados de flavonoides	Burke e Nair (1986)
	Folhas, raízes e caules	E-nerolidol (14,2%) Sesquiterpenos	Mesquita <i>et al.</i> (2005)
	Folhas	E-nerolidol, Longipinanol	Oliveira <i>et al.</i> 2006
<i>Piper hispidum</i>	Frutos	Ácido benzoico e derivados de flavonoides	Burke e Nair (1986)
	Folhas, raízes e caules	α-Pineno (14%)	Mesquita <i>et al.</i> 2005



		Monoterpenos	
	Folhas	b-pineno (19,7%), alfa-pineno (9,0 %)	Potzernheim <i>et al.</i> 2006
<i>Piper hispidinervum</i>	Folhas	Safrol (98,12%)	Maia <i>et al.</i> (1987)
	-	Safrol Mentol	Lobato <i>et al.</i> (1989)
<i>Piper callosum</i>	Folhas	Safrol (64,02%)	Maia <i>et al.</i> (1987)
	Folhas	safrol (74,24%) α -Pineno (20,94%) β -Pineno (12,84%) δ -cadineno (12,7%)	Queiroz (2021)
<i>Piper permucronatum</i>	Folhas	Dilapiol (54,70%) Miristicina (25,61%)	Torquillo <i>et al.</i> (1999)
<i>Piper regnelii</i>	Raízes	Fenilpropanoides 4'7-epoxi-8,3-neolignanos 8',9'-dinor -4'7-epoxi-8,3-neolignanos	Benevides <i>et al.</i> (1999)
	Folhas	Biciclogermacreno (21,88%) β -cariofileno (20,69%) Mirceno (52,60%)	Costantin <i>et al.</i> (2001)
	Folhas, raízes e caules	Cetona sesquiterpênica (43,4%) Sesquiterpenos	Mesquita <i>et al.</i> (2005)
<i>Piper cernuum</i>	Folhas	Biciclogermacreno β -cariofileno Mirceno	Costantin <i>et al.</i> (2001)
	Folhas, raízes e caules	trans-Dihidroagarofurano (22,4%) Sesquiterpenos	Mesquita <i>et al.</i> (2005)
<i>Piper amalago</i>	Folhas, raízes e caules	Emelol (36%) Sesquiterpenos	Mesquita <i>et al.</i> (2005)
	Folhas	Biciclogermacreno (11%),	Monteiro (2021)



		Espatulenol (9,21%), βfelandreno (8,12%)	
	Folhas	α-pineno (6,17%) α-Zingibereno (19,31%)	Humberto (2021)
<i>Piper arboreum</i>	Folhas, raízes e caules	Oxido de cariofileno (36,5%) Sesquiterpenos	Mesquita et al. (2005)
	Folhas	Sesquiterpenos biciclogermacreno (25,03%) (E)-nerolidol (11,12%) e (E)-cariofileno (8,35%)	Cysne et al. (2005)
	Folhas	Biciclogermacreno (12,1%), 10-epi-g-eudesmol (11,6%) óxido de cariofileno (10,1%)	Potzernheim et al. (2006)
<i>Piper submarginalum</i>	Folhas, raízes e caules	α-Pineno (28,2%) Monoterpenos	Mesquita et al. (2005)
<i>Piper vicosanum</i>	Folhas, raízes e caules	Limoneno (45%) Monoterpenos	Mesquita et al. (2005)
<i>Piper umbellatum</i>	Folhas, raízes e caules	Germacreno D (27,4%) Sesquiterpenos	Mesquita et al. (2005)
	Caules	Flavonoides Alcaloides Triterpenos	Kloss et al. (2016)
<i>Piper crassinervium</i>	Folhas	Sesquiterpenos Monoterpenos linalol (28,61%) beta-pineno (20,01%) 1,8-cineol (10,81%) alfa-pineno (11,27%)	Cysne et al. (2005)
	Folhas	Sesquiterpenos Monoterpenos biciclogermacreno (25,07%)	Cysne et al. (2005)



	Folhas	alfa-felandreno (22,53%)	Potzernheim <i>et al.</i> (2006)
		delta-3-carene (10,20%)	
		cis-b-ocimeno (19,6%)	
		b-cariofileno (11,3%)	
<i>Piper carniconnectivum</i>	Folha	óxido de cariofileno (21,3%);	Facundo <i>et al.</i> (2006)
		espatulenol (23,7%);	
	Caules	α -pineno (19,0%)	
		espatulenol (23,7%);	
<i>Piper divaricatum</i>	Raízes	α -pineno (19,0%)	Chaves (2008)
		Piperlonguminina	
<i>Piper malacophyllum</i>	Folhas	ácido benzóico	Santos <i>et al.</i> (2012)
		(+)-cânfora (97,6%)	
<i>Piper piscatorium</i>	Raízes	Monoterpenos	Pimentel <i>et al.</i> (2012)
		Sesquiterpenos	
		ésteres	
		selin-11-en-4- α -ol (57,63%)	
		benzoato de benzila (15,40%)	
<i>Piper glandulosissimum</i>	Ramos	Flavonas	Santos <i>et al.</i> (2015)
		Chalconas	
		Dihidrocalcona	
<i>Piper nigrum</i>	Frutos maduros	Piperina	Almeida (2017)

Fonte: Autores (2023).

Uma importante pesquisa sobre as piperaceas foi publicada por Braz Filho *et al.* (1981) que isolaram das cascas da raiz da espécie *Piper tuberculatum* a pipartina-dímero A, um dímero biologicamente ativo pertencente a classe dos alcaloides. A pipartina tem como estrutura química {5,6-dihidro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-propenil]-2(1H) piridinona}, encontrada nas raízes e caules de espécies de Piper,



vem sendo amplamente estudada por apresentar propriedades biológicas de interesse para a saúde e agricultura (Bezerra *et al.* 2006; Lima, 2022).

Das espécies *Piper aduncum* e *Piper hispidum* Burke e Nair (1986) isolaram a partir de seus frutos, fenilpropeno, ácido benzoico e derivados de flavonoides. Já Maia *et al.* (1987) ao estudarem as espécies *P. hispidinervum* e *Piper callosum* identificaram que o safrol constitui-se no principal componente volátil dos óleos essenciais das duas espécies, sendo que na primeira o teor identificado foi de 98,12%.

Em um estudo semelhante, o potencial antimicrobiano identificado a partir do óleo essencial da espécie *P. hispidinervum* foi atribuído à presença predominante do safrol em sua composição, potencializado por uma pequena quantidade de mentol que também se mostrou presente nas frações isoladas no estudo de Lobato *et al.* (1989). Torquillo *et al.* (1999) ao analisarem a composição química do óleo essencial da espécie *Piper permucronatum* identificaram um total de 33 compostos, sendo constituído principalmente por sesquiterpenos e uma pequena porcentagem de monoterpenos, sendo o componente majoritário o δ -cadineno (12,7%).

A fim de identificar os compostos presentes nas raízes da espécie *Piper regnelii*, conhecida popularmente como “pariparoba”, Benevides *et al.* (1999) isolaram três fenilpropanoides: apiol, dilapiol e miristicina, sete 4'7-epoxi-8,3-neolignanós, e três 8',9'-dinor -4'7-epoxi-8,3-neolignanós além de quatro novos neolignanós incluindo regnelina. Pouco tempo depois, Costantin *et al.* (2001) isolaram a partir do óleo essencial das folhas da mesma espécie os seguintes compostos, Biciclogermacreno (21,88%), β -cariofileno (20,69%), e mirceno (52,60%), os autores relataram a presença destes também na espécie *Piper cernuum*.

Um estudo buscou realizar uma análise comparativa dos óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Piper*, sendo elas: *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper arboreum*, *Piper cernuum*, *Piper hispidum*, *Piper regnelii*, *Piper submarginalum*, *Piper vicosanum* e *Piper umbellata*, nas quais foram identificados



os seguintes compostos, beta-pineno, espatulenol, E-carifileno, óxido de cariofileno, germacreno D e alfa-pineno (Mesquita *et al.* 2005). Neste estudo foi observado que alguns compostos são específicos de cada espécie estudada, mas que as mesmas apresentam uma semelhança química importante, base para futuros estudos.

No mesmo ano, em um estudo semelhante, Cysne *et al.* (2005) ao estudarem os óleos essenciais de quatro espécies de Piper, os quais foram caracterizados mono e sesquiterpenos nos óleos das espécies *Piper crassinervium*, *Piper dilatatum* e *Piper tuberculatum*, e apenas sesquiterpenos nos da espécie *Piper arboreum* apontaram que os compostos que foram identificados em todas as espécies foram: beta-Elementene, (E) cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno e delta-cadineno.

Sesquiterpenos e monoterpenos também foram identificados nos óleos essenciais de diferentes amostras de *Piper aduncum*, sendo o E-nerolidol considerado o principal componente das amostras estudadas, seguido pelo Longipinanol (Oliveira *et al.* 2006). Óleos essenciais das espécies *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper hispidum* quando analisadas em cromatografia gasosa apresentaram predominância de sesquiterpenos, sendo os constituintes majoritários biciclogermacreno, cis-b-ocimeno e b-pineno de cada espécie, respectivamente (Potzernheim *et al.* 2006).

Facundo *et al.* (2006) identificaram como componente majoritário do óleo essencial da folha da espécie *Piper carniconnectivum*, o óxido de cariofileno, já do seu caule foi observada a presença de espatulenol e α -pineno. Um estudo para verificar a composição química de espécies de Piper indicou como componentes predominantes da espécie *Piper permucronatum*, o dilapiol e miristicina (De Moraes *et al.* 2007). Já Chaves (2008) ao estudar a espécie *Piper divaricatum* isolou e caracterizou a partir de suas raízes, a amida comumente conhecida como piperlonguminina além de dois derivados do ácido benzóico.



O relato da composição química do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Piper malacophyllum* indica a presença de 28 constituintes identificados de natureza terpênica, contendo mono e sesquiterpenos, como já mencionado em outras espécies, sendo a (+)-cânfora o constituinte majoritário (Santos *et al.* 2012). Monoterpenos e sesquiterpenos também foram identificados nas raízes frescas de *Piper piscatorium*, além de ésteres, que juntos representaram 98,69% da constituição volátil do material estudado (Pimentel *et al.* 2012).

Com o intuito de investigar os flavonoides da espécie *Piper glandulosissimum*, Santos *et al.* (2015) isolaram três flavonas, duas chalconas e uma dihidrocalcona a partir dos ramos da planta. Os autores apontaram semelhança dos compostos dessa espécie com outras pertencentes ao gênero *Piper*. Kloss *et al.* (2016) ao estudarem a espécie *Piper umbellatum* também relataram a presença de flavonoides nos extratos etanólicos a partir de seus caules, além da presença de alcaloides e triterpenos.

Em um estudo semelhante com folhas, talos e inflorescências da espécie *P. tuberculatum* observou-se também a presença de alcaloides nas folhas, além de glicosídeos cardiotônicos, cumarinas e taninos em todos os órgãos estudados (Gonçalves e Lima, 2016). Alcaloides foram caracterizados como composto majoritário nos frutos maduros de *Piper nigrum*, estes estabelecidos como piperina no estudo de Almeida (2017), que ainda identificou um teor significativo de constituintes químicos polifenólicos nas folhas dessa espécie.

Ao determinar o perfil químico do óleo essencial da espécie *Piper amalago*, Monteiro (2021) identificou em sua composição monoterpenoides e um maior teor de sesquiterpenoides, sendo os componentes majoritários o biciclogermacreno, espatulenol, β -felandreno e α -pineno. O que também foi observado na pesquisa de Humberto (2021) ao estudar a mesma espécie e constatar a predominância de sesquiterpenos na composição de óleo essencial, sendo o α -zingibereno o composto de maior concentração.



Um estudo sobre a composição química da espécie *Piper callosum* relata que as classes de metabólitos secundários detectados foram esteroides, saponinas e compostos fenólicos, sendo que o óleo essencial apresentou como compostos predominantes o safrol, α -pineno, β -pineno e cineol (Queiroz, 2021). A análise fitoquímica de folhas, talos e inflorescências das espécies *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum* demonstrou que ambas possuem em sua composição os metabólitos secundários alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, compostos fenólicos, cumarinas e triterpenos (Freire *et al.* 2022).

Percebe-se que a composição química do gênero vem sendo descrita ao longo dos anos de maneira isolada, conforme os constituintes de cada espécie. A variabilidade química constatada sugere a existência de perfis químicos distintos, o que aumenta a amplitude de possíveis utilidades dessas espécies na indústria farmacêutica e de insumos agrícolas.

1.3 POTENCIAL BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO PIPER

Espécies do gênero *Piper* vem sendo descritas na literatura por apresentarem em sua composição moléculas com ação antimicrobiana, inseticida, nematocida, fungicida e bactericida (Bohatch Junior *et al.* 2016, Braga *et al.*, 2017, Sangi *et al.* 2018, Bastos *et al.* 2018) (Tabela 2).

Tabela 2: Relação da atividade biológica de espécies do gênero *Piper*

Espécie	Tipo do material	Teste	Atividade	Patógeno	Referência
<i>Piper aduncum</i>	Extrato	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Ceratomyxa</i> <i>tingomarianus</i>	Alécio e Fazolin (2002)
	Extrato hidroalcolico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> e <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	Figueira <i>et al.</i> (2003)



	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Ceratomyxa tingomarianus</i>	Fazolin <i>et al.</i> (2005)
	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Sitophilus zeamais</i> Motsch	Estrela <i>et al.</i> (2006)
	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Tenebrio molitor</i> L. 1758	Fazolin <i>et al.</i> (2007)
	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Acaricida	<i>Rhipicephalus</i> (Boophilus) microplus	Silva (2008)
	Extrato etanólico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Streptococcus mutans</i> e <i>Streptococcus sanguis</i>	Magalhães, (2010)
	Extrato aquoso	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Garcia <i>et al.</i> (2012)
	Extrato hexânico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> .	Soares (2020)
<i>Piper alatabaccum</i>	Extrato acetônico	<i>In vitro</i>		<i>Hypothenemus hampei</i>	Santos <i>et al.</i> (2013)
	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	França <i>et al.</i> (2019)
<i>Piper arboreum</i>	Extrato hexânico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> e	Soares (2020)



				<i>Streptococcus sanguinis</i>	
<i>Piper augustum</i>	Extratos alcoólico	<i>In vitro</i>	Acaricida	<i>Tetranychus urticae</i>	Silva et al. (2009)
<i>Piper callosum</i>	Óleos essenciais	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Crinipellis pernicioso</i> , <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Phytophthora capsici</i>	Silva e Bastos (2007)
	Extrato aquoso	<i>In vivo</i>	Fungicida	<i>Colletotrichum</i> sp,	Vilamil et al. (2021)
<i>Piper dilatatum</i>	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Aedes aegypti</i>	Albuquerque et al. (2020)
<i>Piper enckea</i>	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Crinipellis pernicioso</i> , <i>Phytophthora palmivora</i> , e <i>Phytophthora capsici</i> .	Silva e Bastos (2007)
<i>Piper gaudichaudianum</i>	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Bianchini et al. (2022)
<i>Piper hispidinervum</i>	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Sitophilus zeamais</i> Motsch	Estrela et al. (2006)
	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Tenebrio molitor</i> L. 1758	Fazolin et al. (2007)
	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Alternaria alternata</i>	Nascimento et al. (2008)



	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Zacaroni et al. (2009)
<i>Piper hispidum</i>	Extrato acetônico	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Hypothenemus hampei</i>	Santos et al. (2010)
					Santos et al. (2011)
	Extrato alcoólico	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Rizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i>	Freire (2015)
	Extrato alcoólico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Bastos (2018)
<i>Piper hostmannianum</i>	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Aedes aegypti</i>	Albuquerque et al. (2020)
<i>Piper marginatum</i>	Extratos hidroalcoólico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Figueira et al. (2003)
	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Crinipellis perniciosa</i> , <i>Phytophthora palmivora</i> , <i>Phytophthora capsici</i> ,	Silva e Bastos (2007)
	Extrato metanólico	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Colletotrichum scovillei</i>	Araújo et al. (2014)



	Extrato aquoso	<i>In vivo</i>	Fungicida	<i>Colletotrichum</i> sp,	Macedo <i>et al.</i> (2021)
<i>Piper mollicomum</i>	Extrato alcoólico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i>	Almeida <i>et al.</i> (2019)
<i>Piper nigrum</i>	Extrato aquoso	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Fusarium verticillioides</i> e <i>Acremonium</i> sp	Barros <i>et al.</i> (2013)
	Material vegetal	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky	Scopel <i>et al.</i> (2018)
<i>Piper permucronatum</i>	Extrato alcoólico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Xanthomonas axonopodis</i> patovar <i>vesicatoria</i> e <i>Ralstonia solanacearum</i>	Bastos (2018)
<i>Piper regnellii</i>	Extrato hidroetanólico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pessini <i>et al.</i> (2003)
	Extrato	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	Lemos <i>et al.</i> (2011)
<i>Piper tuberculatum</i>	Extrato alcoólico	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Rizoctonia solani</i> e <i>Sclerotium rolfsii</i>	Freire (2015)
					Bastos <i>et al.</i> (2018)



	Extratos etanólicos e hexânicos	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Haemaphysalis irritans</i>	Braga et al. (2017)
	Extrato etanólico	<i>In vitro</i>	Acaricida	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Braga et al. (2018)
	Extrato alcoólico	<i>In vitro</i>	Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lima et al. (2018)
<i>Piper umbellatum</i>	Extrato etanólico	<i>In vitro</i>	Fungicida	<i>Rizoctonia solani</i>	Gusmão et al. (2020)
	Extrato etanólico	<i>In vitro</i>	Inseticida	<i>Aedes aegypti</i>	Pauliquevis et al. (2021)

Fonte: Autores (2023).

O potencial inseticida do gênero *Piper* foi evidenciado por Fazolin et al. (2005) ao avaliarem a toxicidade do óleo essencial de *Piper aduncum* no controle de *Ceratomyza tingomarianus* (conhecido popularmente como Vaquinha do feijoeiro), com eficiência em diferentes concentrações. Os extratos provenientes de *P. aduncum* também já haviam sido descritos por apresentarem efeito inibidor para a vaquinha do feijoeiro (Alécio e Fazolin, 2002).

De maneira semelhante, o óleo essencial de *P. aduncum* L. e *P. hispidinervum* C.DC. preparados em diferentes concentrações, apresentaram efeito inseticida quando testados no controle de *Sitophilus zeamais* Motsch (nome popular Gorgulho) (Estrela et al. 2006). Óleos essenciais das mesmas espécies de *Piper* foram eficientes sobre a taxa de mortalidade de larvas de *Tenebrio molitor* L. 1758, um coleóptero cujas larvas destroem farinhas, fubás, rações e grãos (Fazolin et al. 2007), o que caracteriza o potencial inseticida dessas espécies.

Extratos de diferentes órgãos vegetais de espécies de *Piper* também são descritos na literatura por apresentarem potencial inseticida, como nos estudos de Santos et



al. (2010) e Santos *et al.* (2011) que evidenciaram efeito inseticida dos extratos acetônicos das folhas e raízes de *P. hispidum* respectivamente, sobre *Hypothenemus hampei* responsável pela broca-do-café, com mortalidade de 100% para os extratos de folhas e 90% para os extratos das raízes nas maiores concentrações testadas. Já, Santos *et al.* (2013) ao investigarem extratos com efeito inseticida no controle do mesmo patógeno apontaram como eficiente o extrato preparado com as raízes de *P. alatabaccum* em todas as concentrações estudadas.

A espécie *P. tuberculatum*, amplamente estudada por apresentar propriedades medicinais, apresentou resultados promissores no controle da mosca-dos-chifres (*Haemetobia irritans*), um importante ectoparasito da pecuária bovina (Braga *et al.* 2017). Nesse estudo os autores testaram diferentes solventes para diferentes partes da planta, e apontaram como eficientes os extratos etanólico das folhas e dos talos e o extrato hexânico dos frutos da planta, o que demonstra o potencial diversificado da espécie.

Scopel *et al.* (2018) realizaram testes com a espécie *P. nigrum* frente ao inseto *Sitophilus zeamais* Motschulsky, conhecido popularmente como gorgulho-do-milho, e verificaram que a espécie apresenta propriedade inseticida e efeito repelente promissor para a praga.

Além de se mostrarem potencial controle para importantes insetos que assolam a agricultura, espécies de *Piper* também vêm sendo descritas por apresentarem eficiência no controle de insetos importantes para a saúde humana. Como apresentaram França *et al.* (2019) ao avaliarem o efeito biológicos de óleos essenciais de *P. alatabaccum* no controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, os autores constataram atividade larvicida em 24 horas de exposição e destacaram essa espécie de *Piper* como promissora no controle de insetos vetores.

Óleos essenciais das folhas de *P. dilatatum* e *P. hostmannianum* também foram avaliados para o controle da fase larval de *A. aegypti* e demonstraram ser uma



alternativa viável para tratamento do vetor, uma vez que ambos apresentaram taxa de mortalidade de quase 100% (Albuquerque *et al.* 2020). Assim, como o extrato etanólico da espécie *P. umbellatum* que foi eficiente contra larvas de estágio tardio e estágio inicial de *A. aegypti*, indicaram 100% de mortalidade em diferentes concentrações (Pauliquevis *et al.* 2021).

A atividade acaricida de espécies do gênero *Piper* também vem sendo descrita na literatura. A ação do óleo essencial de *P. aduncum* induziu mortalidade total de larvas do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, responsável por um dos principais parasitismo de bovinos no Brasil, uma possível alternativa de controle contra essa espécie de carrapato (Silva, 2008).

Silva *et al.* (2009) relataram a eficiência de extratos alcoólicos preparados a partir das folhas de espécies de *Piper* sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae*, uma praga do café, sendo a ação acaricida desses extratos observada em diferentes tempos de exposição ao ácaro. Extratos etanólicos das folhas, caules e frutos da espécie *P. tuberculatum* também apresentaram ação acaricida quando submetidas ao controle do carrapato *R. microplus* (Braga *et al.* 2018). Os autores apontaram a eficiência dos extratos ao combaterem as larvas, fêmeas ingurgitadas e na taxa de eclosão dos ovos de carrapato, e promoveram a espécie *P. tuberculatum* como uma fonte promissora de moléculas para o controle da praga.

A atividade fúngica das espécies do gênero *Piper* é amplamente descrita na literatura, tanto com óleos essenciais como com extratos a partir dessas plantas, em especial a ação destes no controle de fungos fitopatogênicos, que causam intensos prejuízos na agricultura.

Óleos essenciais das folhas de diferentes espécies de *Piper* foram eficientes em inibir o crescimento micelial e também a germinação de basidiósporos dos fungos *Crinipellis perniciosus*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*, causadores



da vassoura-de-bruxa e da podridão parda, respectivamente, doenças que acometem o cacaueteiro (Silva e Bastos, 2007).

O efeito fungicida do óleo essencial das folhas de *Piper hispidinervum* foi avaliado por Nascimento *et al.* (2008) sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata*, fungo causador de inúmeras doenças de plantas, e observaram inibição em todas as concentrações utilizadas. No ano seguinte, Zacaroni *et al.* (2009) publicaram resultados promissores com o óleo essencial da mesma espécie sobre três fungos fitopatogênicos, e relataram inibição total do crescimento micelial dos fungos quando em contato com o óleo em diferentes concentrações.

Como citado, os extratos vegetais também são descritos por apresentarem potencial fungicida. Extratos oriundos dos frutos de *Piper aduncum* L. apresentaram resultados promissores sobre a redução do crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco na cultura de soja, com 43% de inibição (Garcia *et al.* 2012). Extratos das folhas de *Piper marginatum* também apresentaram potencial fungicida ao inibir o crescimento micelial de *Colletotrichum scovillei*, fungo que causa a doença antracnose no pimentão (Araújo *et al.* 2014).

Extratos aquosos de *Piper Nigrum* foram eficazes em diferentes concentrações ao inibirem o crescimento micelial dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Acremonium* sp. em 42% e 32% respectivamente, nesse estudo os extratos ainda foram comparados com o de outra espécie que não foi eficiente (Barros *et al.* 2013). Freire (2015) investigou o potencial dos extratos das espécies *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum* e constatou que ambas são eficientes em controlar o crescimento micelial dos fungos *Rizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, microorganismos que causam patologias em cultura de feijoeiro.

Ainda sobre testes para o controle dos patógenos *R. solani* e *S. rolfsii*, Sousa *et al.* (2018) e Bastos *et al.* (2018) evidenciaram o potencial dos extratos de diferentes espécies do gênero *Piper* como promissores fungicidas no controle dos fungos, em



testes *in vitro* e *in vivo*. Extrato etanólico preparado com as folhas da espécie *Piper umbellatum* provocou alterações no desenvolvimento do fungo *R. solani* em testes *in vitro* e, os autores observaram que não houve a formação de escleródios quando em contato com o extrato (Gusmão *et al.* 2020).

Macedo *et al.* (2021) relataram a redução da incidência da doença antracnose nos frutos de pimenta-de-cheiro, quando esses foram pulverizados com extratos aquosos de *P. marginatum*, podendo ser um produto biotecnológico promissor para ser utilizado de forma preventiva no manejo da doença. Ao estudarem o fungo causador da antracnose, *Colletotrichum* sp, Vilamil *et al.* (2021) investigaram a espécies *Piper callosum* sp. e relataram índice de inibição do crescimento micelial de até 75,62%.

Em um estudo mais recente, óleos essenciais obtido das folhas de *Piper gaudichaudianum* tiveram efeitos satisfatórios ao controlar fungos apodrecedores de madeira, o que indica o potencial dessa espécie na busca por produtos naturais que possam substituir preservantes de madeira sintético, conforme relatado por Bianchini *et al.* (2022).

O potencial bactericida das espécies do gênero *Piper* também vem sendo amplamente investigado com resultados promissores para a saúde e agricultura. Pessini *et al.* (2003) destacou o potencial do extrato de *Piper regnellii* no controle de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo o extrato que apresentou melhor resultado quando comparado aos demais tratamentos.

Extratos hidroalcóolicos obtidos a partir das folhas de *P. aduncum* e *P. marginatum* foram testados e consideradas eficientes no controle de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Figueira *et al.* 2003). Fazolin *et al.* (2006) ao descreverem as características gerais de *P. aduncum* apontaram o potencial de diferentes extratos dessa espécie, no controle de *Mycobacterium avium* - intracellulare, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.



Extratos da espécie *P. aduncum* foram investigados em diferentes métodos de extração (decocção, maceração, turbólise e soxhlet), quanto ao seu potencial bactericida frente a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*, onde foi possível observar inibição do patógeno em todos os extratos, com o extrato etanólico obtido a partir de decocção foi o mais ativo para ambas as espécies (Magalhães, 2010).

Os extratos da espécie *Piper regnelli* demonstraram eficiência contra o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e foram apontadas pelos autores como possíveis fitoterápicos de uso humano e animal (Lemos *et al.* 2011).

O potencial da espécie *P. tuberculatum* foi avaliada por meio de seus extratos de folhas, talos e inflorescências sobre a bactéria *S. aureus*, apresentando halos significativos de inibição da bactéria (Lima *et al.* 2018). O mesmo foi observado no estudo de Almeida *et al.* (2019) ao estudarem extratos de diferentes partes da planta *P. mollicomum* e identificarem efeito inibitório destes no controle da bactéria *S. aureus*, o que evidencia a capacidade bactericida de diferentes partes de ambas as espécies.

Cinco espécies de *Piper* foram investigadas quanto ao controle das bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas axonopodis* patovar vesicatoria e *Ralstonia solanacearum*, responsáveis por doenças que acometem o tomateiro, dentre estas os extratos alcoólicos de diferentes partes de *Piper permucronatum* se destacaram por apresentarem halos de inibição em diferentes concentrações (Bastos, 2018). A espécies *Piper arboreum* e *Piper aduncum* foram apontadas por Soares (2020) como fonte natural de compostos com atividade antimicrobiana frente às bactérias relacionadas as doenças bucais.

É possível observar o vasto potencial microbicida que vem sendo descrito ao longo dos anos de espécies de piperaceas, seja como óleos essenciais ou como extratos



brutos ou fracionados. Diante de vasta literatura, as espécies pertencentes ao gênero *Piper* são promissoras e com potencial biotecnológico para a busca de novos fármacos para a saúde humana e animal, e também para novos insumos agrícolas menos agressivos ao meio ambiente.

2. CONCLUSÕES

O gênero *Piper* possui grande relevância e importância dada a sua vasta aplicabilidade relatada na literatura. De origem nativa e predominantemente tropical, as espécies do gênero *Piper* apresentam uma composição química bastante diversificada, embora inúmeros estudos tenham identificado a presença de safrol, monoterpenos e sesquiterpenos em inúmeras espécies.

Estudos apontaram também a presença de metabólitos secundários como alcaloides, triterpenos, cumarinas, saponinas, flavonoides e taninos que se mostraram comuns entre as espécies. Entretanto, é possível observar que alguns compostos são característicos de cada espécie como por exemplo o composto dilapiol e miristicina descrito na espécie *Piper permucronatum* (De Moraes *et al.* 2007).

O potencial microbida das espécies do gênero *Piper* vem sendo amplamente descritos na literatura durante décadas. A capacidade inseticida, acaricida, fungicida e bactericida de extratos e óleos essenciais de numerosas espécies de *Piper* possui potencial biotecnológico com a possível utilização de derivados dessas plantas na obtenção tanto de novos fármacos quanto de novos insumos para a agricultura.

3. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, através do Projeto CFF – Número 485047/2013-6, à Fundação de Amparo ao desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do estado



de Rondônia – FAPERO, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMPBRAPA, a Fundação Oswaldo Cruz Rondônia – FIOCRUZ.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, J. S.; GAMA, E.; FRANÇA, L. P.; DE JESUS, R. P. Atividade larvicida dos óleos essenciais de *Piper Dilatum* e *Piper Hostmannianum* (piperaceae) para o controle de *Aedes Aegypti* (culicidae) em laboratório. **DêCiência em foco**. 4, 1, 22-28, 2020.

ALÉCIO, M.; FAZOLIN, M. Extrato de *Piper aduncum* no controle da vaquinha-do-feijoeiro (*Ceratomyxa tingomarianus* Bechyné). Anais -XI Seminário de Iniciação Científica. **Embrapa Acre**, 2002.

ALMEIDA, K. P. C.; BARROS, A. C. V.; PANTOJA, T. M. A.; CAVALCANTE, F. S.; LIMA, R. A. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper mollicomum* KUNTH (Piperaceae) E seu potencial antimicrobiano. **Revista Gestão e Sustentabilidade ambiental**. v. 8, n.3, 2019.

ALMEIDA, L. A. D. **Caracterização fitoquímica de *Piper nigrum* L.** 2017. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Bacharelado) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Ceará, 2017.

ARAÚJO, E. R.; HARAND, W.; LIMA, I. C.; DIAS, F. C. R.; SANTANA, A. A. D. D.; CARVALHO, R. R. D. C.; LARANJEIRA, D. Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 49, p. 88-94, 2014.

BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A.V.G. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçú-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, p. 553-561, 2008.

BARROS, A. L.; IWAMOTO, R. D.; CARDOSO, C. A. L.; VITORINO, G. T.; DA SILVA MOTA, J.; FERNANDES, C. V.; LANZA JUNIOR, U.; ARENA, A. C.; SHINZATO, M. M.; KASSUYA, C. A. L. Breve Comunicação Interdisciplinar: Análise anti-inflamatória do óleo essencial obtido de *Piper amalago* (Piperaceae). **PECIBES**, v. 1, n. 1, 2015, p. 34-39.

BARROS, L.; ADORIAM, A.; KOBAYASTI, L. Uso de extratos vegetais na inibição do crescimento micelial *in vitro* de *Acremonium* sp. e *Fusarium verticillioides*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, 2013.



BARROSO, G. M.; PEIXOTE, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2ª Edição. Viçosa. Minas Gerais. Brasil. Editora UFV, 2002.

BASTOS, J. S. F. **Extrato de Piper no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas**. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Federal de Rondônia. Rolim de Moura, 2018.

BASTOS, J. S. F.; FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; FONSECA, A. S.; FREIRE, T. C.; SANGI, S. C.; OGRODOWCZYK, L.; OLIVEIRA, K. C. C.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S. Potencial de controle de espécies de Piper sobre fungos fitopatogênicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.8, p.260-272, 2018.

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, MASSUO J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 2, p. 339-343, 1999.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA M. A. S; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 39, p. 801-807, 2006.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n.4, p.1085-1113, 2015.

BIANCHINI, N. H.; GOUVEIA, F. N.; DA SILVEIRA, M. F.; PINHEIRO, C. G.; HEINZMANN, B. M. Óleos essenciais de *Blepharocalyx*, *Nectandra* e *Piper*: atividade sobre fungos apodrecedores de madeira. **Nativa**, v. 10, n.3, p. 417-422, 2022.

BOHATCH JÚNIOR, M. S.; ESMERINO, L. A.; SILVA, R. Z.; VOLPATO, A. M. Efeitos da atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico da *Piper solmsianum* e *Equisetum arvense*. **Electronic Journal of Pharmacy**, v. 13, n. 2, p. 100-106, 2016.

BRAGA, A. G. S.; BARBIERI, F. S.; BRITO, L. G; CELESTINO, C. O.; COSTA, T. S.; FACUNDO, V. A. Atividade pesticida de extratos de *Piper tuberculatum* Jacq sobre *Haematobia irritans* L. **Biota Amazônia**, Open Journal System, v. 7, n 1, p. 54-57, 2017.

BRAGA, A. G. S.; SOUZA, K. F. A.; BARBIERI, F. S.; FERNANDES, C. F.; ROCHA, R. B.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; LACERDA, C. L; CELESTINO, C. O.; FACUNDO, V. A.; BRITO, L. G. Acaricidal activity of extracts from different structures of *Piper*



tuberculatum against larvae and adults of *Rhipicephalus microplus*. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 57-62, 2018.

BRAZ FILHO, R.; DE SOUZA, M. P.; MATTOS, M. E. O. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v.20, n. 2, p.345-346, 1981.

BURKE, B.; NAIR, M. Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican Piper species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1427-1430, 1986.

CHAVES, J.H. **Contribuição ao estudo químico de *Piper divaricatum* e *Schinus terebinthifolius***. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Centro de Ciências. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. Ceará, 2008.

COSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M. J.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P., KATO, M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta medica**. v. 67, n. 08, p. 771-773, 2001.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University**, 1260p, 1981.

CYSNE, J. B.; CANUTO, K. M.; PESSOA, O. D. L.; NUNES, E. P.; SILVEIRA, E. R. Leaf essential oils of four Piper species from the State of Ceará-Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1378-1381, 2005.

DE MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; DOS ANJOS JÚNIOR, J. F.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; DE SOUZA NETO, M. A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n.10, p. 670-675, 2007.

DE OLIVEIRA, J. A. D. S.; RODRIGUES, D. W. Óleos essenciais de Piper L. (Piperaceae) e sua aplicação biotecnológica na agricultura: uma revisão da literatura. **Arquivos do Mudi**, v.25, n.2, p. 100-110, 2021.

ESTRELA, J. L. V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. D. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p. 217-222, 2006.

FACUNDO, V. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, Â. C. Essential oil of Piper carniconnectivum C. CD. leaves and stems. **Journal of essential oil research**, v.18, n.3, p. 296-297, 2006.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L.V.; CATANI, V.; DA COSTA, C. R. **Potencialidades da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.)**: características gerais e resultados de pesquisa, Embrapa Acre, 2006.



FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. D. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p. 113-120, 2007.

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

FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; SILVA, C. A. L.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana do extrato e do óleo essencial de *Piper* spp cultivadas na coleção de germoplasmas do CPQBA-Unicamp. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p.403, 2003.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 21 mar, 2023.

FRANÇA, L.; MARQUES, L.; de LIMA, R. L.; CHAVES, F.; TADEI, W. Análise química e biológica de *Piper alatabaccum* para controle de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em laboratório. In: **Congresso nacional e semana acadêmica de biotecnologia da universidade do estado Amazonas-UEA**, v. 4. 2019, Manaus. UEA, 2019.

FREIRE, T. C. **Extrato vegetal de piper com potencial atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***. 2015. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Federal de Rondônia. Rolim de Moura, 2015.

FREIRE, T. C.; SANGI, S. C.; BASTOS, J. S. F.; DA FONSECA, A. S.; DA SILVA, R. R.; JUNIOR, J. R. V.; FERNANDES, C. F. Avaliação fitoquímica de folhas, talos e inflorescência de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*. **Research, Society and Development**, v.11, n.7, 2022.

GARCIA, R. Á.; JULIATTI, F. C.; BARBOSA, K. A. G.; CASSEMIRO, T. A. Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre *Sclerotinia sclerotiorum*. **Bioscience. Journal (Online)**, p. 48-57, 2012.

GOGOSZ, A. M.; BOEGER, M. R. T.; NEGRELLE, R. R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, p. 405-417, 2012.

GONÇALVES, A. P. S.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* JACQ. **South American**



Journal of Basic Education, Tachical and Technological. v. 3, n. 2; p.100-109, 2016.

GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS, E. V. S. S.; QUEIROZ, G. A. Piper in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12735>>. Acesso em: 18 maio, 2022.

GUSMÃO, D. E.; CHAVES, P.; MATIAS, R.; PEDRINHO, D. R.; PEREIRA, S. R.; CORRÊA, B. O. Avaliação do Efeito do Extrato Etanólico de *Piper umbellatum* L. no Controle Alternativo de *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*. **Ensaios e Ciência Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24(5-esp.), p. 516-522. 2020.

HUMBERTO, Ana Paula dos Santos. **Análise do perfil químico e anatômico de três espécies de Piper do oeste do Paraná**. 2021. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Santa Helena, 2021.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F., DONOGHUE, M. J. Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético. Tradução de Simões, A.O., Singer, R.B., Singer, R.F., Chies, T.T.S. 3ª edição. Porto Alegre. Rio Grande do Sul. **Editora Artmed**, 2009.

KLOSS, L. C.; ALBINO, A. M.; SOUZA, R. G.; LIMA, R. A. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae). **South American Journal of Basic Education, Tachical and Technological**, v. 3, p. 118-128, 2016.

LEMOS, C. O. T.; GONÇALVES, R. M.; SIQUEIRA, V. L. D.; FILHO, L. C.; CABRAL, V. F. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de extratos de Pariparoba. **VII EPCC–Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**, Maringá, 2011.

LIMA, G. M. de. **Atividade fitotóxica e análise toxicológica de piplartina: aplicação em processos biotecnológicos**. 2022. 122f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. Paraná, 2022.

LIMA, R. A.; BARROS, A. C. V.; ALMEIDA, K. P. C.; PANTOJA, T. M. A. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Revista Eletrônica da FAINOR**, v. 11, n. 2, 2018.

LOBATO, A. M.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. D. F. D. S.; MAIA, J. G. S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 19, p. 355-363, 1989.



MACEDO, R. G. L.; DA SILVA, J. L. D. S.; SOUZA, A. Q. L. Produtos naturais no controle de *Colletotrichum* sp. associado a pimenta-de-cheiro (*Capsicum chinense* Jacq.). **Agrarian**, v. 14, n. 52, p. 194-202, 2021.

MAGALHAES, Chaiana Fróes. **Efeito de extratos e frações de *Piper aduncum* sobre o crescimento e metabolismo dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis***. 2010.53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Imunopatologia) Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares. Minas Gerais, 2010.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. D.; LUZ, A. I.; ZOGHBI, M. D. G.; RAMOS, L. S. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, v. 10, n. 3, p. 200-204, 1987.

MELO, A.; ARAÚJO, A. A.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Aristolochiaceae e Piperaceae. **Rodriguésia**, v. 64, p. 543-553, 2013.

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

MONTEIRO, L. M. **Investigação etnofarmacológica de *Piper amalago* L. (Piperaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, 2021.

MORA-VIVAS, F. D.; VELASCO, J.; DÍAZ, T.; ROJAS-FERMÍN, L.; RÍOS-TESCH, N.; CARMONA, J. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de Peperomia acuminata de los Andes venezolanos. **Revista peruana de biología**, v. 23, n. 3, p. 301-304, 2016.

NASCIMENTO, E. V.; BONILLA, O. H.; DE LUCENA, E. M. P.; DO NASCIMENTO, Y. A. P.; VIEIRA, M. I. C.; FARIAS, I. B. M.; NASCIMENTO, S. F.; DE LIMA, F. R. A. Ocorrências e usos da Família Piperaceae, em especial no Estado do Ceará: Revisão e nova identificação geográfica Occurrences and uses of the Piperaceae Family, especially in Ceará state: Review and new geographical identification. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 183-205, 2022.

NASCIMENTO, L. D. S.; LIMA, R. A. Uma revisão bibliográfica sobre as piperaceae para fins medicinais e econômicos. **Educamazônia - Educação, Sociedade e Meio Ambiente**, v. 16, p. 200-214, 2023.

NASCIMENTO, F. R.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; LIMA, R. K.; SALGADO, A. P. S. P.; GUIMARÃES, L. G. L. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, p. 503-508, 2008.



OLIVEIRA, J. C.; DIAS, I. J.; DA CAMARA, C. A.; SCHWARTZ, M. O. Volatile constituents of the leaf oils of *Piper aduncum* L. from different regions of Pernambuco (Northeast of Brazil). **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 5, p. 557-559, 2006.

PAULIQUEVIS, C. F.; OLIVEIRA, A. K. M.; MATIAS, R.; SILVA, P. G.; ZANELLA, D. D. F. P.; ROEL, A. R.; PORTO, K. R. Efeito larvídica do extrato etanólico de *piper umbellatum* sobre o mosquito *Aedes aegypti*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 1, p. 84-101, 2021.

PESSINI, G. L.; HOLETZ, F. B.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. D. G.; ANDRADE, M. A.; ZACARONI, L. M.; GUIMARÃES, L. G. D. L. Influência da secagem sobre o rendimento e composição química dos compostos voláteis das raízes de *Piper piscatorum* Trel. & Yunck. (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 715-718, 2012.

POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Analysis of the essential oil of three species of *Piper* collected in the region of the Distrito Federal (Cerrado-Brazilian Savannah) and comparison with oils of plants from region of Paraty, State of Rio de Janeiro (Atlantic Rain Forest). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 246-251, 2006.

QUEIROZ, Cesar Castelo Branco de. **Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum* Ruiz & Pav. (Piperaceae)**. 2021. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET). Itacoatiara. São Paulo, 2021.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T. B.; FIDALGO, L. M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N. *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n.7, 2019.

SANGI, S. C.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; BASTOS, J. S. F.; FONSECA, A. S.; FREIRE, T. C.; OGRODOWCZYK, L.; NUNES, J. D. K.; OLIVEIRA, K. C. C.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S. Extratos de *Piper* no controle alternativo de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* em *Coffea canephora*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.8, p. 212-223, 2018.



SANTOS, F. P.; ALVES, H. D. S.; LIMA, E. D. O.; CHAVES, M. C. D. O. Flavonoides de *Piper glandulosissimum* Yuncker (Piperaceae). **Química Nova**, v. 38, p. 172-177, 2015.

SANTOS, M. R. A. D.; SILVA, A. G.; LIMA, R. A.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; POLLI, A. R.; FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Brazilian Journal of Botany**, v. 33, p. 319-324, 2010.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; TEIXEIRA, C. A. D.; ALPIREZ, I. P. V.; FACUNDO, V. A. Composição química e atividade inseticida do extrato acetônico de *Piper alatabaccum* Trel & Yuncker (Piperaceae) sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, p. 332-336, 2013.

SANTOS, M. R.; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; TEIXEIRA, C. D.; LIMA, D. K.; POLLI, A. R.; FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato de raiz de *Piper hispidum* HBK (Piperaceae) sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 3, 2011.

SANTOS, T. G.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; GASPER, A. L. D.; CRUZ, A. B.; SCHIMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, p. 477-481, 2012.

SCOPEL, W.; SCOPEL, E. L.; BOTTEON, V. W.; ROZA-GOMES, M. F. Bioatividade de macerados de *Anthemis* sp., *Coriandrum sativum* e *Piper nigrum* contra *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Evidência**, v. 18, n.1, p. 95-109, 2018.

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

SILVA, G. A. T. da. **Estudo fitoquímico das folhas e frutos de *Piper caldense* C. DC. (Piperaceae)**. 2013. 204f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba: João Pessoa, 2013.

SILVA JUNIOR, I. F., Balogun, S. O., de Oliveira, R. G., Damazo, A. S., & de Oliveira Martins, D. T. *Piper umbellatum* L.: A medicinal plant with gastric-ulcer protective and ulcer healing effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 123-131, 2016.



SILVA, N. R. D.; SILVA, G. A.; PICANÇO, M. C.; XAVIER, V. M.; PEREIRA, R. M.; TOMAZ, A. C. Toxicidade de extratos de plantas ao ácaro rajado *tetranychus urticae*. In: **Simpósio dos Cafés do Brasil**. 6, Vitória, Espírito Santo, 2009.

SILVA, W. C. **Potencialidade acaricida sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e estudo fitoquímico de *Piper aduncum* L. (Piperaceae), *Palicourea marcgravii* St. Hil (Rubiaceae) e *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)**. 2008. 128f. Tese – (Doutorado em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

SOARES, Karoline Vitória da Cruz. **Estudo da composição química e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos das folhas de *Piper arboreum* e *Piper aduncum***. 2020.90f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2020.

SOUSA, I.; FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; SILVA, D.; MENDES, T. L. O.; FREIRE, T. C.; FONSECA, A. S.; SANGI, S. C. Atividade fungitóxica de extratos de *Piper* sp. contra os fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.3, p.50-56, 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. Baseado em APG III. 3ª Edição. Nova Odessa, São Paulo, SP. Instituto Plantarum, 2012.

TORQUILHO, H. S.; PINTO, A. C.; GODOY, R. L. O.; GUIMARÃES, E. F. Essential Oil of *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae) from Rio de Janeiro, **Brazil, Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 4, p. 429-430, 1999.

VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIM, L. **Espécies de plantas nativas da Flora Brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília. Ministério do Meio Ambiente, 2016.

VILAMIL, E. S.; DEMOSTHENES, L. C. R.; CANIATO, F. F.; DA SILVA BENTES, J. L.; NETO, P. D. Q. C. Efeito do extrato vegetal de *Piper callosum* sp. in vitro sobre *Colletotrichum* sp. agente etiológico da antracnose do pimentão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 27655-27667, 2021.

YUNCKER, T.G. **Hoehnea**. v. 2, p. 19-366, 1972.

ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; PIMENTEL, F. A.; GUIMARÃES, L. G. D. L.; SALGADO, A. P. S. P. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta amazônica**, v. 39, p. 193-197, 2009.



Enviado: 25 de setembro de 2023.

Aprovado: 06 de outubro de 2023.

¹ Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Rondônia (2018) (stricto sensu). Pós Graduada em Docência do Ensino Superior pela faculdade São Luís (2019) (Latu Sensu). Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade São Lucas (2014). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8009-979X>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0634812827491159>.

² Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede BIONORTE (Stricto sensu). Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Rondônia. Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade São Lucas. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4019-3412>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0456233723446786>.

³ Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (stricto sensu). Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (stricto sensu). Graduação em Farmácia pela Universidade Federal do Ceará. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5269-1139>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7426209328649448>.

⁴ Doutor em Agronomia (Stricto sensu). Graduado em Agronomia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7939-8119>.

⁵ Orientadora. Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo (2005) Mestrado em Imunologia pela Universidade de São Paulo (2003). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9221-7749>. Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9093880214338747>.

Análise fitoquímica dos extratos de *Piper permucronatum* yuncker

Phytochemical analysis of yuncker *Piper permucronatum* extracts

DOI: 10.55905/oelv21n11-057

Recebimento dos originais: 05/10/2023

Aceitação para publicação: 06/11/2023

Jessica Silva Felix Bastos

Mestra em Ciências Ambientais

Instituição: Instituto Federal de Rondônia

Endereço: Avenida 15 de Novembro, s/n, Planalto, Guajará Mirim – RO,
CEP: 76850-000

E-mail: jessicafelixbio@gmail.com

Aline Souza da Fonseca

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede de Biodiversidade e
Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE)

Instituição: Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Endereço: Av. Pres. Dutra, 2965, Olaria, Porto Velho - RO, CEP: 76801-058

E-mail: alinesouzadafonseca@gmail.com

Tamiris Chaves Freire

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pela Rede de Biodiversidade e
Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE)

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Endereço: Embrapa Rondônia, BR-364, Km 5,5, s / nº, Porto Velho - RO,
CEP: 76815-800

E-mail: tamirischavesfreire@gmail.com

Simone Carvalho Sangi

Mestra em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Endereço: Embrapa Rondônia, BR-364, Km 5,5, s / nº, Porto Velho - RO,
CEP: 76815-800

E-mail: simonecarvalhosangi@gmail.com

Renata Reis da Silva

Mestra em Química dos Recursos Naturais

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Endereço: Embrapa Rondônia, BR-364, Km 5,5, s / nº, Porto Velho - RO,
CEP: 76815-800

E-mail: renata.reis@embrapa.br

Juliana Pavan Zuliani

Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo (USP)
Instituição: Universidade Federal de Rondônia (UNIR)
Endereço: Rua da Beira 7671 BR364 Km3,5 Lagoa, Porto Velho – RO,
CEP: 76812-245
E-mail: zuliani.juliana@gmail.com

Cleberon de Freitas Fernandes

Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará (UFC)
Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)
Endereço: Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, nº 2.270, Planalto
do Pici, Fortaleza - CE, CEP: 60511-110
E-mail: cleberon.fernandes@embrapa.br

José Roberto Vieira Júnior

Doutor em Agronomia
Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)
Endereço: Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, nº 2.270, Planalto
do Pici, Fortaleza - CE, CEP: 60511-110
E-mail: jose-roberto.vieira@embrapa.br

RESUMO

O presente trabalho relata a identificação de classes de metabólitos secundários presentes em diferentes extratos da espécie *Piper permucronatum* Yuncker. Encontrada amplamente na floresta Amazônica, a espécie é descrita na literatura por suas ações biológicas como inseticida, fungicida, bactericida e nematocida, desta forma a análise fitoquímica é importante para o estudo de moléculas promissoras. A espécie foi coletada no campo experimental da Embrapa Rondônia e a avaliação realizada no laboratório de fitopatologia. Para os testes fitoquímicos realizados, os extratos foram obtidos a partir das folhas, talos e inflorescências da planta e os resultados baseados em precipitação e coloração dos extratos diluídos em soluções e reativos específicos para cada teste. Nos extratos das três partes da planta identificou-se a presença das classes dos metabólitos secundários cumarinas e alcaloides, além de serem constatadas a presença de taninos hidrolisáveis e compostos fenólicos nos extratos das folhas, flavonoides, taninos condensados e triterpenos nos extratos preparados com os talos da planta, e triterpenos, taninos condensados e compostos fenólicos identificados a partir das inflorescências da espécie.

Palavras-chave: metabólitos secundários, piper, testes fitoquímicos.

ABSTRACT

The present work reports the identification of classes of secondary metabolites present in different extracts of the species *Piper permucronatum* Yuncker. Widely found in the Amazon rainforest, the species is described in the literature for its biological actions as

an insecticide, fungicide, bactericide and nematocidal, thus phytochemical analysis is important for the study of promising molecules. The species was collected in the experimental field of Embrapa Rondônia and the evaluation carried out in the phytopathology laboratory. For the phytochemical tests carried out, the extracts were obtained from the leaves, stems and inflorescences of the plant and the results based on precipitation and coloring of the extracts diluted in solutions and specific reagents for each test. In the extracts of the three parts of the plant, the presence of the classes of secondary metabolites coumarins and alkaloids was identified, in addition to the presence of hydrolysable tannins and phenolic compounds in the extracts of the leaves, flavonoids, condensed tannins and triterpenes in the extracts prepared with the stalks. of the plant, and triterpenes, condensed tannins and phenolic compounds identified from the inflorescences of the species.

Keywords: secondary metabolites, piper, phytochemical tests.

1 INTRODUÇÃO

Plantas com propriedades medicinais são utilizadas desde os primórdios das civilizações, apontadas na literatura como a principal forma de tratamento de doenças na antiguidade (Santos et al. 2018). Na atualidade, a utilização de plantas medicinais ainda apresenta importante relevância na economia mundial, principalmente em países em desenvolvimento, o que proporciona avanços em pesquisas com intuito de estudá-las (Carvalho et al. 2022).

Espécies de plantas que apresentam propriedades medicinais possuem em sua composição substâncias bioativas com ação antioxidante denominados metabólitos secundários, que são definidos como compostos naturais produzidos pelas plantas, com capacidade de fornecer proteção a estresses bióticos e abióticos (Pereira e Cardoso 2012; Borges e Amorim 2020). O metabolismo secundário vegetal é formado por compostos orgânicos com potencial atividade biológica (Cunha et al. 2016).

O Brasil detém uma fonte promissora de plantas com potencial medicinal, com uma biodiversidade de aproximadamente 55.000 espécies de plantas, o que equivale de 20 a 22% do total mundial (Paulert et al. 2019). De distribuição pantropical, a família Piperaceae se destaca no país, sendo amplamente distribuída nas florestas brasileiras, especialmente na Amazônia e Mata Atlântica (Nascimento et al. 2022).

O gênero *Piper* está entre os principais gêneros da família, por ser o maior em número de espécies, estas possuem propriedades aromáticas e são utilizadas ao longo da história da humanidade como plantas alimentícias e medicinais (BFG, 2015; Salehi et al. 2019). Dentre as espécies desse gênero, a espécie *Piper permucronatum* Yuncker, de origem nativa, é endêmica do Brasil e compreende arbustos de até 2 metros de altura (GUIMARÃES et al. 2015).

Conhecida popularmente como elixir paregórico, as folhas da espécie *P. permucronatum* são tradicionalmente utilizadas na preparação de chás para o tratamento de cólicas e problemas digestivos (Anjos Junior, 2007). A utilização dessa espécie de maneira medicinal desperta o interesse científico sobre sua composição, dessa forma o objetivo do presente estudo foi identificar os metabólitos secundários presentes nos extratos de folhas, talos e inflorescência da espécie *P. permucronatum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DOS ENSAIOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Rondônia e no Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde da Fiocruz, ambos localizados no município de Porto Velho-RO. Os testes foram realizados utilizando folhas, talos e inflorescências de *Piper permucronatum* (permissão de acesso para coleta e análises - SisGen No A088959).

A espécie foi coletada no campo experimental da Embrapa Rondônia (S 08° 48'56.0" W 063° 50' 46.1") em junho de 2019 em temperatura média diária de 25 °C e 32 mm de chuva no período. Após a coleta, o material vegetal foi encaminhado para o laboratório de fitopatologia onde foram separados folhas, talos e inflorescências. A confirmação botânica foi realizada com o depósito no Herbário Dr. Ary Tupinambá Penna Pinheiro, localizado no Centro Universitário São Lucas, Porto Velho – RO, sob o número de registro 7761.

2.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE *P. PERMUCRONATUM*

Foram realizados testes fitoquímicos para verificar a possível presença ou ausência de determinadas classes de metabólitos secundários dos extratos de folhas, talos e inflorescência de *P.permucronatum* de acordo com protocolos e metodologia de Kloss et al. (2016), Matsumoto et al.(2009) e Gonçalves e Lima (2016).

2.2.1 Detecção de Saponinas

A cada 2 mL de extrato foram adicionados 5,0 mL de água fervendo. Após resfriamento, a solução foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 20 minutos. A presença de espumas na solução indica a presença de saponinas.

2.2.2 Teste de Shinoda - Detecção de Flavonoides

A presente pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide na presença de ácido. Dessa forma colocou-se em um tubo de ensaio 2,0 mL do extrato de folha, talo e inflorescência, separadamente, e adicionou-se 2 gotas de acetato de chumbo a 10%. A presença de um precipitado corado indica a positividade da reação.

2.2.3 Reação de Cloreto Férrico (Detecção de Taninos)

Foram adicionados 10 mL de água destilada a 2,0 mL de extrato. Em seguida a mistura foi filtrada e adicionou-se 2 gotas da solução de cloreto férrico a 10%. Coloração azul escura indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto que coloração verde é indicativo de taninos condensados.

2.2.4 Detecção de Cumarinas

Para a realização desse teste foram adicionados 2,0 mL de extrato em um tubo de ensaio, este foi tampado com papel filtro impregnado em solução 10% de NaOH e levado a banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida removeu-se o papel de filtro e examinou-se sob câmara de luz ultravioleta (UV). A fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

2.2.5 Reação de Salkowski (Detecção de Triterpenos)

A 1 mL de extrato foram adicionados 2,5 mL de clorofórmio, em seguida essa solução foi filtrada e transferida para um tubo de ensaio e adicionado o reagente de Salkowski. A mudança de coloração ocorre de acordo com a natureza da substância: cor estável azul, violeta ou vermelho é indicativo de triterpenos na solução.

2.2.6 Detecção de Alcaloides

A cada 2mL de extrato adicionou-se 2mL de ácido clorídrico (10%), as misturas foram aquecidas em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Após o resfriamento pipetou-se 1,3 µl das soluções em um tubo de ensaio, separadamente, e com o auxílio de uma pipeta Pasteur adicionou-se oito gotas do Reativo de Dragendorff, a formação de precipitado de coloração laranja a vermelho indica a presença de alcaloides.

2.2.7 Detecção de Compostos Fenólicos

Para a realização desse teste 5 gotas de cada extrato alcoólico foram adicionadas em placas de toque com 5 gotas de cloreto férrico. O teste apresenta resultado positivo para compostos fenólicos com o surgimento de coloração verde.

2.2.8 Detecção de Antraquinona

Em 100mg de pó do material vegetal foram adicionados 5mL de clorofórmio, a solução foi filtrada. Em seguida adicionou-se 2mL do filtrado com 2mL de NH₄OH (10%). Uma cor rosa brilhante confirma a presença de Antraquinona.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica foi realizada através de testes colorimétricos para identificação qualitativa, que determinam a presença ou ausência de classes de metabólitos a partir dos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências da espécie *P. permucronatum*, conforme técnicas para: saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenos, alcalóides, compostos fenólicos e antraquinonas.

Observa-se que nos extratos brutos preparados a partir das folhas da planta, foi possível identificar a presença de quatro diferentes classes de metabólitos secundários: taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides e compostos fenólicos (tabela 1).

Tabela 1: Triagem fitoquímica para os extratos de folhas de *P.permucronatum*

Classe de metabólito analisada	Extrato bruto das folhas	Coloração
Saponinas	-	Sem espuma
Flavonoides	-	-
Taninos hidrolisáveis	+	Azul
Taninos condensados	-	-
Cumarinas	+	Verde
Triterpenos	-	-
Alcaloides	+	Laranja
Compostos fenólicos	+	Verde
Antraçnona	-	-

Nota: “+” representa uma classe de metabólito presente no extrato, de acordo com os testes realizados. “-” representa uma classe de metabólito ausente no extrato de acordo com os testes realizados. Fonte Autores (2023).

Já nos extratos preparados a partir dos talos da espécie *P. permucronatum* foi possível identificar a presença de um número maior de metabólitos secundários, sendo eles: flavonoides, taninos condensados, cumarinas, triterpenos e alcaloides, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Triagem fitoquímica para os extratos de talos de *P.permucronatum*

Classe de metabólito analisada	Extrato bruto dos talos	Coloração
Saponinas	-	Sem espuma
Flavonoides	+	Laranja
Taninos hidrolisáveis	-	-
Taninos condensados	+	Verde
Cumarinas	+	Verde

Triterpenos	+	Violeta
Alcaloides	+	Laranja
Compostos fenólicos	-	-
Antracnona	-	-

Nota: “+” representa uma classe de metabólito presente no extrato, de acordo com os testes realizados. “-” representa uma classe de metabólito ausente no extrato de acordo com os testes realizados. Fonte Autores (2023).

A triagem fitoquímica realizada com os extratos das inflorescências da planta também identificou a presença de cinco classes de metabólitos secundários: taninos condensados, cumarinas, triterpenos, alcaloides e compostos fenólicos (tabela 3).

Tabela 3: Triagem fitoquímica para os extratos de inflorescências de *P. permucronatum*

Classe de metabólito analisada	Extrato bruto das inflorescências	Coloração
Saponinas	-	Sem espuma
Flavonoides	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	-
Taninos condensados	+	Verde
Cumarinas	+	Verde
Triterpenos	+	Violeta
Alcaloides	+	Laranja
Compostos fenólicos	+	Verde
Antracnona	-	-

Nota: “+” representa uma classe de metabólito presente no extrato, de acordo com os testes realizados. “-” representa uma classe de metabólito ausente no extrato de acordo com os testes realizados. Fonte Autores (2023).

Os resultados obtidos permitem observar que a espécie *P. permucronatum* possui em sua composição uma especificidade de compostos químicos distintos para cada parte de planta estudada, o que corrobora com Facundo et al. (2008) que relatou a diferença de constituintes e de suas concentrações ao estudarem talos e frutos de *Piper hispidum* e *Piper tuberculatum*.

Observa-se que ao realizar o teste para detectar saponinas, após agitação, aquecimento e resfriamento não foi possível observar a formação de espuma em nenhum dos extratos de *P. permucronatum*, como apresentado nas tabelas. Assim como a classe de metabólito denominado antraquinona, que também não foi identificada em nenhum dos extratos estudados (Tabelas 1, 2 e 3).

Os testes a fim de investigar a presença de Flavonoides, por meio do teste de Shinoda, indicaram a presença dessa classe de metabólito apenas nos extratos de talos da planta (mudança de cor) (tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Kloss et al (2016) ao detectarem a presença de flavonoides nos extratos dos talos de *Piper umbellatum* e a ausência deste composto nos extratos de suas inflorescências.

Os flavonoides são descritos por apresentarem efeitos antimicrobianos, antivirais, citotóxico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, antiinflamatório, antiulcerogênico e antiplaquetário (Machado et al. 2008). Essa classe de metabólitos pode estar associada ao potencial bactericida dos extratos de talos de *P. permucronatum* no controle das bactérias fitopatogênicas *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis patovar vesicatoria* descrita nos estudos de Bastos (2018).

Os testes de reação de cloreto férrico para identificar Taninos resultaram na presença desse composto nos extratos das 3 partes da planta *P. permucronatum*, sendo que no extrato de folha foram detectados Taninos hidrolisáveis (caracterizado pela coloração azul escura) (tabela 1), já nos extratos de talos e inflorescências foram identificados Taninos condensados (caracterizado pela coloração verde) (Tabela 2 e 3).

Tanto os taninos condensados e hidrolisados são descritos na literatura por apresentarem potencial controle a microrganismos (Monteiro et al. 2005). A divisão dos taninos ocorre de acordo com sua estrutura química, os taninos hidrolisáveis possuem em sua composição monômeros de ácido gálico ou ácido elágico, já os taninos condensados são formados pela polimerização de unidades de catequina (Paiva et al. 2002).

Com o teste de Salkowski foi possível identificar a mudança de coloração nos extratos provenientes dos talos e inflorescências de *P. permucronatum*, o que indica a presença de Triterpenos na composição destes (tabelas 2 e 3), o que não foi observado no extrato preparado com as folhas da planta (tabela 1). O mesmo foi analisado no estudo de

Freire et al (2022) ao avaliarem e identificarem a presença de triterpenos nos extratos de talos e inflorescências de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum* e a ausência deste metabólito nos extratos preparados a partir das folhas dessas espécies, o que pode ser uma característica do gênero *Piper*.

Os triterpenos são importantes moléculas que devido a sua complexidade estão fora do alcance da síntese química, e que formam um dos grupos mais numerosos e diversos de produtos naturais vegetais (Thimmappa et al. 2014). A atividade antimicrobiana dos triterpenos foi descrita por Smania (2003) ao avaliar e constatar a capacidade deste no controle de fungos e bactérias, o que pode indicar o potencial de espécies vegetais que possuem em sua composição essa classe de metabólitos, o que foi identificado em espécies do gênero *Piper*.

O teste para detecção de compostos fenólicos indicou a presença deste nos extratos de folhas e inflorescências de *P. permucronatum* caracterizada pelo surgimento da coloração verde ao contato com o cloreto férrico (tabelas 1 e 3). Já nos extratos de talos dessa planta foi constatada a ausência dessa classe de metabólito, uma vez que não ocorreu a mudança de cor (tabela 2).

Silva et al. (2010) apontam benefícios à saúde humana a partir dos compostos fenólicos, sendo sua capacidade relacionada a atividade anti-inflamatória, antioxidante e ação de radicais livres no organismo. Esse estudo aponta a capacidade promissora de espécies pertencentes do gênero *Piper*, visto que a presença de compostos fenólicos também foi descrita em folhas, talos e inflorescências de *Piper mollicomum* Aubl. (Almeida et al. 2019), assim como nas folhas e inflorescências de *P. permucronatum*.

A triagem fotoquímica identificou a presença de Cumarinas nos extratos brutos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum*, por meio da fluorescência de cor verde. As cumarinas apresentam ampla atividade biológica como agente anticoagulante, antioxidante, antiviral, antidiabético, antibacteriano e antifúngico (Franco et al. 2021).

A atividade fungicida da classe do metabólito secundário foi observada por Sousa et al. (2018) na inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum musae* frente a cumarina isolada de óleos de cumaru (*Dipteryx odorata*). Já Souza et al. (2005) destacou o potencial de isolados de cumarinas no controle de bactérias Gram-positivas e

Gram-negativas, o que reforça o potencial destas no controle de microorganismos, assim como o potencial das espécies que compõem em sua composição esse metabólito.

A classe de metabólito dos alcaloides também foi identificada nos extratos estudados, nos quais em contato com o reagente de Dragendorff foi possível detectar a formação de precipitado de cor laranja nos extratos de folhas, talos e inflorescência de *P. permucronatum*, o que caracteriza sua presença. Os alcaloides são compostos orgânicos cíclicos que contêm nitrogênio em estado de oxidação negativa, com estrutura variada (Pelletier, 2001).

Existem aproximadamente 5.500 alcaloides descritos atualmente, a classe está entre os compostos de maior interesse econômico e medicinal por apresentarem substâncias altamente eficientes e com potencial microbicida (Roy, 2017). Produzidos por uma variedade de seres vivos, como plantas, bactérias e animais, os alcaloides tem sido utilizados na medicina desde a antiguidade, apresentando potencial antimalárico, antitumorais, antiasmáticos e antibacteriano (Barbieri et al. 2017). Leyva-Acuna et al. (2021) também evidenciaram a atividade fungicida de alcaloides isolados do extrato de uma variedade de planta na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus parasiticus*.

A presença de cumarinas e alcaloides nos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* pode indicar uma característica específica do gênero Piper, uma vez que Gonçalves e Lima (2016) ao realizarem a triagem fitoquímica dos extratos de folhas e inflorescência de *P. tuberculatum* detectaram a presença de cumarinas e alcaloides em ambos os extratos. Esses metabólitos também foram identificados em extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. mollicomum* (Almeida et al. 2019) e *P. hispidum* (Freire et al. 2022).

Os compostos identificados nos extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* se relacionam ao potencial biológico da espécie que vem sendo descrito na literatura por sua capacidade inseticida (Porto et al. 2017), fungicida (Bastos et al. 2018), bactericida (Bastos, 2018), nematicida e ovicida (Sangi et al. 2018), o que enfatiza a importância da composição fitoquímica da espécie.

4 CONCLUSÃO

Os testes fitoquímicos realizados com os extratos de folhas, talos e inflorescências de *P. permucronatum* indicam a diferença na composição de metabolitos secundários nas diferentes partes da planta, sendo que somente as classes das cumarinas e alcaloides foram identificadas no três extrato.

As classes de metabólitos secundários identificados nos extratos de *P. permucronatum* podem estar relacionados ao potencial biológico da espécie, sendo o estudo uma importante análise preliminar.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K.P.C.; BARROS, A.C.V.; PANTOJA, T.M.A.; CAVALCANTE, F.S.; LIMA, R.A. Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper mollicomum* kunth (piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. **Revista Gestão e Sustentabilidade ambiental**, v. 8, n.3. 2019.

ANJOS JUNIOR, João Francisco dos. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho. Rondônia. 2017.

BORGES, L.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. *Revista Agrotecnologia*, Ipameri, v. 11; n.1; p. 54-67. 2020.

BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S.F.; NABAVI, S.M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiological research**, v. 196, p. 44-68. 2017.

BASTOS, J.S.F. Extrato de *Piper* no controle de fungos e bactérias fitopatogênicas. 2018. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Rondônia). Universidade Federal de Rondônia. Rolim de Moura. 2018

BASTOS, J. S. F.; FERNANDES, C. F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; FONSECA, A. S.; FREIRE, T. C.; SANGI, S. C.; OGRODOWCZYK, L.; OLIVEIRA, K. C. C.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S. Potencial de controle de espécies de *Piper* sobre fungos fitopatogênicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.8, p.260-272, 2018.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n.4, p.1085-1113. 2015.

CARVALHO, J.C.S.; SILVEIRA, E.R.; MATOS, T.M. Perspectivas na pesquisa de Plantas Medicinais Brasileiras. Laboratório de Anatomia Vegetal, p.194. In *Botânica no Inverno* -Universidade de São Paulo; Instituto de Biociências, Departamento de Botânica. 2022.

CUNHA, A.L.; MOURA, K.S.; BARBOSA, J. C.; DOS SANTOS, A.F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. *Diversitas Journal*, v. 1; n.2; p. 175-181. 2016.

FACUNDO, V. A.; POLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**. v.38, n.4, p.743–748, 2008.

FRANCO, D. P.; PEREIRA, T. M.; VITORIO, F.; NADUR, N. F.; LACERDA, R. B.; KÜMMERLE, A. E.A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, p. 180-197, 2021.

FREIRE, T.C.; SANGI, S.C.; BASTOS, J.S.F.; DA FONSECA, A.S.; DA SILVA, R.R.; JUNIOR, J.R.V.; FERNANDES, C.F. Avaliação fitoquímica de folhas, talos e inflorescência de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*. **Research, Society and Development**, v.11, n.7, 2022.

GONÇALVES, A.P.S.; LIMA, R.A. Identificação das classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper tuberculatum* JACQ. **South American Journal of Basic Education, Tachical and Technological**. v. 3, n. 2; p.100-109. 2016.

GUIMARÃES, E.F.; Carvalho-Silva, M.; Monteiro, D.; Medeiros, E.S.; Queiroz, G.A. 2015 *Piperaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB190>>.

KLOSS, L.C.; ALBINO, A.M.; SOUZA, R.G.; LIMA, R.A. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae). **South American Journal of Basic Education, Tachical and Technological**, v. 3; p. 118-128, 2016.

LEYVA-ACUÑA, M.A.; QUINTANA-OBREGÓN, E.A.; SOTO-LANDEROS, F.; BAEZ-PARRA, K.M.; MONTES-ÁVILA, J.; ANGULO-ESCALANTE, M.A. Actividad antifúngica de alcaloides del extracto metanólico de *Jatropha platyphylla* contra *Aspergillus parasiticus*. **Biotechnia**, v.22, n. 3, p. 100-107, 2021.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; DE OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuada)*, v. 27; n. 1/2. 2008.

MATSUMOTO, R.S.; RIBEIRO, J.P.N.; TAKAO, L.K.; LIMA, M.I.S. Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 631-635, 2009.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.D.; ARAÚJO, E.D.L.; AMORIM, E.L.C.D. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, p. 892-896, 2005.

NASCIMENTO, E.V.; BONILLA, O.H.; DE LUCENA, E.M.P.; DO NASCIMENTO, Y.A.P.; VIEIRA, M.I.C.; FARIAS, I.B.M.; DO NASCIMENTO, S.F.; DE LIMA, F.R.A. Ocorrências e usos da Família Piperaceae, em especial no Estado do Ceará: Revisão e nova identificação geográfica. **Brazilian Journal of Development**, v. 8; n.1; p.183-205. 2022.

PAIVA, S.R.D.; HERINGER, A.P.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. Taninos condensados de espécies de Plumbaginaceae. **Floresta e Ambiente**. v. 9, p. 153-157, 2002.

PAULERT, R.; DA COSTA ZONETTI, P.; CORDEIRO, J.; KOZERA, C.; STEFANELLO, S. Cultivo de plantas medicinais: integração do conhecimento tradicional e científico. Desenvolvimento sustentável na produção agroalimentar. Florianópolis: CCA/UFSC, p. 73-88. 2019.

PEDÓ, T.; ROLIM, J.M.; MEDEIROS, L.B.; PETER, M.; DOS SANTOS PEREIRA, L.H.; MARTINAZZO, E.G.; AUMONDE, T.Z.; MAUCH, C.R. Produção de mudas de tomate enxertado no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária**, v. 27, n.1, 2002.

PELLETIER S. W. Alkaloids: chemical and biological perspectives, v. 15, p. 1–635, 2001.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PORTO, K. R.; MOTTI, P.R.; YANO, M.; ROEL, A.R.; CARDOSO, C.A.; MATIAS, R. Screening of plant extracts and fractions on *Aedes aegypti* larvae found in the state of Mato Grosso do Sul (linnaeus, 1762) (culicidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89; p. 895-906. 2017.

ROY, A. A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. **International Journal of Plant Biotechnonology**, v. 3, n. 2, p.1-9. 2017.

SALEHI, B.; ZAKARIA, Z.A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z.K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T.B.; FIDALGO, L.M.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N. Piper species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n.7. 2019.

SANGI, S. C.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; BASTOS, J. S. F.; FONSECA, A. S.; FREIRE, T. C.; OGRODOWCZYK, L.; NUNES, J. D. K.; OLIVEIRA, K. C. C.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S. Extratos de Piper no controle alternativo de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* em *Coffea canephora*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.8, p.212-223, 2018.

SANTOS, L.S.N.; SALLES, M.G.F.; PINTO, C.M.; PINTO, O.R.O.; RODRIGUES, I.C.S. O saber etnobotânico sobre plantas medicinais na comunidade da brenha, redenção, CE. Agrarian Academy, **Centro Científico Conhecer**. v.5, n.09. 2018.

SILVA, M.L.C.; COSTA, R. S., DOS SANTOS SANTANA, A., KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. Semina: **Ciências Agrárias**, v.31; n. 3; p. 669-681. 2010.

SMANIA, E.de F.A. Esteróis e triterpenos isolados de espécies de Ganoderma Karsten e sua atividade antimicrobiana. 2003.138f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Santa Catarina. 2003.

SOUSA, B. C. M., BARATA, L. E. S., MACÊDO, C. G., FRAGA, S. S., KASPER, A. A. M., LOURIDO, K. A., PAULINO, G. S.; ALMEIDA, E.C.; SARTORATTO, A.; LUSTOSA, D. C. Avaliação do teor de Cumarina e atividade antifúngica de frações de Óleo de Cumaru. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 6, p. 63-69, 2018.

SOUZA, S. M. Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados. 2005. 94f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2005.

THIMMAPPA, R.; GEISLER, K.; LOUVEAU, T.; O'MAILLE, P.; OSBOURN, A. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual review of plant biology**, v.65; p. 225-257. 2014.