



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



TESE DE DOUTORADO

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
ESPÉCIES DA FAMÍLIA PIPERACEAE DURANTE A
ONTOGENIA**

Giselle Barbosa Bezerra

Recife,
Fevereiro/2020

Giselle Barbosa Bezerra*

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
ESPÉCIES DA FAMÍLIA PIPERACEAE DURANTE A
ONTOGENIA**

Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-
Graduação em Química como
requisito para obtenção do título
de Doutora em Química pela
Universidade Federal Rural de
Pernambuco.

Orientador: Clécio Souza Ramos

* Bolsista CAPES

Recife,
Fevereiro/2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B574p Bezerra, Giselle Barbosa
Perfil Químico e Atividade Antimicrobiana de Espécies da Família PIPERACEAE durante a Ontogenia /
Giselle Barbosa Bezerra. - 2020.
117 f. : il.

Orientador: Clecio Souza Ramos.
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Química, Recife, 2020.

1. Piperaceae. 2. Ontogênese. 3. Atividade Antimicrobiana. I. Ramos, Clecio Souza, orient. II. Título

CDD 540

Giselle Barbosa Bezerra

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
ESPÉCIES DA FAMÍLIA PIPERACEAE
DURANTE A ONTOGENIA**

BANCA DA TESE DE DOUTORADO

Prof. Dr. Clécio Souza Ramos (DQ-UFRPE)
Orientador

Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho (DQ-UFRPE)
1º Examinador

Prof. Dr. Marcílio Martins de Moraes (DQ-UFRPE)
2º Examinador

Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara (DQ-UFRPE)
3º Examinador

Prof^a. Dra. Queila Patrícia da Silva Barbosa Freitas (CAP-UFPE)
4º Examinador

Prof. Dr. Jucleiton José Rufino de Freitas (UACSA-UFRPE)
Suplente

DEDICO

Ao meu namorado Wallyson Alves e a minha família por todo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre me dá forças em inúmeros momentos de fraqueza.

Ao meu orientador Prof. Dr. Clécio Souza Ramos, por todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Marcílio Moraes, por todo apoio, incentivo e colaboração durante a realização deste e outros trabalhos.

Ao Prof. João Rufino, pelas palavras de incentivo e ensinamentos durante minha jornada acadêmica.

A meu namorado e amigo, Wallyson Alves, pelo companheirismo, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minha família, por sempre acreditar no meu potencial e me impulsionar a continuar a caminhada acadêmica.

Ao meu grande amigo, Marcílio Wagner, por todo apoio, colaboração e amizade.

As minhas amigas Milena Martins, Aldicéia Moura, Drielly Maria e Carolina Alves pelo companheirismo e palavras de incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Ecoquímica e Síntese Orgânica (LEQS), Aldicéia, André, Bianca, Drielly, Eduardo, Fábria, Leonardo, Nicolý, Marcílio e Mauricélia, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e pela troca de conhecimentos.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Química, pelo espaço concedido e a oportunidade da realização deste trabalho.

Ao Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (CENAPESQ) e ao Laboratório de Biotecnologia Agroindustrial pelo espaço para que fosse possível a realização das análises deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo financiamento da bolsa.

A todos que contribuíram de alguma forma para meu crescimento profissional e pessoal.

Muito Obrigada!

**Não permita que o medo lhe paralise. Dê um passo à frente. A estrada
se fará aos poucos, sob seus pés.
(Pe. Fábio de Melo)**

**O coração do homem planeja o seu caminho, mas o SENHOR lhe dirige
os passos. (Provérbios, 16:9)**

RESUMO

As plantas, assim como todo ser vivo, necessitam de substâncias ao longo do seu crescimento, desenvolvimento e defesa, no entanto a biossíntese de muitas destas substâncias só ocorre durante a ontogenia, isto é, fases sequenciais no ciclo de vida da planta onde ocorrem mudanças significativas que podem levar a diferentes perfis químicos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar as variações no perfil químico e a atividade antimicrobiana durante a ontogênese das seguintes espécies da família Piperaceae: *Peperomia pellucida*, *Piper arboreum*, *Piper caldense* e *Piper marginatum*. O extrato etanólico das folhas de *P. pellucida* durante a ontogenia apresentou variação química em seu perfil, as folhas produziram a substância dilapiol durante toda ontogênese da planta. Enquanto as substâncias *epi*- α -cadinol e 2,4,5-trimetoxi-estireno só foram encontradas na fase de plântulas dessa espécie. A folha da planta jovem com 3 meses de idade apresentou o maior potencial antimicrobiano enquanto que a folha da planta adulta apresentou melhor potencial antifúngico, frente ao fungo *Epidermophyton floccosum*, com CMI de 39,0 $\mu\text{g/mL}$. A *P. marginatum* também apresentou variações na produção de metabólitos secundários durante a ontogênese. A substância dilapiol só foi produzida pela planta durante o 6º mês de idade e as substâncias *Z* e *E*-asarona estavam presentes em todos os estágios de desenvolvimento da planta. O estudo do potencial antimicrobiano revelou que as plântulas com 6 e 7 meses de idade apresentaram melhores resultados frente as bactérias patógenas e o potencial antifúngico aumentaram durante a ontogênese da planta. As espécies de *P. caldense* e *P. arboreum* exibiram variações no perfil químico das folhas de plântulas e folhas adultas, com diferenças quantitativas significativas em seus compostos majoritários. Todas as espécies em estudo apresentaram em seus perfis químicos variações qualitativas ou quantitativas em uma das fases da ontogenia, bem como, mudanças significativas na atividade antimicrobiana.

Palavras-Chave: Piperaceae, ontogênese, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Plants, just like all living beings, need different substances throughout their growth, development, and defense. However, the biosynthesis of many of these substances only occurs during ontogeny. In this context, the aim of these work was to investigate variations in the chemical profile and antimicrobial activity during ontogenesis until the adult stage of the following species of the *Piperaceae* family: *Peperomia pellucida*, *Piper arboreum*, *Piper caldense* and *Piper marginatum*. The ethanolic extract of *P. pellucida* leaves during ontogeny showed chemical differentiation where the leaves produce the substance dilapiol throughout the plant's ontogenesis. On the other hand, the substances epi- α -cadinol and 2,4,5-trimethoxy-styrene can only be found in the seedling phase of this species. The young plant leaf, until the age of 3 months old, has the highest antimicrobial potential and the adult plant leaf has the highest antifungal potential against the fungus *Epidermophyton floccosum* with CMI of 39.0 $\mu\text{g/mL}$. The *P. marginatum* also showed variations in the production of secondary metabolites during ontogenesis. Furthermore, it was determined that the dilapiol is only produced by the plant during the 6th month of age and the Z and E-asarone are present in all stages of the plant's development. The evaluation of antimicrobial potential revealed that seedlings at the age of 6 and 7 months present better results against pathogenic bacteria and the antifungal potential increases during the plant's ontogenesis. The species of *P. caldense* and *P. arboreum* exhibited variations in the chemical profile of seedlings and adult leaves, with significant quantitative differences in their major compounds. All the species under study showed in their chemical profiles qualitative or quantitative variations in at least one of the ontogeny phases, beyond presented significant changes in antimicrobial activity.

Keywords: Piperaceae, ontogenesis, antimicrobial activity.

SUMÁRIO

Resumo.....	viii
Abstrat.....	ix
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xvi
Lista de Quadros.....	xvii
Lista de Esquemas.....	xvii
Lista de Símbolos e Abreviatura.....	xviii
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Metabólitos Secundários	10
1.2 Ontogenia de Plantas e o Metabolismo Secundário	11
1.3 Família Piperaceae	15
1.3.1 Gênero <i>Piper</i>	16
1.3.1.1 <i>Piper arboreum</i>	21
1.3.1.2 <i>Piper caldense</i>	22
1.3.1.3 <i>Piper marginatum</i>	25
1.3.2 Gênero <i>Peperomia</i>	28
1.3.2.1 <i>Peperomia pellucida</i>	31
1.4 OBJETIVOS.....	36
1.4.1 Objetivo Geral:.....	36
1.4.2 Objetivos Específicos:	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 Solventes Utilizados.....	37
2.2 Material Vegetal	37
2.2.1 Cultivo das Plântulas	37
2.2.2 Plantas Adultas.....	37

2.2.3 Obtenção dos Extratos Brutos de <i>Peperomia pellucida</i>	38
2.2.4 Obtenção dos Extratos Brutos de Espécies de <i>Piper</i>	38
2.3 Equipamentos Utilizados.....	38
2.3.1 Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	38
2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE	39
2.3.3 Análise de Componentes Principais – PCA	40
2.3.4 Cromatografia Planar Analítica e Preparativa.....	40
2.3.5 Cromatografia Líquida à Vácuo - CLV.....	40
2.3.6 Cromatografia em Coluna.....	40
2.4 Fracionamento e Purificação dos Metabólitos Secundários das Folhas da Família Piperaceae.....	41
2.4.1 <i>P. pellucida</i>	41
2.4.1.1 Raíz de <i>P. pellucida</i>	42
2.4.2 <i>P. marginatum</i>	43
2.5 Atividade Biológica.....	45
2.5.1 Atividade Antimicrobiana	45
2.5.2 Concentração Mínima Inibitória – CMI	45
2.5.3 Leitura das Microplacas	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1 Variações ontogenéticas das folhas de plântulas e planta adulta de <i>P. pellucida</i>	47
3.2 Análise do perfil químico das plântulas e planta adulta de <i>Peperomia pellucida</i>	47
3.2.1 Estudo fitoquímico dos extratos orgânicos dos tecidos de <i>Peperomia pellucida</i>	51
3.2.2 Estudo estatístico durante ontogênese das folhas de <i>P. pellucida</i>	54
3.3 Atividade Antimicrobiana de <i>P. pellucida</i>	56

3.3.1 Atividade Antimicrobiana das Plântulas e Planta Adulta de <i>P. pellucida</i>	56
3.3.2 Atividade Antimicrobiana dos Tecidos de <i>P. pellucida</i>	58
3.4 Variações ontogenéticas das folhas de plântulas e planta adulta de <i>Piper marginatum</i>	60
3.4.1 Análise Comparativa do Perfil Químico das Espécies de <i>Piper</i>	65
3.4.2 Identificação das substâncias encontradas nos extratos das folhas de espécies da família Piperaceae durante ontogênese	72
3.4.2.1 Identificação do 2,4-trimetoxi-estireno.....	72
3.4.2.2 Identificação do dilapiol.....	73
3.4.2.3 Identificação do epi- α -cadinol.....	74
3.4.2.4 Identificação do α -pineno.....	76
3.4.2.5 Identificação do <i>p</i> -cimeno.....	77
3.4.2.6 Identificação do limoneno.....	78
3.4.2.7 Identificação da (<i>E</i>)-asarona.....	79
3.5 Atividade antimicrobiana das folhas de plântulas e folhas adultas de <i>P. marginatum</i>	80
3.6 Análise comparativa do perfil químico das espécies de <i>Piper</i>	84
3.6.1 <i>Piper caldense</i>	84
3.6.2 <i>Piper arboreum</i>	86
4. CONCLUSÃO	88
5. REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fatores que podem influenciar a produção e o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.....	11
Figura 2: Início da germinação da semente de uma planta.....	12
Figura 3: Estruturas químicas de naftoquinonas isoladas das sementes e plântulas de <i>Euclea natalensis</i>	13
Figura 4: Estruturas químicas dos compostos isolados das folhas de plântulas e folhas adultas de <i>P. gaudichaudianum</i>	14
Figura 5: Espécies dos gêneros da família Piperaceae. A- <i>Piper nigrum</i> , B- <i>Peperomia obtusifolia</i> , C- <i>Ottonia martiana</i> , D- <i>Manekia incurva</i> , E- <i>Verhuellia lunaria</i>	16
Figura 6: Números de publicações e citações para o gênero <i>Piper</i>	17
Figura 7: Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Piper</i>	18
Figura 8: Espécie <i>Piper arboreum</i>	21
Figura 9: Metabólitos secundários isolados de <i>P. arboreum</i> associados às atividades biológicas.....	22
Figura 10: Espécie <i>P. caldense</i> C.D.C.....	23
Figura 11: Estrutura química da caldensina isolada de <i>P. caldense</i>	23
Figura 12: Substâncias isoladas de <i>P. caldense</i>	25
Figura 13: Espécie <i>Piper marginatum</i>	26
Figura 14: Aristolactamas isoladas do extrato etanólico de <i>P. marginatum</i>	27
Figura 15: Compostos isolados de <i>P. marginatum</i>	27

Figura 16: Substâncias isoladas do fruto de <i>P. marginatum</i>	28
Figura 17: Espécie <i>Peperomia pellucida</i>	31
Figura 18: Substâncias isoladas de <i>P. pellucida</i>	34
Figura 19: Fracionamento e purificação dos metabólitos secundários das folhas de <i>P. pellucida</i>	41
Figura 20: Fracionamento e purificação dos metabólitos secundários das raízes de <i>P. pellucida</i>	42
Figura 21: Fracionamento e purificação dos metabólitos secundários das folhas de <i>P. marginatum</i>	44
Figura 22: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de <i>P. pellucida</i>	47
Figura 23: Perfil químico obtido por CG-EM dos extratos das folhas de plântulas e plantas adultas de <i>P. pellucida</i>	49
Figura 24: Substâncias identificadas na plântula e planta adulta de <i>P. pellucida</i>	49
Figura 25: Cromatograma e espectro de massa do CG-EM da fração CP2 e do padrão dilapiol.....	52
Figura 26: Perfil cromatográfico (HPLC) e espectros de UV da fração R2 e do padrão dilapiol.....	53
Figura 27: Gráficos de <i>scores</i> e de <i>loadings</i> da análise de componentes principais das amostras de <i>P. pellucida</i>	55
Figura 28: Análise do perfil cromatográfico (CLAE) obtido dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de <i>P. marginatum</i> coletados na mata atlântica da UFRPE.....	61

Figura 29: Gráficos de <i>scores</i> e de <i>loadings</i> da análise de componentes principais das amostras de <i>P. marginatum</i>	62
Figura 30: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de <i>P. marginatum</i>	64
Figura 31: Cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos das folhas adultas e das plântulas de <i>P. marginatum</i>	66
Figura 32: Substâncias identificadas na plântula e planta adulta de <i>P. marginatum</i>	67
Figura 33: Espectro de massa do composto 2,4,5-trimetoxi-estireno.....	73
Figura 34: Espectro de massa do CG-EM da substância dilapiol.....	74
Figura 35: Espectro de massa do CG-EM da substância <i>epi-α-cadinol</i>	75
Figura 36: Espectros de massas do composto α -pineno.....	76
Figura 37: Espectros de massas do composto <i>p</i> -cimeno.....	77
Figura 38: Espectros de massas do composto limoneno.....	78
Figura 39: Espectros de massas do composto <i>E</i> -asarona.....	79
Figura 40: Perfil cromatográfico (CG-EM e CLAE) da substância asarona.....	80
Figura 41: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de <i>P. caldense</i>	84
Figura 42: Estrutura química do ácido caldensínico (9) identificado nos extratos brutos das folhas adultas e plântulas de <i>P. caldense</i>	86
Figura 43: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de <i>P. arboreum</i>	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades biológicas e metabólitos secundários isolados de algumas espécies do gênero <i>Piper</i>	20
Tabela 2: Atividades biológicas e metabólitos secundários isolados de algumas espécies do gênero <i>Peperomia</i>	30
Tabela 3: Atividades biológicas relatadas em <i>P. pellucida</i>	33
Tabela 4: Microrganismos utilizados na atividade antimicrobiana.....	45
Tabela 5: Composição química dos extratos orgânicos das folhas de <i>P. pellucida</i> durante ontogênese.....	50
Tabela 6: Concentração Mínima Inibitória – CMI dos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de <i>P. pellucida</i>	57
Tabela 7: Concentração Mínima Inibitória – CMI dos extratos do caule, raiz e fruto de <i>P. pellucida</i>	59
Tabela 8: Composição química dos extratos orgânicos das folhas de <i>P. marginatum</i> durante ontogênese.....	68
Tabela 9: Metabólitos secundários detectados nos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de <i>P. marginatum</i>	72
Tabela 10: Concentração Mínima Inibitória – CMI dos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de <i>P. marginatum</i>	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Gradiente de eluição no CLAE dos extratos clorofórmicos.....39

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta de fragmentação no espectro de massas do 2,4,5-trimetoxi-estireno.....73

Esquema 2: Proposta de fragmentação no espectro de massas do dilapiol.....74

Esquema 3: Proposta de fragmentação no espectro de massas do *epi*- α -cadinol.....75

Esquema 4: Proposta de fragmentação no espectro de massas do α -pineno.....76

Esquema 5: Proposta de fragmentação no espectro de massas do *p*-cimeno.....77

Esquema 6: Proposta de fragmentação no espectro de massas do limoneno.....78

Esquema 7: Proposta de fragmentação no espectro de massas da *E*-asarona.....79

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia Líquida à Vácuo
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DCM	Diclorometano
IR	Índice de Retenção
PP	Placa Preparativa
PCA	Análise dos Componentes Principais
SPE	Extração em Fase Sólida
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
UFPEDA	Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

1. INTRODUÇÃO

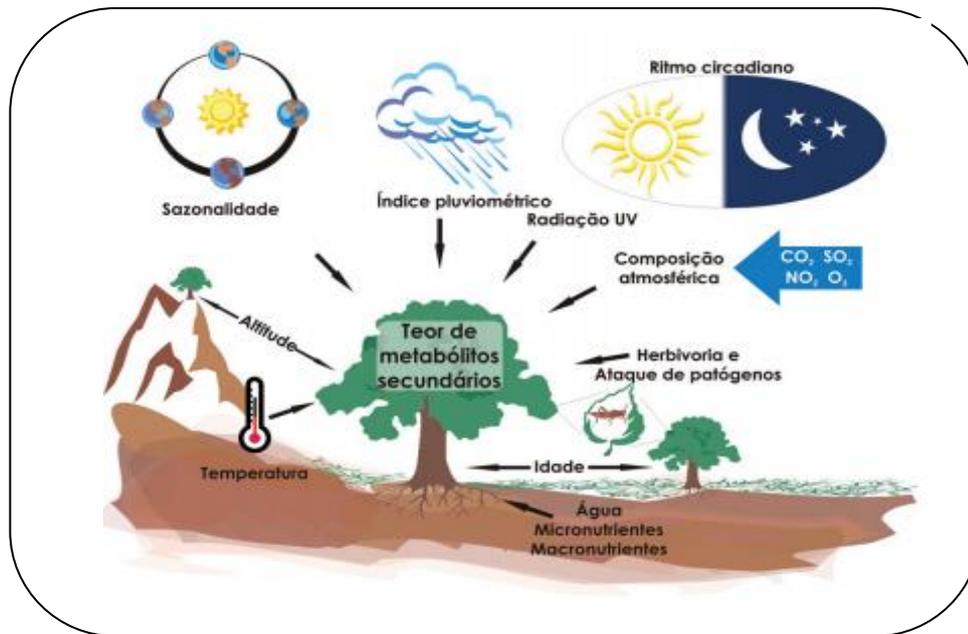
1.1 Metabólitos Secundários

Todo ser vivo necessita de substâncias que são essenciais para o seu desenvolvimento. Um exemplo são as plantas, que possuem uma grande diversidade de substâncias indispensáveis à manutenção e o desenvolvimento de seu ciclo de vida. Essas substâncias são classificadas como metabólitos primários e secundários que são produzidas pela maioria dos organismos vivos. Os metabólitos secundários não estão ligados diretamente à manutenção da vida do organismo, ou seja, enquanto os metabólitos primários estão envolvidos nos processos metabólicos associados ao crescimento e manutenção da vida dos vegetais, os secundários, embora ditos não essenciais para o organismo, tem a função de defesa química em organismos (PICHERSKY e GANG, 2000; SIMÕES *et al.*, 2010).

Ainda que possuam distribuição de substâncias limitadas em famílias e gêneros do reino vegetal, as substâncias produzidas pelo metabolismo secundário têm recebido grande atenção devido à diversidade de suas estruturas químicas e potencial biológico. Além da função protetora contra herbívoros e patógenos, os metabólitos secundários possuem funções ecológicas agindo como infoquímicos nas interações interespecíficas entre espécies. Por exemplo, como sinomônio na polinização e alomônio na defesa contra herbívoros (NEWMAN e CRAGG, 2012; GARCÍA e CARRIL, 2009).

O perfil de metabólitos secundários em plantas durante o seu desenvolvimento pode sofrer variações entre suas espécies ou espécimes devido a fatores bióticos ou abióticos. Um exemplo é a resposta à ação de herbívoros, sazonalidade, altitude e umidade (Figura 1) (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Figura 1: Fatores que podem influenciar a produção e o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.

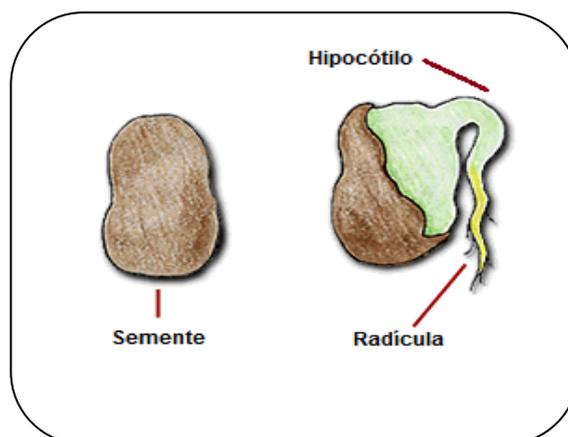


Fonte: GOBBO-NETO e LOPES, 2007

1.2 Ontogenia de Plantas e o Metabolismo Secundário

Os organismos vivos passam por diversas fases sequenciais durante o ciclo de vida, aos quais chamamos de Ontogenia (GATSUK *et al.* 1980).

O início do desenvolvimento de uma planta ocorre após o final da germinação, que é caracterizado pelo aparecimento da radícula, espécie de raiz primária, que absorve nutrientes e água do meio (CASTRO *et al.*, 2002). Em seguida, ocorre o início do desenvolvimento do hipocótilo, que é a parte inicial do caule (Figura 2).

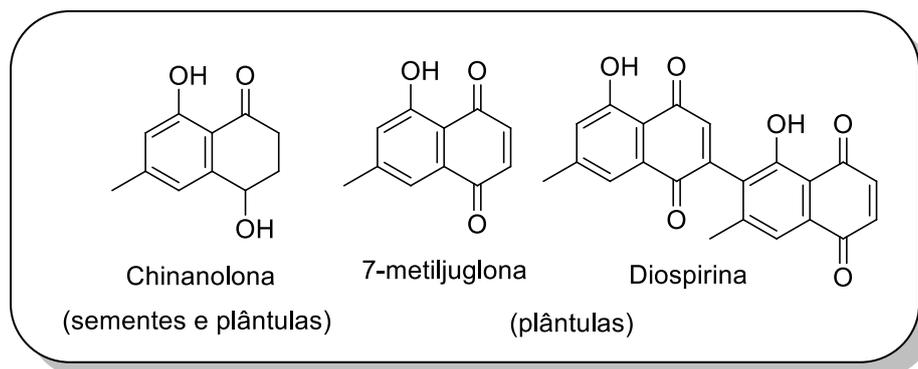
Figura 2: Início da germinação da semente de uma planta.

Fonte: Adaptado de http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/legumino/frejol/germinac.htm

Um estudo comparativo do perfil químico de plântulas e plantas adultas de *Cannabis sativa* durante a ontogênese mostrou uma variação no perfil de compostos canabinoides (VOLGEMANN *et al.*, 1988). Na ontogênese em *Araucaria angustifolia*, o perfil químico dos caules na plântula apresentou dímeros de apigenina e na fase adulta a presença de isoflavonoides, lignanas, coniferaldeído e *p*-hidroxibenzaldeído (FONSECA *et al.*, 2000). Danelutte *et al.*, (2000) mostraram quantitativamente que o perfil metabólico da planta adulta quando comparado ao perfil de plântulas de *Viola sebifera* é bastante diferenciado. Nas plântulas, observa-se a predominância da lignana hidroxiotobaina, enquanto que nas sementes essa substância é encontrada em baixo teor.

Outras diferenças significativas podem ser observadas no estudo de Bapela *et al.*, (2007) que verificaram a variação quantitativa de naftoquinonas em plântulas de *Euclea natalensis*. Todas as três naftoquinonas identificadas foram detectadas nas plântulas, enquanto que na semente foi encontrada, apenas a shinanolona (Figura 3).

Figura 3: Estruturas químicas de naftoquinonas isoladas das sementes e plântulas de *Euclea natalensis*.

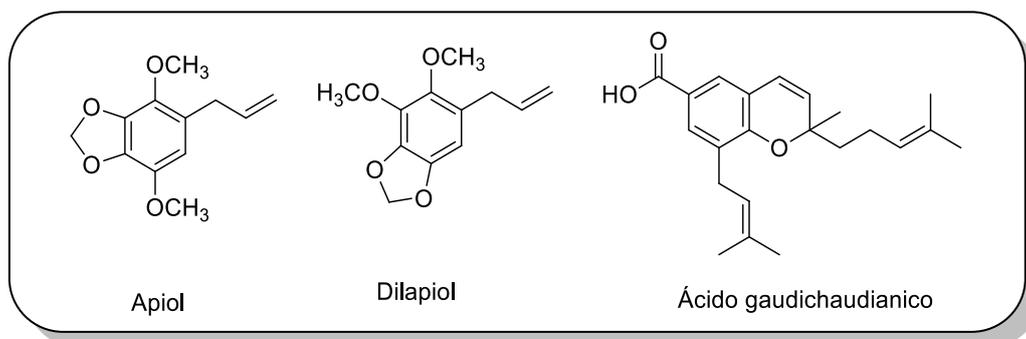


O óleo essencial das folhas de plântulas de *Melaleuca alternifolia* apresentou diferenças quantitativas nos monoterpenóides, quando comparado com óleo essencial das folhas da planta adulta (RUSSELL e SOUTHWELL, 2002). Os perfis químicos das folhas de plântulas das espécies *Piper solmsianum*, *Piper regnellii* e *Piper gaudichaudianum* apresentaram variações quando comparado as folhas adultas. Nas plântulas dessas espécies, os fenilpropanóides dilapiol e apiol, são encontrados como constituintes principais, diferentemente das folhas das plantas adultas que acumulam a lignana grandisina na espécie de *P. solmsianum* e o derivado de neolignanas, conocarpano, em *P. regnellii*. O ácido gaudichaudianico é encontrado predominantemente nas folhas adultas de *P. gaudichaudianum* (YAMAGUCHI *et al.*, 2011). Um estudo fitoquímico realizado com extratos de diversas partes da planta adulta e de plântulas de *P. reticulatum*, levou ao isolamento e caracterização de quatro amidas, a diidrowisanidina, maior concentração nas folhas das plântulas, a wisanidina, a (2*E*,4*E*)-*N*-isobutileicosa-2,4-dienamida e a (3*E*,5*E*,14*E*)-*N*-pirrolidileicosa-3,5,14-trienamida com maior concentração nas folhas adultas (SILVA, 2011).

A investigação fitoquímica de diversos órgãos de plantas adultas, plântulas, cultivadas *in vivo* e *in vitro*, e suspensões celulares de *P. solmsianum* revelou a presença de ácidos benzóicos e benzaldeídos substituídos, esteróides, fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas (NAVARRO, 2009). Extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de

P. gaudichaudianum apresentaram diferenciação nos perfis químicos durante ontogenia da planta (Figura 4). Nas folhas adultas o composto majoritário encontrado foi o ácido gaudichaudianico, enquanto nas folhas das plântulas o apiol e o dilapiol foram os principais compostos (GAIA *et al.*, 2014).

Figura 4: Estruturas químicas dos compostos isolados das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. gaudichaudianum*.



A fase inicial do ciclo de vida de uma planta é de grande importância para o ciclo vegetal. Além das mudanças estruturais que podem ser observadas durante a ontogenia do vegetal, o processo morfofuncional e o mecanismo de defesa do indivíduo são fatores bastante determinantes para compreensão da estrutura e dinâmica populacional do indivíduo (GOODGER *et al.*, 2013).

De acordo com Ressel *et al.*, (2004), a classificação morfofuncional das plântulas depende principalmente da textura, exposição e função dos cotilédones durante o processo de germinação e crescimento inicial. Mudanças estruturais foram observadas durante a ontogenia das folhas de *Eucalyptus froggattii*, indicando que nas fases iniciais de desenvolvimento há o predomínio de compostos fenólicos e o acúmulo de terpenoides ao longo do crescimento da planta (GOODGER *et al.*, 2013).

Adicionalmente, os estágios da planta também podem sofrer alterações devido ação de herbívoros. Como por exemplo, há uma diferença entre o sistema de defesa de plântula e plantas adultas de *Plantago lanceolata* quando predadas pelas lagartas *Junonia coenia*. Nas plântulas é observada a

compensação por crescimento, mas não a indução química, como estratégia de defesa (BARTON, 2008).

1.3 Família Piperaceae

A família Piperaceae com espécies distribuídas em diversos biomas, é amplamente encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo (KATO e FURLAN, 2007). São classificadas como plantas herbáceas, arbustivas ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas, usualmente com mais de três metros de altura. O caule é nodoso, as folhas são inteiras, dorsiventrais, alternas, pecioladas, com ou sem estípulas (GOGOSZ *et al.*, 2012). Embora não seja uma família considerada muito grande quando comparada com as demais, é uma das maiores representantes das angiospermas basais. (WANKE *et al.*, 2007).

Descrita pela primeira vez por Linnaeus em 1753 possui cerca de mais de 3700 espécies identificadas e distribuídas em oito gêneros. No Brasil ocorrem cerca de 500 espécies distribuídas em 5 gêneros que são encontrados principalmente na Mata Atlântica. São estes: *Piper*, *Peperomia*, *Ottonia*, *Manekia* (classificada anteriormente como *Sacorrhachis*) (WANKE *et al.*, 2007) e *Verhuellia*, um pequeno gênero descrito recentemente (FIGURA 5) (MACHADO, 2007; SOUZA e LORENZI, 2005; KATO e FURLAN, 2007; SAMAIN *et al.*, 2010).

Figura 5: Espécies dos gêneros da família Piperaceae. A- *Piper nigrum*, B- *Peperomia obtusifolia*, C- *Ottonia martiana*, D- *Manekia incurva*, E- *Verhuellia lunaria*.



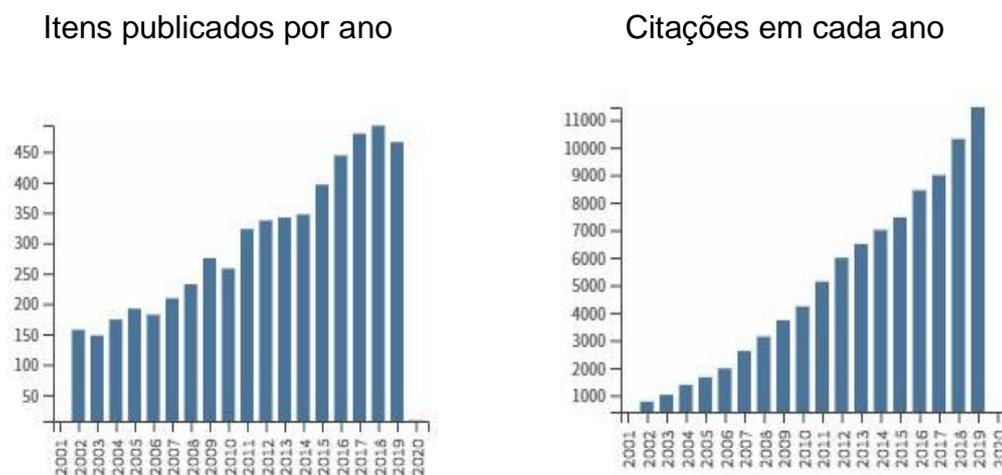
Fonte: Google imagens.

As espécies de *Piperaceae* são conhecidas devido a sua importância econômica, biológica e ecológica mediante a diversidade de metabólitos secundários biologicamente ativos presentes em sua composição, como terpenos, pironas, lactonas, cromenos, chalconas, lignóides, amidas e alcalóides (KATO e FURLAN, 2007). Uma espécie amplamente conhecida é a *Piper nigrum*, pimenta-do-reino, de grande importância econômica e usada como condimento e conservante, devido às propriedades organolépticas e medicinais da amida piperina, presente em abundância nos frutos da planta. Outras espécies de *Piperaceae* são usadas na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, por exemplo; as folhas de *P. amalago* são usadas para aliviar dores estomacais e no combate a diversas infecções, enquanto, as folhas e talos de *P. marginatum* e *P. tuberculatum* são utilizadas contra mordida de cobra, como sedativos e distúrbios digestivos, (ARAÚJO-JUNIOR *et al.*, 1999; BURCI *et al.*, 2013).

1.3.1 Gênero *Piper*

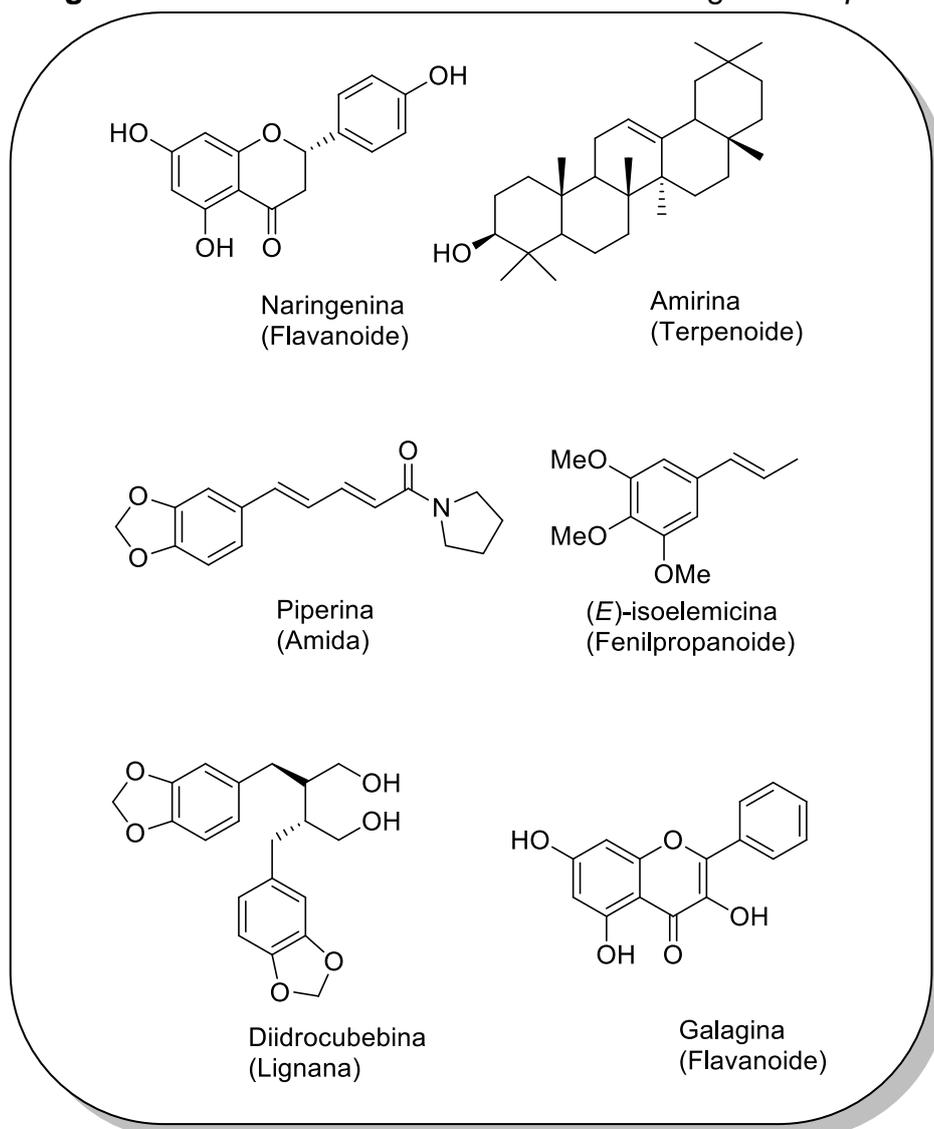
Dentre os gêneros da família *Piperaceae*, destacam-se os gêneros *Piper* e *Peperomia*. Estes, são os mais representativos desta família, com cerca de 2000 e 1700 espécies, respectivamente. O gênero *Piper* destaca-se pelo amplo estudo das substâncias biologicamente ativas, o que justifica o uso extensivo de espécies deste gênero na medicina popular, como tratamento de arritmias e de asma, dores estomacais, como agentes anti-inflamatórios, analgésicos e também como inseticidas (WANKE *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2012; RAMOS e KATO, 2012).

O estudo com espécies do gênero *Piper* tem recebido grande atenção com crescimento anual de publicação pronunciado, principalmente a partir do ano de 1997, em que há relato de um número considerável de substâncias isoladas do gênero, chegando ao ano de 2019 com um total de 8993 citações e 466 publicações. Em 2020 já foram publicados 8 artigos com o gênero *Piper* (FIGURA 6).

Figura 6: Número de publicações e citações para o gênero *Piper*.

Fonte: Web of Science. Data de acesso:13/01/2020

Os estudos da composição química de espécies do gênero *Piper* resultaram no isolamento de diferentes classes de substâncias fisiologicamente ativas (Figura 7) como alcalóides, chalconas, hidrochalconas, lignanas, neolignanas, ácidos benzóicos prenilados, terpenos, piperolídeos, flavonóides, flavanonas e amidas (RAMOS *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2000; RAMOS *et al.*, 2009; LAGO *et al.*, 2004; BAO *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2015; JEON *et al.*, 2019).

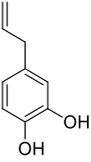
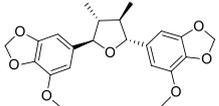
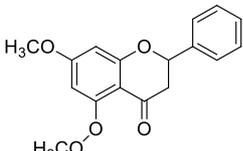
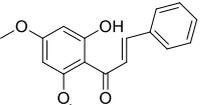
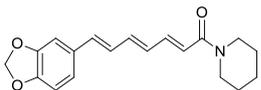
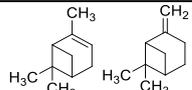
Figura 7: Metabólitos secundários isolados do gênero *Piper*.

Além de apresentar uma ampla diversidade química, as espécies do gênero *Piper* exibem um grande potencial biológico, o que justifica a importância e o crescimento de estudos químicos e biológicos envolvendo essas espécies (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017). Dentre as atividades biológicas apresentadas por compostos isolados no gênero *Piper* destacam-se a *Piper nigrum* com atividades antiinflamatória, antioxidante, analgésica, antitumoral, inseticida, antimicrobiana, antiúlcera, antileishmania, tripanocida e antivilgigo (SINGH e CHOUDHARY, 2015). *P. amalago*, usada na medicina popular como analgésico, exibe atividade anti-hiperalgesia, antinociceptiva e anti-artrítico em roedores e atividade diurético, natriurético e efeitos antiliteásica

(ARRIGO *et al.*, 2015; NOVAES, *et al.*, 2014). Enquanto a *P. betle* apresenta atividade antioxidante e citotóxica para linha celular de hepatoma humano, que é o mais frequente câncer originado no fígado PLC-PRF-5 (ATIYA, SINHA e LAL, 2018).

Alguns componentes bioativos relatados em várias espécies do gênero *Piper* estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Atividades biológicas e metabólitos secundários isolados de algumas espécies do gênero *Piper*.

Classe	Substância	Espécie	Atividade	Referência
Fenilpropanoide	 Hidroxicavicol	<i>P. betel</i>	Antifúngica	Singburaudom, N. (2015)
Lignanas	 (7R,8R,7'R,8'R)-34,3',4'-dimetilenodioxi-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana	<i>P. solmsianum</i>	Tripanocida	Martins <i>et al.</i> , (2013)
Flavanoides	 5,7-dimetoxiflavona	<i>P. caninum</i>	Antibacteriano	Salleh <i>et al.</i> , (2015)
	 Flavocaina B	<i>P. methysticum</i>	Antitumoral	Abu <i>et al.</i> , (2015)
Amida	 Piperina	<i>P. arboreum</i>	Antibacteriana e Antifúngica	Nascimento <i>et al.</i> , (2015)
Terpenos	 α -pineno β -pineno	<i>P. tuberculatum</i>	Antiparasitária	Sales <i>et al.</i> , (2018)

1.3.1.1 *Piper arboreum*

A *P. arboreum* (Figura 8), uma espécie do gênero *Piper*, é encontrada em matas de encosta, sendo amplamente distribuída pelos estados do Amazonas, Amapá, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Floresce e frutifica nos meses de Agosto a Abril, normalmente cresce a 3 m de altura. Também é conhecida popularmente como “fruto-de-morcego”, “jaborandi-pimenta”, “jaborandi-falso”, “pimenta-do-mato” e “pimenta-dos-índios” (GUIMARÃES e MONTEIRO, 2006; RAMOS e KATO, 2009).

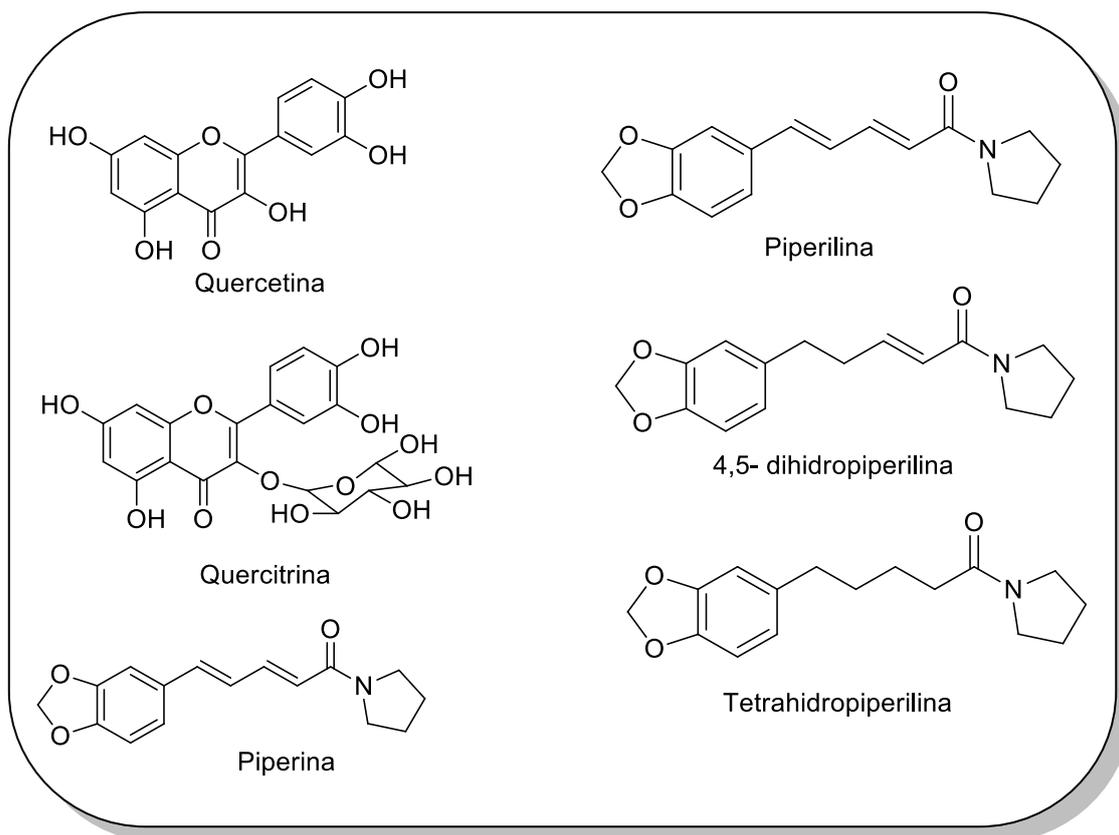
Figura 8: Espécie *Piper arboreum*.



Fonte: Própria.

A *P. arboreum* é uma planta utilizada na medicina tradicional brasileira principalmente nos casos de bronquite, constipações, no tratamento de reumatismo e gripes (DUKE e VASQUEZ, 1994). Amidas e flavonóides tem sido isoladas de *P. arboreum* (Figura 9) e associadas às diversas atividades biológicas da planta como antioxidante (MARKHAM *et al.*, 1978; REGASINI *et al.*, 2008), antifúngica (REGASINI *et al.*, 2009), antiprotozoária (REGASINI *et al.*, 2009), esquistossomicida (CARRARA *et al.*, 2014) e antimicrobiana (NASCIMENTO *et al.*, 2015). O óleo essencial das folhas de *P. arboreum* também apresenta atividade antifúngica e as substâncias responsáveis pertencem à classe dos terpenos (monoterpenos e sequiterpenos) (NAVICKIENE *et al.*, 2006).

Figura 9: Metabólitos secundários isolados de *P. arboreum* associados às atividades biológicas.



Um estudo químico comparativo com as diversas partes de *P. arboreum* revelou que as folhas, caules e raízes apresentaram perfis químicos diferentes. Nas folhas, foram encontrados terpenos e ácidos graxos, no caule, amidas, e, na raiz, foram encontrados ácidos graxos (DUARTE *et al.*, 2016).

1.3.1.2 *Piper caldense*

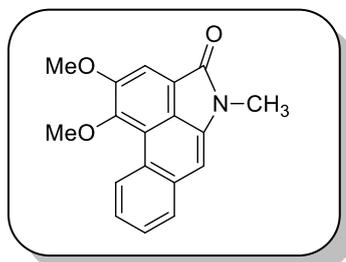
Outra espécie importante do gênero *Piper*, é a *Piper caldense* (Figura 10). Esta espécie é amplamente encontrada nos estados de Pernambuco, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Paraíba, São Paulo e Rio de Janeiro. Cresce em habitat caracterizado por alta umidade e pouca luminosidade, frutificando no período de Julho à Outubro. Além disso, pode chegar a medir 2,5 m de altura. (GUIMARÃES e SILVA, 2012).

Figura 10: Espécie *P. caldense* C.D.C.

Fonte: Própria.

A *P. caldense*, também conhecida popularmente por “pimenta d’arda”, “pimenta d’água” e “jaborandi” é usada no estado da Paraíba como sedativo, contra picada de cobra, e alívio de dores (CARDOSO JÚNIOR e CHAVES, 2003).

Há poucos relatos de estudos fitoquímicos e biológicos de *P. caldense* com apenas oito artigos entre o ano de 1999 a 2018 (WEB OF SCIENCE, 2018). Uma *N*-aristolactama foi isolada das raízes de *P. caldense*, sendo, previamente obtida apenas de origem sintética (CARDOZO JÚNIOR e CHAVES, 2003) (Figura 11). O fracionamento por métodos cromatográficos dos extratos brutos de diclorometano e metanol das folhas de *P. caldense* permitiu o isolamento do ácido caldensínico, um ácido benzóico prenilado, com atividade antifúngica contra os fungos fitopagênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (FREITAS *et al.*, 2009).

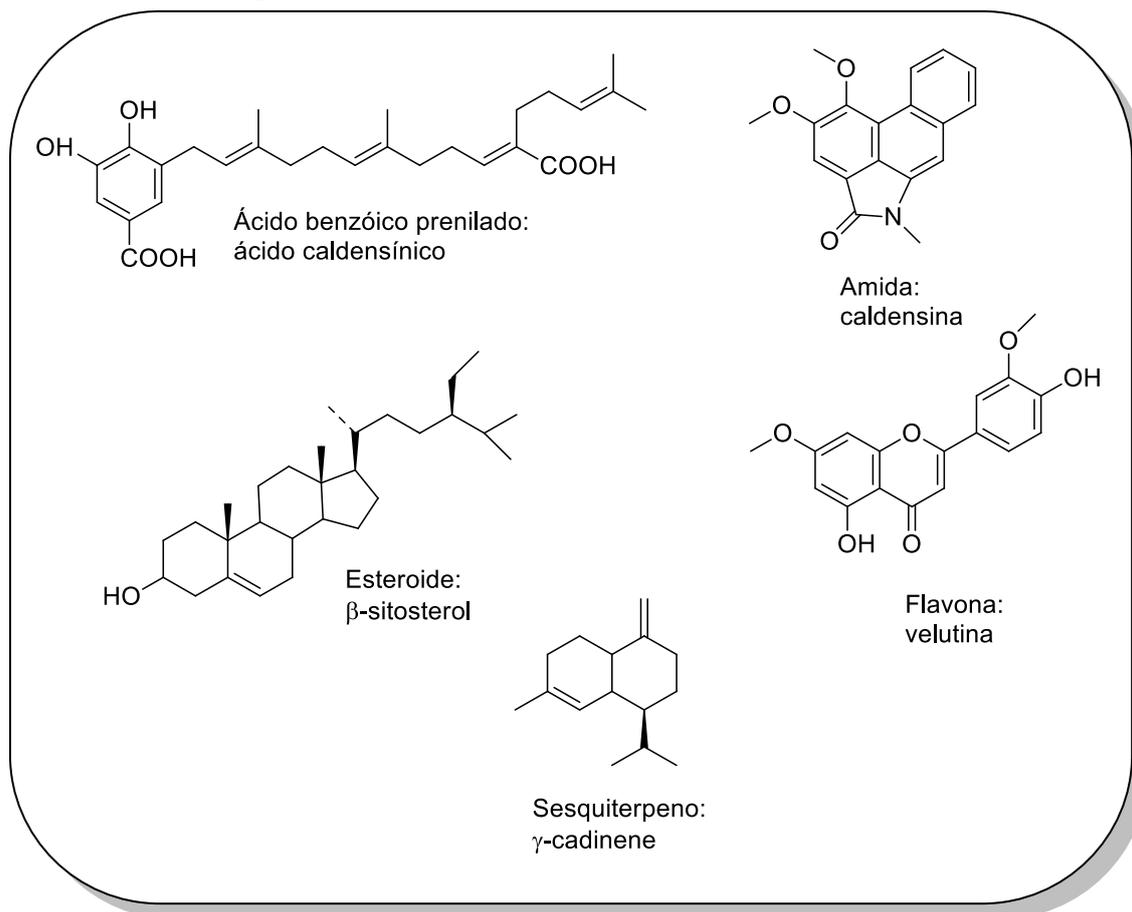
Figura 11: Estrutura química da caldensina isolada de *P. caldense*.

Um estudo *in vivo* usando ratos Wistar machos com o extrato bruto das folhas de *P. caldense* revelou uma diminuição no consumo de álcool em animais tratados com o extrato (PEREIRA, GUEDES e DA SILVA, 2015).

Os extratos brutos das folhas, caules, as raízes e os frutos de *P. caldense* apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (CORDOVA *et al.*, 2010). O ácido 3-geranilgeranil-4-hidroxibenzóico, isolado pela primeira vez de *P. caldense*, exibiu forte atividade antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas (FREITAS *et al.*, 2016).

A análise química dos óleos essenciais dos tecidos de *P. caldense* levou a identificação das substâncias: α -cardinal, α -muurolol, tujopsan-2- β -ol e δ -cadiene nas folhas dessa planta. Nas raízes foi possível identificar as substâncias valenene, pentadecano, elina-3,7-11-dieno e α -terpineol. E no caule, as substâncias terpina-4-ol, α -terpineol e α -cadinol 2- β -ol. Todos os óleos apresentaram atividade antimicrobiana (ROCHA *et al.*, 2016).

Os principais compostos isolados da espécie de *P. caldense* estão apresentados na Figura 12.

Figura 12: Substâncias isoladas de *P. caldense*.

1.3.1.3 *Piper marginatum*

A espécie de *Piper marginatum* (Figura 13), é encontrada nos estados do Pará, Amazonas, Ceará, Paraíba e Pernambuco. Esta planta pode chegar a medir até 5m de altura, e o período de frutificação ocorre no mês de Novembro (GUIMARÃES E GIORDANO, 2004).

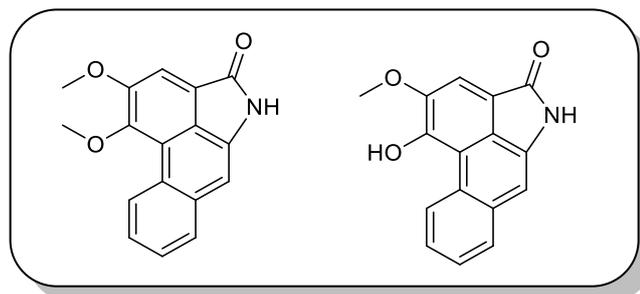
Figura 13: Espécie *Piper marginatum*.

Fonte: Própria.

Conhecida popularmente como malvaíscó, capeba-cheirosa, nhandi, pimenta-do-mato, pimenta-dos-índios, e capeba-mansa; a *P. marginatum* tem uso na medicina popular na forma de chá com ação antiespasmódica e para tratar infecções no fígado e baço (GUIMARÃES e GIORDANO, 2004). Suas raízes têm indicação contra mordida de cobra (aplicada no local), e alívio de coceiras (CHAVES *et al.*, 2006). D'Angelo e colaboradores (1997) atribuíram estas propriedades à vasoconstrição provocada pela noradrenalina presente na planta. Na culinária, a *P. marginatum* pode ser utilizada como condimento, substituindo a pimenta-do-reino (GUIMARÃES E GIORDANO, 2004).

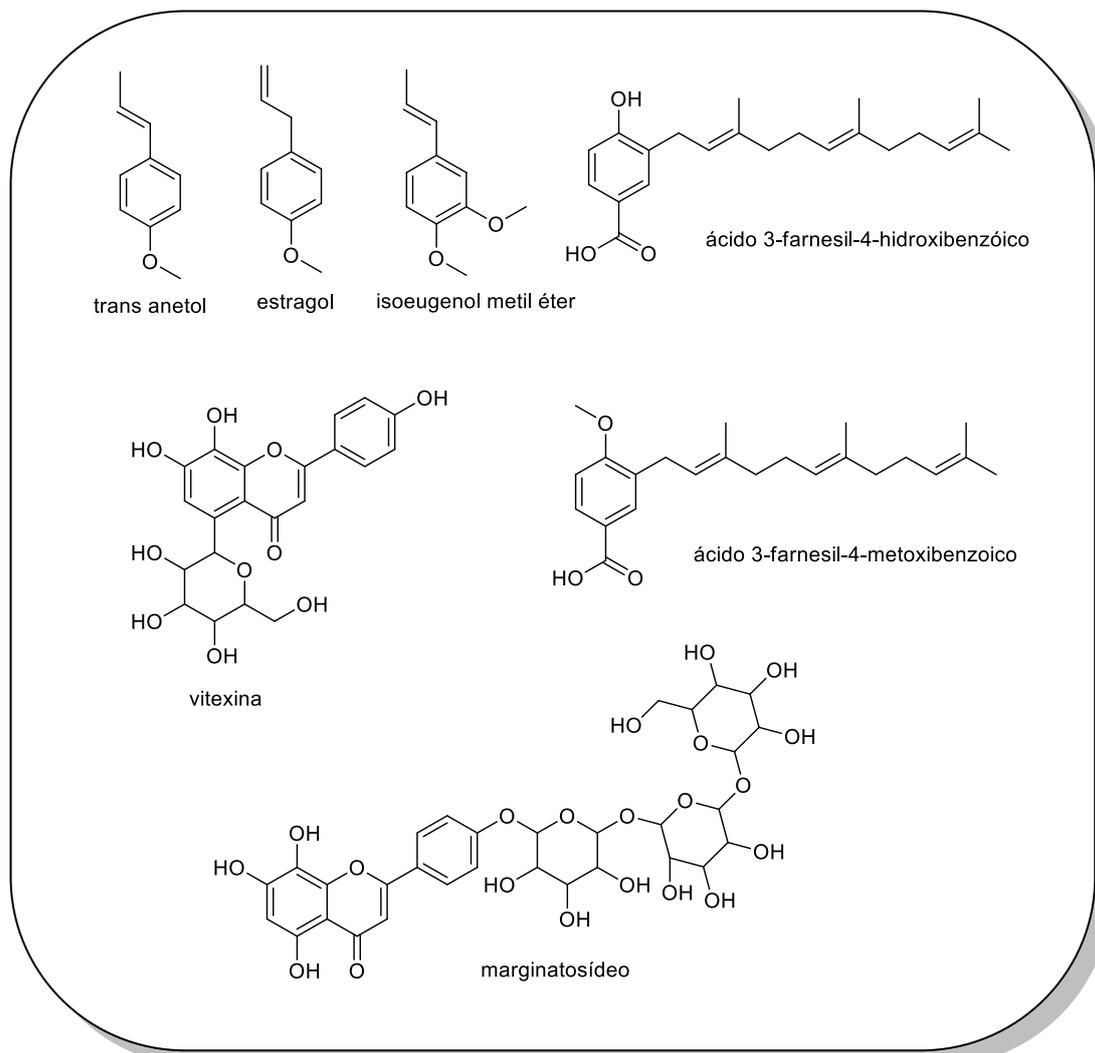
A maior parte dos estudos relatando a fitoquímica de *P. marginatum* é destinada aos óleos essenciais (BRÚ e GUZMAN, 2016), onde foram identificados monoterpenos, sesquiterpenos, e fenilpropanoides (RAMOS *et al.*, 1986; COSTA *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2008; TANGARIFE-CASTAÑO *et al.*, 2014; SOUTO *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2014). Enquanto, para o extrato, foram isolados aristolactamas (Figura 14), esteróides e noradrenalina (alcaloide) (CHAVES *et al.*, 2006; D'ANGELO *et al.*, 1997).

Figura 14: Aristolactamas isoladas do extrato etanólico de *P. marginatum*.



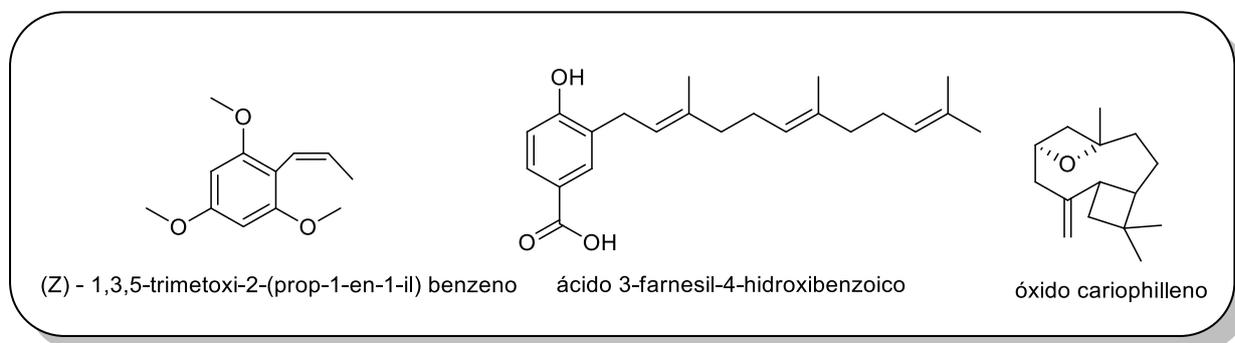
Nos extratos de *P. marginatum* também foram identificados outros metabólitos secundários como o anetol, o estragol, o isoeugenol metil éter, os ácidos 3-farnesil-4-hidroxibenzóico e 3-farnesil-4-metoxibenzóico e os glicosídeos marginatosídeo e vitexina (Figura 15) (PARMAR *et al.*, 1997).

Figura 15: Compostos isolados de *P. marginatum*.



Chaves e Santos (2002) realizaram um estudo com o extrato dos frutos de *P. marginatum* e encontraram três substâncias (FIGURA 16), sendo o (Z)-1,3,5-trimetoxi-2-(prop-1-en-1-il) benzeno considerado um novo composto natural.

Figura 16: Substâncias isoladas do fruto de *P. marginatum*.



A espécie de *P. marginatum* apresenta algumas propriedades medicinais, dentre elas, hemostática, anti-inflamatória, analgésica, (D'ANGELO *et al.*, 1997), inseticida (SOUTO *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2011), larvicidas (COSTA *et al.*, 2010), antifúngica, antibacteriana, citotóxica (GAMBOA *et al.*, 2018; TANGARIFE-CASTAÑO *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2014; PASCOLI *et al.*, 2018), acaricida (RIBEIRO *et al.*, 2016) e atividade esquistossomicida (GONÇALVES *et al.*, 2019).

1.3.2 Gênero *Peperomia*

Como o gênero *Piper*, o gênero *Peperomia* apresenta um número elevado de espécies distribuídas pelo continente americano encontradas principalmente em regiões de florestas úmidas ou montanhosas. No Brasil ocorrem aproximadamente 200 espécies desse gênero, sendo dividido em 5 subgêneros: *Acrocarpidium*, *Micropiper*, *Rhynchophorum*, *Sphaerocarpidium* e *Tildenia* (WANKE *et al.*, 2006; MONTEIRO e GUIMARÃES, 2008; YUNCKER, 1974).

A maioria das espécies de *Peperomia* apresenta em suas folhas um tecido, epiderme com alto teor de água, com grau de suculência variando consideravelmente com a morfologia foliar, fator que compensa os períodos de seca que são comuns às plantas que vivem sobre o apoio de outras. Decorrente desse fato, as plantas desse gênero são consideradas resistentes a ambientes secos e possuem facilidade no cultivo (KAUL, 1977; TAKEMORI *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2008).

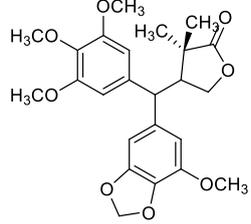
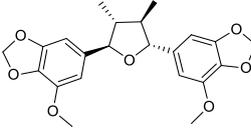
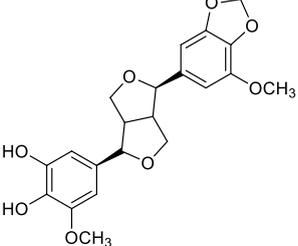
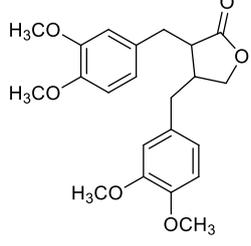
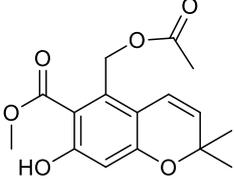
Por possuir folhagem com a morfologia peculiar, as espécies do gênero *Peperomia* são muito utilizadas como plantas ornamentais. Além disso, muitas dessas espécies são de grande relevância na medicina, sendo utilizadas no tratamento dos cânceres de mama, pulmão, estômago e fígado, no tratamento de distúrbios respiratórios, infecções, entre outros. (WANG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014; MBAH *et al.*, 2012).

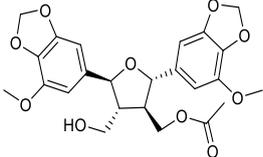
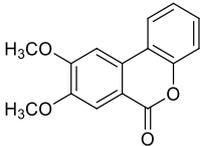
Os estudos fitoquímicos com espécies do gênero *Piper* são mais representativos do que estudos fitoquímicos com o gênero *Peperomia*. No entanto, mais de 200 compostos de espécies de *Peperomia* são descritos na literatura (GUTIERREZ *et al.*, 2016).

Um artigo de revisão com trinta espécies de *Peperomia* revelou que os policetídeos (33%) são os principais compostos da classe, seguido por lignanas (31%), fenilpropanóides (12%) e flavonóides (11%). Amidas, normalmente encontradas em espécies de *Piper*, não são uma classe comumente encontrada em espécies de *Peperomia* que compõem aproximadamente cerca de 8% dos compostos descritos (GUTIERREZ *et al.*, 2016).

Entre os metabólitos secundários isolados das espécies do gênero, destacam-se os flavonóides (WU *et al.*, 2005), as lignanas tetraidrofurânicas (FELIPPE *et al.*, 2008), lignanas furofurânicas (CHENG e CHEN, 2008), as substâncias fenólicas preniladas (MOTA *et al.*, 2009), policetídeos (WANG *et al.*, 2012), meroterpenos (SALAZAR *et al.*, 2012), dentre outros. Muitos desses metabólitos secundários são responsáveis pelas diferentes atividades biológicas das espécies de *Peperomia* (Tabela 2).

Tabela 2: Atividades biológicas e metabólitos secundários isolados de algumas espécies do gênero *Peperomia*.

Classe	Substância	Espécie	Atividade	Referência
Lignana		<i>Peperomia pellucida</i>	Anticancerígena	Xu <i>et al.</i> , (2006)
		<i>Peperomia blanda</i>	Tripanocida	Felippe <i>et al.</i> , (2008)
		<i>Peperomia duclouxii</i>	Antiinflamatória	Li <i>et al.</i> , (2007)
Lignana		<i>Peperomia vulcanica</i>	Antimicrobiana	Mbah <i>et al.</i> , (2012)
Cromenos		<i>Peperomia villipetiola</i>	Antifúngica	Salazar <i>et al.</i> , (2005)

		<i>Peperomia dindygulensis</i>	Citotóxica	Wu <i>et al.</i> , (2005)
Benzopirano		<i>Peperomia pellucida</i>	Antidiabética	Susilawati <i>et al.</i> , (2017)

1.3.2.1 *Peperomia pellucida*

A *Peperomia pellucida* (Figura 17) é a espécie mais estudada do gênero *Peperomia*. É uma planta considerada de pequeno porte e, quando adulta, chega a medir 40 cm de altura, com um ciclo de vida em torno de 8 meses. Possui ampla distribuição na Ásia e na América do Sul podendo adaptar-se a diferentes ambientes, crescendo principalmente em lugares com umidade e ao abrigo da luz solar (MAJUMDER, 2011).

Figura 17: Espécie *Peperomia pellucida*.



Fonte: Própria

Conhecida popularmente no Nordeste brasileiro como coraçãozinho, língua de sapo, erva de vidro e erva de jabuti (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2004), a *P. pellucida* é utilizada em diferentes etnias como alimento e também com vastas aplicabilidades na medicina popular. Suas principais aplicações medicinais são: controlar níveis de colesterol (SANTOS *et al.*, 2001), contra tosse ou dor de garganta, arritmias cardíacas (ESTRELA, 1994), problemas estomacais (KALITA *et al.*, 2015), antidepressivos (KOCH *et al.*, 2015), furúnculos, dores de cabeça (ARRIGONI-BLANK, 2004), febre e cicatrizante (MUNOZ *et al.*, 2000) infecções vaginais, infecções renais e contra picadas de cobra, escorpião e insetos (RAGHAVENDRA e PRASHITH, 2018), dentre outros.

Devido ao seu potencial biológico, os extratos e compostos isolados da *P. pellucida* têm sido alvo de diversos estudos que mostraram a ação analgésica, anti-inflamatória (ARRIGONI-BLANK *et al.*, 2004), citotóxica, anticancerígena (XU *et al.*, 2006; BUHIAN *et al.*, 2019), antimicrobiana (MENDES *et al.*, 2011), antioxidante (MOHAMAD *et al.*, 2015), no tratamento de fraturas ósseas (FLORENCE *et al.*, 2017), e atividade antidiabética da planta (SUSILAWATI *et al.*, 2017) (TABELA 3).

Tabela 3: Atividades biológicas relatadas em *P. pellucida*.

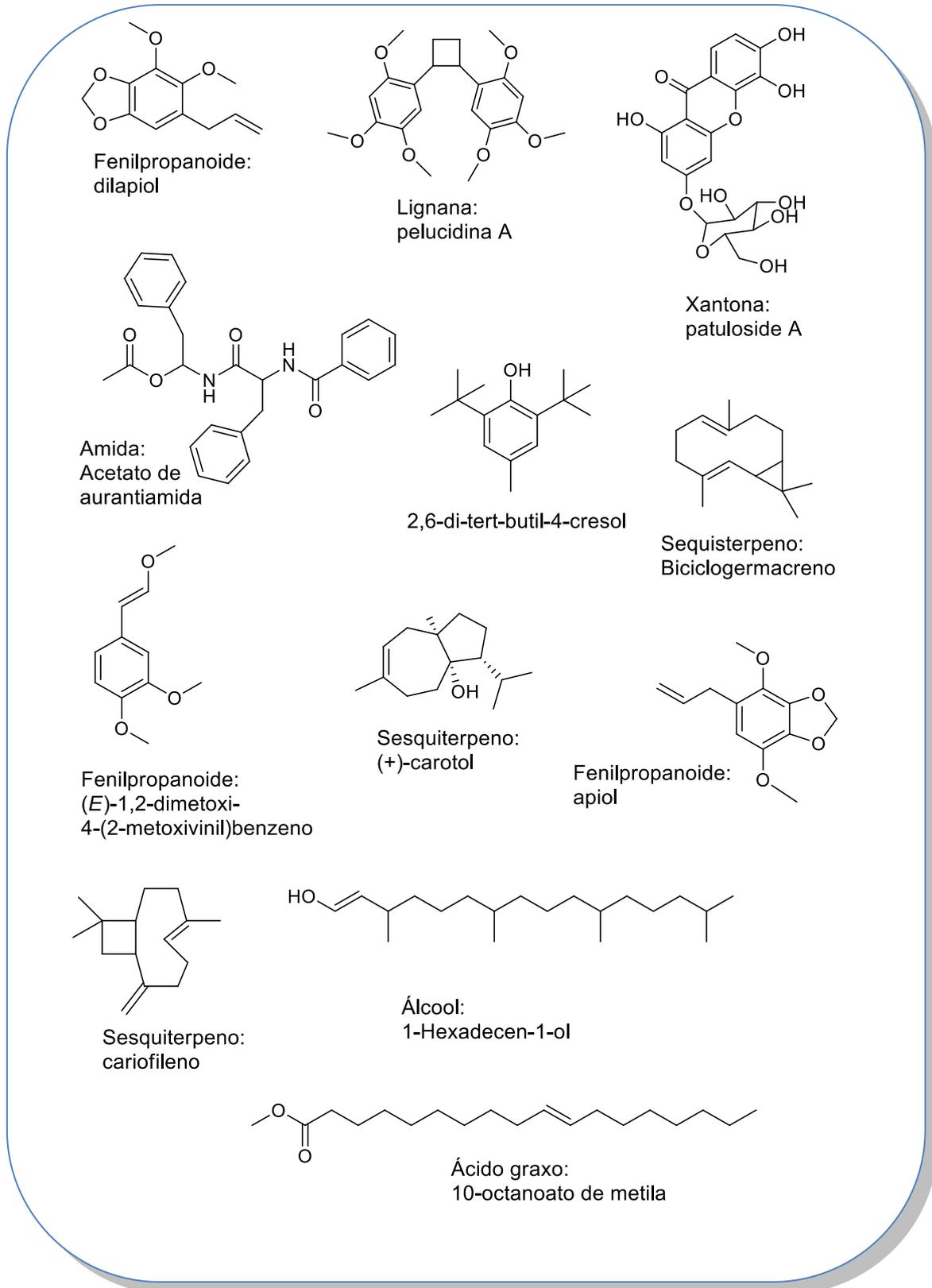
Parte da Planta	Extrato	Atividade Biológica	Referência
Folhas	CHCl ₃	Antifúngica	Ragasa <i>et al.</i> , (1998)
Partes aéreas e raízes	EtOH	Anticancerígena	Xu <i>et al.</i> , (2006)
Folhas	EtOH	Antibacteriana, Antifúngica e Citotóxica	Khan <i>et al.</i> , (2010)
Folhas	H ₂ O, EtOH e MeOH	Antimicrobiana	Ojo <i>et al.</i> , (2012)
Folhas	EtOH	Antibacteriana	Igwe e Mgbemena, (2014)
Partes aéreas e raízes	EtOH	Antitumoral, Analgésica, Antibacteriana, Antifúngica, Antiinflamatória, Sedativa	Narayanamoorthi <i>et al.</i> , (2015)
Partes aéreas e raízes	Seco	Antibacteriana	Idris <i>et al.</i> , (2015)
—	DCM	Antimicrobiana e Antioxidante	Mohamad <i>et al.</i> , (2015)
Folhas	<i>n</i> -hexano, EtOAc, <i>n</i> -BuOH e EtOH	Antidiabética	Susilawati <i>et al.</i> , (2017)

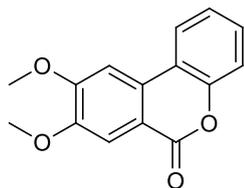
— Não reportado.

Estudos fitoquímicos da *P. pellucida* relataram a presença de fenilpropanoides (MANALO *et al.*, 1983), flavonoides (AQIL, 1993), lignanas tetraidrofurânicas (XU *et al.*, 2006) e cromenos (SUSILAWATI, 2015). Já a composição química do óleo essencial das folhas de *P. pellucida* é bastante

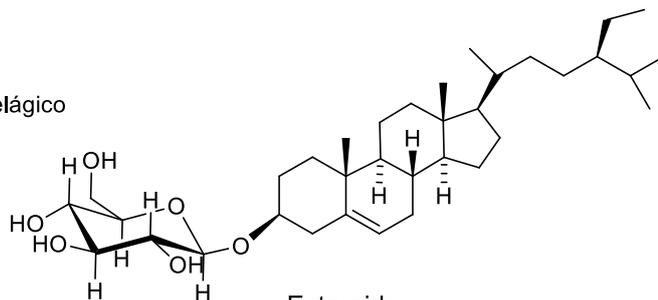
investigada e revelaram a presença dos fenilpropanoides, dilapiol e apiol como os constituintes majoritários (FRANÇOIS *et al.*, 2013; VERMA *et al.*, 2014) (FIGURA 18).

Figura 18: Substâncias isoladas de *P. pellucida*.

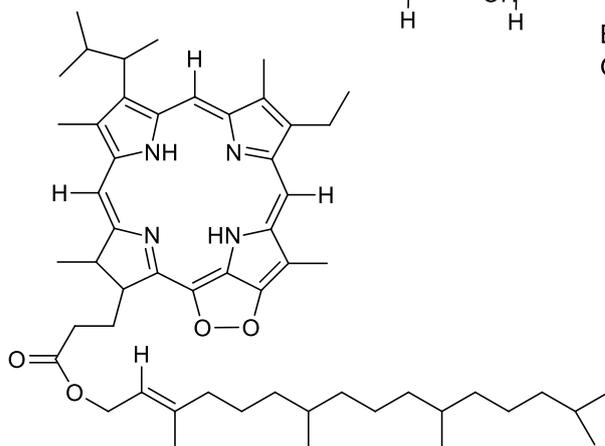




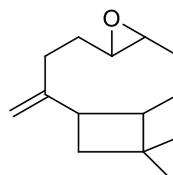
Pirona:
Ácido 8,9-dimetoxi-elágico



Esteróide:
Glicosídeo-D- (-)-β-sitosterol



Feofitina



Terpeno:
óxido de cariofileno

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral:

Investigar o perfil químico e avaliar a atividade antimicrobiana de espécies de Piperaceae durante a sua ontogênese.

1.4.2 Objetivos Específicos:

- Cultivar as espécies de Piperaceae: *Peperomia pelúcida*, *Piper arboreum*, *Piper caldense* e *Piper marginatum*.
- Obter os extratos brutos do caule, raíz, folhas e frutos de *P. pellucida*.
- Obter os extratos brutos das folhas das espécies de Piperaceae em diferentes estágios de desenvolvimento.
- Determinar os perfis químicos dos extratos brutos por técnicas cromatográficas (CLAE-UV, CG-EM) com o auxílio da análise multivariada dos dados (PCA).
- Isolar e determinar as estruturas químicas dos principais constituintes das espécies de Piperaceae durante sua ontogênese.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos das plântulas e planta adulta de espécies da família Piperaceae.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Solventes Utilizados

Os solventes foram obtidos comercialmente com pureza P.A.: Diclorometano (Quimex[®]), Metanol (Neon[®]), Clorofórmio (Qhemis[®]) e Dimetilsufóxido (Vetec[®]).

Nas análises cromatográficas, foram utilizados os solventes: Metanol (grau CLAE), Ácido fórmico (Sigma-Aldrich[®]) e Água purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]).

2.2 Material Vegetal

2.2.1 Cultivo das Plântulas

As florescências de espécies de *Piper* e *Peperomia* foram coletadas de espécies adultas e utilizadas para germinar em solo composto por uma mistura de terra adubada comercialmente e areia. As sementes foram cultivadas em vasos de plástico na cor preta contendo altura de 5 diâmetro, superfície de 5,8 e diâmetro inferior de 4,2 cm e volume de 90 mL. Em seguida, os vasos foram vedados com um plástico transparente e mantidos a 25 ± 3 °C e irrigadas no período de 3 em 3 dias.

2.2.2 Plantas Adultas

As folhas das espécies de *P. caldense* e *P. arboreum* foram coletadas no fragmento de Mata Atlântica localizada no Campus na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife. A *Peperomia pellucida* adulta e as folhas de *P. marginatum* foram coletadas da coleção de conservação “*ex situ*” no Campus da UFRPE.

2.2.3 Obtenção dos Extratos Brutos de *Peperomia pellucida*

As folhas das plântulas e planta adulta, os caules, as raízes e os frutos de *P. pellucida* foram secos separadamente em estufa a 50 °C por 48h e posteriormente triturados em almofariz com pistilo até a obtenção de um pó fino. O material vegetal de cada parte seca foi macerado e submetido à extração com diclorometano (3 x 100 mL), pelo método de maceração a frio, por 48h. Todo o material vegetal foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (40 °C, ± 120 rpm), obtendo-se os extratos brutos diclorometânicos do caule, raiz, fruto e folhas de plântula e planta adulta.

2.2.4 Obtenção dos Extratos Brutos de Espécies de *Piper*

As folhas das plantas adultas e plântulas de *P. marginatum*, *P. arboreum* e *P. caldense* foram mantidas em freezer a uma temperatura de -80 °C, após a coleta. Em seguida foram maceradas em almofariz e pistilo para obter um pó fino que foi transferido para tubos de ensaio fechados. A extração foi realizada com um sistema de 3 solventes: clorofórmio:metanol:água na proporção de 1:1, 1 mL de CHCl₃ e 1mL de MeOH/H₂O. Posteriormente, agitados no vortex durante 5 minutos, homogeneizados em ultrassom por 1 minuto e centrifugados a 3.400 rpm por 10 minutos. O procedimento de extração foi repetido por 3 vezes. A fração clorofórmica foi seca a temperatura ambiente e o extrato aquoso foi liofilizado. Em seguida, as frações foram submetidas a análises químicas (KIM, CHOI e VERPOORTE, 2010).

2.3 Equipamentos Utilizados

2.3.1 Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para as análises de CG-EM, 2 mg de cada extrato foi previamente diluído em 1 mL de MeOH (para as espécies de *Piper*) e 1 mL de DCM (para a espécie *P. pellucida*) e tratado em cartucho de extração em fase sólida (SPE) de sílica de fase reversa C18 (Sep-Pak) como etapa de pré-purificação. Em

seguida, os extratos brutos foram analisados em um cromatógrafo a gás, Clarus 580 PerkinElmer acoplado ao espectrômetro de massas acoplado do modelo Clarus SQ8S, coluna elite-5MS com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, com sistema de injeção split flow.

A temperatura de injeção foi de 250 °C e as amostras foram eluídas em uma rampa programada de 40 a 280 °C a uma taxa de 25 °C/min. O gás Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 0,56 mL/min em modo split (1:30).

2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

Para obtenção dos perfis cromatográficos das amostras de *Peperomia pellucida* e das espécies de *Piper* em CLAE, 2 mg de cada extrato foi previamente diluído em 1 mL de MeOH e tratado em cartucho de extração em fase sólida (SPE) de sílica de fase reversa C18 (Sep-Pak) como etapa de pré-purificação. Em seguida, os extratos brutos foram analisados em um sistema de cromatografia acoplado a um detector na região do UV-Vis com de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (Shimadzu LC10), sendo eluídos com misturas de MeOH:H₂O em gradiente de polaridade com fluxo de 1 mL/min (QUADRO 1) . As análises foram realizadas em coluna Phenomenex® de fase reversa C18 (Luna C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m).

Quadro 1: Gradiente de eluição no CLAE dos extratos clorofórmicos.

Solventes	Tempo (min)	% Solvente
Água + 0,01% de ácido fórmico	0-2	30
	5	30
	15	50
	30	100
	35	100
	40	30

2.3.3 Análise de Componentes Principais – PCA

Os dados das análises de CLAE foram processados utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007. Em seguida, foram submetidos a tratamento quimiométrico por PCA usando como parâmetros os tempos de retenção e áreas dos picos. A análise de componentes principais foi realizada utilizando o programa The Unscrambler® versão 9.7 (CAMO Software AS, Noruega).

2.3.4 Cromatografia Planar Analítica e Preparativa

As análises por CCDA foram efetuadas em placas da Merck®, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F₂₅₄, com suporte em alumínio de espessura 0,2mm. As análises em CCDP foram desenvolvidas em placas de vidro de tamanho 20 x 20 cm, espessura 1,0 mm de sílica gel 60 P/UV₂₅₄ contendo gesso da Macherey - Nagek®. As revelações das substâncias foram realizadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm).

2.3.5 Cromatografia Líquida à Vácuo – CLV

As análises por CLV foram realizadas em funil de buchner de 400 mL contendo celite 545 P.A (Dinâmica®) utilizando solução gradiente de Hex:AcOEt (9:1) até AcOEt puro. As placas foram reveladas sob luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

2.3.6 Cromatografia em Coluna

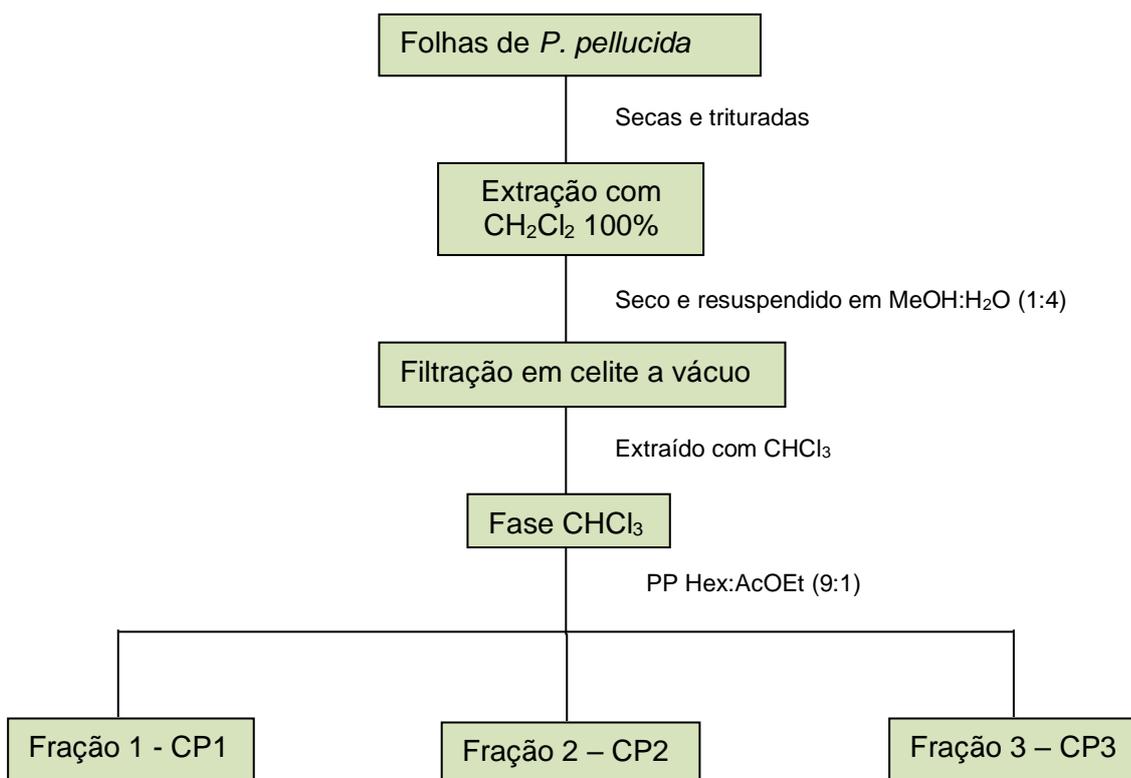
O fracionamento do extrato através da cromatografia em coluna foi realizado utilizando-se coluna de vidro com comprimento e diâmetro de acordo com as massas das amostras a serem fracionadas. Como fase estacionária, foi utilizado sílica gel 60 (0,063-0,2 mm / 70-230 mesh ASTM) da Macherey – Nagek®, sendo a proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada.

2.4 Fracionamento e Purificação dos Metabólitos Secundários das Folhas da Família Piperaceae

2.4.1 *P. pellucida*

2,56 g do extrato bruto das folhas adultas de *P. pellucida* foi suspenso em MeOH:H₂O (1:4, 400 mL) e depois filtrado em um funil de vidro sinterizado contendo celite 545 (Dinâmica). Posteriormente, o filtrado foi extraído com CHCl₃ (3 x 150 mL) em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e em seguida concentrada em rota-evaporador produzindo 110 mg de um extrato livre de clorofila. Em seguida, o extrato foi fracionado e submetido à cromatografia em Placa Preparativa – PP (FIGURA 19).

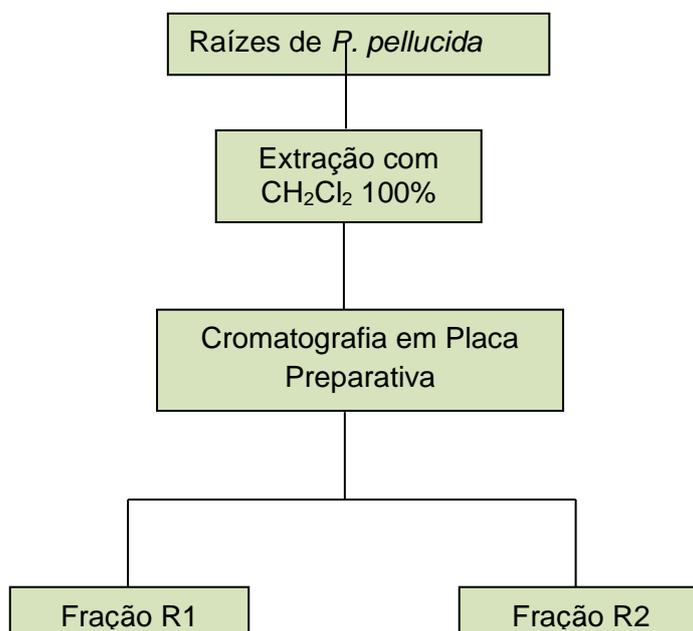
Figura 19: Fracionamento e purificação dos metabólitos secundários das folhas de *P. pellucida*.



2.4.1.1 Raíz de *P. pellucida*

As raízes de plantas adultas de *P. pellucida* foram secas em estufa por 48h à 50 °C e, em seguida, trituradas, em moinho de facas, para a obtenção do extrato bruto. O material vegetal seco e macerado (100 g) foi submetido à extração com diclorometano (3 x de 200 mL), pelo método de maceração à frio por 48h. Em seguida, todo o material vegetal foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (40 °C, ± 120 rpm) obtendo-se 10 g do extrato bruto. Posteriormente, o extrato foi fracionado e submetido à cromatografia em Placa Preparativa – PP (FIGURA 20).

Figura 20: Fracionamento e purificação dos metabólitos secundários das raízes de *P. pellucida*.

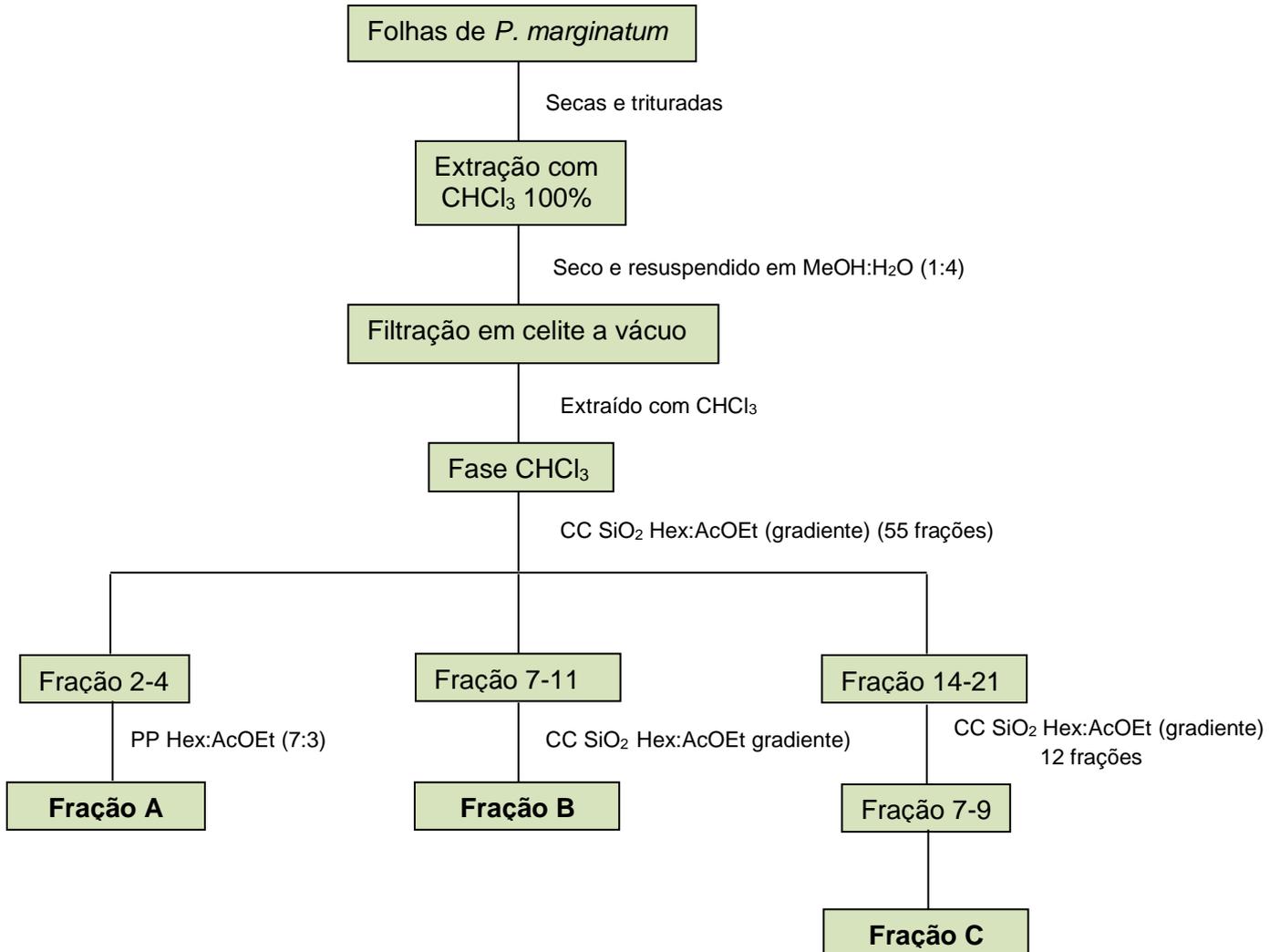


2.4.2 *P. marginatum*

As folhas de plantas adultas de *P. marginatum* foram secas em estufa por 48h, a 50 °C, e, em seguida, foram maceradas em moinho de facas para a obtenção do extrato bruto. O material vegetal seco e macerado (100 g) foi submetido à extração exaustiva com clorofórmio (3 x de 200 mL), pelo método de maceração a frio por 48h. Em seguida, todo o material vegetal foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (40 °C, ± 120 rpm) obtendo-se 11 g do extrato bruto.

O extrato bruto foi suspenso em MeOH:H₂O (1:4, 400 mL) depois filtrado em um funil de vidro sinterizado contendo celite 545 (Dinâmica). Posteriormente, o filtrado foi extraído com CHCl₃ (3 x 150 mL), em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e, em seguida, concentrada em rota-evaporador produzindo um extrato (5 g) livre de clorofila. 2,05 g desse extrato foi fracionado em coluna de sílica, eluída com hex:AcOEt (9:1) aumentando até AcOEt puro, resultando em 55 frações. As frações que apresentaram semelhança foram reunidas e purificadas usando coluna cromatográfica (CC) e placa preparativa (PP) (FIGURA 21).

Figura 21: Fracionamento e purificação dos metabólitos secundários das folhas de *P. marginatum*.



2.5 Atividade Biológica

2.5.1 Atividade Antimicrobiana

Para a avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana dos extratos das espécies de Piperaceae, foram utilizados dez microrganismos, provenientes da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 4). A suspensão dos microrganismos foi padronizada pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em água destilada, correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^7 UFC/mL para fungos.

Tabela 4: Microrganismos utilizados na atividade antimicrobiana.

Bactérias gram-positivas	Bactérias gram-negativas	Fungos
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 02)	<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA 224)	<i>Epidermophyton floccosum</i> (UFPEDA 2563)
<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 86)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA 396)	<i>Malassezia furfur</i> (UFPEDA 1320)
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA 138)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)	<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)
		<i>Penicillium</i> (UFPEDA 2556)

2.5.2 Concentração Mínima Inibitória – CMI

A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição em multiplacas com 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Foram distribuídos 175 μ L de meio de cultura líquido de Mueller – Hinton (para bactérias) e Sabouraud (para fungos), nos primeiros

poços correspondentes as amostras. Nos demais adicionou-se apenas 100 µL do meio de cultura. No poço das amostras foi adicionado também 25 µL da solução amostras (*P. pellucida* – caule, raiz, fruto, folhas 3,4 e 5 meses de idades e folhas adultas; plântulas e folhas adultas de *P. marginatum*). Nos poços do solvente foram distribuídos 75 µL do meio de cultura e adicionado 25 µL do solvente (o mesmo que foi utilizado para solubilizar as amostras). No primeiro poço do padrão (cetoconazol para fungos e metronidazol para bactérias) foi distribuído 175 µL do meio e 25 µL da solução padrão. Na coluna do meio de cultura, foram distribuídos 100 µL do meio de cultura e por final, na coluna do microrganismo, além dos 100 µL do meio distribuído, foi acrescentado 10 µL da suspensão dos microrganismos padronizados. O processo de microdiluição seriada ocorreu da primeira linha da placa que continha as amostras com o meio de cultura, descendo pelas colunas dos poços sucessivamente até a última linha, onde foi retirado 100 µL da mistura (meio de cultura com amostra) no total da diluição. Nos poços do padrão também foi realizado o processo de microdiluição seriada. Concluída a microdiluição, 10 µL dos inóculos microbianos padronizados foram adicionados nas colunas das amostras, meio, solvente e padrão. A análise foi realizada em triplicata para todas as amostras. As microplacas foram cultivadas à 37 °C por 18-24 horas para bactérias e 30 °C por 48-72 horas para os fungos.

2.5.3 Leitura das Microplacas

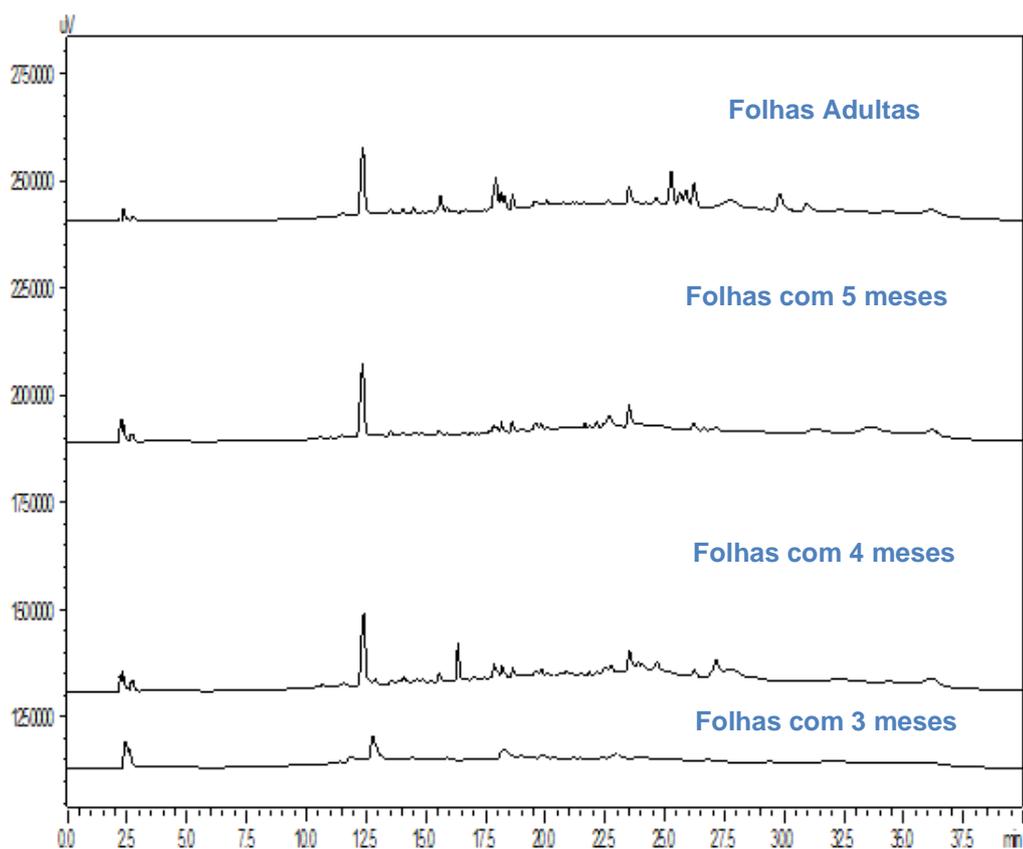
Após o período de cultivo, 24h para as bactérias e 48h para os fungos, as amostras foram reveladas com a adição de 10 µL da solução de risazurina a 0,01% e incubadas por 3 horas para que ocorresse a mudança de coloração nos poços. A CMI foi definida como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do microrganismo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Variações ontogenéticas das folhas de plântulas e planta adulta de *P. pellucida*

Inicialmente foi feita uma análise sobre a ontogênese das folhas de *P. pellucida*, através da técnica de CLAE-DAD com todos os extratos obtidos das folhas da planta para identificar se haveria variações ou modificações em seu perfil químico. Desta forma, o monitoramento periódico dos perfis químicos dos extratos das folhas com 3, 4 e 5 meses de idade e folhas adultas de *P. pellucida* foram obtidos (Figura 22).

Figura 22: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. pellucida*.



Na amostra com 3 meses, foi observado os picos com tempos de retenção em 13 e 12 min que não foram identificados nos outros estágios de desenvolvimento da planta, além de uma diminuição na quantidade de picos em relação aos outros estágios da planta. A variação de metabólitos

secundários, em plântulas ocorre devido a diversos fatores abióticos e bióticos, incluindo fatores fisiológicos, sendo que a planta na fase de desenvolvimento produz maior quantidade de substâncias relacionadas com seu crescimento, implicando na redução de metabólitos secundários durante este estágio (BARTON, 2008; BOEGE e MARQUIS, 2005).

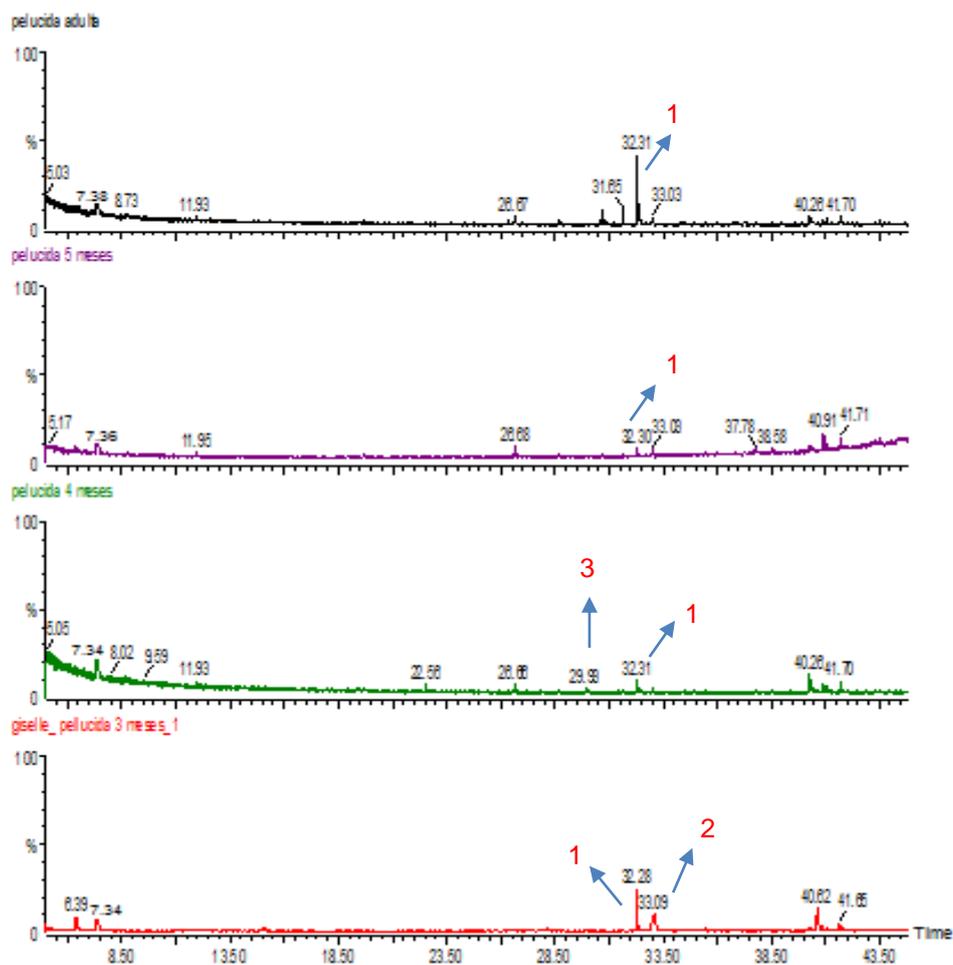
A plântula com 4 meses apresentou uma alta similaridade em produção de metabólitos secundários com a plântula com 5 meses. Assim como, a planta adulta que também exibiu um cromatograma similar, apesar da plântula com 4 meses que apresentou um pico com tempo de retenção em 16,5 min que não estava presente nos outros estágios.

Assim, como foi verificado pela técnica CLAE que há variações na produção dos metabólitos secundários de *P. pellucida*, procurou-se elucidar quais substâncias presentes nos extratos das folhas de plântulas e folhas adultas são responsáveis por tal distinção. Para isso, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas – CG-EM.

3.2 Análise do perfil químico das plântulas e planta adulta de *Peperomia pellucida*

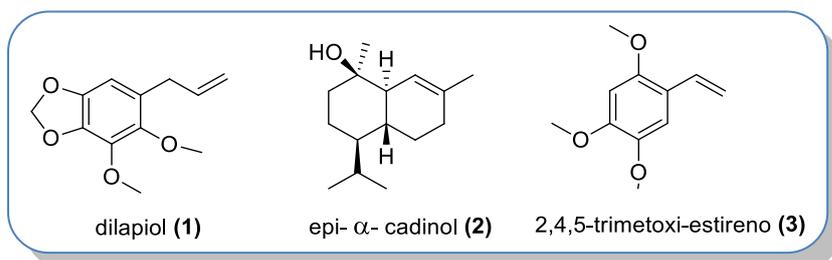
Os perfis químicos dos extratos brutos obtidos por CG-EM e CLAE-DAD das folhas das plântulas de *P. pellucida* apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas quando comparados ao perfil químico do extrato bruto das folhas adultas (Figura 23).

Figura 23: Perfil químico obtido por CG-EM dos extratos das folhas de plântulas e plantas adultas de *P. pellucida*.



No total, foi possível a identificação de três compostos nos extratos analisados: o dilapiol **(1)**, o epi- α -cadinol **(2)**, e o 2,4,5-trimetoxi-estireno **(3)** (Figura 24).

Figura 24: Substâncias identificadas na plântula e planta adulta de *P. pellucida*.



Os componentes dos extratos orgânicos durante a ontogênese de *P. pellucida* foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₆) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura (Adams, 2007) e suas concentrações calculadas através da área integral de seus respectivos picos (TABELA 5).

Tabela 5: Composição química dos extratos orgânicos das folhas de *P. pellucida* durante ontogênese.

Compostos	IR _C	IR _L	Estágio / Percentual (%)			
			3 meses	4 meses	5 meses	Adulta
2,4,5-trimetoxi-estireno	1548	*Manalo <i>et al.</i> , (1983)	–	1,46	–	–
dilapiol	1610	1620	7,56	2,85	0,98	14,53
epi- α -cadinol	1630	1638	7,98	–	–	–

IR_C = Índice de Retenção Calculado, IR_L = Índice de Retenção da Literatura.

*Dados comparados com Manalo *et al.*, (1983).

_Substância não identificada.

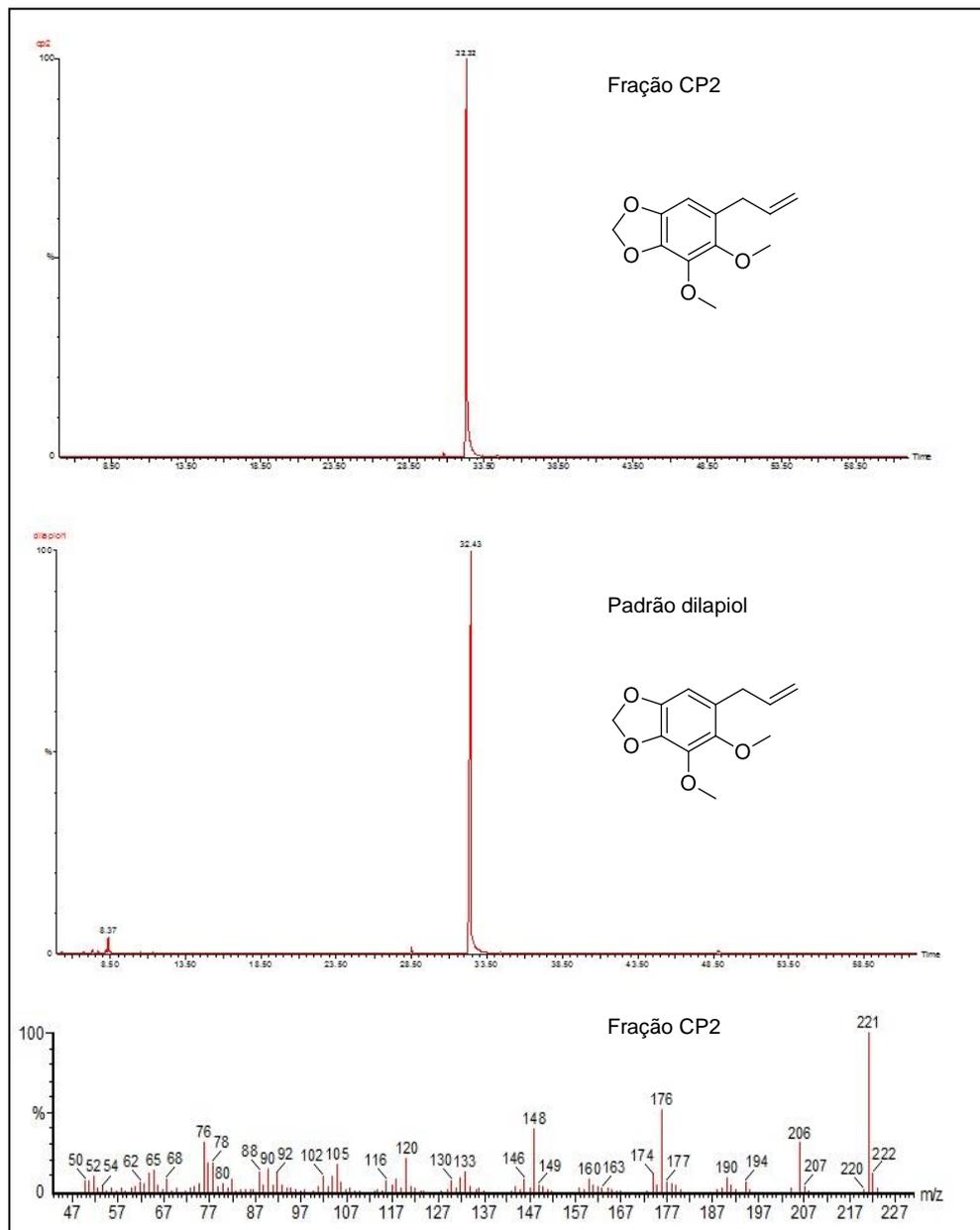
O fenilpropanoide dilapiol foi identificado em todos os estágios de desenvolvimento das folhas de *P. pellucida*, no entanto, o maior percentual foi obtido nas folhas adultas (14,53%) e nas folhas com 3 meses (7,56%). Verificou-se também que os compostos epi- α -cadinol e 2,4,5-trimetoxi-estireno são encontrados em dois estágios diferentes da planta. O epi- α -cadinol foi encontrado com 7,98% apenas nas folhas da plântula com 3 meses, enquanto o 2,4,5-trimetoxi-estireno foi encontrado com 1,46% nas folhas da plântula com 4 meses. Desta forma, podemos considerar que o dilapiol é o composto majoritário da *P. pellucida* tanto na fase adulta quanto na fase de plântula (3 meses) e que as substâncias, epi- α -cadinol e 2,4,5-trimetoxi-estireno, só podem ser isoladas na fase de plântula da *P. pellucida*, uma vez que não está presente na fase adulta da planta.

Corroborando com nosso estudo, Moraes, (2016) trabalhou com o isolamento das substâncias em diferentes estágios de desenvolvimento da *P. pellucida*, e também identificou a substância 2,4,5-trimetoxi-estieno nas folhas da plântula com 4 meses de idade. Em contra partida, a substância dilapiol foi identificada apenas nas folhas com 4 meses e nas folhas adultas da planta.

3.2.1 Estudo fitoquímico dos extratos orgânicos dos tecidos de *Peperomia pellucida*

O extrato diclorometânico, 110 mg, das folhas de *P. pellucida* foi fracionado em placa preparativa, produzindo três frações. O monitoramento destas foi feito por cromatografia em camada delgada, CG-EM e HPLC. A partir dessas análises, verificou-se que a fração CP2 (10 mg) apresentou-se mais pura, quando comparada com as demais. A comparação do perfil químico da amostra CP2 com os dados descritos na literatura (ADAMS, 2007) e por comparação com um padrão obtido pelo nosso grupo de pesquisa, revelou que a amostra é composta majoritariamente pela substância dilapiol (FIGURA 25).

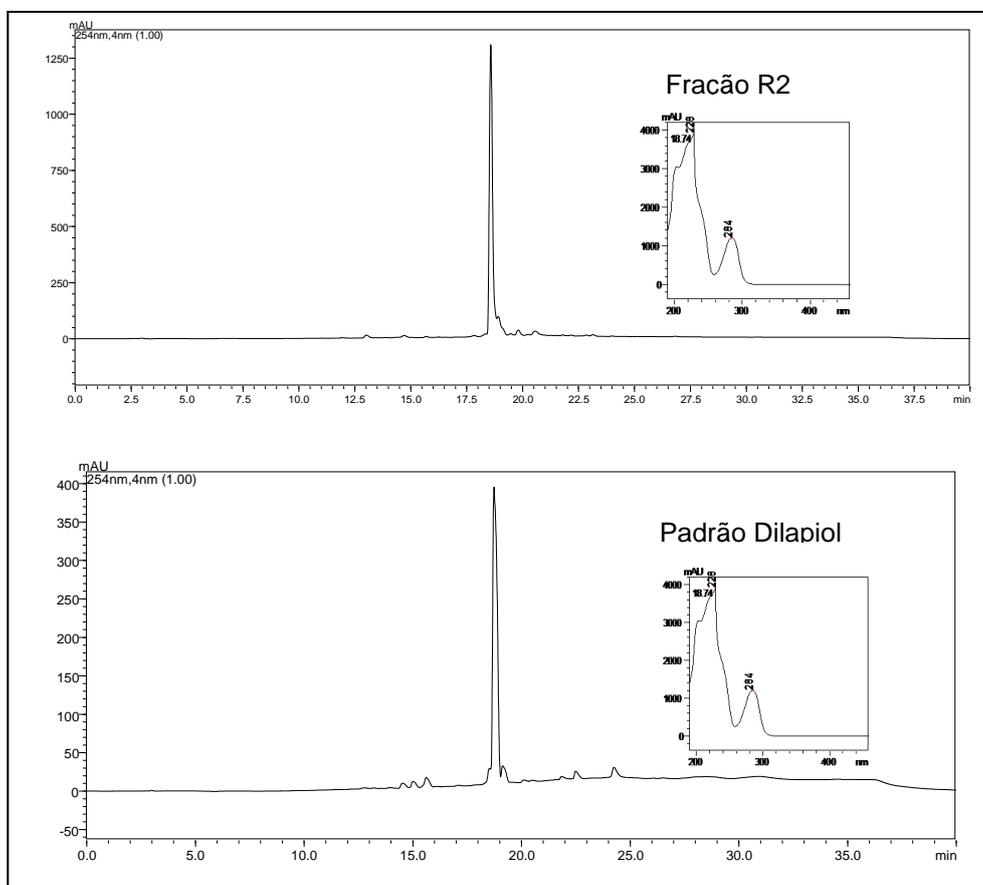
Figura 25: Cromatogramas e espectro de massa do CG-EM da fração CP2 e do padrão dilapiol.



A partir da purificação da fração R2, obtida do extrato diclorometânico das raízes de *P. pelúcida*, também foi isolada e identificada a substância dilapiol, a qual se apresentou como um óleo amarelo. O perfil químico por HPLC da fração R2 foi comparado com o perfil químico do padrão dilapiol. Os espectros de UV obtidos através da HPLC mostram picos idênticos em comprimentos de onda máximo em 228 e 284 nm indicando que os cromóforos

da fração R2 e do padrão dilapiol são idênticos e conseqüentemente pertencem ao mesmo composto (FIGURA 26).

Figura 26: Perfil cromatográfico (HPLC) e espectros de UV da fração R2 e do padrão dilapiol.



A presença do dilapiol nos óleos essenciais das folhas de *P. pellucida* é relatada na literatura (FRANÇOIS *et al.*, 2013; VERMA *et al.*, 2015; OKOH *et al.*, 2017). Assim como é descrito o isolamento do dilapiol nos extratos das folhas de *P. pellucida* em diferentes estágios de maturidade (MORAES, 2016), e também de diferentes tecidos da planta (IGWE e MGBEMENA, 2104; MOHAMAD *et al.*, 2015; GUTIERREZ *et al.*, 2016).

3.2.2 Estudo estatístico durante ontogênese das folhas de *P. pellucida*

Para a análise estatística durante a ontogênese das folhas de *P. pellucida*, utilizou-se a técnica de Componentes Principais – PCA com o objetivo de acompanhar, possíveis alterações na produção de metabólitos secundários. Os dados dos extratos com 3, 4 e 5 meses de idade e folhas adultas de *P. pellucida* obtidos por CLAE-UV foram tratados no programa Excel e posteriormente submetidos à análise de componentes principais (PCA).

O gráfico de *scores* obtido da análise de PCA destacou 93% da variância entre os dados, sendo 81% explicados por PC1 e 12% por PC2. No gráfico de *loadings* observaram-se as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos da planta (Figura 27).

Para a plântula com 4 meses de idade verificou-se uma similaridade com a plântula com 5 meses, assim como para a planta adulta, mas a presença do pico com TR = 16,5 min na plântula com 4 meses referente a substância 2,4,5-trimetoxi-estireno que não está presente nos outros estágios, as colocou em grupos distintos.

Os dados obtidos pela análise HPLC-UV e os máximos de absorbância da substância (257 nm e 312 nm) foram comparados com máximos de absorbância da literatura (259 nm e 314 nm) os quais trataram da mesma substância, 2,4,5-trimetoxi-estireno (MANALO *et al.*, 1983). Esse foi o fator responsável pela separação entre as plântulas com 4 e 5 meses e a planta adulta.

Assim, utilizando-se dados do PCA, HPLC-UV e também do auxílio das análises por CG-EM para o monitoramento periódico ao longo do desenvolvimento das folhas de *P. pelúcida*, foi possível encontrar mudanças metabólicas ocorridas durante a ontogênese da planta, mostrando que a substância dilapiol está presente em todos os estágios e que as substâncias 2,4,5-trimetoxi-estireno e *epi- α* -cadinol só são encontradas nas plântulas de *P. pellucida*.

3.3.3 Atividade Antimicrobiana de *P. pellucida*

3.3.3.1 Atividade Antimicrobiana das Plântulas e Planta Adulta de *P. pellucida*

Como foi verificado que há variações na produção e acúmulo de metabólitos durante a ontogênese de *P. pelúcida*, realizou-se ensaios antimicrobianos com os extratos obtidos para verificar possíveis alterações no potencial antimicrobiano durante o desenvolvimento da planta.

Desta forma, os extratos das folhas de plântulas com 3, 4 e 5 meses e folhas adultas de *P. pellucida* foram submetidos a ensaios antimicrobianos com 8 microrganismos pelo método de microdiluição (CMI). A tabela 6 exhibe as

concentrações mínimas inibitórias dos espécimes para cada microrganismo testado.

Tabela 6: Concentração Mínima Inibitória – CMI dos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de *P. pellucida*.

Microrganismos	3 meses	4 meses	5 meses	Adulta
<i>S. aureus</i> (02)	1250	2500	2500	2500
<i>B. subtilis</i> (86)	2500	2500	2500	2500
<i>E. coli</i> (224)	19,5	2500	2500	2500
<i>K. pneumoniae</i> (396)	625	2500	2500	2500
<i>E. faecalis</i> (138)	1250	312,5	2500	2500
<i>C. albicans</i> (1007)	1250	1250	1250	1250
<i>M. furfur</i> (1320)	2500	2500	2500	2500
<i>E. floccosum</i> (2563)	1250	1250	312,5	39,0

Os extratos das folhas de plântulas e das folhas da planta adulta de *P. pellucida* apresentaram potencial antimicrobiano. Quando testado com as bactérias gram-positivas *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. faecalis* e gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae* foi observado que as plântulas com 5 meses e as folhas adultas inibiram esses patógenos com a mesma concentração de 2500µg/mL. A concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias para a plântula com 4 meses diferiu apenas para a bactéria *E. faecalis*, correspondendo a 312,5 µg/mL, a menor concentração, quando comparada com as exibidas pelas outras plântulas. A plântula com 3 meses exibiu menor concentração de 1250 µg/mL para *S. aureus* e *E. faecalis*, e as concentrações mais baixas de 19,5 e 625 µg/mL frente as bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Esse fato pode ser atribuído às variações de metabólitos secundários em plântulas

que são responsáveis pela defesa da planta contra inimigos naturais (BARTON, 2008), e à presença das substâncias *epi- α -cadinol* e *dilapiol*, que juntas podem ter potencializado a atividade antibacteriana do extrato com 3 meses, uma vez que a presença de tais substâncias na composição química tanto de óleos essenciais quanto de extratos orgânicos exibem atividade antimicrobiana (GUTIERREZ *et al.*, 2016; OKOH *et al.*, 2017; DE SOUZA e SOUSA, 2018).

Os extratos das plântulas com 5 meses de idade e da planta adulta exibiram melhores resultados para ação antifúngica com concentrações de 312,5 e 39 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, frente ao fungo *E. floccosum*, corroborando com a literatura que destaca que a espécie de *P. pellucida* apresenta potente atividade antimicrobiana (MENDES *et al.*, 2011).

3.3.3.2 Atividade Antimicrobiana dos Tecidos de *P. pellucida*

Os extratos brutos dos diferentes tecidos (caule, raiz e fruto) de *P. pellucida* também foram submetidos a ensaios antimicrobianos por Concentração Mínima Inibitória – CMI (Tabela 7).

Tabela 7: Concentração Mínima Inibitória – CMI dos extratos do caule, raiz e fruto de *P. pellucida*.

Tecidos de <i>P. pellucida</i> e CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
Microrganismos	Caule	Raíz	Fruto
<i>S. aureus</i> (02)	312,5	2500	1250
<i>B. subtilis</i> (86)	625	2500	1250
<i>E. coli</i> (224)	39,0	2500	1250
<i>K. pneumoniae</i> (396)	625	1250	1250
<i>E. faecalis</i> (138)	312,5	1250	625
<i>C. albicans</i> (1007)	625	625	2500
<i>M. furfur</i> (1320)	1250	1250	1250
<i>E. floccosum</i> (2563)	156,2	625	78,1

O extrato do caule de *P. pelúcida* exibiu menores valores de CMI quando comparados aos valores dos extratos das raízes e frutos, principalmente para a bactéria *E. coli*, uma bactéria *gram*-negativa considerada bastante resistente a antibióticos, com CMI de 39 $\mu\text{g/mL}$. Para o fungo *E. floccosum* o caule exibiu CMI de 156,2 $\mu\text{g/mL}$. Esse é um resultado muito significativo, visto que, apesar da *P. pellucida* ser bastante estudada, poucos são os estudos voltados na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato do caule. Há relatos prévios da atividade antimicrobiana com os extratos da planta inteira e com os óleos essenciais do caule, mas não com o extrato de *P. pellucida* (VERMA *et al.*, 2014; GUTIERREZ *et al.*, 2016). O extrato da raiz de *P. pellucida*, exibiu melhor atividade frente aos fungos *C. albicans* e *E. floccosum* com CMI de 625 $\mu\text{g/mL}$,

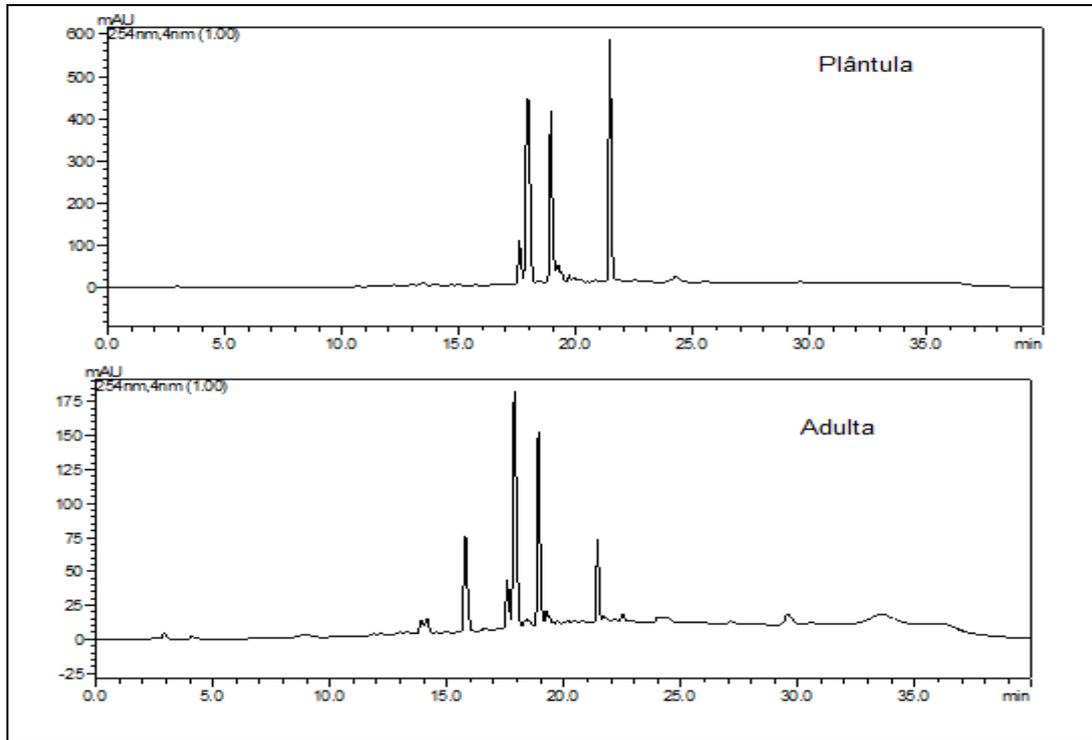
respectivamente. O fruto exibiu melhor atividade frente ao fungo *E. floccosum*, com CMI de 78,1 µg/mL.

As partes da planta de *P. pellucida* (folhas, caules, raízes e frutos) apresentaram valores de CMI que variaram de 19 a 2500 µg/mL para diferentes tipos de bactérias *gram* negativas e positivas, indicando o caule com o maior potencial antimicrobiano e de amplo espectro para o uso no tratamento de patologias infecciosas.

3.4 Variações ontogenéticas das folhas de plântulas e planta adulta de *Piper marginatum*

Para o estudo sobre a ontogênese das folhas de *P. marginatum*, realizou-se, a princípio, uma análise através da técnica de HPLC-UV com extratos obtidos das folhas na fase de plântula e na fase adulta da planta para identificar se haveria variações ou modificações em seu perfil químico (Figura 28). As folhas da plântula e folhas adultas de *P. marginatum* foram coletadas na mata atlântica de Dois Irmãos – Recife, PE.

Figura 28: Análise do perfil cromatográfico (CLAE) obtido dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. marginatum* coletados na mata atlântica da UFRPE.

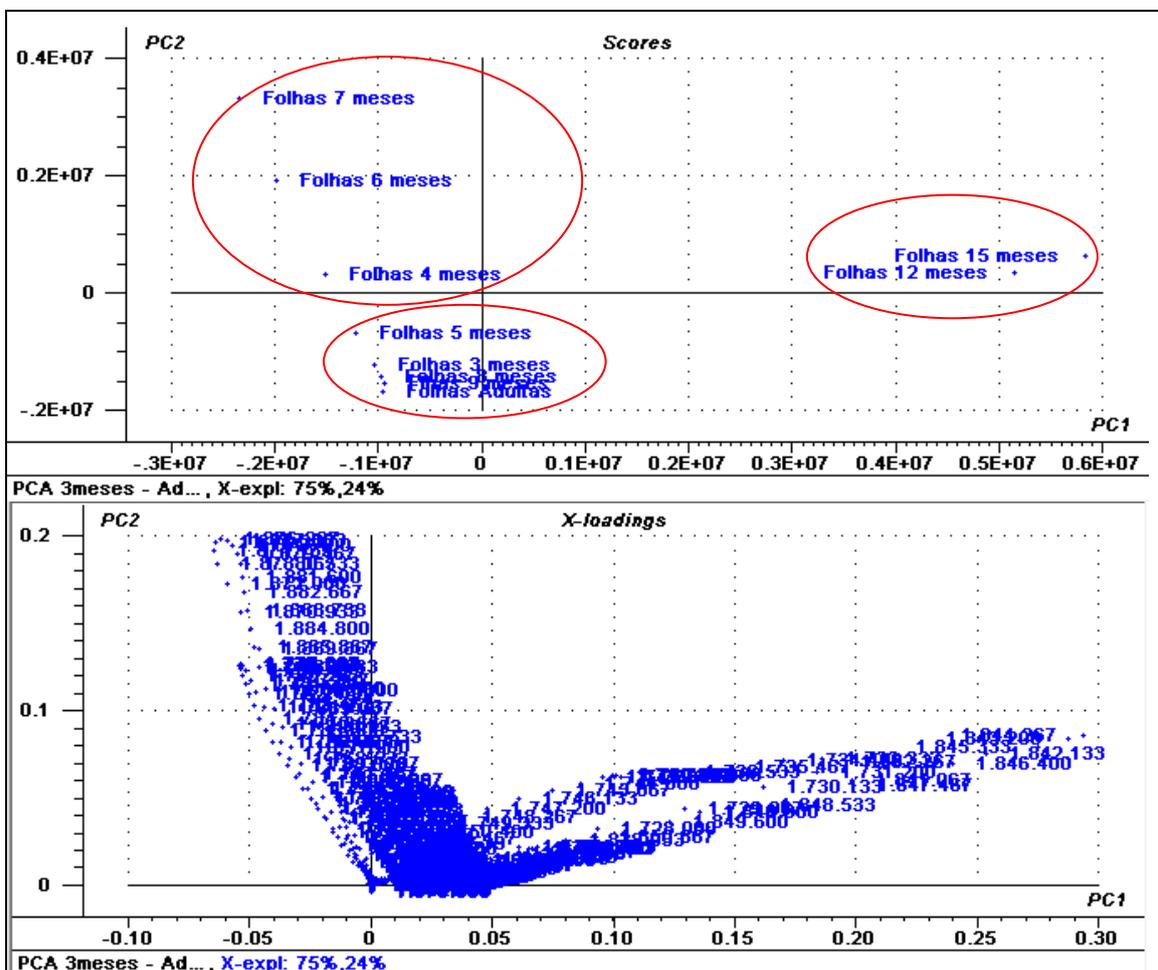


Através dos cromatogramas obtidos, foi possível verificar que houve mudanças significativas nos picos detectados na fase de plântula e na fase adulta de *P. marginatum*, onde esta última apresentou uma produção mais acentuada de metabólitos. Desta forma, iniciou-se o cultivo das sementes de *P. marginatum* para verificar se haveria variações no perfil químico da planta durante todo seu desenvolvimento.

Assim, o monitoramento periódico dos perfis químicos dos extratos das folhas de *Piper marginatum* foi realizado a partir de coletas das folhas das plântulas com diferentes idades, partindo de 3 à 9 meses e após com 12 e 15 meses de idade. Os dados dos extratos obtidos por CLAE foram tratados no programa Excel e posteriormente submetidos à análise de componentes principais (PCA).

O gráfico de scores obtido da análise de PCA destacou 99% da variância entre os dados, sendo 75% explicados por PC1 e 24% por PC2. No gráfico de *loadings*, observaram-se as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos da planta (Figura 29).

Figura 29: Gráficos de *scores* e de *loadings* da análise de componentes principais das amostras de *P. marginatum*.



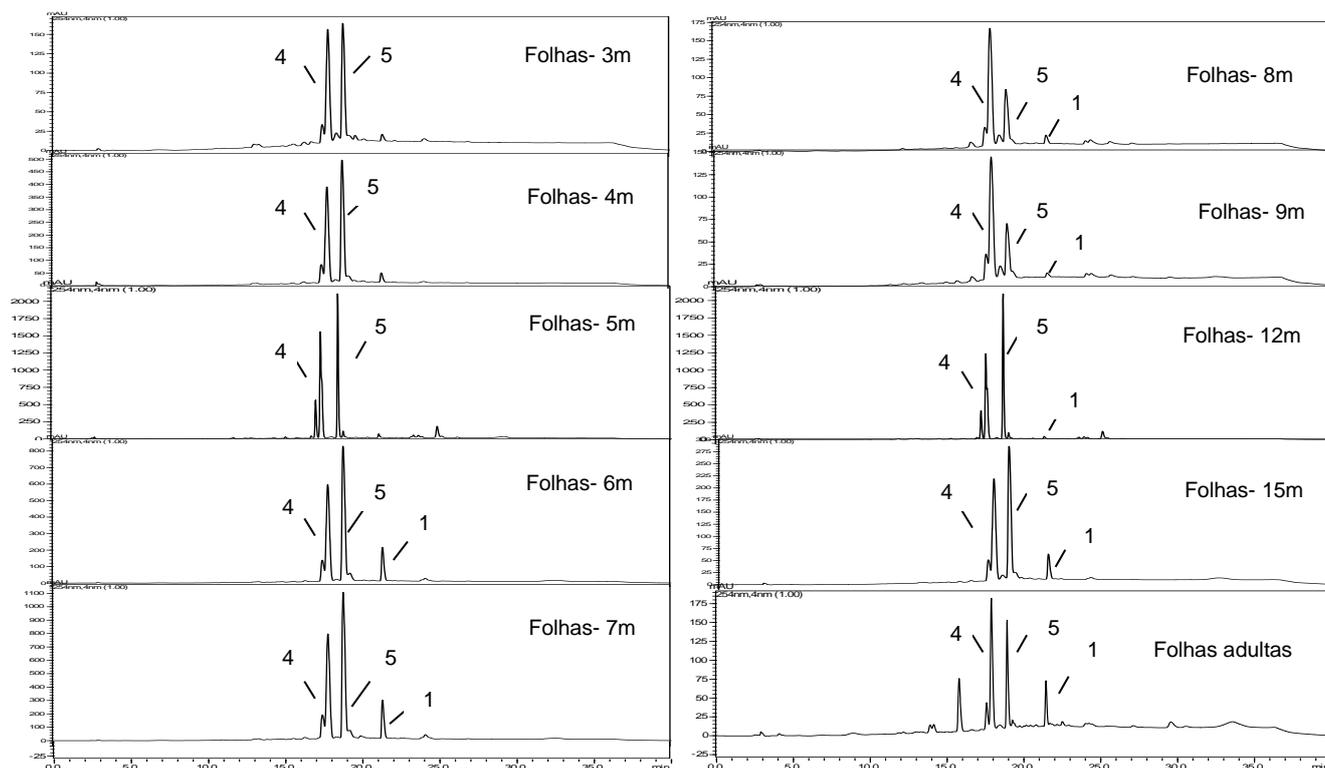
De acordo com o gráfico, foi possível observar uma produção de metabólitos secundários muito similar entre as folhas das plântulas e as folhas adultas de *P. marginatum*, embora houve uma diferenciação entre elas que as colocaram em grupos distintos no gráfico de PCA. As plântulas com 3, 4 e 5 meses apresentaram um perfil químico muito similar entre elas, e também similaridade do perfil químico entre as folhas da planta adulta e as plântulas

com 8 e 9 meses levando-as para o mesmo grupo PC1 no gráfico. Essa similaridade foi devida a presença das substâncias detectadas por CG-EM e CLAE, tais como: α -pineno, *p*-cimeno, *Z* e *E*-asarona.

As folhas com 12 e 15 meses de idade apresentaram semelhança no perfil com as demais plântulas com 4, 6 e 7 meses, o que as deixa no mesmo grupo PC2, mas, apresenta uma separação bastante significativa que pode ser devido as variações de concentração da amostra no momento da análise e pela concentração das substâncias. As folhas com 15 meses e adultas não apresentam em sua composição as substâncias α -pineno, *p*-cimeno e limoneno, responsáveis pela defesa da planta contra herbívoros. Nelas, observou-se a presença apenas das substâncias *Z* e *E*-asarona como constituintes majoritários e do dilapiol, que apareceu em uma concentração bastante significativa nesses estágios.

O que pode ser observado nas análises por CLAE-UV (Figura 30) das folhas de *P. marginatum*, em diferentes fases de desenvolvimento, é que as substâncias *Z* e *E*-asarona foram encontradas como constituintes majoritários em todas as fases de desenvolvimento da planta. A presença dessas substâncias é maior no estágio da planta com 15 meses e na planta adulta, uma vez que, nestas fases a composição química da planta é constituída basicamente pelas substâncias *Z*-asarona (4) e *E*-asarona (5). Enquanto para as plântulas com 3, 4 e 5 meses não foi identificada a presença do dilapiol (1), essa substância é observada nas folhas de *P. marginatum* apenas a partir do estágio de 6 meses da planta.

Figura 30: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. marginatum*.



Assim, através dos perfis dos cromatogramas pode-se observar uma mudança bastante significativa no perfil de metabólitos detectados nas fases iniciais da planta e na fase adulta, devido as variações nas concentrações das substâncias *Z* e *E*-asarona e do aparecimento da substância dilapiol apenas na plântula com 6 meses. Percebeu-se ainda que além das substâncias já mencionadas, nas folhas adultas de *P. marginatum*, há presença de uma substância não detectada com tempo de retenção em 15,5 minutos que é bastante acentuada nesta fase da planta.

Variações quantitativas e qualitativas também foram observadas em outras espécies de plantas durante seus diferentes estágios de desenvolvimento (VOGELMANN *et al.*, 1988; DANELUTTE *et al.*, e FONSECA *et al.*, 2000), um exemplo é a espécie de *Piper*, a *P. gaudichaudianum* relatada no trabalho de Gaia *et al.*, (2014).

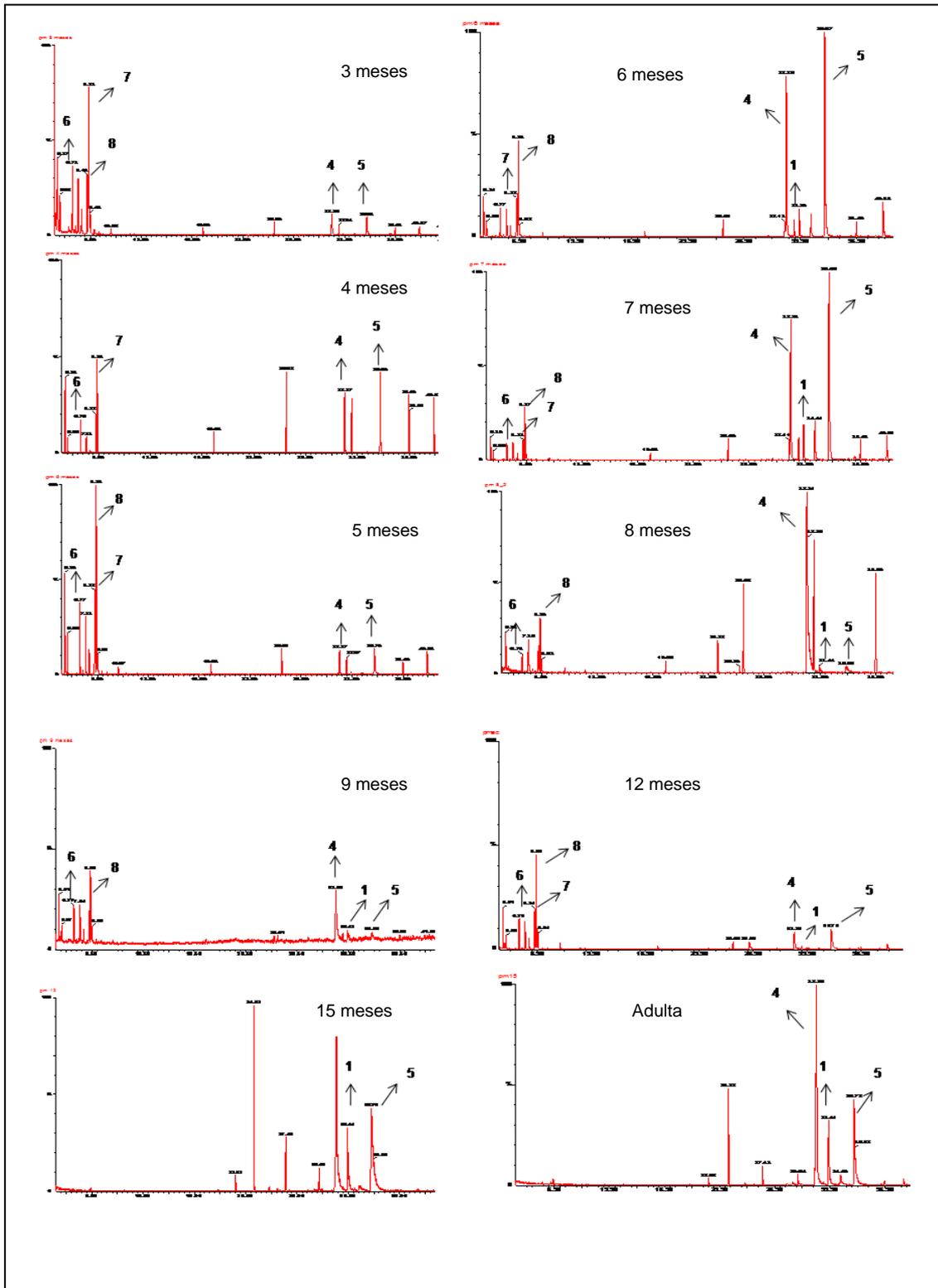
No caso da *P. marginatum*, foram observadas variações na concentração e na produção de metabólitos secundários nas diferentes fases de desenvolvimento das folhas da espécie, o que contribui para um novo conhecimento sobre o perfil químico da planta durante sua ontogênese.

3.4.1 Análise Comparativa do Perfil Químico de *Piper maginatum*

As folhas das plântulas e folhas adultas de *P. marginatum* foram coletadas da nossa coleção “*in situ*” no próprio Departamento de Química localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

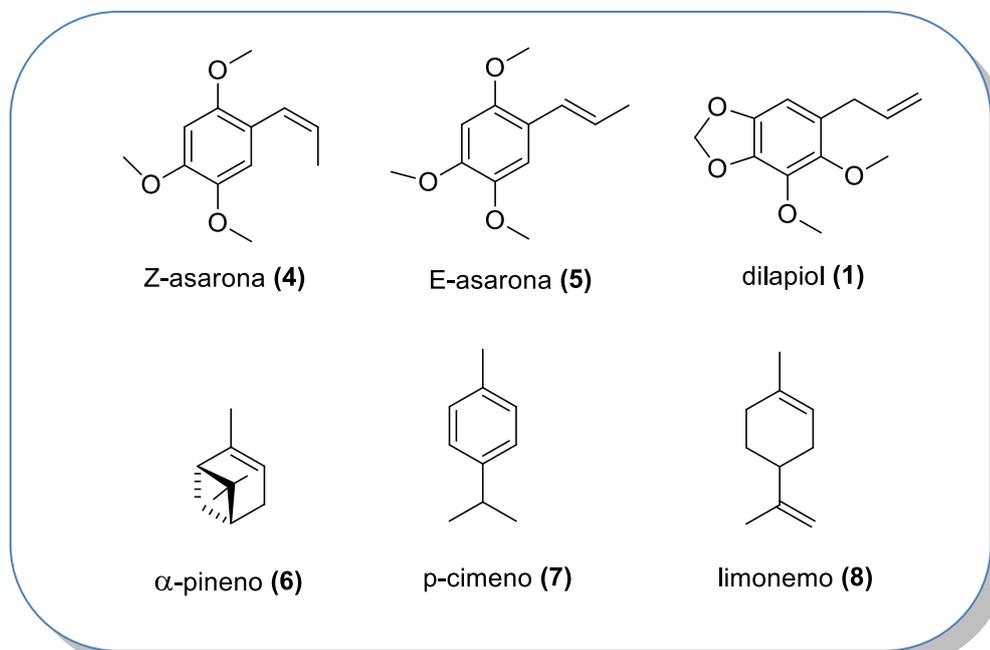
Para a análise da comparação do perfil metabólico e para identificar as substâncias responsáveis pela distinção do perfil químico de *P. marginatum* foi empregado a técnica de CG-EM. Os cromatogramas dos extratos das plântulas e planta adulta são exibidos na figura 31.

Figura 31: Cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos das folhas adultas e das plântulas de *P. marginatum*.



Com base na interpretação dos espectros de massas dos picos detectados por CG-EM, foi possível identificar seis substâncias presentes nos extratos das folhas de *P. marginatum*: dilapiol (**1**), *Z*-asarona (**4**), *E*-asarona (**5**), α -pineno (**6**), *p*-cimeno (**7**) e limoneno (**8**) (Figura 32).

Figura 32: Substâncias identificadas na plântula e planta adulta de *P. marginatum*.



Os componentes dos extratos orgânicos durante a ontogênese de *P. marginatum* identificados com base no índice de retenção (IR) e comparados com os dados da literatura são descritos na tabela 8.

Tabela 8: Composição química dos extratos orgânicos das folhas de *P. marginatum* durante ontogênese.

Composto	IR _C	IR _L	Estágio/Percentual (%)
α-pineno	918	932	3 meses – 9,14
			4 meses – 2,11
			5 meses – 7,48
			6 meses – *
			7 meses – 0,93
			8 meses – 1,09
			9 meses – 3,98
			12 meses – 3,94
			15 meses - *
			Adulta - *
p-cimeno	1019	1020	3 meses – 7,35
			4 meses – 2,49
			5 meses – 8,03
			6 meses – 3,81
			7 meses – 2,26
			8 meses – *
			9 meses – *
			12 meses – 5,26
			15 meses - *
			Adulta - *
Limoneno	1023	1024	3 meses – 19,73
			4 meses – 6,32
			5 meses – 20,75
			6 meses – 9,57
			7 meses – 6,08

			<p>8 meses – 3,21</p> <p>9 meses – 7,93</p> <p>12 meses – 5,26</p> <p>15 meses - *</p> <p>Adulta - *</p>
Z-asarona	1608	1616	<p>3 meses – 3,51</p> <p>4 meses – 5,61</p> <p>5 meses – 3,63</p> <p>6 meses – 19,14</p> <p>7 meses – 18,90</p> <p>8 meses – 24,02</p> <p>9 meses – 12,34</p> <p>12 meses – 3,60</p> <p>15 meses – 39,17</p> <p>Adulta – 40,67</p>
E-asarona	1699	1675	<p>3 meses – 3,18</p> <p>4 meses – 9,46</p> <p>5 meses – 4,47</p> <p>6 meses – 27,97</p> <p>7 meses – 5,33</p> <p>8 meses – 2,80</p> <p>9 meses – 0,33</p> <p>12 meses – 4,40</p> <p>15 meses – 25,33</p> <p>Adulta – 24,43</p>
Dilapiol	1638	1620	<p>3, 4 e 5 meses - *</p> <p>6 meses – 3,04</p> <p>7 meses – 4,55</p>

Dilapiol			8 meses – 7,48
			9 meses – 1,60
			12 meses – 3,60
			15 meses – 10,59
			Adulta – 11,38

IR_C = Índice de Retenção Calculado, IR_L = Índice de Retenção da Literatura.

*Substância não identificada.

Através dos cromatogramas obtidos por CG-EM foi possível observar que houve mudanças significativas no perfil químico da *P. marginatum*, principalmente nas folhas com 15 meses e nas folhas adultas.

As substâncias α -pineno, p -cimeno e limoneno foram as substâncias mais identificadas na fase de plântulas, com um percentual mais acentuado na plântula com 3 meses, 9,14; 7,35 e 19,73%, respectivamente. A presença dessas substâncias em maior percentual, principalmente nessa fase, é devido a se tratar de substâncias com grande potencial contra ação de insetos herbívoros, uma necessidade indispensável para as plântulas que precisam de uma proteção mais acentuada contra predadores, o que facilita a continuidade do seu desenvolvimento (RUSSELL E SOUTHWELL, 2002; VIEGAS JÚNIOR, 2003). O α -pineno não está presente nas folhas da plântula com 6 meses e nas folhas com 15 meses e adulta. Assim como o p -cimeno e o limoneno que também não foram encontrados nas folhas com 15 meses e nas folhas adultas da *P. marginatum*.

Um fator notório e importante ocorre para a substância dilapiol, que foi produzida pelas folhas da *P. marginatum* apenas a partir dos 6 meses de idade com um percentual de 3,04%. Esse valor aumentou consideravelmente nos demais estágios de desenvolvimento da planta, principalmente para a fase adulta, que constitui 11,38% da composição química da planta. Ao se tratar da análise de extrato orgânico, esse dado é muito importante, uma vez que a maior parte dos trabalhos sobre a investigação química da planta ocorre com os óleos essenciais (SOUTO *et al.*, 2002; BRÚ e GUZMAN, 2016). Mesmo

assim, a presença da substância dilapiol não é muito comum nos óleos, sendo apenas encontrada seu isômero o apiol (MORAES *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2008). Desta forma, esse é o primeiro relato da identificação do dilapiol nos extratos da folha de *P. marginatum*, assim como é também o primeiro relato da identificação dessa substância na ontogênese da planta.

As substâncias *Z* e *E*-asarona foram identificadas em todos os estágios de desenvolvimento da planta, mas a maior concentração foi observada nas folhas adultas com 40,67 e 24,43%, respectivamente. Para a substância *E*-asarona os maiores percentuais foram encontrados na plântula com 6 meses e nas folhas com 15 meses (27,97 e 25,33%) sendo este último ainda maior quando comparado com a folha adulta para a mesma substância. Tanto a substância *Z*-asarona quanto a *E*-asarona já são bem descritas na literatura como compostos majoritários nas folhas de *P. marginatum* (BRÚ e GUZMAN, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2016), mas nenhum trabalho relatou a identificação dessas nos extratos de diferentes estágios de desenvolvimento da planta, o que torna nosso trabalho fundamental no auxílio do desenvolvimento de pesquisas futuras.

Através das análises dos dados obtidos por CG-EM e CLAE-UV foi possível a identificação dos metabólitos encontrados nos extratos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. marginatum* (Tabela 9).

Tabela 9: Metabólitos secundários detectados nos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de *P. marginatum*.

Metabólitos	Tempo de Retenção* (min)	UV λ_{max} **(nm)	Íons fragmentos observados EM (m/z)
α -pineno	6,73	--	136 [M-1] 121, 93
<i>p</i> -cimeno	8,18	--	134 [M-1] 119, 90
Limoneno	8,33	--	136 [M-1] 68, 120, 92
<i>Z</i> -asarona	32,25	220, 256	208 [M-1] 193, 178, 150
<i>E</i> -asarona	32,67		
Dilapiol	32,31	228, 284	222 [M-1] 176, 206

*Tempo de retenção obtido pelo CG, **Uv-vís obtido pela CLAE, -- não detectado.

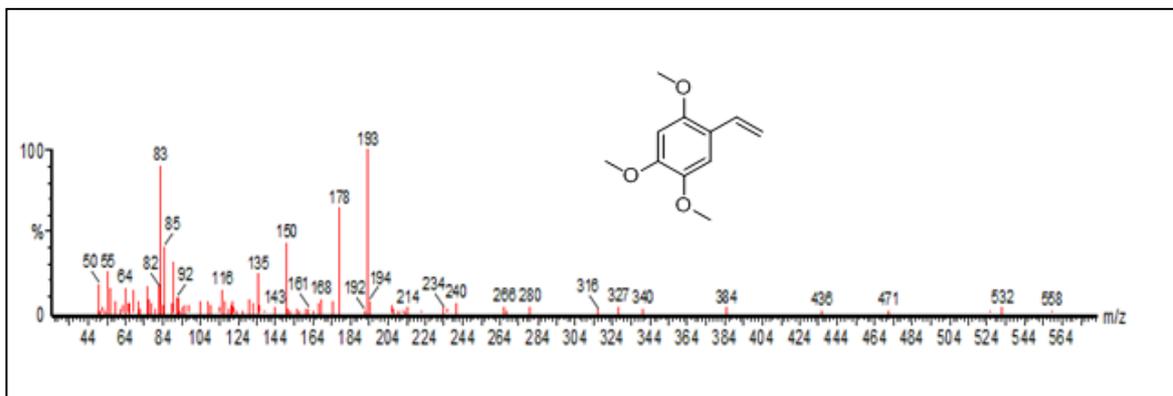
3.4.2 Identificação das substâncias encontradas nos extratos das folhas de espécies da família Piperaceae durante ontogênese

3.4.2.1 Identificação do 2,4,5-trimetoxi-estireno

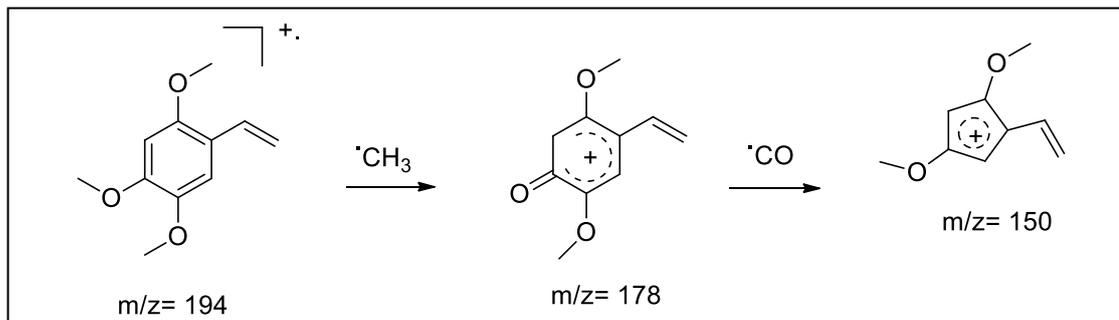
No espectro de massas da substância 2,4,5-trimetoxi-estireno foi observado a presença do pico base em $m/z = 194$ Da, correspondente a massa molecular $[M-1] = C_{11}H_{14}O_3$ (Figura 33). E os fragmentos em m/z 178 Da, associado a perda de uma metila de uma das metoxilas e o íon fragmento em m/z 150 Da, correspondente a eliminação do CO (ESQUEMA 1). Os dados de

massa foram comparados com a literatura no qual foi confirmado como sendo a substância 2,4,5-trimetoxi-estireno (MANALO *et al.*, 1983).

Figura 33: Espectro de massas do composto 2,4,5-trimetoxi-estireno.



Esquema 1: Proposta de fragmentação no espectro de massas do 2,4,5-trimetoxi-estireno.

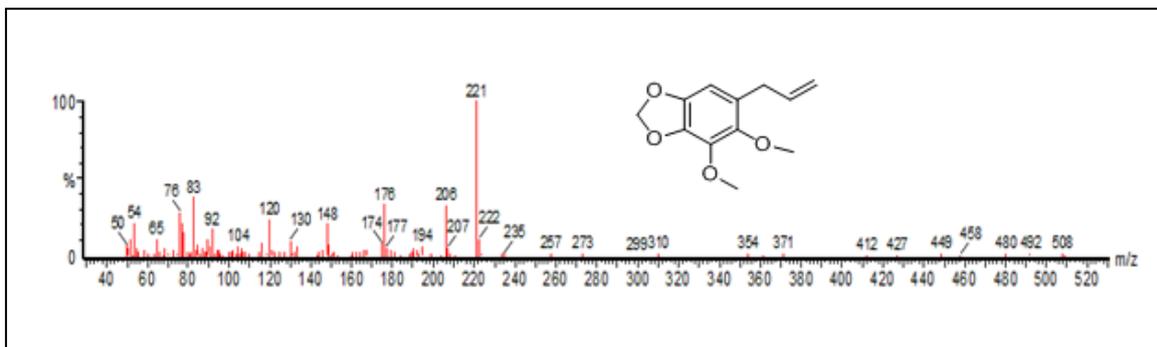


3.4.2.2 Identificação do dilapiol

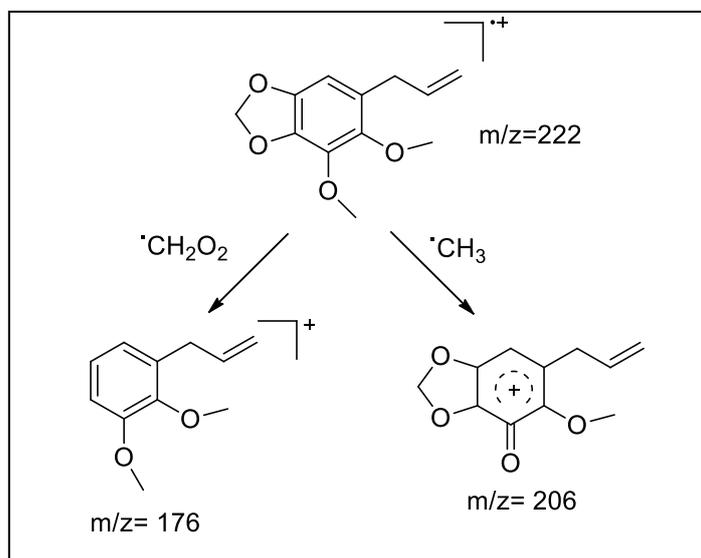
No espectro de massas da substância dilapiol observou-se a presença do pico base $m/z = 222$ Da, correspondente a com a fórmula molecular $[\text{M}-1]$ $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (FIGURA 34). E os fragmentos em $m/z = 176$ Da, proveniente da perda de grupo 1,3 dioxolano e o íon fragmento em $m/z = 206$ Da, correspondente a perda de uma metila (ESQUEMA 2). Os dados de massa

foram comparados com a literatura no qual foi confirmado como sendo a substância dilapiol (ADAMS, 2007).

Figura 34: Espectro de massa do CG-EM da substância dilapiol.



Esquema 2: Proposta de fragmentação no espectro de massas do dilapiol.

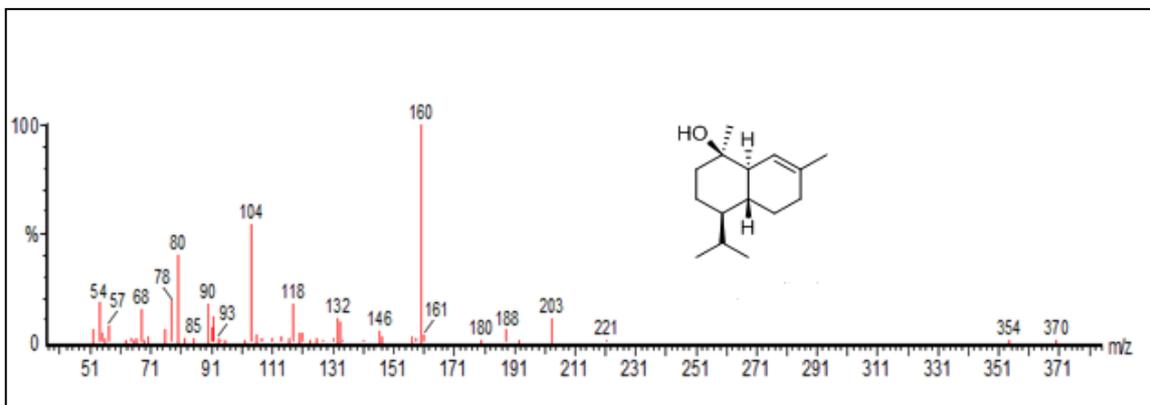


3.4.2.3 Identificação do epi- α -cadinol

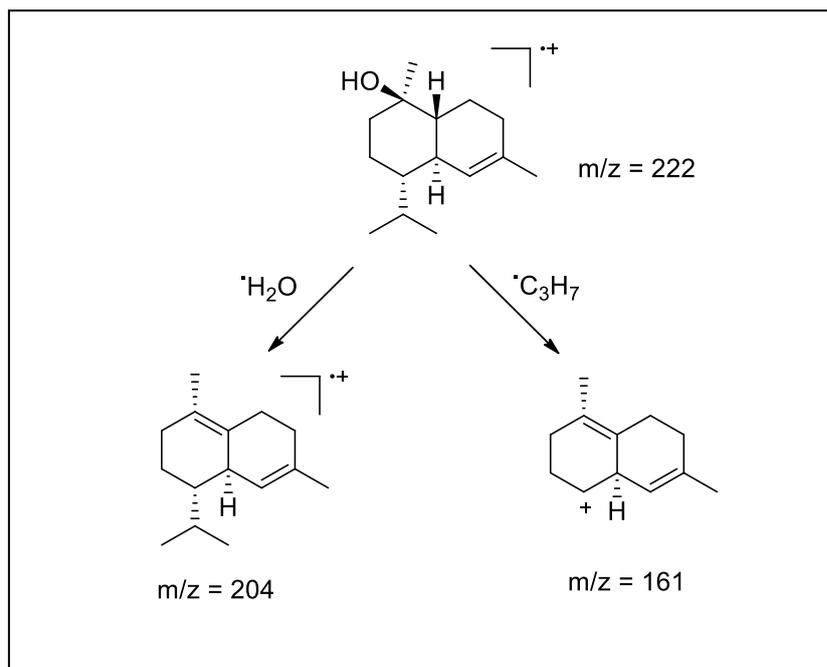
No espectro de massas da substância epi- α -cadinol observou-se a presença do pico base $m/z = 222$ Da, correspondente com a fórmula molecular $[M-1] C_{15}H_{26}O$ (FIGURA 35). E os fragmentos em $m/z = 204$ Da, proveniente da perda de uma molécula de água e o íon fragmento em $m/z = 161$ Da,

correspondente a perda do grupo propil (ESQUEMA 3). Os dados de massa foram comparados com a literatura no qual foi confirmado como sendo a substância epi- α -cadinol (ADAMS, 2007).

Figura 35: Espectro de massa do CG-EM da substância epi- α -cadinol.



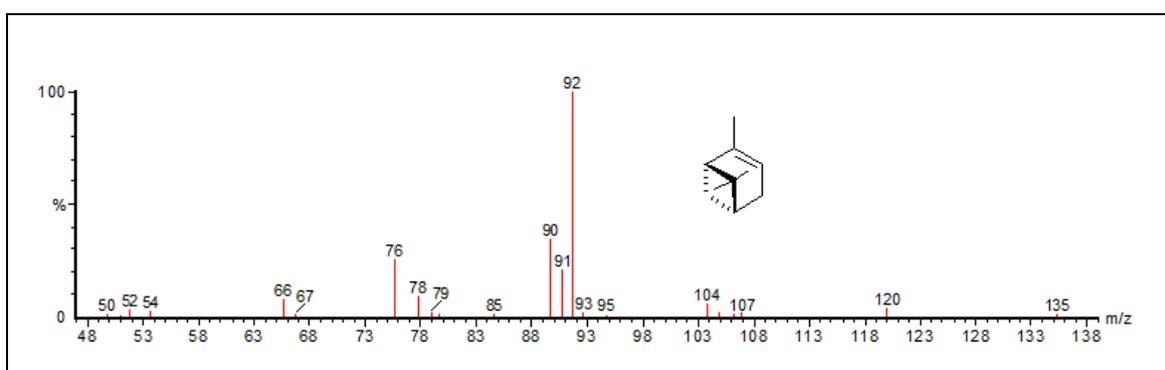
Esquema 3: Proposta de fragmentação no espectro de massas do epi- α -cadinol.



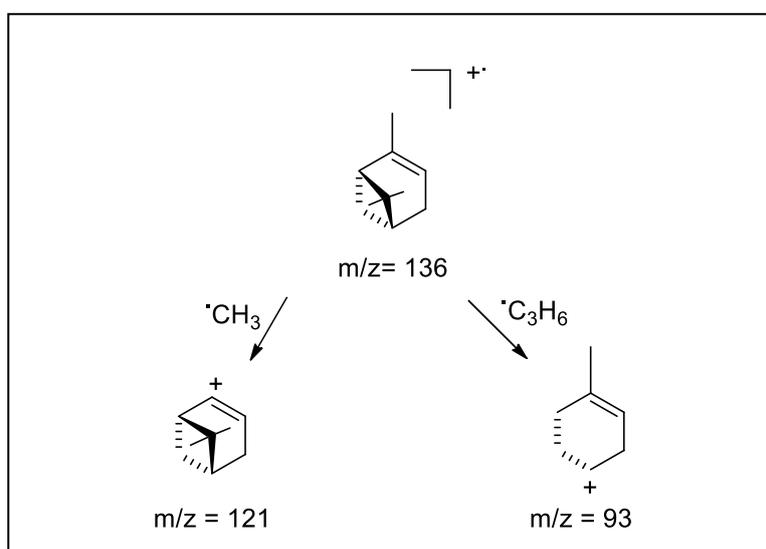
3.4.2.4 Identificação do α -pineno

No espectro de massas do α -pineno foi observado a presença do pico base em $m/z = 136$ Da, correspondente a massa molecular $[M-1] = C_{10}H_{16}$ (FIGURA 36). E o fragmento em $m/z = 121$ Da, associado a perda de uma metila na molécula e o íon fragmento em $m/z = 93$ Da, referente a perda do grupo C_3H_6 (ESQUEMA 4). Os dados de massa foram comparados com a literatura no qual foi confirmado como sendo a substância α -pineno (ADAMS, 2007).

Figura 36: Espectro de massas do composto α -pineno.



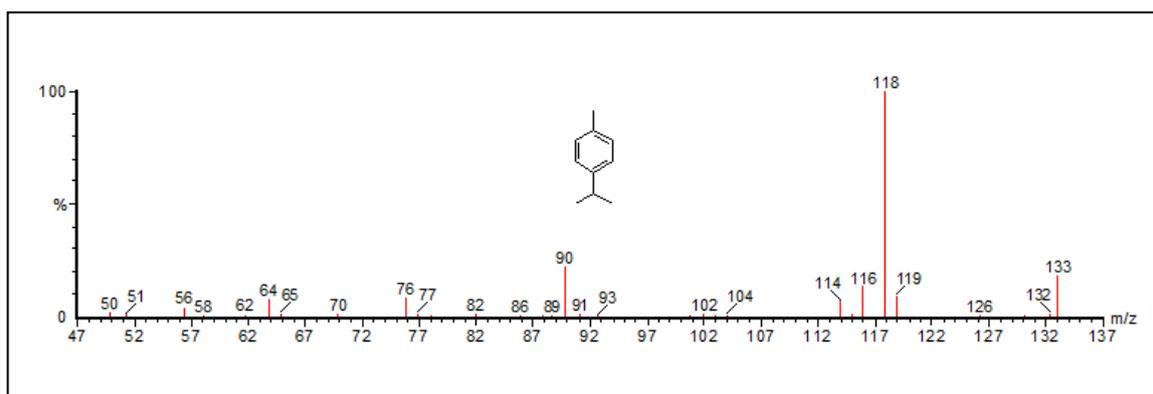
Esquema 4: Proposta de fragmentação no espectro de massas do α -pineno.



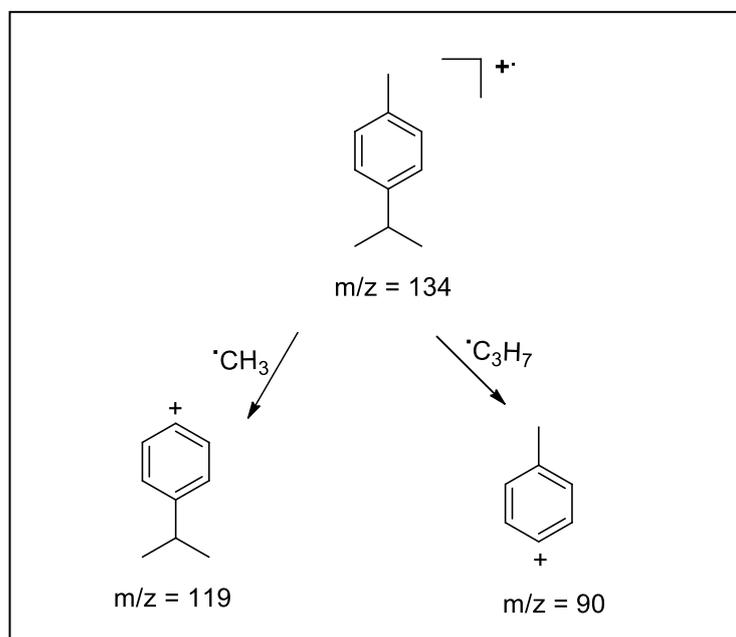
3.4.2.5 Identificação do *p*-cimeno

No espectro de massas do *p*-cimeno foi observado a presença do pico base em $m/z = 134$ Da, correspondente a massa molecular $[M-1] = C_{10}H_{14}$ (FIGURA 37). E o fragmento em $m/z = 119$ Da, associado a perda de uma metila na molécula e o íon fragmento em $m/z = 90$ Da, referente a perda do grupo C_3H_7 (ESQUEMA 5). Os dados de massa foram comparados com a literatura no qual foi confirmado como sendo a substância *p*-cimeno (ADAMS, 2007).

Figura 37: Espectro de massas do composto *p*-cimeno.



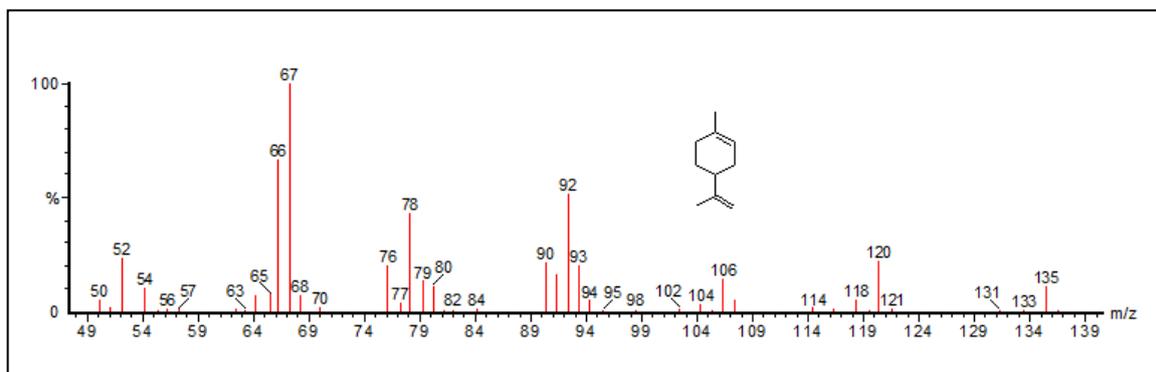
Esquema 5: Proposta de fragmentação no espectro de massas do *p*-cimeno.



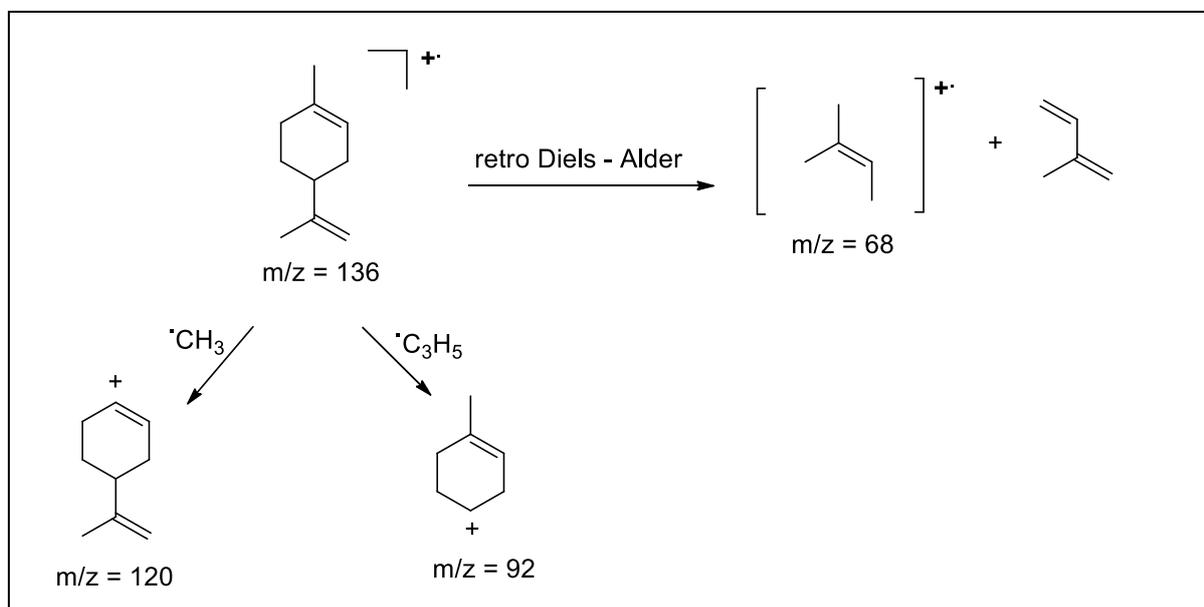
3.4.2.6 Identificação do limoneno

No espectro de massas do limoneno foi observado a presença do pico base em $m/z = 67$ Da, correspondente a massa molecular $[M-1] = C_{10}H_{16}$ (FIGURA 38). O limoneno sofre sua principal fragmentação pela reação de retro Diels-Alder e o principal sinal no EM é o íon radical a $m/z = 68$. E o fragmento em $m/z = 120$ Da, associado a perda de uma metila na molécula e o íon fragmento em $m/z = 92$ Da, referente a perda do grupo C_3H_5 (ESQUEMA 6). Os dados de massa foram comparados com a literatura no qual foi confirmado como sendo a substância limoneno (ADAMS, 2007).

Figura 38: Espectro de massas do composto limoneno.



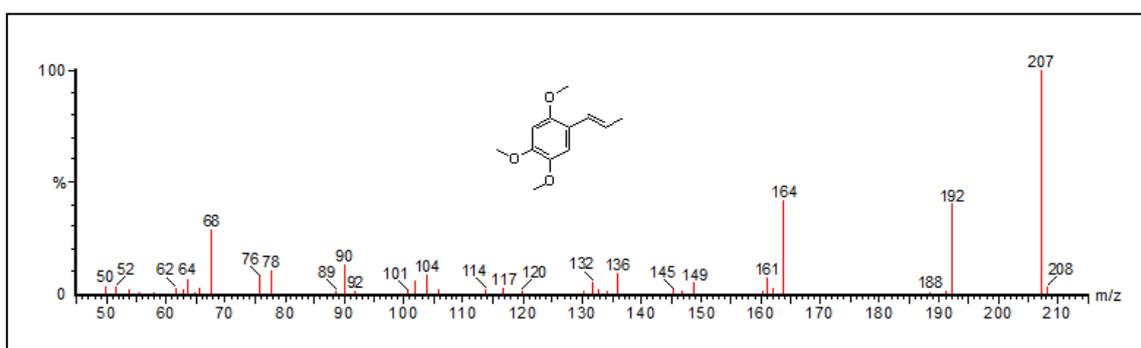
Esquema 6: Proposta de fragmentação no espectro de massas do limoneno.



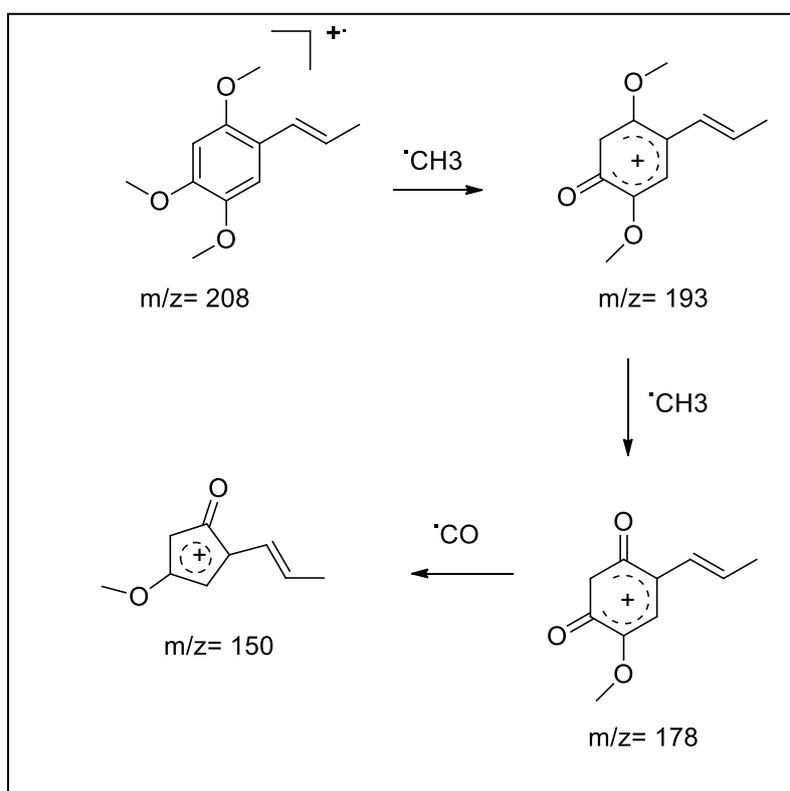
3.4.2.7 Identificação da (*E*)-asarona

No espectro de massas da *E*-asarona foi observado a presença do pico base em $m/z = 208$ Da, correspondente a massa molecular $[M-1] = C_{12}H_{16}O_3$ (FIGURA 39). E o fragmento em $m/z = 193$ Da, associado a perda de uma metila de uma das metoxilas, o íon fragmento em $m/z = 150$ Da, correspondente a eliminação do CO (ESQUEMA 7). O espectro de massa foi comparado com a literatura e identificado como a *E*-asarona (ADAMS, 2007).

Figura 39: Espectro de massas do composto *E*-asarona.

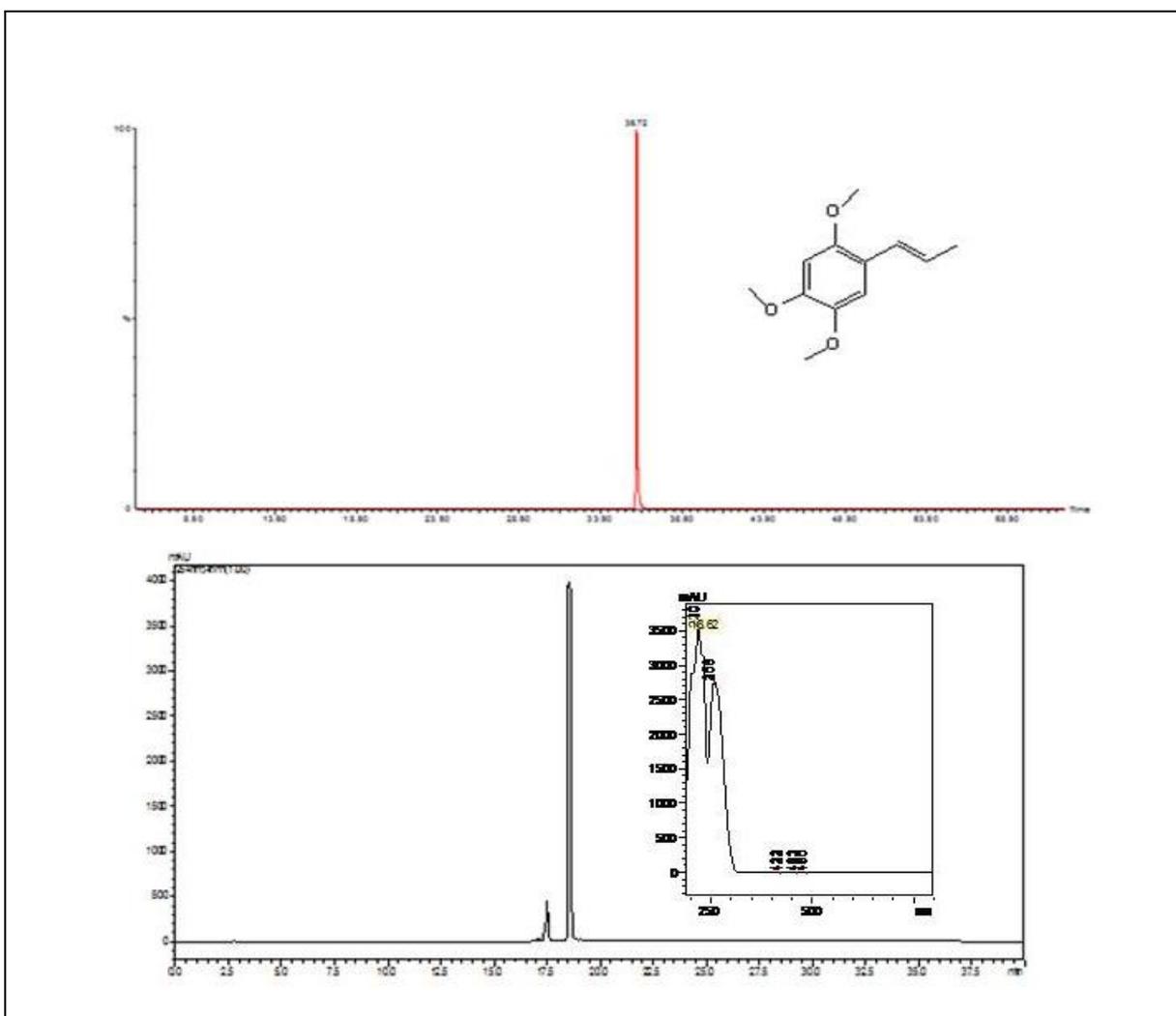


Esquema 7: Proposta de fragmentação no espectro de massas da *E*-asarona.



A partir da purificação das frações obtidas do extrato clorofórmico das folhas de *P. marginatum* também foram isoladas e identificadas às substâncias asarona e dilapiol, sendo confirmadas através das análises de CG-EM e CLAE (Figura 40).

Figura 40: Perfil cromatográfico (CG-EM e CLAE) da substância asarona.



3.5 Atividade Antimicrobiana das Folhas de Plântulas e Folhas Adultas de *P. marginatum*

Os extratos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. marginatum* foram submetidos a ensaios antimicrobianos com 7 microrganismos pelo

método de microdiluição (CMI). A tabela 10 exhibe as concentrações mínimas inibitórias dos espécimes para cada microrganismo testado.

Tabela 10: Concentração Mínima Inibitória – CMI dos extratos das folhas das plântulas e das folhas adultas de *P. marginatum*.

CMI das folhas de <i>P. marginatum</i> (µg/mL)											
Microrganismos	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses	7 meses	8 meses	9 meses	12 meses	15 meses	Adulta	*Padrão
<i>S. aureus</i> (02)	1250	1250	1250	625	625	1250	2500	2500	1250	1250	19,5
<i>P. aeruginosa</i> (416)	1250	1250	1250	625	625	1250	1250	1250	1250	1250	19,5
<i>K. pneumoniae</i> (396)	1250	1250	1250	625	625	1250	2500	1250	1250	1250	19,5
<i>E. faecalis</i> (138)	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	156,2
<i>C. albicans</i> (1007)	625	2500	625	625	625	2500	625	2500	2500	2500	>2500
<i>Penicillium</i> (2556)	1250	1250	156,2	625	312,5	1250	>2500	2500	2500	2500	19,5
<i>M. furfur</i> (1320)	625	625	625	625	156,2	78,1	156,2	78,1	78,1	78,1	19,5

*Padrão utilizado para bactérias: Metronidazol. Padrão utilizado para fungos: Cetoconazol.

Todos os extratos de *P. marginatum* testados apresentaram potencial antimicrobiano. Os menores valores de CMI (625 µg/mL) foram obtidos frente às bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* nas folhas das plântulas com 6 e 7 meses de idade. Um dado significativo, uma vez que *K. pneumoniae* é considerada uma bactéria gram-negativa resistente a antibióticos (SEIBERT *et al.*, 2014). Para as demais folhas com diferentes idades (3,4,5, 8 meses e folhas adultas) foi observado que inibiram esses patógenos com a mesma concentração de 1250 µg/mL, assim como, frente a bactéria *E. faecalis* que mantiveram a mesma concentração de 1250 µg/mL.

Ao ser testado frente aos fungos, as folhas das plântulas e folhas adultas também exibiram potencial antimicrobiano. Para o fungo *C. albicans* os menores valores de CMI (625 µg/mL) foram obtidos pelas plântulas com 3, 5, 6, 7 e 9 meses de idade, valores bem inferiores quando comparado com o obtido pelo padrão cetoconazol, que exibiu concentração mínima >2500 frente a esse patógeno. *C. albicans* é um tipo de levedura capaz de causar diversos quadros infecciosos (VIEIRA e SANTOS, 2016) e os extratos das folhas de *P. marginatum* conseguiram inibir seu crescimento e proliferação, resultando em agentes promissores para desenvolvimento de novos fármacos.

Os melhores resultados apresentados para os extratos das folhas de plântulas e folhas adultas foram obtidos frente ao fungo *M. furfur* com CMI de 625 µg/mL para as plântulas com 3, 4, 5, e 6 meses; 156,2 µg/mL para as plântulas com 7 e 9 meses e 78,1 µg/mL para as plântulas com 8, 12 e 15 meses e para a planta adulta. O *M. furfur* é um fungo lipofílico que desempenha patologias dermatológicas, incluindo foliculite, dermatite e seborréia. Essas infecções são tratadas principalmente pelo uso do cetoconazol, um derivado imidazólico (LIMA *et al.*, 2002). Em nossos resultados, o padrão obtido comercialmente, cetoconazol inibiu esse patógeno em todas as concentrações testadas (19,5 µg/mL) e os extratos das folhas de *P. marginatum* durante a ontogênese obtiveram um resultado promissor, inibindo o *M. furfu* com CMI de 78,1 µg/mL. Desta forma, os extratos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. marginatum* podem ser considerados ótimos candidatos a fármacos.

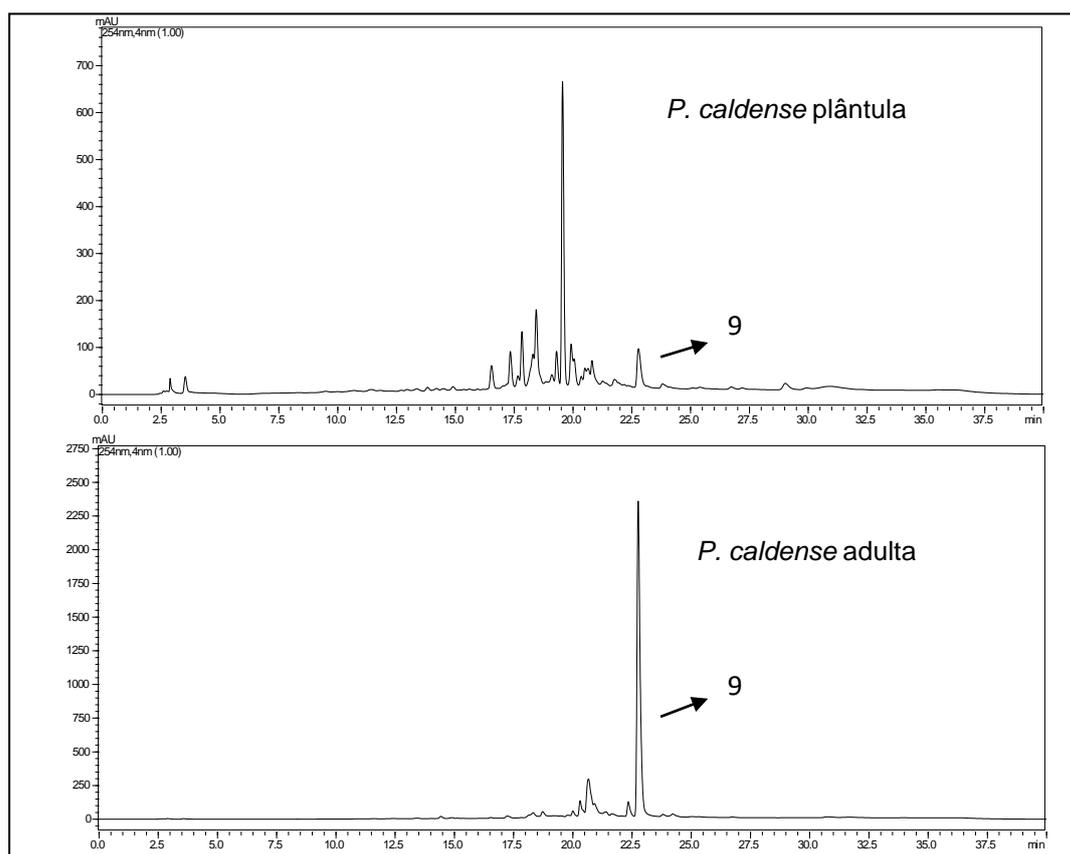
Há poucos relatos sobre a atividade antimicrobiana dos extratos de *P. marginatum* (Brú e Guzman, 2016; Pascoli *et al.*, 2018), sendo as pesquisas voltadas em maior parte para os óleos essenciais. Assim, visando ampliar o conhecimento sobre o potencial antimicrobiano dessa espécie, esse é o primeiro relato sobre a atividade antimicrobiana das folhas da *P. marginatum* durante a ontogênese, o que torna nosso trabalho bastante relevante para estudos futuros.

3.6 Análise Comparativa do Perfil Químico das Espécies de *Piper*

3.6.1 *Piper caldense*

Para análise da comparação do perfil metabólico de *P. caldense* foram coletadas folhas de plântulas e folhas adultas na mata atlântica de Dois Irmãos – Recife, PE e em seguida foi empregada a técnica de CLAE-UV (Figura 41).

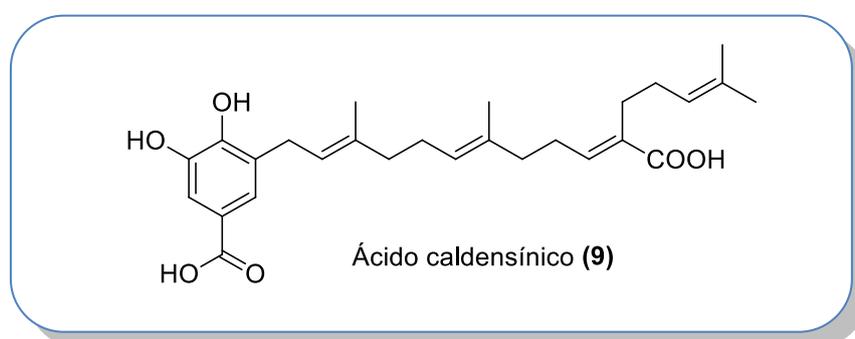
Figura 41: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. caldense*.



Através dos perfis dos cromatogramas pode-se observar uma mudança bastante significativa no perfil de metabólitos detectados na fase inicial da planta e na fase adulta, principalmente com a substância com tempo em 22,75 min que está presente tanto nas folhas da plântula quanto nas folhas adultas de *P. caldense*.

As análises por CLAE-UV indicaram que essa substância (9) se refere ao ácido caldensínico (Figura 42) (FREITAS *et al.*, 2016). Nas folhas da planta adulta ele é o composto majoritário, enquanto na fase de plântula essa substância está em menor quantidade.

Figura 42: Estrutura química do ácido caldensínico (9) identificado nos extratos brutos das folhas adultas e plântulas de *P. caldense*.



Outra mudança significativa quando se compara o perfil das folhas na fase de plântula e na fase adulta está no tempo de retenção de 19,57 min que é bastante intenso na plântula, correspondendo à substância majoritária nessa fase, e na fase adulta, a mesma substância com o mesmo tempo de retenção é encontrada em menor concentração.

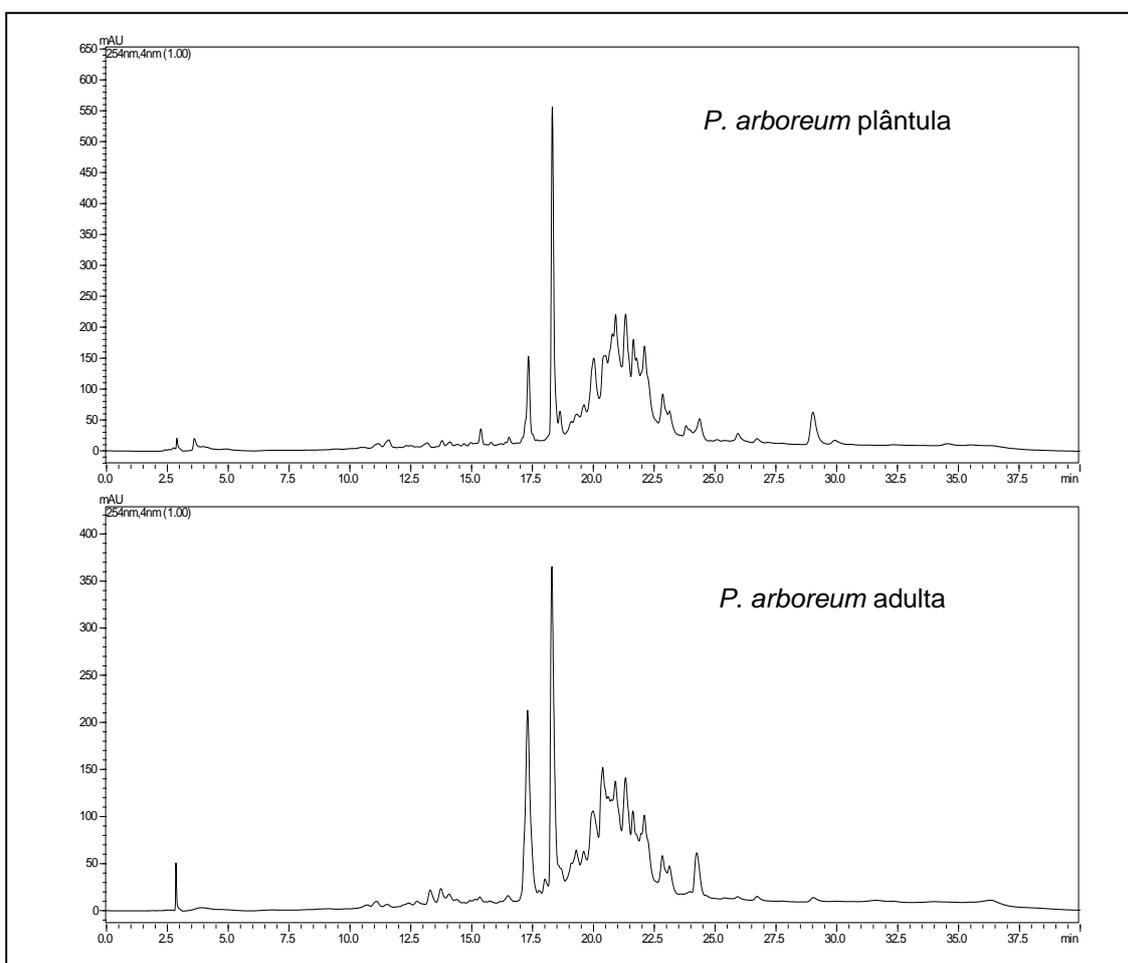
Percebe-se que na fase de plântula de *P. caldense* há uma produção mais acentuada de metabólitos secundários do que na fase adulta, o perfil químico muda consideravelmente, desde a quantidade de substâncias, a intensidade das mesmas e os compostos majoritários que muda da fase de plântula para a fase adulta, como podem ser observados no trabalho de Gaia, (2014) que realizou o estudo com a *P. caldense* durante ontogênese e percebeu que a mesma sofre variações na produção de metabólitos secundários durante seu desenvolvimento.

Mesmo não sendo possível o acompanhamento durante a ontogênese das folhas de *P. caldense*, fica evidente que há mudanças bastante consideráveis para estudos posteriores, o que pode acarretar na identificação e isolamento de novas substâncias na planta.

3.6.2 *Piper arboreum*

Para análise da comparação do perfil metabólico de *P. arboreum* foram coletadas folhas de plântulas e folhas adultas na mata atlântica de Dois Irmãos – Recife, PE e em seguida foi empregada a técnica CLAE-UV (Figura 43).

Figura 43: Perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos brutos das folhas de plântulas e folhas adultas de *P. arboreum*.



Ao ser analisado os cromatogramas da CLAE-UV pôde-se notar que as folhas das plântulas não apresentam mudanças significativas quando comparada com as folhas da planta adulta.

Nas folhas das plântulas podemos notar substâncias com tempo de retenção em 4 min e 29 min que não estão presentes nos extratos das folhas adultas, além da intensidade dos picos em 17,5 min e 18,5 min que são bem mais intensos na planta adulta. O que nos sugere que o perfil químico das folhas de *P. arboreum* não variam muito quando se faz a comparação entre a plântula e a folha adulta.

Mas, mediante a má resolução dos cromatogramas obtidos e da presença das substâncias com tempos de retenção distintos, se faz necessário a repetição das análises, em busca de elucidar quais são as substâncias responsáveis pela distinção entre folhas de plântula e folhas adultas de *P. arboreum*.

4. CONCLUSÃO

Baseado nos perfis químicos dos extratos foi possível observar que há diferenças significativas na produção de metabólitos secundários durante a ontogênese de espécies da família Piperaceae.

✓ As folhas de *P. pellucida* produzem a substância dilapiol durante toda ontogênese da planta. Enquanto as substâncias *epi*- α -cadinol e 2,4,5-trimetoxi-estireno só podem ser encontradas na fase de plântulas dessa espécie. O dilapiol também é encontrado nas raízes de *P. pellucida*.

✓ O estudo do potencial antimicrobiano de *P. pellucida* revelou um dado importantíssimo sobre a planta que é amplamente usada na medicina popular: que a folha da planta jovem com 3 meses de idade possui a maior atividade frente aos microorganismos testados, enquanto, a folha da planta adulta apresenta fraca atividade frente a esses patógenos, mas uma fonte potente contra o fungo *E. floccosum* com CMI de 39,0 $\mu\text{g/mL}$. A folha da planta com 3 meses de idade e o caule da planta adulta podem ser considerados os mais indicados para uso no tratamento de infecções.

✓ Os extratos das folhas de *P. marginatum* apresentaram variações na produção de metabólitos secundários durante ontogênese. A substância dilapiol só é produzida durante o 6º mês de idade da planta. As substâncias Z e E-asarona estão presentes em todos os estágios de desenvolvimento da planta, mudando apenas a concentração. Sendo a Z-asarona o composto majoritário das folhas de *P. marginatum*.

✓ O estudo do potencial antimicrobiano de *P. marginatum* revelou que as plântulas com 6 e 7 meses de idade apresentam melhores resultados frente as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Enquanto para os fungos *C. albicans* e *Penicillium* foi verificado que as plântulas exibem melhores resultados quando comparado com a fase adulta. Já para o fungo *M. furfu* o potencial antifúngico aumenta durante a ontogênese da planta.

- ✓ Há pequena diferença no perfil químico das folhas da plântula e folhas adultas de *P. arboreum*, com o aparecimento de duas substâncias na plântula que não são encontradas nas folhas adultas.

- ✓ O perfil químico das folhas da plântula e planta adulta de *P. caldense* sofre variação. Há maior produção de substâncias na fase de plântula do que na fase adulta. O composto ácido caldensínico é majoritário nas folhas adultas.

6. REFERÊNCIAS

ABU, N.; MOHAMED, N. E.; YEAP, S. K.; LIM, K. I.; AKHTAR, M. N.; ZULFADLI, A. J.; KEE, B. B.; ABDULLAH, M. P.; OMAR, A. R.; ALITHEEN, N. B. In vivo antitumor and antimetastatic effects of flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, 1401-1417, 2015.

ADAMS, R. P. **In identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois, 2007.

ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M.; SILVA, M. H. L.; SILVA, J. D.; BASTOS, C. N.; SOUSA, P. J. C.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Variability in Essential-Oil Composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 5, 2008.

AQUIL, M.; KHAN, I.Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Scientist of Physical Science**, v.5, 213-215, 1993.

ARAÚJO, E. R.; HARAND, W.; LIMA, I. C.; DIAS, F. C. R.; SANTANA, A. A. D.; CARVALHO, R. R. C. C.; LARANJEIRA, D. Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.2, 88-94, 2014.

ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; CHAVES, M. C. O.; CUNHA, E. V. L., GRAY, A. I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, 325-327, 1999.

ARRIGO, J. S.; BALEN, E.; LANZA JUNIOR, U.; MOTA, J. S.; IWAMOTO, R. D.; BARISON, A.; SUGIZAKI, M. M.; KASSUYA, C. A. L. Antinociceptive, antihyperalgesic and antiarthritic activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 2015.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; DMITRIEVA, E. G.; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflammatory and

analgesic activity of *Peperomia pellucid* (L.) H.B.K. (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, 215-218, 2004.

ASSIS, C. P. O.; GONDIM JR., M. G. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; CÂMARA, C. A. G. Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). **Journal of Stored Products Research**, v.47, 311-315, 2011.

ATIYA, A.; SINHA, B. N.; LAL, U. R. New chemical constituents from the *Piper betle* Linn. (Piperaceae). **Natural Product Research**, v.32, n. 9, 1080-1087, 2018.

BAO, N.; OCHIR, S.; SUN, Z.; BORJIHAN, G.; YAMAGISHI, T. Occurrence of Piperidine alkaloids in *Piper* species collected in different areas. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, 211-214, 2014.

BAPELA, M. J.; LALL, N.; ISAZA-MARTINEZ, J. H.; REGNIER, T.; MEYER, J. J. M. Variation in the content of naphthoquinones in seeds and seedlings of *Euclea natalensis*. **South African Journal of Botany**, v.73, 606-610, 2007.

BARTON, K. E. Phenotypic plasticity in seedling defense strategies: compensatory growth and chemical induction. **Oikos**, v.117, 917-925, 2008.

BUHIAN, S. P.; OYONG, G.; CABRERA, E. Cytotoxicity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK Extracts on Cancer Cell Lines and Their Effects on *cfos* and *cjun* Genes, **Philippine Agricultural Scientist**, v.102, 27-35, 2019.

BURCI, L. M.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; RODRIGUES, R. V.; FACUNDO, V. A.; MILITÃO, J. S. L. T.; SANTOS, A. R. S.; MARQUES, M. C. A.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P. Antiulcer and gastric antisecretory effects of dichloromethane fraction and piplartine obtained from fruits of *Piper tuberculatum* Jacq. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n.1, 165-174, 2013.

BOEGE, K.; MARQUIS, R. J. Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, 441-448, 2005.

BRÚ, J. e GUZMAN, J. D. Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, 767-779, 2016.

CARDOZO JÚNIOR, E. L. e CHAVES, M. C. O. Caldensin, A New Natural N-Methylaristolactam from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n. 3, 216-218, 2003.

CARRARA, V. S.; VIEIRA, S.C.H.; DE PAULA, R.G.; RODRIGUES, V.; MAGALHÃES, L.G.; CORTEZ, D.A.G.; DA SILVA FILHO, A. A. In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of *Piper* species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of Helminthology**, v.88, 321-326, 2014.

CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. (Eds.), 2002. Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal. Eduem, Maringá.

CHAVES, M. C. O.; SANTOS, B. V. O. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**, v. 73, 547-549, 2002.

CHAVES, M.C.O., OLIVEIRA, A.H., SANTOS, B.V.O. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, 75-77, 2006.

CORDOVA, S. M.; BENFATTI, C. S.; MAGINA, M. D. A.; GUEDES, A.; CORDOVA, C. M. M. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente à *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n.4, 241-244, 2010.

COSTA, J. G. M.; SANTOS, P. F.; BRITO, S. A.; RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; LIMA, S. G. Composicao Quimica e Toxicidade de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Frente a Larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.29, n.3, 463-467, 2010.

DANELUTTE, A. P.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J. Lignoids in seedlings of *Virola sebifera*. **Phytochemistry Analysis**, v.11, 383-386, 2000.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R.; **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**, CRC Press: Florida, 1994.

DUARTE, M. S.; PONTES, M. J. C.; RAMOS, C. S. Differentiation of the Chemical Profile of *Piper arboreum* Tissues Using NIR Spectrometry and Principal Component Analysis. **Journal of Applied Spectroscopy**, v.82, n.6, 2016.

DUARTE, M. C. T., FIGUEIRA, G. M., PEREIRA, B., MAGALHÃES, P. M.; DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,v.14, n.1, 6-8, 2004.

D'ANGELO, L. C. A.; XAVIER, H. S.;TORRES, L. M. B.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, anti-inflammatory and hemostatic. **Phytomedicine**, v. 4, 33-40, 1997.

ESTRELA, E. **Plantas Medicinales Amazonicas: Realidad y Perspectivas**. Quito: Programa de Las Nacionales Unidas para el Desarrollo (PNVD), 1994. p. 265.

FELIPPE, L. G., BALDOQUI, D. C., KATO, M. J., BOLZANI, V. DA S., GUIMARÃES, E. F., CICALLELLI, R. M. B., FURLAN, M. Trypanocidal

tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, 69(2), 445–450, 2008.

FLORENCE, N. T.; HUGUETTE, S. T. S.; HUBERT, D. J.; RACELINE, G. K.; DESIRE, D. D. P.; PIERRE, K.; THEOPHILE, D. Aqueous extract of *Peperomia pellucida* (L.) HBK accelerates fracture healing in Wistar rats. **BioMed Central: Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, 188, 2017.

FONSECA, F. N.; FERREIRA, A. J. S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N. P.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; KATO, M. J. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v.55, 575-580, 2000.

FREITAS, L. A. B.; AQUINO, F. S.; ARAÚJO, J. M.; RAMOS, C. S. Chemical Profiles and Antimicrobial Activity of *Piper caldense* Tissues. **Annals of Chromatography and Separation Techniques**, v. 2, n. 3, 1026, 2016.

FREITAS, G. C.; KITAMURA, R. O. S.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; GUIMARÃES, E. F. G.; KATO, M. J. Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, 119–122, 2009.

FRANÇOIS, T.; MICHEL, J. D. P.; VYRY, W. N. A.; FABRICE, F. B.; LAMBERT, S. M.; HENRI, A. Z. P.; CHANTAL, M. Composition and antifungal properties of essential oils from five plants growing in the mountainous area of the west Cameroon. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.16, p.679-688, 2013.

GAIA, A. M.; YAMAGUCHI, L. F.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Age-dependent changes from allylphenol to prenylated benzoic acid production in *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Phytochemistry**, v.106, 86-93, 2014.

GAMBOA, F.; MUÑOZ, C. C.; NUMPAQUE, G.; SEQUEDA-CASTAÑEDA, L. G.; GUTIERREZ, S. J.; TELLEZ, N. Antimicrobial Activity of

Piper marginatum Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. **International Journal of Microbiology**, 2018.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal**, v.2, n.3,119-145, 2009.

GATSUK, L. E., SMIRNOVA, O. V., VORONTZOVA, L. V., ZAUGOLNOVA, L. B.; ZHUKOVA, L. A. Age states of plants of various growth forms: a review. **Journal of Ecology**,v. 68, 675-696,1980.

GOBBO-NETO, L. e LOPES, N. P. Plantas Medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

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, n. 2, 405-417, 2012.

GOODGER, J. Q. D.; HESKES, A. M.; WOODROW, I. E. Contrasting ontogenetic trajectories for phenolic and terpenoid defences in *Eucalyptus froggattii*. **Annals Botany**, v.112, 651-659, 2013.

GONÇALVES, R.; AYRES, V. F. S.; MAGALHÃES, L. G.; CROTTI, A. E. M.; CORRÊA, G. M.; GUIMARÃES, A. C.; TAKEARA, R. Chemical Composition and Schistosomicidal Activity of Essential Oils of Two Piper Species from the Amazon Region. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 22:3, p. 811-820, 2019.

GUTIERREZ, Y. V.; YAMAGUCHI, L. F.; MORAES, M. M.; JEFFREY, C. S.; KATO, M. J. Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v.15, 1009-1033, 2016.

GUIMARÃES, E. F. e SILVA, M. C. **Piperaceae**. Parte integrante da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, v. 7, 263-320, 2012.

GUIMARÃES, E. F., GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v.55, n.84, 21-46, 2004.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, n.3, 569-589, 2006.

IDRIS, O. O.; OLATUNJI, B. P.; MADUFOR, P. *In vitro* Antibacterial Activity of the Extracts of *Peperomia pellucida* (L). **British Microbiology Research Journal**, v. 11(4), p.1-7, 2016.

IGWE, O. U.; MGBEMENA, N. M-A. Chemical Investigation and Antibacterial Activity of the Leaves of *Peperomia pellucida* L. HBK (Piperaceae). **Asian Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2(1), p. 78-86, 2014.

JEON, H-J.; KIM, K.; KIM, Y-D.; LEE, S-U. Naturally occurring Piper plant amides potential in agricultural and pharmaceutical industries: perspectives of piperine and piperlongumine. **Applied Biological Chemistry**, 62:63, 2019.

KALITA, G. J.; ROUT, S.; MISHRA, R. K.; SARMA, P. Traditionally used medicinal plants of bajali subdivision, barpeta district, Assam. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v.3, 8-17, 2015.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v.79, 529-538, 2007.

KAUL, R. B. The role of the multiple epidermis in foliar succulence of *Peperomia* (Piperaceae). **Botanical Gazette**, v.138, 213-218, 1977.

KHAM, A.; RAHMAN, M.; ISLAM, M. S. Isolation and Bioactivity of a Xanthone Glycoside from *Peperomia pellucida*. **Life Sciences and Medicine Research**, 2010.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v.5, n. 3, 537, 2010.

KOCH M.; KEHOP, D. A.; KINMINJA, B.; SABAK, M.; WAVIMBUKIE, G. BARROWS, K. M.; MATAINAHO, T. K.; BARROWS, L. R.; RAI, P. P. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the East Sepik province of Papua New Guinea. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 11, 79, 2015.

LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. D.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; GUIMARAES, E. F.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67 1783–1788, 2004.

LI, N.; WU, J-L.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J-I.; BAI, L-M.; WANG, L-Y.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive Lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal Natural Product**, v. 70, p. 544-548, 2007.

LIMA, E. O.; BELÉM, L. F.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; NUNES, R. J.; ANDRICOPULO, A.; SILVA, V. E. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, 2002.

MACHADO, N. S. O. **Estudo da anatomia foliar de espécies do gênero *Piper* L. (Piperaceae) no estado do Rio de Janeiro**. Tese de

Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 103p. 2007.

MAJUMDER, P. Evaluation of pharmacognostic, phytochemical profile along with quantitative physicochemical standards on the root of the medicinal herb *Peperomia pellucida* (L.) HBK. **Journal of pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.10, p.1-4, 2011.

MANALO, J. B.; HAN, B. H.; HAN, Y. N.; PARK, M. H.; ANZALDO, F. E. Studies on ether-soluble neutral compounds of *Peperomia pellucida*. **Archives of Pharmacal Research**, v.6, 133-136, 1983.

MARTINS, R. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 667-670, 2013.

MARTINS, R. C. C.; LATORRE, L. R.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v.55, 843–846. 2000.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids. III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v.34,1389-1397, 1978.

MORAES, M. M.; SILVA, T. M. G.; SILVA, R. R.; RAMOS, C. S.; CAMARA, C. A. G. Cicardian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromatáticas**, v.13, n.3, 270-277, 2014.

MBAH JA, NGEMENYA MN, ABAWAH AL *et al.* Bioassayguided discovery of antibacterial agents: in vitro screening of *Peperomia vulcanica*, *Peperomia fernandopoioana* and *Scleria striatinux*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 11:10, 2012.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM NETO, P. J.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 1, 121-125, 2011.

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

MOHAMAD, H.; ANDRIANI, Y.; BAKAR, K.; SIANG, C. C.; SYAMSUMIR, D. F.; ALIAS, A.; RADZI, S. A. M. Effect of drying method on anti-microbial, anti-oxidant activities and isolation of bioactive compounds from *Peperomia pellucida* (L) Hbk. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 2015, 7(8):578-584.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F.; Flora do Parque Nacional de Itatiaia – Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). **Rodriguésia**, 161-195, 2008.

MOTA, J. S.; LEITE, A. C.; BATISTA, J. M.; LOPEZ, S. N.; AMBROSIO, D. L.; PASSERINI, G. D.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. *In vitro* trypanocidal activity of phenolic derivatives from *Peperomia obtusifolia*. **Planta Medica**, v.75, n. 6, 620-623, 2009.

MUNOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; ARRAZOLA, S.; CALLAPA, J.; RUIZ, G.; CHOQUE, J.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach – Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alenos Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, 123-131, 2000.

NADIAH ABU, N.; MOHAMED, N. E.; YEAP, S. K.; LIM, K. L.; AKHTAR, M. N.; ZULFADLI, A. J.; KEE, B. B.; ABDULLAH, M. P.; OMAR, A. R.;

ALITHEEN, N. B. In vivo antitumor and antimetastatic effects of flavokawain B in 4T1 breast cancer cell-challenged mice. **Drug Design, Development and Therapy**, 9, 2015.

NARAYANAMOORTHY, V.; VASANTHA, K.; RENCY, R. C.; MARUTHASALAM, A. GC MS determination of bioactive components of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth. **Bioscience Discovery**, v. 6(2), 83-88, 2015.

NAVARRO, L. B. **Variabilidade de fenilpropanóides, lignanas tetraindrofurânicas e aristolactamas em *Piper salmsianum* C.D.C.** Dissertação. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

NASCIMENTO, S. A.; ARAÚJO, E. A.; DA SILVA, J. M.; RAMOS, C. S. Chemical Study and Antimicrobial Activities of *Piper arboreum* (PIPERACEAE). **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.60, n.1, 2015.

NASCIMENTO, J. C.; PAULA, V. F.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Occurrence, biological activities and ¹³C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, n.11, p. 2288-2311, 2012.

NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, 467-470, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, 311-335, 2012.

NOVAES, A. S.; MOTA, J. S.; BARISON, A.; VEBER, C. L.; NEGRÃO, F. J.; KASSUYA, C. A. L.; BARROS, M. E. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piperamalago* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v. 21, 523–528, 2014.

OJO, O. O.; AJAYI, S. S.; OWOLABI, L. O. Phytochemical screening, anti-nutrient composition, proximate analyses and the antimicrobial activities of the aqueous and organic extracts of bark of *Rauvolfia vomitoria* and leaves of *Peperomia pellucida*. **International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, vol. 2(6), pp. 127-134, 2012.

OKOH, S. O.; IWERIEBOR, B. C.; OKOH, O. O.; OKOH, A. I. Bioactive Constituents, Radical Scavenging, and Antibacterial Properties of the Leaves and Stem Essential Oils from *Peperomia pellucida* (L.) Kunth. **Pharmacognosy Magazine**, 13:S392-400, 2017.

PARMAR, V.; JAIN, S. C.; BISHT, K.S., JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M., Phytochemistry of the Genus Piper. **Phytochemistry**, v.46, 597-673; 1997.

PASCOLI, I. C.; ANJOS, M. M.; SILVA, A. A.; LORENZETTI, F. B.; CORTEZ, D. A. G.; MIKCHA, J. M. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; ABREU FILHO, B. A. Piperaceae extracts for controlling *Alicyclobacillus acidoterrestris* growth in commercial orange juice. **Industrial Crops & Products**, v.116, 224-230. 2018.

PEREIRA, R.; GUEDES, A.; DA SILVA, G. E. O extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Piper caldense* C. DC. na redução do consumo de álcool em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1,157-163, 2015.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, v.5, 439-445, 2000.

RAGASA, C. Y.; DUMATO, M.; RIDEOUT, J. A. Antifungal compounds from *Peperomia pellucida*. **ACGC Chemical Research Communications**, v.7, 54-61, 1998.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolism of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. **Phytochemistry**, v.69, 2157–2161, 2008.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Sequestration of prenylated benzoic acid and chromenes by *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae) feeding on *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Chemoecology**, v.19: 73–80, 2009.

RAMOS, C.; KATO, J. M. Secondary metabolites from the phloem of *Piper solmsianum* (Piperaceae) in the Honeydew of *Edessa meditabunda*. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 604-606, 2012.

RAMOS, C. S.; KATO, J. M. Hydrolysis of Methyl Benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* Beetle. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, 560-563, 2009.

RAMOS, L. S.; DA SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S.; Essential oil of *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, v.49, 712-713, 1986.

RAGHAVENDRA, H. L. e PRASHITH, K. T. R. Ethnobotanical uses, phytochemistry and pharmacological activities of *peperomia pellucida* (L.) Kunth (piperaceae) - a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, 2018.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; SIQUEIRA, J. R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J. Radical Scavenging Capacity of *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.6 900-903, 2008.

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

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

RESSEL, K.; FREDERICO, A. G. G.; SCHIAVINI, I.; OLIVEIRA, P. E. Ecologia morfofuncional de plântulas de espécies arbóreas da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. **Revista Brasil. Botânica**, v.27, n.2, p.311-323, 2004.

RIBEIRO, N.; CÂMARA, C.; RAMOS, C. Toxicity os essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 76, 2016.

ROCHA, D. S.; SILVA, J. M.; NAVARRO, D. M. A. F.; CAMARA, C. A. G.; LIRA, C. S.; RAMOS, C. S. Potential Antimicrobial and Chemical Composition of Essential Oils from *Piper caldense* Tissues. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v.60, n.3, 148-151, 2016.

RUSSELL, M. e SOUTHWELL, I. Monoterpenoid accumulation in *Melaleuca alternifolia* seedlings. **Pytochemistry**, v.59, 709-716, 2002.

SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**, 66, 573–579, 2005.

SALAZAR, K. J. M.; LAGO, J. H. G.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Meroterpenes from *Peperomia oreophila* Hensch. and *Peperomia arifolia* Miq. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, 782-785, 2012.

SALLEH, W. M. N. H.W.; AHMAD, F.; YEN, K. H. Chemical constituents from *Piper caninum* and antibacterial activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n.6, 020-025, 2015.

SALES, V. S. *et al.*, Antiparasitic Activity and Essential Oil Chemical Analysis of the Piper Tuberculatum Jacq Fruit. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.17, n.1, 268-275, 2018.

SAMAIN, M. S.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; RODRÍGUEZ, F. J.; STOLL, A.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. Verhuellia is a segregate lineage in *Piperaceae*: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany** 105, 677–688; 2010.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. D.; GUIMARAES, E. F.; KAPLAN, M. A. C.; Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v.58, p.547-551, 2001.

SEIBERT, G.; HÖRNER, R.; MENEGHETTI, B. H.; RIGHI, R. A.; FORNO, N. L. F. D.; SALLA, A. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Journal Einstein**, v. 12(3), 282-286, 2014.

SILVA, R. A. **Análise metabolômica e atividades biológicas de Piper reticulatum L.** Dissertação. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 150; 2011.

SINGBURAUDOM, N. Hydroxychavicol from Piper betel leave is an antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Journal of Biopesticides**, v.8, n.2, 82-92, 2015.

SINGH, I. P.; CHOUDHARY, A. Piperine and Derivatives: Trends in Structure. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n.17, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SMITH, J. F.; STEVENS, A. C.; TEPE, E. J.; DAVIDSON, C. Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of Piper and Peperomia (Piperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, 9-30, 2008.

SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Insecticidal Activity of Piper Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.41, 510–517, 2012.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa. 640p. 2005.

SUSILAWATI, Y.; NUGRAHA, R.; KRISHNAN, J.; MUHTADI, A.; SUTARDJO, S.; SUPRATMAN, U. A New Antidiabetic Compound 8,9-dimethoxy Ellagic Acid from Sasaladaan (*Peperomia pellucida* L. Kunth). **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, p. 269, 2017.

TAKEMORI, N. K.; BONA, C.; ALQUINI, Y. **Anatomia Comparada das Folhas de Espécies de *Peperomia* (Piperaceae) - I. Ontogênese do Tecido Aqüífero e dos Estômatos**. Acta Botanica Brasilica, v.17, n.3, 387-394, 2003.

TANGARIFE-CASTAÑO, V.; CORREA-ROYER, J. B.; ROA-LINARES, V. C.; PINO-BENITEZ, N.; BETANCUR-GALVIS, L. A.; DURÁN, D. C.; STASHENKO, E. E.; MESA-ARANGO, A. C. Anti-dermatophyte, anti-Fusarium and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n.3, 221-227, 2014.

VERMA, R. S.; PADALIA, R. C.; GOSWAMI, P.; CHAUHAN, A. Essential oil composition of *Peperomia pellucida* (L.) Kunth from India. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, 89-95, 2014.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, 390-400, 2003.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49(3), 235-239, 2017.

VOLGEMANN, A. F.; TURNER, J. C.; MAHLBERG, P. G.,. Cannabinoid composition in seedlings compared to adult plants of *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Product**, v.51, 1075-1079, 1988.

WANKE, S. M. A.; JARAMILLO, T.; BORSCH, M. S.; SAMAIN, D. S.; NEINHUIS, C. Evolution of piperales- matk gene and trnk intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.42, 477-497, 2007.

WANKE, S.; SAMAIN, M. S.; VANDERSCHAEVE, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus *Peperomia* (Piperaceae) inferred from the trnK/matK region (cpDNA). **Plant Biology**, v.8, 93-102, 2006.

WANG, Q. W.; YU, D. H.; LIN, M. G.; ZHAO, M.; ZHU, W. J.; LU, Q.; LI, G. X.; WANG, C.; YANG, Y. F.; QIN, X. M.; FANG, C.; CHEN, H. Z.; YANG, G. H. Antiangiogenic polyketides from *Peperomia dindygulensis* Miq. **Molecules**, v.17, 4474–4483, 2012.

WU, J. L.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; KAKUTA, S.; TANG, W. X.; OKA, S.; KIUCHI, M.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive Tetrahydrofuran Lignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, v.68, 1656–1660, 2005.

XU, S.; LI, N.; NING, M. M.; ZHOU, C. H.; YANG, Q. R.; WANG, M. W. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. **Journal Natural Products**, v. 69, p. 247-250, 2006.

YAMAGUCHI, L. F.; FREITAS, G. C.; YOSHIDA, N. C.; SILVA, R. A.; GAIA, A. M.; SILVA, A. M.; SCOTTI, M. T.; EMERENCIANO, V. D.; GUIMARÃES, E. F.; FLOH, E. I. S.; COLOMBO, C. A.; SIQUEIRA, W. J.; KATO, M. J. Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from *Piper* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, 2371-2382, 2011.

YANG, C. H.; TAN, D. H.; HSU, W. L.; JONG, T. T.; WEN, C. L.; HSU, S. L.; CHANG, P. C. Anti-influenza virus activity of the ethanolic extract from *Peperomia sui*. **Jounal Ethnopharmacol**, v.155, 320–325, 2014.

YUNCKER, T. G.; The Piperaceae of Brazil-III: *Peperomia* taxa of uncertain status. **Hoehnea**, 71-413, 1974.