

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
CURSO DE FARMÁCIA

ILZE DOURADO CAMPOS

MORFOANATOMIA, ATIVIDADE ALELOPÁTICA E POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Piper*  
*callosum* RUIZ & PAV. (PIPERACEAE)

ITACOATIARA

2019

ILZE DOURADO CAMPOS

MORFOANATOMIA, ATIVIDADE ALELOPÁTICA E POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Piper  
callosum* RUIZ & PAV. (PIPERACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Ciências e Tecnologia da  
Universidade do Amazonas, como requisito  
parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em  
Farmácia.

Orientador:

Professor Dr. Maxwell Adriano Abegg

Co - Orientador:

Biólogo Me. Nicanor Tiago Bueno Antunes

ITACOATIARA

2019

### Ficha Catalográfica

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

C198m	<p>Campos, Ilze Dourado Morfoanatomia, atividade alelopática e potencial antimicrobiano do extrato bruto e frações das folhas de Piper callosum Ruiz &amp; Pav. (Piperaceae) / Ilze Dourado Campos. 2019 48 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientador: Maxwell Adriano Abegg Coorientador: Nicanor Tiago Bueno Antunes TCC de Graduação (Farmácia) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Folhas de Piper callosum. 2. estudo morfológico e histoquímico. 3. potencial alelopático. 4. atividade antimicrobiana. I. Abegg, Maxwell Adriano II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	--

ILZE DOURADO CAMPOS

MORFOANATOMIA, ATIVIDADE ALELOPÁTICA E POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Piper  
callosum* RUIZ & PAV. (PIPERACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Ciências e Tecnologia da  
Universidade do Amazonas, como requisito  
parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em  
Farmácia.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Professor Dr. Maxwel Adriano Abegg, Presidente

Orientador

Universidade Federal do Amazonas

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Isabel Reis Guesdon, Membro

Universidade Federal do Amazonas

---

Professora Me. Gleica Soyan Barbosa Alves, Membro

Universidade Federal do Amazonas

Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã, pela fé e confiança depositadas. E a todos que de alguma forma me incentivaram e tornaram esse caminho mais fácil de ser percorrido.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por sempre colocar as coisas no seu devido lugar e por me mostrar que nem tudo é no meu tempo.

Aos meus pais, Carlos Palmeira e Rosa Marília, que me auxiliaram em cada momento durante minha vida acadêmica, sempre me incentivando e me dando suporte. E que sempre me ensinaram que é com esforço que se vence. Muito obrigada, amo vocês.

A minha irmã, Carla Dourado, que sempre me apoiou e enxugou minhas lágrimas, nos momentos em que eu não aguentava. E que ficava comigo até tarde, muitas vezes, dormia ao meu lado, durante os estudos. Te amo, meu neném.

Aos meus avós, tanto paterno, quanto materno e a minha bisavó Rosa, que sempre me aconselharam e que auxiliaram na minha infância, moldando a pessoa que hoje sou. E que foram responsáveis, indiretamente, por escolher a área de Farmácia.

Aos meus tios Ozicarlos e Alaneide, que me receberam e me acolheram durante todo o período do Estágio Supervisionado I e II. E aos tios, Rubens e Iolanda, pela oportunidade no mercado de trabalho, onde pude crescer profissional e pessoalmente. Muito obrigada.

A todos os meus familiares que não citei o nome, mas que sempre colaboraram com a minha formação e para que esse momento acontecesse.

Ao Gustavo Pinheiro, por ter me encorajado, dado forças e acreditado em mim, quando eu não conseguia, por ter aturado todos os meus surtos de impaciência e estresse, durante minhas iniciações científicas e, principalmente, na reta final. Te amo.

Aos meus amigos, Marcelino, André, Adilson e Jackson, que com sua amizade me ajudaram a passar cada etapa, tornando-as mais divertidas.

Aos meus professores, Anderson Guimarães, Renata Takeara, Clicya Anaíze, Ranieri Campos por abrirem a porta do mundo da Iniciação Científica e por acreditarem no meu potencial como pesquisadora.

A FAPEAM, pelo apoio financeiro para que este projeto fosse realizado.

Ao professor e orientador, Maxwel Abegg, por ter aceito orientar este trabalho.

Ao Nicanor Tiago, por toda ajuda e paciência, durante a elaboração e correção deste trabalho.

A todos os professores efetivos, substitutos e técnicos do curso de Farmácia, que passaram pelo ICET nesse processo, que contribuíram para minha formação acadêmica, compartilhando seus conhecimentos e experiências.

*Ebenézer! Até aqui nos ajudou o Senhor*  
*(1 SAMUEL 7. 12)*  
*Não importa o que aconteça, continue a nadar*  
*(WALTERS, GRAHAM; PROCURANDO NEMO, 2003)*

## RESUMO

*Piper* tem grande importância medicinal, possui uma elevada riqueza de espécies e detém grande valor comercial, devido as características de seus óleos essenciais. Dada à evidência etnofarmacológica para os numerosos usos medicinais populares atribuídos à *Piper callosum*, e do potencial farmacológico de seus fitoconstituintes, esta espécie é considerada uma planta medicinal promissora para o desenvolvimento de fitofármacos. Este estudo tem como objetivo a caracterização morfoanatômica e a análise das atividades alelopática e antimicrobiana do extrato bruto e frações das folhas de *Piper callosum*. As folhas foram submetidas a técnicas morfológicas e histoquímicas com técnicas clássicas. O potencial alelopático do extrato e frações foi investigado por germinação e medidas crescentes. As folhas de *P. callosum* caracterizam-se morfológicamente como: hipoestomáticas e elípticas, apresentam tricomas glandulares na epiderme, possuem mesófilo composto por parênquima clorofiliano. Foi registrada a presença de hipoderme em ambas as faces de suas folhas. Dispõem de idioblastos secretores que se distribuem no mesófilo e apresentam resultados histoquímicos positivos para detecção de óleos essenciais. O extrato bruto (FEB) e suas frações foram testadas quanto ao potencial alelopático em relação as sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Allium cepa* (cebola), confirmando a capacidade do extrato e frações interferirem diretamente na germinação, na velocidade de germinação, crescimento, hipocótilo e radícula durante o bioensaio. A fração de acetato de etila (FAC) e fração clorofórmica (FCLO) afetaram todos os parâmetros avaliados para alface e, FAC, fração hexânica (FHEX) e FEB afetaram o crescimento para cebola. Os testes antibacterianos foram submetidos no método de difusão em ágar e indicaram que as folhas de *P. callosum* não apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos testados.

**Palavras chave:** Folhas de *Piper callosum*. Estudo morfológico e histoquímico. Potencial alelopático. Atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

*Piper* has great medicinal importance, has a high species richness and holds great commercial value, due to the characteristics of its essential oils. Given the ethnopharmacological evidence for the numerous popular medicinal uses attributed to *Piper callosum* and the pharmacological potential of its phytochemicals, this species is considered a promising medicinal plant for the development of phytopharmaceuticals. This study aims to characterize the morphology and analysis of the allelopathic and antimicrobial activities of the crude extract and fractions of the leaves of *Piper callosum*. The leaves were submitted to morphological and histochemical techniques with classic techniques. The allelopathic potential of the extract and fractions was investigated by germination and increasing measures. The leaves of *P. callosum* are morphologically characterized as: hypoestomatic and elliptic, have glandular trichomes in the epidermis, have mesophyll composed of chlorophyllic parenchyma. The presence of hypodermis on both sides of its leaves was recorded. They have secretory idioblasts that are distributed in the mesophyll and present positive histochemical results for the detection of essential oils. The crude extract (FEB) and its fractions were tested for allelopathic potential in relation to the seeds of *Lactuca sativa* (lettuce) and *Allium cepa* (onion), confirming the ability of the extract and fractions to interfere directly in germination, germination speed, growth, hypocotyl and radicle during the bioassay. The fraction of ethyl acetate (FAC) and chloroform fraction (FCLO) affected all parameters evaluated for lettuce and, FAC, hexane fraction (FHEX) and FEB affected growth for onions. The antibacterial tests were submitted to the agar diffusion method and indicated that the leaves of *P. callosum* did not present antimicrobial activity for the tested microorganisms.

**Key words:** *Piper callosum* leaves. Morphological and histochemical study. Allelopathic. Potential antimicrobial activity.

## LISTA DE IMAGENS

Figura 1 – Plantas pertencentes à Piper – (A) <i>Piper callosum</i> ; (B) <i>Piper tuberculatum</i> ; (C) <i>Piper marginatum</i> .....	18
Figura 2 - Vista frontal da epiderme da lâmina foliar de <i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.: (A) Face adaxial; (B) Face abaxial; (C) Venação da folha de <i>P. callosum</i> .....	28
Figura 3 - Vista das secções transversais das folhas de <i>Piper callosum</i> . - (D) Tricomas glandulares; (E) Idioblastos; (F e G) Resultados histoquímicos positivos para detecção de óleos essenciais (cor azul) .....	29
Figura 4 - Resultados de crescimento e germinação de alface submetidos a diferentes concentrações de extrato bruto e frações. (A) Comprimento Total; (B) Tamanho do Hipocótilo; (C) Tamanho da Radícula .....	31
Figura 5 - Resultado de crescimento e germinação de cebola submetidos a diferentes concentrações de extrato bruto e frações. (A) Índice de Velocidade de Germinação; (B) Comprimento Total; (C) Tamanho do Hipocótilo; (D) Tamanho da Radícula .....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado da análise dos testes histoquímicos para a indicação de compostos fenólicos, proteínas, polissacarídeos de cadeia longa e lipídeos totais/ óleos essenciais da folha de <i>P. callosum</i> .....	29
Tabela 2 - Resultados da análise de variância para o extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> , usando as variáveis (Amostras e Concentrações) sobre o IVG, comprimento total, comprimento de hipocótilo e comprimento de radícula de <i>L. sativa</i> . ....	30
Tabela 3 - Resultados da análise de variância para extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> , usando as variáveis (Amostras e Concentrações) sobre o IVG, comprimento total, comprimento de hipocótilo e comprimento de radícula de <i>A. cepa</i> .....	33
Tabela 4 - Ensaio de atividade antimicrobiana utilizando o extrato bruto das folhas de <i>P. callosum</i> e clorafenicol. ....	36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	17
<b>3.2. Objetivo Específico</b> .....	17
<b>4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....	18
<b>4.1. Sobre a planta</b> .....	18
<b>4.2. Caracterização morfoanatômica</b> .....	19
<b>4.3. Alelopatia</b> .....	20
<b>4.4. Potencial antimicrobiano</b> .....	22
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	24
<b>5.1. Material vegetal</b> .....	24
<b>5.2. Estudo anatômico e histoquímico</b> .....	24
<b>5.3. Procedimentos de extração</b> .....	25
<b>5.4. Teste de potencial alelopático</b> .....	25
5.4.1. Germinação e crescimento .....	26
5.4.2. Teores de clorofila .....	26
<b>5.5. Ensaio de atividade antimicrobiana</b> .....	26
<b>5.6. Análises dos dados</b> .....	27
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>6.1. Rendimento do extrato alcóolico</b> .....	28
<b>6.2. Estudo morfoanatômico e histoquímico</b> .....	28
<b>6.3. Avaliação do potencial alelopático</b> .....	30
6.3.1. Teores de clorofila .....	<b>36</b>
<b>6.4. Ensaio de atividade antimicrobiana</b> .....	36
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

A família de plantas tropicais Piperaceae inclui 13 gêneros, são eles: *Artanthe*, *Lindeniopiper*, *Macropiper*, *Manekia*, *Ottonia*, *Piperomia*, *Piper*, *Piperanthera*, *Pothomorphe*, *Sarcorhachis*, *Trianaeopiper*, *Verhuellia* e *Zippelia*. (THE PLANT LIST, 2013), que forneceram a civilizações passadas e fornece para as atuais, uma fonte de diversos medicamentos e especiarias (SCOTT *et al.*, 2007). Da família, destaca-se o gênero *Piper*, que inclui muitas espécies caracterizadas pelo uso na medicina popular e pela importância econômica e comercial, devido à produção de óleos essenciais utilizados pela indústria de condimentos, farmacêutica e de inseticidas (SILVA, 1999).

Os compostos bioativos dos extratos de espécies de *Piper* demonstraram uma ação expressiva como agentes anticancerígenos, antitumorais e antimicrobianos em vários estudos farmacológicos (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017). Esses compostos, possuem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas e antimaláricas (MGBEAHURUIKE *et al.*, 2017).

O tamanho diminuto das partes florais e a uniformidade morfológica das partes vegetativas gera problemas taxonômicos em *Piper*, o que pode ocasionar erros na identificação da espécie (MACHADO, 2007). Além disso, são poucos as informações disponíveis na literatura sobre a anatomia e morfologia das estruturas que contém os fitoconstituintes (MACHADO, 2007).

Na medicina popular brasileira, as folhas e o caule jovem de *Piper callosum* Ruiz & Pav. são utilizados na forma de infusão ou cataplasma para tratar dismenorreia, cólicas intestinais, diarreia, além de repelente (ANDRADE *et al.*, 2009). Possui atividades adstringente, hemostáticas, digestivas, diuréticas e depurativas (ANDRADE *et al.*, 2009).

Diversos fitoconstituintes voláteis e fixos foram isolados de *Piper callosum*, incluindo amidas, alcaloides, terpenos, tais como monoterpenos de hidrocarboneto, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos de hidrocarbonetos, sesquiterpenos oxigenados e esteroides; e fenólicos, como flavonoides oxigenados e fenilpropanóides (PARMAR *et al.*, 1997; FACUNDO *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2009). Estudos de óleos essenciais obtidos de *P. callosum* demonstraram atividades antifúngicas, inseticidas e larvicidas (ANDRADE *et al.*, 2009).

Muitos desses fitoconstituintes são compostos bioativos conhecidos e possuem efeito alelopático (RIZVI *et al.* 1992; REIGOSA *et al.* 2006). Os principais responsáveis por tais propriedades são os taninos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, sesquiterpenos, flavonoides

e ácidos fenólicos (KING e AMBIKA, 2002). Ao longo dos anos, tem-se comprovado que as plantas produzem substâncias químicas com propriedades alelopáticas que afetam ou não algumas espécies de plantas (especificidade) (CARVALHO, 1993). Esses fitoconstituintes são denominados como aleloquímicos e, por meio de interações bioquímicas, esses compostos afetam a germinação e o crescimento de outras plantas (INDERJIT e DUKE, 2003). Assim, a alelopatia é definida como qualquer efeito direto ou indireto, benéfico ou prejudicial, de uma planta ou de microrganismos sobre outra planta, mediante produção de compostos químicos que são liberados no ambiente (RICE, 1984).

Esses compostos provenientes de extratos de plantas podem contribuir para o desenvolvimento de antibióticos mais eficazes e menos tóxicos, na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (OSTROSKY *et al.*, 2008). A busca por novos agentes antimicrobianos, para aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos, faz-se cada vez mais necessária, devido ao surgimento de microrganismos resistentes aos antibióticos em uso clínico, e aos microrganismos oportunistas que levam a infecções fatais. (OSTROSKY *et al.*, 2008).

*Piper*, destaca-se, pela sua riqueza em compostos químicos com consideráveis atividades biológicas. O panorama fitoquímico da maioria das espécies deste gênero já foi investigado, o que levou ao isolamento de compostos fisiologicamente ativos, respectivos às mais variadas classes (PARMAR *et al.*, 1997). Silva *et al.* (1992), citam diversas atividades biológicas dos compostos terpênicos, dentre elas a atividade herbicida, antimicrobiana, citostática e antitumoral.

Portanto, dado a riqueza química e aos problemas taxonômicos de *Piper callosum*, o presente trabalho tem como objetivo a caracterização morfoanatômica das folhas, a análise da atividade alelopática e antimicrobiana do extrato bruto e frações das folhas desta espécie.

## 2. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho teve como foco o estudo da morfoanatomia, atividade alelopática e potencial antimicrobiano do extrato bruto e frações das folhas de *Piper callosum* Ruiz & Pav. (Piperaceae).

*P. callosum* se destaca economicamente, por ser rica em compostos químicos com consideráveis atividades biológicas e pela sua utilização na medicina popular (PARMAR *et al.*, 1997). Dada essa utilização, fez-se necessário o estudo morfoanatômico devido a similaridade morfológica entre as espécies de *Piper*. Esta similaridade contribui para erros de identificação, troca, e até mesmo a falsificação quando as espécies são coletadas e comercializadas como plantas medicinais. Em virtude desse equívoco, é necessário estabelecer características morfológicas e anatômicas que auxiliem na identificação correta e como controle de qualidade desta planta (ALBIEIRO *et al.* 2005).

Já, quando se refere a alelopatia, os efeitos alelopáticos ocorrem por intermédio de substâncias químicas, denominadas aleloquímicos, que pertencem a diferentes classes de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcaloides, saponinas, taninos entre outros (INDERJIT e DUKE, 2003; RICE, 1984). Desse modo, a investigação do potencial alelopático das plantas, pode representar uma oportunidade para a descoberta de novas moléculas e compostos ativos com possibilidade de emprego na agricultura e como fornecedora de fármacos. Neste trabalho a alelopatia foi estudada devido aos componentes químicos e atividade biológica, presentes nas folhas de *P. callosum* e do gênero a que pertence.

Devido a resistência dos microrganismos, do âmbito hospitalar, e a dificuldade de eliminar toda essa resistência, devido ao seu mecanismo de propagação (GOODMAN, 2003), é de fundamental importância a análise e controle deste mecanismo, já que as cepas multirresistentes colocam em risco toda a população. Como o problema de resistência a medicação continua crescendo, é necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos úteis ou novas formas de tratar o microrganismo resistente. Extratos de diversas plantas, como *Rosmarinus officinalis* Linnaeus, *Coriandrum sativum* Lindel, *Micromeria fruticosa* (L.) Druce, *Cuminum cyminum* Linnaeus, *Mentha piperita* Linnaeus, e *Piper*, possuem, além de propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica e tendência a potencializar os antibióticos (CHANDA, 2011). Desse modo, estudos de novos antimicrobianos em plantas, são importantes e cruciais em diversos setores do mercado farmacêutico. Além disso, as plantas são fortes candidatas em estudos de

bioprospecção, atuando nas descobertas da atividade farmacológica de novos agentes antimicrobianos.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Caracterizar morfoanatomicamente as folhas da espécie *Piper callosum* e, analisar a atividade alelopática e antimicrobiana do extrato bruto e frações da planta.

#### **3.2. Objetivo Específico**

- Realizar o estudo morfoanatômico das folhas de *Piper callosum*.
- Avaliar a alelopatia do extrato bruto e frações, em diferentes concentrações, frente as sementes de *Lactuca sativa* Linnaeus e *Allium cepa* Linnaeus em relação ao crescimento e germinação.
- Analisar a atividade antimicrobiana do extrato, em relação as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

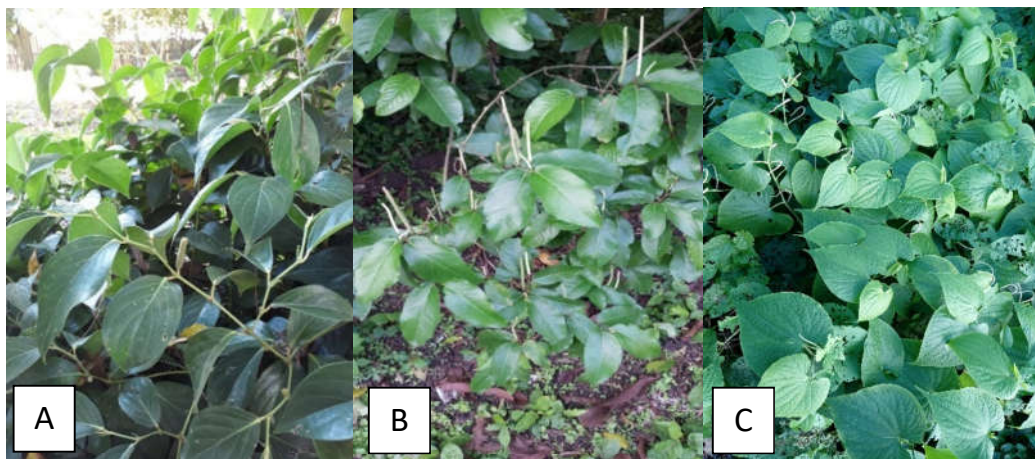
## 4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 4.1. Sobre a planta

A família *Piperaceae* inclui 13 gêneros e 2.658 espécies (*THE PLANT LIST*, 2013). No Brasil, esta família compreende cinco gêneros, em que *Piper* e *Piperomia*, são os gêneros predominantes (RORIG e POSER, 1991; RATES *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 1998; DANELUTTE *et al.*, 2003).

As plantas pertencentes à *Piper* são herbáceas ou arbustivas, possuem folhas inteiras, intercaladas, inflorescência espiculada, com flores hermafroditas muito reduzidas (Figura 1) (HEGNAUER, 1996). Certas espécies deste gênero possuem como principais características a essência forte, agradável e sabor ácido; e, são usadas em ampla diversidade no uso de condimentos, aromatizantes e medicinal (HEGNAUER, 1996).

Figura 1 – Plantas pertencentes à *Piper* – (A) *Piper callosum*; (B) *Piper tuberculatum*; (C) *Piper marginatum*



Fonte A: CAMPOS, I. D. Fonte B: NOGUEIRA, S. R. Fonte: C NUNES J. S.

Diferentes componentes químicos já foram encontrados nas espécies de Piperaceas, como: amidas, cromonas, fenilpropanoides, lignanas e neolignanas (MARTINS *et al.*, 2003). Ainda, diversos terpenos foram isolados nas espécies desta família, como componentes do óleo essencial de folhas, flores e caules, em que, a análise dos compostos voláteis aponta a presença de monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides, tais como, apiol, dilapiol, miristicina, safrol, limoneno, citral, geraniol, mirceno, canfeno, eugenol, cariofileno, E-nerolidol, entre outros, com significativas propriedades biológicas. (MARTINS *et al.*, 2003).

A ação biológica de espécies de *Piper* é muita variada e muito utilizada na medicina popular para tratamento de inúmeras doenças (VIEIRA, 1992; DI STASI, 2000; LORENZI e MATOS, 2002). O gênero, destaca-se economicamente, por ser rico em compostos químicos com consideráveis atividades biológicas (PARMAR *et al.*, 1997). O panorama fitoquímico da

maioria das espécies deste gênero já foi investigado, levando ao isolamento de compostos fisiologicamente ativos, respectivos às mais variadas classes (PARMAR *et al.*, 1997).

Silva *et al.* (1992), citam diversas atividades biológicas dos compostos terpênicos, dentre elas a atividade herbicida, antimicrobiana, citostática e antitumoral. A magnitude do gênero *Piper* é baseada na utilização de abundantes espécies como plantas medicinais e, como fonte de matéria-prima para a indústria farmacêutica, cosmética e perfumaria. (LEAL, 2000).

Dentre as espécies de *Piper*, *Piper callosum* Ruiz et Pav. se destaca por sua utilização na medicina popular, em que o chá da folha é usado para extinguir os distúrbios gastrintestinais, como afrodisíaco e repelente (VAN DEN BERG, 1993). A espécie é conhecida popularmente como João Brandin e óleo elétrico, e o seu óleo essencial contém safrol (64 %), metil-eugenol (2,69 %) e  $\alpha$ -pineno (6,9 %) (MAIA *et al.*, 2000). No estudo dos componentes químicos fixos e voláteis desta espécie, foram isolados alcaloides; terpenos, como monoterpenos de hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos de hidrocarbonetos, sesquiterpenos oxigenados e esteroides; fenólicos, como flavonoides oxigenados e fenilpropanoides (PARMAR *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 2004; FACUNDO *et al.*, 2004). A avaliação do extrato etanólico das folhas de *P. callosum*, sugere a presença de fenólicos, terpenos e ausência de saponinas, e a análise do óleo essencial é constituído, principalmente por safrol (AYRES, 2014).

#### 4.2. Caracterização morfoanatômica

A principal particularidade utilizada para diferenciar *Piper* dos demais gêneros da família é o hábito arbóreo-arbustivo, já que *Piperomia* agrupa as espécies herbáceas (SOUZA e LORENZI, 2012), enquanto *Manekia* compreende as trepadeiras volúveis (SCHUBERT *et al.*, 2012).

A morfologia das folhas, das nervuras e das brácteas florais são as características morfológicas tradicionalmente empregadas para descrever as espécies de *Piper*. O tamanho das flores e a variedade da forma dos caracteres vegetativos, associados à elevada riqueza de táxons do gênero, podem atrapalhar na identificação das espécies (JARAMILLO e MANOS, 2001; YUNCKER, 1972; GUIMARÃES e CARVALHO-SILVA, 2009; CARVALHO-SILVA *et al.*, 2015).

Devido à similaridade morfológica entre as espécies de *Piper*, como ressaltado por Pessini *et al.* (2003) e por Albiero *et al.* (2005), torna difícil diferenciar e identificar de forma clara e objetiva cada uma delas, que acaba por contribuir nos erros de identificação, troca e falsificação, quando estas espécies são coletadas e comercializadas como plantas medicinais.

### 4.3. Alelopatia

O termo alelopatia engloba todas as interferências provocadas entre microrganismos e plantas, estimuladas pela liberação de substâncias químicas, por meio de tecidos vegetais vivos ou não (MOLISCH, 1937). A maioria desses componentes é resultado da atividade do metabolismo secundário da planta, onde sua concentração pode variar entre espécies e entre o local em que estão presentes, já que a síntese dos metabólitos secundários é iniciada por variações bióticas e abióticas que as plantas são expostas. (FERREIRA e AQÜILA, 2000)

Rice (1984), determina o termo alelopatia como o efeito direto ou indireto, vantajoso ou desvantajoso, que uma planta ou microrganismos tem sobre outra planta, por meio da produção de compostos químicos que são liberados no ambiente. Ele, ainda, difere a alelopatia de competição, afirmando que: “os efeitos alelopáticos dependem dos aleloquímicos liberados no ambiente pelas plantas doadoras. Dessa maneira, a alelopatia diferencia-se da competição, pois a competição é a diminuição ou retirada de algum fator ambiental, como água, luz e nutrientes necessários à outra planta no mesmo ecossistema”

O mecanismo de ação dos aleloquímicos ainda é pouco conhecido, devido à dificuldade de distinguir os efeitos secundários das causas primárias. Algumas plantas produzem compostos, provenientes do metabolismo secundário, que agem inibindo ou contribuindo no processo de germinação, por acometer os seguintes processos: divisão celular, aumento de estruturas celulares, crescimento induzido por hormônios, permeabilidade de membranas, absorção de minerais, abertura estomática, fotossíntese, respiração, síntese proteica, metabolismo de lipídeos e ácidos orgânicos, atividade de várias enzimas e nas relações hídricas do vegetal (RICE, 1984). A atividade alelopática se dá por meio dos efeitos destas substâncias, em conjunto com às condições ambientais, e pode ser um fator que causa o sucesso ou infortúnio no cultivo de plantas. (FERREIRA, 2004).

A alelopatia está diretamente ligada a outros estresses ambientais, abrangendo temperaturas extremas, deficiências de nutrientes e umidade, radiação, insetos, doenças e herbicidas (EINHELLING, 1996). Geralmente, as condições de estresse estimulam a produção de aleloquímicos, ampliando o efeito alelopático. (EINHELLIG, 1995).

Os metabólitos secundários podem prevenir a decomposição das sementes e acometer a dormência e o desenvolvimento das gemas (HARBORNE, 1988). Todavia, é importante lembrar que os efeitos benéficos de uma planta sobre outra não devem ser separados do conceito de alelopatia, uma vez que, um certo componente químico pode ter efeito inibitório ou

estimulante, que dependerá da sua concentração no ambiente e sensibilidade do tecido a eles (RICE, 1984).

O desempenho, concreto, dos aleloquímicos em relação as plantas é, simplesmente, uma sinalização periférica de mudanças anteriores. Assim, os estudos referentes ao efeito de aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento da planta são manifestações secundárias de processos ocorridos a nível molecular e celular (FERREIRA e AQUILA, 2000; FERREIRA, 2004).

Pires *et al.* (2001) enfatizam que a grande maioria dos estudos em alelopatia refere-se somente ao efeito do aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-alvo, sem levar em conta os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas e genéticas. No entanto, Macias *et al.* (1998) mostraram a relevância dos estudos sobre as interações alelopáticas, que é capaz de ser vantajosa na pesquisa por fitotoxinas naturais produzidas por plantas ou microrganismos, e, que seus derivados sintéticos podem ser empregados como herbicidas naturais mais intrínsecos e, menos prejudiciais ao meio ambiente.

Os compostos aleloquímicos estão localizados nas folhas, caules aéreos, rizomas, raízes, flores, frutos e sementes de diversas espécies, mas as folhas e as raízes são as fontes mais significativas de aleloquímicos (RODRIGUES *et al.* 1992; INDERJIT e DAKSHINI, 1992, 1994). Esses podem ser liberados pelas plantas por lixiviação a partir dos tecidos, volatilização, exsudação pelas raízes e decomposição de resíduos da planta (RODRIGUES *et al.* 1992; INDERJIT e DAKSHINI, 1992, 1994).

As toxinas solúveis em água (ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, substâncias pécticas, terpenoides, alcaloides, compostos fenólicos e giberelinas) (ALMEIDA, 1988). Assim, as toxinas são lixiviadas da parte aérea e das raízes ou dos resíduos vegetais em decomposição, depositando-se no solo e acometendo o crescimento da comunidade ao seu redor (ALMEIDA, 1988).

Na volatilização, os compostos aromáticos das folhas, flores, caules e raízes podem ser absorvidos por outras plantas, afetando, principalmente, o crescimento ou o desenvolvimento das plantas que se encontram nas proximidades (ALMEIDA, 1988; DURIGAM e ALMEIDA, 1993). Nesse grupo, estão inclusos os compostos como o gás carbônico, a amônia, o etileno e os terpenóides. Os terpenoides agem sobre as plantas vizinhas por via dos próprios vapores ou condensados no orvalho ou, chegam ao solo e são filtrados pelas raízes (SOUZA,1988). Nas raízes são liberadas um grande número de compostos alelopáticos que são liberados na rizosfera circundante e podem atuar direta ou indiretamente nas interações entre as plantas, sejam elas de diferentes espécies, e na ação de microrganismos.

Entre esses compostos exsudados pelas raízes, são citados o ácido oxálico, a amidalina, a cumarina e o ácido transcinâmico (SOUZA,1988).

Na decomposição dos resíduos, as toxinas são liberadas pela decomposição, direta ou indireta, das partes aéreas ou subterrâneas, pela ação de microrganismos. A perda da integridade de membranas celulares permite a liberação de muitos compostos (como os glicosídeos cianogênicos, ácidos fenólicos, agropireno, cumarinas e flavonóides), que são tóxicos aos organismos vizinhos (RICE, 1984; SOUZA, 1988).

#### **4.4. Potencial antimicrobiano**

As bactérias são microrganismos procarióticos específicos do Reino Bacteria, com aproximadamente 0,2 a 2 µm de diâmetro e 1 a 6 µm de comprimento; possuem diferentes formas, como cocos, bacilos, espirilos e vibriões; tem em sua estrutura celular: cápsula (camada mucosa), parede celular, membrana celular, citoplasma, inclusões, ribossomos, cromossomos, plasmídeos, fimbrias e flagelos (TRABULSI, 2005).

Bactérias como *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp., entre outras, são responsáveis por várias doenças em seres humanos. Enquanto as bactérias, acima, podem ser patogênicas, outras fazem parte da microbiota normal dos seres humanos, importantes para o funcionamento e proteção de alguns órgãos (KONEMAN, 2001).

As infecções bacterianas têm sido uma das principais causas de patologias ao longo da história, com a descoberta e advento dos antibióticos, este problema inclina-se a desaparecer. Contudo, nos dias de hoje, os microrganismos têm progredido em seus mecanismos de resistência que, divergem dos avanços alcançados nos tratamentos das infecções (GOODMAN, 2003).

O primeiro caso de resistência bacteriana à antibióticos foi publicado em 1947, quando foi relatado o isolamento de *S. aureus*, resistente à penicilina em 38 de 100 pacientes com infecções estafilocócicas, na Inglaterra (BARBER, 1947). Em 1961, cepas de *S. aureus* resistentes a metilina e outras penicilinas semissintéticas já haviam sido isoladas (JEVONS, 1961). Conforme os estudos divulgados por Jeong *et al.* (2014) e Fluegge (2006), a ocorrência de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) isolado de *swab* nasal de indivíduos saudáveis, foi de 91% na Coreia e 82,1% na Alemanha.

Há dois tipos de resistência aos antimicrobianos, a resistência natural e a adquirida; a natural em que, qualquer indivíduo, isolado da espécie, independentemente de onde foi isolado,

apresenta resistência, sendo uma característica específica de um microrganismo, que ocorre sem a exposição ao antibiótico; e a adquirida, apenas algumas cepas a apresentam, justamente porque desenvolveram ao longo do tempo (TRABULSI, 2005). Existem quatro grandes mecanismos de resistência aos antibióticos são eles: alteração da permeabilidade; alteração do local de ação; a bomba de efluxo e; o mecanismo enzimático, que altera a estrutura química do antibiótico (GOODMAN, 2003).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos varia do local, da região, do país, e tem estrita associação com a terapia antimicrobiana frequentemente usada pelos profissionais de saúde (TRABULSI, 2005). Para auxiliar no controle de desenvolvimento da resistência é necessário traçar os perfis dos locais de hospitais e instituições conhecendo, assim, a tendência do comportamento e, desta maneira, viabilizar formas efetivas de controle (FLUEGGE, 2006; TAVARES, 2001).

É reconhecida a dificuldade de eliminar completamente a resistência bacteriana em ambientes hospitalares, em virtude do mecanismo de propagação. Logo é fundamental a análise e controle deste processo, uma vez que essas cepas multirresistentes colocam em risco toda a população (FLUEGGE, 2006; TAVARES, 2001). Como o problema de resistência a medicação continua crescendo, é necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos úteis ou novas formas de tratar o microrganismo resistente (NEGI, 2012).

Extratos de diversas plantas, como *Rosmarinus officinalis*, *Coriandrum sativum*, *Micromeria fruticosa* L., *Cuminum cyminum*, *Mentha piperita*, possuem, além de propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica, com tendência à potencialização de antibióticos, e esta interação demonstrou muitos resultados promissores (CHANDA, 2011).

Desse modo, estudos de novos antimicrobianos em plantas são importantes e cruciais em diversos setores de empresas farmacêuticas. Além disso, as plantas são fortes candidatas em estudos de bioprospecção, atuando nas descobertas da atividade farmacológica de novos agentes antimicrobianos, especialmente em países como o Brasil, que oferece uma elevada biodiversidade a ser estudada e analisada (LIMA *et al.*, 2006).

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Material vegetal

As folhas frescas de *P. callosum* foram coletadas, para preparação do extrato etanólico, na área do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia - ICET, na Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 3°08'33.6"S 58°25'53.0"W, no município de Itacoatiara/AM. Foi coletada uma amostra específica de folhas intactas, completamente desenvolvidas e expandidas para a caracterização morfoanatômica e histoquímica. A morfologia foliar externa foi classificada de acordo com a classificação proposta por Hickey (1974). Folhas inteiras e cortes transversais foram fixados em formalina tamponada (FNT) e sulfato ferroso (SFF) por 48 horas (JOHANSEN, 1940), e posteriormente estabilizados em etanol a 70%, segundo Berlyn e Miksche (1976).

### 5.2. Estudo anatômico e histoquímico

Folhas inteiras e fragmentos da base, meio e ápice foram submetidos à técnica de diafanização por meio de hidróxido de sódio a 5% (NaOH) até a despigmentação total (SASS, 1951) e clarificados em hipoclorito de sódio (NaClO) a 10%. Após lavagem e armazenamento em álcool a 70%, o material foi corado em violeta de cristal a 1% e fucsina básica, e subsequentemente montado em gelatina de Kaiser, de acordo com Roeser (1972).

O material fixado na FNT foi seccionado transversalmente com a mão livre no micrótomo de uma tabela, e os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina para uma descrição geral do padrão anatômico (O'BRIEN *et al.*, 1964), e submetidos aos seguintes testes histoquímicos: azul de Coomassie, para detecção de proteínas totais (FISHER, 1968); PAS (reagente de Schiff / ácido periódico), para polissacarídeos de cadeia longa (O'BRIEN e MCCULLY, 1981; McMANUS, 1948); Sudan Red para lipídios totais (DAVID e CARD, 1964); e NADI - Reagente NADI (DAVID e CARD, 1964) para óleos essenciais e oleorresinas. As seções transversais também foram submetidas ao sulfato ferroso (SFF) para identificação de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940).

Os procedimentos de microscopia foram realizados no laboratório de botânica do ICET-UFAM. Observações e documentação fotográfica foram realizadas sob microscópio óptico (Leica DM500) com auxílio de um *smartphone*. As imagens e a montagem da placa foram realizadas com a ajuda da versão 0.92.3 do programa Inkscape®, software livre.



### 5.3. Procedimentos de extração

Folhas intactas e de tamanho aproximado de *P. callosum* foram coletadas uma a uma, e, posteriormente, limpas com um pano umedecido em água destilada. Depois, 3 kg de folhas foram triturados com auxílio de tesouras para adquirir maior superfície de absorção no processo de extração. Logo após a trituração, adicionaram-se 3 litros de álcool etílico 96%, para obtenção do extrato hidroalcoólico, e a solução foi deixada em repouso a temperatura ambiente por 15 dias.

O extrato bruto etanólico foi seco em banho – Maria à 70 °C e armazenado em frascos de vidro devidamente identificados como **FEB**. Decorrido este processo, o rendimento do extrato bruto (FEB), foi calculado pela seguinte equação:

**Equação 1:**

$$Rf: \frac{M_{ext}(g)}{M_{folhas}(g)} \times 100$$

Em que: **Rf** é o rendimento final; **Mext**, a massa do extrato alcoólico seco; **Mfolhas**, massa das folhas.

O fracionamento foi feito através da partição sólido-líquido. Foram determinados 200 mg do extrato bruto para a partição em cada solvente utilizado: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Foram feitas três lavagens, de 50 mL cada uma, com os solventes em ordem crescente de polaridade. Após o fracionamento foram obtidas as seguintes frações: **FHEX**, para a fração hexânica; **FCLO**, fração clorofórmica; **FAC**, para acetato de etila; e **FREM**, para a fração remanescente hidroalcoólica.

### 5.4. Teste de potencial alelopático

O exame do potencial alelopático da FEB e das frações de *P. callosum* foi realizado sobre as sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) e *Allium cepa* L. (cebola) de acordo com a metodologia descrita por Macías *et al.* (2005). Assim, 50 sementes de *L. sativa* e 25 de *A. cepa* foram colocadas em placas de Petri com papel Whatman nº 6 e 5mL do extrato (FEB) e frações, preparadas nas concentrações de 62,5 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL, para alface e, 125 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL para cebola para cada amostra em água. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada concentração, seguido de incubação a temperatura controlada (25 °C). Como controle negativo, utilizou-se água destilada em vez dos tratamentos, extratos e frações.

#### 5.4.1. Germinação e crescimento

Os bioensaios de germinação e crescimento foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Macías *et al.* (2005). A germinação foi monitorada durante todo o processo. As sementes de alface germinadas foram contadas em um intervalo de 24 horas por 7 dias e as sementes de cebola germinadas em um intervalo de 24 horas por 14 dias. O ensaio terminou quando o número de sementes germinadas permanece estável.

O índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes foi calculado pela equação:

**Equação 2:**

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

Em que **G1, G2, G3, G4 ... Gn** é o número de sementes germinadas e **N1, N2, N3, N4 ... Nn** é o número de dias após o início do ensaio.

O teste de crescimento foi executado após ter cessado o período de germinação e consistiu em medir o comprimento da radícula e hipocótilo de 10 plantas em cada tratamento.

#### 5.4.2. Teores de clorofila

Para o ensaio de clorofila total, foi utilizado o método proposto por Paula *et al.* (2014) em que, ao final dos testes de germinação e crescimento, um total de 10 plântulas primárias foram cortadas inteiras e transferidas para tubos de ensaio com 5,0 ml de etanol 96% e então os tubos foram embrulhados em papel alumínio e deixados em temperatura ambiente por 24 horas.

Finalizado esse período, as leituras de absorvância da Clorofila A (663 nm) e B (645nm) foram feitas com espectrofotômetro. Para o branco, foi utilizado o etanol 96%. O teor de Clorofila Total foi calculado pela equação:

**Equação 3:**

$$\text{Clorofila Total} = 20,2 \times \text{Abs A} + 8,02 \times \text{Abs B}$$

Em que **Abs A** e **Abs B** são as absorvâncias das clorofilas A e B, respectivamente.

#### 5.5. Ensaio de atividade antimicrobiana

Para o estudo do potencial antimicrobiano utilizou-se o método de difusão em disco adaptado de Salvagnini *eta al.*, (2008) e Ostrosky *et al.*, (2008) em linhagens de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidemirdis* (ATCC 12228).

As cepas foram inoculadas em caldo BHI (caldo de infusão de cérebro e coração), para que crescessem, e incubadas a 35 °C por 24 horas. Subsequente a este processo, uma alíquota, de cada cepa inoculada foi semeada em ágar Mueller Hinton, e, novamente, incubada em estufa a 35 °C em um intervalo de 24h. Cada cultura bacteriana foi diluída em solução salina estéril (5 mL) a 0,9% e ajustada a 0,5 na escala de turbidez de MacFarland. O repique foi realizado em placa contendo Mueller Hinton com auxílio de alça de platina estéril.

O extrato foi preparado na concentração de 100 mg/mL. Os discos de antibiogramas foram empregados de 10 µL da solução do extrato, e levados à estufa para total evaporação do solvente. Os controles negativos dos discos foram empregados com o mesmo solvente (álcool 70%) utilizado para diluir a amostra e, para o controle positivo foram utilizados 30 µg de clorafenicol.

Os discos de antibiogramas, já impregnados, foram depositados sobre as placas inoculadas. As placas foram levadas à estufa a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as placas foram retiradas e os halos foram medidos com auxílio do paquímetro.

## **5.6. Análises dos dados**

Para a análise do potencial alelopático, as frações e as concentrações testadas foram consideradas como variáveis independentes e comprimento total, tamanho do hipocótilo, tamanho da radícula e IVG, como variáveis dependentes. A normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk, e foi considerada que os valores das variáveis dependentes não diferiram de uma distribuição normal, com  $p > 0,05$ .

Verificado a normalidade, foram realizadas Análise de Variância de Duas Vias (ANOVA's Two-Way), seguido pelo teste de Tukey a 5% de significância, quando necessário. As análises foram realizadas empregando o software estatístico R, versão 3.5.3 (R TEAM CORE DEVELOPMENT, 2016) através do pacote Vegan (OKSANEN *et al.*, 2013) e o pacote Agricolae (MENDIBURU, 2017).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

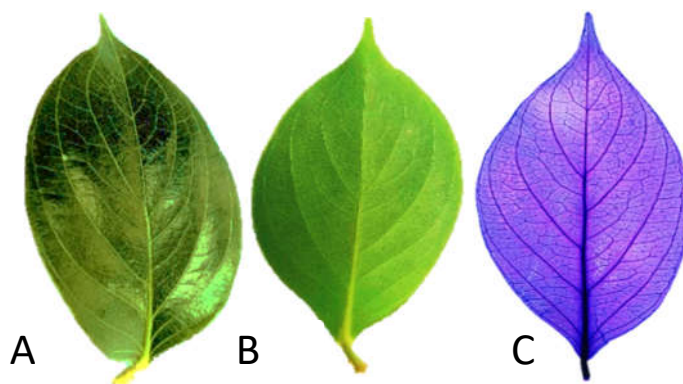
### 6.1. Rendimento do extrato alcóolico.

O rendimento do extrato foi obtido relacionando a massa do extrato bruto resultante da extração (230,754g) com a massa do material botânico utilizado para a extração. O extrato foi obtido a partir de 3 kg das folhas de *P. callosum* (código **FEB**). A partir dos cálculos realizados, obteve-se um rendimento de 7,7% de extrato bruto para 3 kg de material botânico coletado.

### 6.2. Estudo morfoanatômico e histoquímico

Os resultados morfológicos (Figura 2), mostraram que as folhas são completas, glabras e alternadas, com formato elíptico – ovalado, base e membro assimétrico e ápice acuminado. Sua cor é esverdeada nas faces adaxial e abaxial (Figura 2A e 2B), e pode ser visto que a adaxial é mais brilhante e mais escura que a abaxial. Possui venação proeminente em suas faces, esta é do tipo eucamptódroma (Figura 2C). Esses resultados assimilam-se aos perfis de *Piper crassinervium* H. B & K e *Piper gaudichaudianum* Kuntze, descritas por Albiero *et al.* (2005a, 2006), e assimilam-se aos perfis de *Piper* descritos por Gogosz *et al.* (2012).

Figura 2 - Vista frontal da epiderme da lâmina foliar de *Piper callosum* Ruiz & Pav.: (A) Face adaxial; (B) Face abaxial; (C) Venação da folha de *P. callosum*



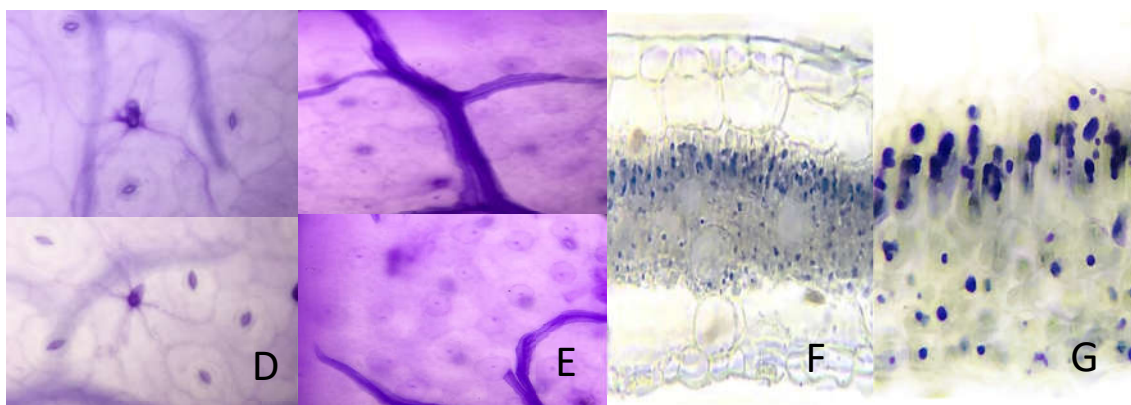
Fonte: GUESDON, I. R.; CAMPOS, I. D. 2018.

As folhas possuem estômatos localizados na epiderme inferior; tricomas glandulares, revestidos por cutícula lisa (Figura 3D). Hipoderme em ambas as faces.

Possui idioblastos secretores (Figura 3E). Eles apresentam forma elíptica e esférica, distribuem-se pelo mesófilo, em geral, no parênquima clorofiliano na nervura central. Eles ainda podem ser visualizados nos ramos vasculares das folhas. Os testes histoquímicos da tabela 1, indicam que os idioblastos são ricos em lipídeos totais/ óleos essenciais.

O mesófilo é dorsiventral, composto pelo parênquima paliçádico, na face adaxial, e por parênquima lacunoso, na face abaxial. E nele, também estão localizados os óleos essenciais. Todos esses resultados corroboram com o perfil anatômico das folhas de *Piper callosum*, descritas por Silva *et al.* (2017)

Figura 3 - Vista das secções transversais das folhas de *Piper callosum*. - (D) Tricomas glandulares; (E) Idioblastos; (F e G) Resultados histoquímicos positivos para detecção de óleos essenciais (cor azul).



Fonte: GUESDON, I. R.; CAMPOS, I. D. 2018.

Os resultados histoquímicos (Tabela 1) indicam que as folhas de *P. callosum* são ricas em compostos fenólicos e óleos essenciais, estes, por sua vez, estão acumulados nos idioblastos. Na Figura 3F e 3G, é possível ver o resultado do teste NADI, que indica a localização dos óleos essenciais, que são representados pela cor azul. Parmar *et al.* (1997), Facundo *et al.* (2004) e Andrade *et al.* (2009), afirmaram que, a mistura de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas identificados na secreção, das estruturas secretoras de *P. callosum* está de acordo com os fitoconstituintes da planta. Em *Piper*, os idioblastos são descritos, anatomicamente, como estruturas secretoras oleosas (GOGOSZ, 2012; MARINHO, 2011). Esses testes reforçam os resultados obtidos por Silva *et al.* (2017).

Tabela 1 - Resultado da análise dos testes histoquímicos para a indicação de compostos fenólicos, proteínas, polissacarídeos de cadeia longa e lipídeos totais/ óleos essenciais da folha de *P. callosum*.

Teste	Classe de metabólitos	Resultados
SFF	Compostos Fenólicos	+
Azul de Coomassie	Proteínas	-
PAS	Polissacarídeos de cadeia longa	-
Sudan Red /NADI	Lipídeos Totais / Óleos essenciais	+

(+) resultado positivo, (-) resultado negativo; (SFF) Sulfato ferroso; (PAS) Reagente de Schiff; (NADI)  $\alpha$ -naftol e dimetilfenileno diamina.

### 6.3. Avaliação do potencial alelopático

Na Tabela 2 é representado o resultado da ANOVA, nela nenhum tratamento afetou o IVG de alface.

Tabela 2 - Resultados da análise de variância para o extrato bruto e frações de *P. callosum*, usando as variáveis (Amostras e Concentrações) sobre o IVG, comprimento total, comprimento de hipocótilo e comprimento de radícula de *L. sativa*.

	Grau de liberdade (dF)	Valor de F	Valor de P
<b>IVG</b>			
Amt.	5	0.391	0.852
Conc.	2	0.173	0.841
Int. (Amt + Conc)	8	0.954	0.482
<b>COMPRIMENTO TOTAL</b>			
Amt.	5	4.632	0.001*
Conc.	2	6.146	0.004*
Int. (Amt + Conc)	8	3.310	0.004*
<b>COMPRIMENTO HIPOCÓTILO</b>			
Amt.	5	5.955	0.0002*
Conc.	2	5.956	0.005*
Int. (Amt + Conc)	8	3.452	0.003*
<b>COMPRIMENTO RADÍCULA</b>			
Amt.	5	4.213	0.003*
Conc.	2	3.957	0.026*
Int. (Amt + Conc)	8	2.416	0.03*

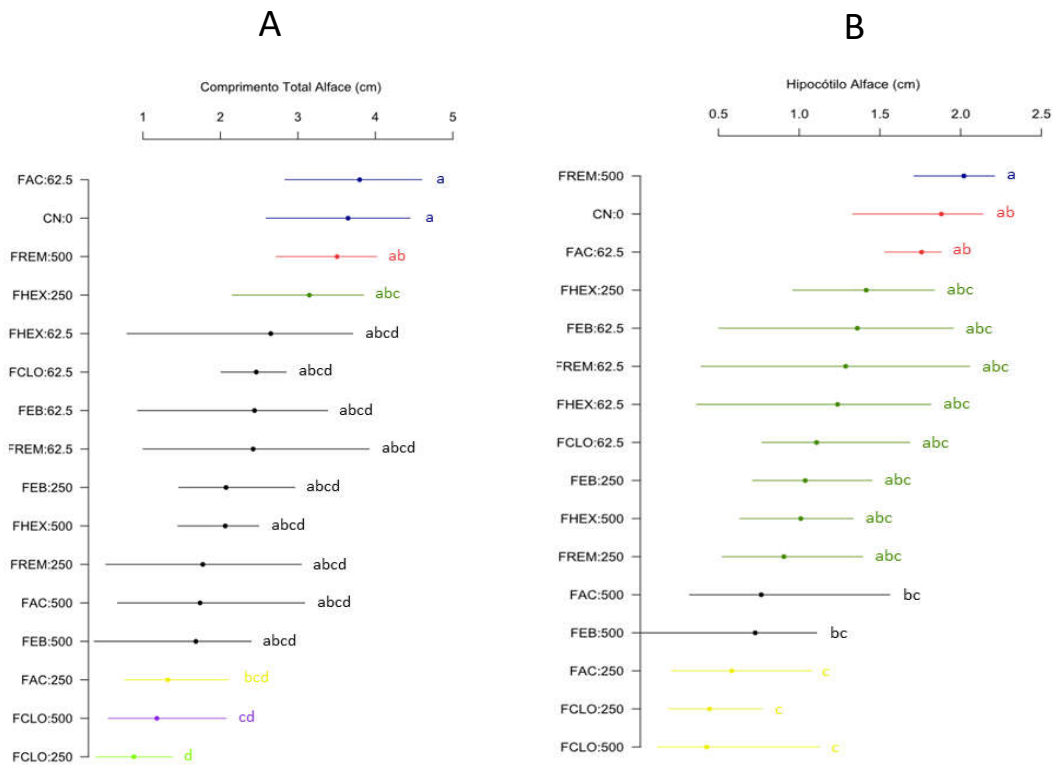
Nota: (\*): Houve diferença significativa, quando comparado ao controle negativo; Fórmulas mais altas indicam correlação mais forte. IVG: Índice de Velocidade de Germinação; Amt: Amostra; Conc: Concentração; Int: Interação.

Na figura 4A é possível analisar os resultados obtidos para o comprimento total das sementes de alface, em que a FAC a 250 µg/ mL e FCLO a 250 µg/ mL e a 500 µg/ mL, tiveram o melhor resultado de efeito alelopático ( $p = 0.03$ ;  $p = 0.004$ ;  $p = 0.017$ , respectivamente), quando comparado ao controle negativo.

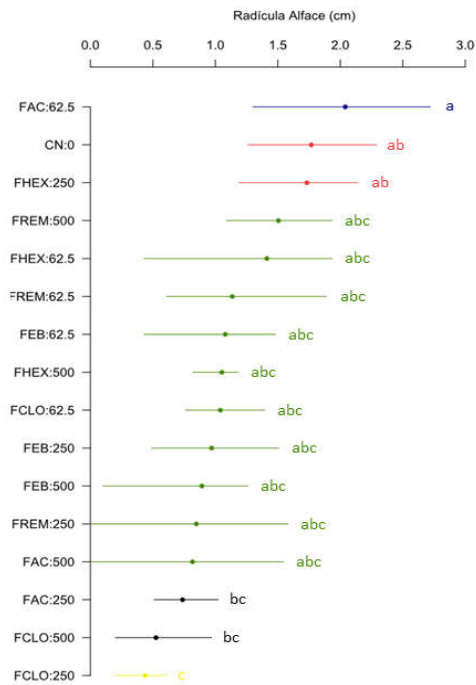
Na figura 4B são analisados os resultados obtidos para o hipocótilo das sementes de alface, em que as frações de FAC a 250 µg/ mL, FCLO a 250 µg/ mL e a 500 µg/ mL, exibiram melhor resultado ( $p = 0.015$ ;  $p = 0.004$ ;  $p = 0.003$ , respectivamente) quando comparado ao controle negativo. O valor de F para o teste de crescimento total e hipocótilo sobre as sementes de alface, demonstra que o aumento da concentração acaba por promover a inibição do comprimento total e hipocótilo das plântulas, o que indica que diferentes metabólitos podem ser os responsáveis pela atividade.

Na Figura 4C, são analisados os resultados obtidos para a radícula das sementes de alface, é possível notar que FCLO a 250 µg/ mL teve o menor valor de crescimento e diminuíram o comprimento da radícula de alface ( $p = 0.039$ ), quando comparado ao controle. De acordo com o valor de F, das radículas, na tabela 2, a inibição da radícula, está associada mais a concentração do que a composição química da amostra (extrato e frações) analisadas. Isso indica que a interação entre amostra e concentração pode ser física, por mudanças tanto na osmolaridade, quanto na difusão do meio, não sendo relacionada aos compostos aleloquímicos, como no comprimento total e hipocótilo.

Figura 4 - Resultados de crescimento e germinação de alface submetidos a diferentes concentrações de extrato bruto e frações. (A) Comprimento Total; (B) Tamanho do Hipocótilo; (C) Tamanho da Radícula



### C



Fonte: CAMPOS, I. D. 2018.

Para cebola, na tabela 3, é possível observar, a partir do valor de F, que as concentrações testadas afetam mais o crescimento das sementes, do que amostras. Isto se deve ao fato de que a FHEX é rica em fenóis, e a FEB é rica em terpenos, que são moléculas de baixo molecular, e convertem as soluções em hipotônicas. Todas as concentrações estimularam o crescimento do hipocótilo das sementes de cebola. De acordo com a tabela 3, foi possível notar que a interação entre amostras e concentração instilaram nesse fator. No entanto, a convergência assemelha-se mais ao aumento da concentração de que a composição química da planta, atribuindo a compreensão que os compostos apolares são mais eficazes quando comparado aos polares, não obstante, os compostos polares exibiram melhor resultado para as sementes de alface, sendo esta, por sua vez, uma dicotiledônea, e a cebola uma monocotiledônea.

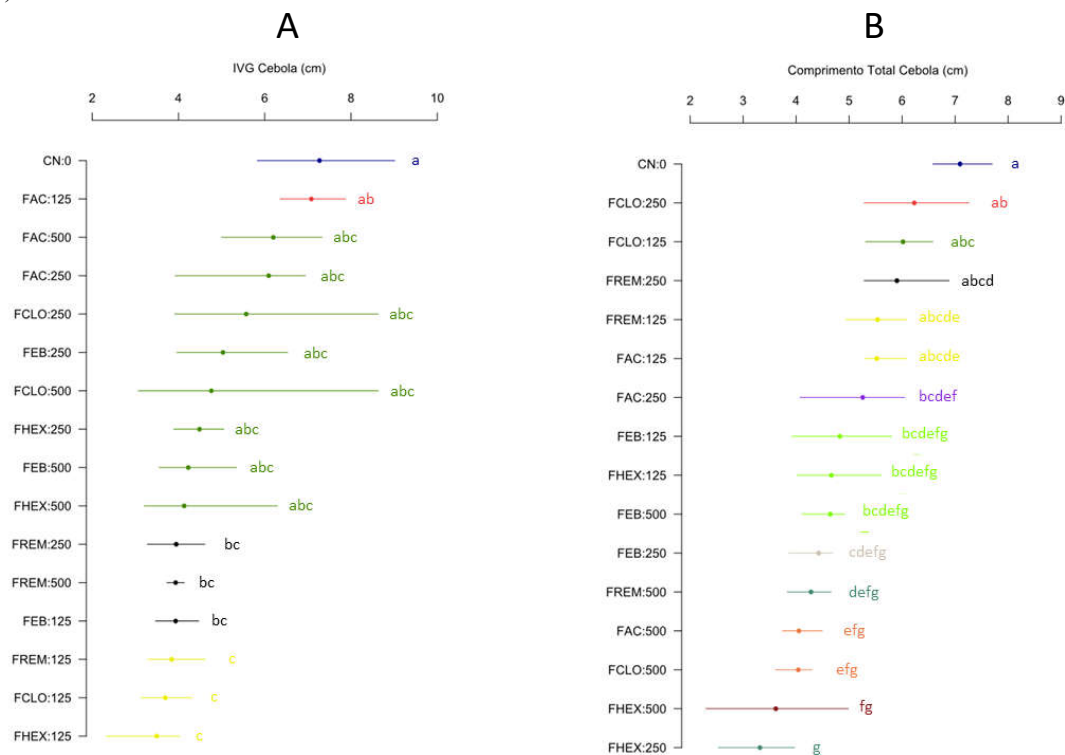


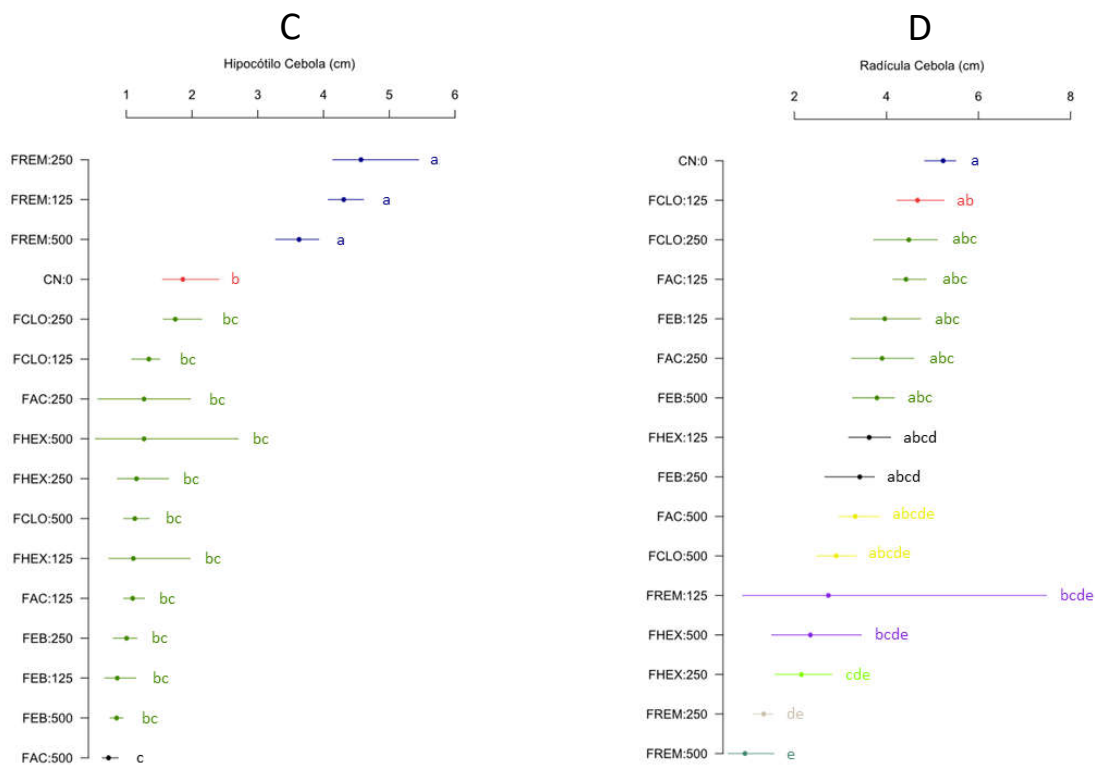
Tabela 3 - Resultados da análise de variância para extrato bruto e frações de *P. callosum*, usando as variáveis (Amostras e Concentrações) sobre o IVG, comprimento total, comprimento de hipocótilo e comprimento de radícula de *A. cepa*.

	Grau de liberdade (dF)	Valor de F	Valor de P
<b>IVG</b>			
Amt.	5	9.918	1.47e-06*
Conc.	2	1.260	0.293
Int. (Amt + Conc)	8	0.835	0.576
<b>COMPRIMENTO TOTAL</b>			
Amt.	5	16.58	1.74e-09*
Conc.	2	16.98	2.65e-06*
Int. (Amt + Conc)	8	3.15	0.006*
<b>COMPRIMENTO HIPOCÓTILO</b>			
Amt.	5	102.277	< 2e-16*
Conc.	2	5.166	0.009*
Int. (Amt + Conc)	8	1.113	0.371
<b>COMPRIMENTO RADÍCULA</b>			
Amt.	5	14.406	1.29e-08*
Conc.	2	8.833	0.0005*
Int. (Amt + Conc)	8	1.030	0.427

Nota: (\*) Houve diferença significativa, quando comparado ao controle negativo; Fórmulas mais altas indicam correlação mais forte. IVG: Índice de Velocidade de Germinação; Amt: Amostra; Conc: Concentração; Int: Interação.

Figura 5 - Resultado de crescimento e germinação de cebola submetidos a diferentes concentrações de extrato bruto e frações. (A) Índice de Velocidade de Germinação; (B) Comprimento Total; (C) Tamanho do Hipocótilo; (D) Tamanho da Radícula.





Fonte: CAMPOS, I. D. 2018.

Em relação ao IVG das sementes de cebola (Figura 5A), a FREM a 500 µg/mL afetou a velocidade de germinação das sementes ( $p < 0,001$ ), quando comparada ao controle. De acordo com o valor de F, da tabela 3, percebe-se que a amostra apresenta uma interferência maior, quando testadas nas sementes de cebola, quando comparada ao valor de F da concentração.

Na Figura 5B, no que se refere ao comprimento total das sementes de cebola, as frações de FAC a 500 µg/mL, FCLO a 500 µg/mL e FEB a 250 µg/mL, expressaram o melhor resultado (todas as frações tiveram o  $p < 0,001$ ) quando avaliadas comparativamente ao controle negativo.

Na Figura 5C, no que se refere a hipocótilo, é possível notar que a FAC a 500 µg/mL foi a única fração que diferiu significativamente ( $p = 0.030$ ), quando comparada ao controle negativo. Todas as outras concentrações estimularam o crescimento do hipocótilo. De acordo com a tabela 3, é possível perceber que a natureza química da amostra e as concentrações testadas, influenciaram nos parâmetros avaliados. Porém, a relação entre amostra e concentração, parece ser maior quando ocorre o aumento da concentração, em detrimento à natureza química, ressaltando a ideia em que os metabólitos de alta polaridade são mais eficazes que os de baixa polaridade.

Na Figura 5D pode-se observar que a FHEX a 250 µg/mL e a 500 µg/mL, e a FREM a 250 µg/mL, dispuseram do melhor resultado ( $p = 0.002$ ;  $p = 0.006$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente)

quando comparados ao controle negativo. De acordo com o valor de F, a composição química da amostra é mais pertinente e associada com a atividade visualizada. Neste caso, os metabólitos de baixa polaridade apresentam maior efetividade que os com maior polaridade.

Conforme os resultados apresentados, é possível observar a relação dose-dependente entre IVG, crescimento e a natureza química dos extratos, pois as concentrações das amostras analisadas, aumentaram no IVG e no comprimento das plântulas de alface e cebola. Sobressaíram-se FAC a 250 µg/mL, FCLO a 250 µg/mL e a 500 µg/ mL, quando avaliados em relação as sementes de alface, e a fração FHEX em todas as concentrações testadas, segundo os parâmetros avaliados para as sementes de cebola.

De acordo com An *et al.* (1993), é assumido que alguns aleloquímicos possuem dois atributos, inibitório e estimulatório. Rice (1984) menciona que em baixo tratamento, os efeitos alelopático podem não ser inibitórios para a espécie receptora, mas sim estimulantes, em determinados casos. No entanto, segundo os resultados obtidos neste trabalho, foi presenciado efeitos inibitórios, mesmo em concentrações baixas, e que em certos casos, essas mesmas concentrações, se tornaram estimulantes para o crescimento do hipocótilo de *L. sativa* e *A. cepa*. Os resultados mostraram que independente da concentração, da espécie receptora e da planta em avaliação, as sementes de *L. sativa*, foram as que sofreram maior atividade alelopática.

Extratos alcoólicos de capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC), tiveram efeito alelopático significativo no desenvolvimento da radícula das sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. *Simpson*), porém o mesmo extrato não demonstrou potencial alelopático sobre o desenvolvimento do hipocótilo de alface. (FILHO *et al.*, 2012)

A atividade biológica de um dado aleloquímico depende tanto da concentração como do limite da resposta da espécie afetada. O limite de inibição para um dado químico não é constante, porém está intimamente relacionado à sensibilidade da espécie receptora, aos processos metabólicos da planta e às condições ambientais. (SOUZA FILHO, *et al.*, 2009). A maioria das substâncias alelopáticas é derivada dos compostos fenólicos, que influenciam na absorção de nutrientes (BOOKER *et al.*, 1992), na atividade enzimática (DEVI e PRASAD, 1992), nas relações hídricas (BARKOSKY e EINHILLIG, 1993), na fotossíntese e na respiração (HEJL *et al.*, 1993). Entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos estão os terpenos, alcalóides, compostos fenólicos, esteróides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (MALHEIROS e PERES, 2001).

### 6.3.1. Teores de clorofila

No experimento realizado para avaliar o teor de clorofila total (clorofilas a + b), verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos. A redução no teor de clorofila promove uma redução nas taxas fotossintéticas. A fotossíntese é o processo físico-químico para o crescimento das plantas, a qual é influenciada por fatores ambientais e por aleloquímicos (ZHOU e YU, 2006).

Segundo Chou (1999), certas classes de aleloquímicos interferem na fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas. Rizvi *et al.* (1992) citam os ácidos fenólicos, às cumarinas, os polifenóis e os flavonoides, presentes em *Piper*, como os principais aleloquímicos responsáveis pela inibição da fotossíntese, por alterarem o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas.

### 6.4. Ensaio de atividade antimicrobiana

Os resultados dos testes antibacterianos indicaram que o extrato bruto de *P.callosum* não apresentou atividade antimicrobiana para as seguintes linhagens testadas, conforme tabela abaixo:

Tabela 4 - Ensaio de atividade antimicrobiana utilizando o extrato bruto das folhas de *P. callosum* e clorafenicol.

Cepas	Produto testado/ concentração/ tamanho do halo (cm)		
	<i>P. callosum</i> Extrato bruto (FEB) 100 mg/ mL	Clorafenicol Controle positivo 30 µg/ MI	Clorafenicol Controle negativo Solvente
ATCC 25922	-	3,1	0
ATCC 27853	-	1,8	0
ATCC 14028	-	3,1	0
ATCC 6538	-	3,2	0
ATCC 12228	-	4,2	0

(-) não apresentou halo de inibição

O resultado antimicrobiano do extrato das folhas de *Piper callosum* mostrou que essas folhas não possuem a atividade antimicrobiana, divergindo do gênero a que pertence. Já que, segundo Silva *et al.* (1992), este gênero é caracterizado pelas diversas atividades biológicas dos compostos terpênicos, dentre eles a atividade antimicrobiana.

## 7. CONCLUSÃO

As características morfoanatômicas descritas para a folha, tais como, hipoestomáticas e elípticas, apresentam tricomas glandulares na epiderme, e com mesófilo composto por parênquima clorofiliano homogêneo, hipoderme em ambas as faces e idioblastos secretores que se distribuem pelo mesófilo, geralmente alinhados na epiderme, contribuem na identificação de *P. callosum*. Apresenta resultados histoquímicos positivos para compostos fenólicos e lipídeos totais. Conclui-se também que a fração FAC, em todas as concentrações, interferiu na germinação, IVG e crescimento inicial das plântulas de alface e cebola. O extrato de *P. callosum* não possui atividade antimicrobiana sobre as cepas testadas.

## REFERÊNCIAS

- ALBIERO, A. L. M. *et. al.* Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B. & K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**. v. 19, n. 2, p. 305-312. 2005a.
- ALBIERO, A. L. M.; *et. al.* Morfoanatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 24, n. 4, p. 550-554. 2005b
- ALMEIDA, F. S. A. Alelopatia e as Plantas, **IAPAR, Londrina**. p. 60. 1988
- ALVES-ARAÚJO, A.; SANTOS. F. A.; ALVES. M. Caracterização palinológica de espécies de *Amaryllidaceae sensu stricto* ocorrentes no nordeste brasileiro. **Acta Bot Bras**. v. 21, n. 4, p. 967-976. 2007
- AN, M.; JOHNSON, I. R.; LOVETTE, J. V. Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemical and its interpretation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 10, p. 2379- 2389. 1993.
- ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de *Piper* da Amazônia. **FEC/UFPA, Belém**. 2009.
- ANDRADE, E. H. A. *et. al.* Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. **Rich. Biochem. Syst. Ecol.** v. 39, n. 4, p. 669-675. 2011
- AYRES, V. F. S. *et. al.* Prospecção química e toxicidade do extrato bruto e óleo essencial de *Piper callosum*, coletada em Itacoatiara-AM, frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **XXIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. 2014.
- BARBER, M. Staphylococcal infection due to penicillin-resistant strains. **Br Med J**.v. 2, n. 4534, p. 863-65. 1947
- BARKOSKY, R. R.; EINHILLIG, F. A. Effect of salicylic acid on plant-water relationships. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.19, n.2, p.237-247, 1993.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. **Low a State University, Eames**, 1976.
- BOOKER, F. L.; BLUM, U.; FISCUS, E. L. Short-term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. **Journal of Experimental Botany, Oxford**, v.43, n.250, p.649-655, 1992.
- CARRIJO, T. T. *et. al.* Pollen morphology of some related genera of Vernoniaeae (Asteraceae) and its taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution**. v. 299, p. 1275-1283. 2013.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência tecnologia e produção. **Campinas: Fundação Cargill**. p. 326. 1980,

- CARVALHO, S. I. C. Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Bandeirante. p. 72. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.** 1993.
- CARVALHO-SILVA, M. *et. al.* Two new species of *Piper* section *Otonia* (Piperaceae) from southeastern Brazil. ***Phytotaxa***. v. 212, n.4, p. 293–299. 2015.
- CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. v. 1, n. 13, p. 520-29. 2011
- CHOU, C. H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **CRC Crit Rev Plant Sci**. v. 18, n. 5, p. 609-30. 1999.
- DANELUTTE, A. P. *et. al.* Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. **Phytochemistry**, n. 64, p. 555-559. 2003.
- DAVID, R.; CARDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif *Nadi*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences Paris. Série D**. v. 258, p. 1338–1340. 1964.
- DELACHIAVE, M. E. A.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Efeitos alelopáticos de losna (*Artemisia absinthium* L.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 21, n. 1, p. 265-269. 1999.
- DEVI, S. R.; PRASAD, M. N. V. Effect of ferulic acid on growth and hydrolytic enzyme activities of germinating maize seeds. **Journal of Chemical Ecology, New York**, v.18, n.11, p.1981-1990, 1992.
- DI STASI, L. C. *et. al.* Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. **2a. Ed. São Paulo SP. Editora UNESP.** 2002.
- DURIGAM, J. C., ALMEIDA, F. L. S. Noções sobre alelopatia. Jaboticabal: **FUNEP**. p. 28. 1993.
- EINHELLIG, F. A. Allelopathy: current status and future goals. In: INDERJIT, DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A. Allelopathy: organisms, processes and applications. Washington. p. 1-24. (**ACS. Symposium Series**, 582). 1995
- EINHELLING, F. A., Interaction involving allelopathy in cropping systems. **Agron J**, v. 88, n. 6, p. 886-893. 1996.

- FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; FILHO, R.B. Flavonóides de *Piper callosum* da Amazônia. 2004. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/anteriores/23/resumos/0765-2>. Acesso em: 18 de abril de 2019.
- FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of *Cymbidioid orchids*. **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, p. 957–978. 2000.
- FERREIRA, A. G. & BORGHETTI, F. Germinação do básico ao aplicado. **Porto Alegre: Artmed**. p. 323. 2004.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **R. Bras.Fisiol.Veg. (Edição Especial)**. v. 12, p. 175 – 204. 2000.
- FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany**. v. 85, p. 455-460. 2000.
- FILHO, A. L. M. *et. al.* Avaliação do potencial alelopático de capim – santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) sobre o desenvolvimento inicial de alface (*Lactuca sativa* L.). **Ensaios e Ciência. Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 12. 2012.
- FISHER, D. B. **Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy histochemie**, v. 16, p. 92-96. 1968.
- FLUEGGE, K. *et. al.* Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a South Western region of Germany. **European journal of pediatrics**. v. 165, n. 10, p. 688-90. 2006.
- GOGOSZ, A. M. *et. al.* Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (*Piperaceae*). **Rodriguésia**. v. 63, n. 2, p. 405-417. 2012.
- GOODMAN e GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 120, n. 3 – 4, p. 339–350. 2008.
- GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M. Piperaceae *In: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. **São Paulo: Instituto de Botânica**. v. 72009.
- HARBONE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 3<sup>a</sup> ed. Academic Press, London. p. 383. 1988.
- HEGNAUER, R. Cheomotaxonomie der Planzen. Basel, **Berkhauser-Verlag**, p. 311-324. 1996.
- HEJL, A. M.; EINHILLIG, F. A.; RASMUSSEN, J. A. Effect of juglone on growth, photosynthesis and respiration. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.19, n.3, p.559-568. 1993.



- HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledoneas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Buenos Aires. v. 16, n. 1-2, p. 1-26, 1974.
- HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants. 3th ed.**, London, Claredon Press. 1973.
- INDERJIT e DAKSHINI, K. M. M. Allelopathic effect of *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) on characteristics of four soils and tomato and mustard growth. **American Journal of Botany**. v. 81, p. 799-804. 1992.
- INDERJIT e DAKSHINI, K. M. M. Interference potencial of *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) growth and physiological responses of asparagus bean, *Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis*. **American Journal of Botany**. v. 79, p. 977-981. 1992.
- INDERJIT e DAKSHINI, K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**. v. 61, p. 28-44. 1995.
- JARAMILLO, M. A. *et. al.* A phylogeny of the tropical genus *Piper* using ITS and the chloroplast intron psbJ–petA. **Systematic Botany**. v. 33, p. 647–660. 2008.
- JEONG, D. H. *et. al.* Anti-inflammatory activity of methanol extract and n-hexane fraction mojabanchromanol b from *Myagropsis myagroides*. **Life Sci**. v. 114, n. 1, p. 12-19. 2014.
- JEVONS, M. P. Celbenin-resistant staphylococci. **British Medical Journal**. v. 1, n. 5219, p. 124-25. 1961.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.
- JR. OLIVEIRA, R. S. de *et al.* (Eds.), **Biologia e Manejo de plantas Daninhas**. 2011
- KING, S. R. e AMBIKA, R. Allelopathic plants. 5. *Chromolaena odorata* (L.). **Allelopathy Journal**. v. 9, p. 35-41. 2002.
- KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido.5. ed.** Rio de Janeiro: Guanabaran. 2001.
- LIMA, I. O. *et. al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Rev Bras Farmacogn**. v.16, n. 2, p. 197 - 201. 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP. **Instituto Plantarum**. p. 512. 2002.
- LUNA, B. N. *et. al.* Comparative leaf anatomy of neotropical *Stylogyne* species (Myrsinoideae-Primulaceae). **Rodriguésia** v. 64, p. 717 – 726. 2013.
- MACHADO, N. S. O. *et. al.* Comparative anatomy of the leaves of *Piper lepturum* (Kunth) C.DC. var. *lepturum* and *Piper lepturum* var. *angustifolium* (C.DC.) **Yunck. Hoehnea** v. 42, p. 01 – 08. 2015.

- 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. p. 103. 2007.
- MACIAS, F. A. *et. al.* Bioactive norsesquiterpenos from *Helianthus annuus* with potencial allelopathic activity. **Phytochemistry**. v. 49, n.3, p. 709 - 717. 1998.
- MACÍAS, F.A. *et. al.* **Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press, 2005.
- MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 13, n. 1, p. 55-65. 2001.
- MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Belém, PA. **Museu Paraense Emílio Goeldi**. 2000.
- MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. **In: YNES, R. A., CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos. p. 503-523. 2001.
- MARINHO, C. R.; ZACARO, A. A.; VENTRELLA, M. C. Secretory cells in *Piper umbellatum* (Piperaceae) leaves: a new example for the development of idioblasts. **Flora – Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**. v. 206, n. 12, p. 1052-1062. 2011.
- MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948.
- MEDEIROS, A. R. M. **Alelopatia: Importância e suas aplicações**. Horti Sul. v. 1, n. 3, p. 27 – 32. 1990.
- MENDIBURU, F. Package ‘agricolae’, Statistical Procedures for Agricultural Research. **R package version**. v. 1, p. 2-8. 2017.
- MGBEAHURUIKE, E. E. *et. al.* Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 54-69. 2017.
- MOLISCH, H. **Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie**. Jena, Fischer. 1937.
- MOREIRA D. L.; KAPLAN M. A. C.; GUIMARÃES E. F. Essential oil of two *Piper* species (Piperaceae). **An. Acad. Bras. Ci.** v. 70, n. 4, p. 151-154. 1998.
- MOURELLE, D. *et. al.* Comparative pollen morphology and viability among endangered species of *Butia* (Arecaceae) and its implications for species delimitation and conservation. **Palynology**. v. 40, p. 160–171. 2016.

- NEGI, B. S.; DAVE, B. P.; AGARWAL, Y. K. Evaluation of Antimicrobial Activity of Bauhinia purpurea Leaves Under In Vitro Conditions. **Indian J Microbiol.** v. 52, n. 3, p. 360 - 65. 2012.
- NUNES, J. D. *et. al.* Cytogenetics of *Piper hispidinervum* and *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v. 42, p. 1049 – 1052. 2007.
- O'BRIEN T. P.; MCCULLY, M. E. 'The study of plant structure: principles and selected methods.' (Termarcarphi PTY. LTD: Melbourne). 1981.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. **Protoplasma.** v. 59. p. 368 – 373, 1964.
- OKSANEN, J. *et. al.* Vegan: Community Ecology Package. **R package version 2.0-10.** 2013.
- OSTROSKY, E. A. *et. al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia,** v.18, p.301-307. 2008.
- PARMAR, V. S. *et. al.* Phytochemistry of the genus *Piper*.**Phytochemistry.** v. 46, p. 597–673. 1997.
- PAULA, C.S. *et. al.* Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 35, n. 1, p. 47-52. 2014.
- PESSINI, G. L. *et. al.* **Acta Farma Bonaerense.** v. 22, p. 209-216 .2003
- PIRES, N. M. *et. al.* Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.** v. 13, n. 1, p. 55 - 65. 2001.
- PRATES, H. T. *et. al.* Efeito do extrato aquoso de *Leucena* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília,** v. 35, n. 5, p. 909 – 914. 2000.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing,** Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acessado em: 13 de outubro de 2018.
- RATES, S. M.; CHAVES, C. G.; VON POSER, G. L. Investigation of local anesthetic effect and toxicity of *Ottonia propinqua* (Piperaceae). **Acta Farm. Bonoarense.** v. 16, n. 2, p. 113-116, 1997.
- REIGOSA, M. J. **Allelopathy: A physiological process with ecological implications,** Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p.127-39. 2006.
- RICE, E. L. **Allelopathy. 2. Ed. New York: Academic,** p. 422. 1984.

- RIZVI, S. J. H. *et al.* A discipline called allelopathy. In: Rizvi SJH, Rizvi H. (Eds.) **Allelopathy: Basic and applied aspects**. London: Chapman & Hall. p. 1-10. 1992.
- RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D.; REIS, R. A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: FCAVJ – UNESP/ FUNEP. p. 18. 1992.
- ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**. v. 6, p. 33–36. 1972.
- RORIG, L. R.; POSER, G. L. V. *Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae*. **Farm**, v. 72, n. 1, p. 15-17. 1991.
- SALVAGNINI, L. E. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, nº 2, p. 241-244, 2008.
- SASS, J. E. Botanical microtechnique. **Dress, Ames: Iowa Stat College**. p. 228. 1951.
- SCHUBERT, H. K. *et al.* A Systematic Revision of the Genus *Manekia* (Piperaceae). **Systematic Botany**.v. 37, p. 587–598. 2012..
- SILVA, E. M. J.; MACHADO, S. R. **Rev. Bras. Bot.** v. 22, p. 117-24. 1999
- SILVA, J. K. R. *et al.* Antioxidant capacity and larvicidal and antifungal activities of essential oils and extracts from *Piper krukoffii*. **Nat. Prod. Commun.** v. 6, n. 9, p. 1361–1366. 2011.
- SILVA, M. *et al.* **Química de los triterpenos**. Washington D. C. Secretaria General de la Organizacion de los Estados Americanos, p. 327-331, 1992
- SILVA, R. J. F. *et al.* Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: valuable assessment for its quality control. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 20-33, Feb. 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102695X2017000100020&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2017000100020&lng=en&nrm=iso)>. Acessado em 27 de Junho de 2019.
- SCOOT, I. M. *et al.* A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochem Rev.** v. 7, p. 65. 2008.
- SOUSA, P. J. C. *et al.* Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 217-221. 2008.
- SOUZA FILHO, A. P. S. *et al.* Atividade Potencialmente Alelopática do Óleo Essencial de *Ocimum americanum*. **Planta Daninha, Viçosa-MG**, v. 27, n. 3, p. 499-505, 2009.
- SOUZA FILHO, A. P. S. *et al.* Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 24, n. 4, p. 649-656, out. / dez. 2006.

- SOUZA FILHO, A. P. S. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 24, no. 3, p. 607-610, jul. / set. 2006.
- SOUZA, I. F. Alelopatia de plantas daninhas. **Informe agropecuário, Belo Horizonte**. v. 13, n. 150, p. 75-78. 1988.
- SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; OLIVEIRA, J. H. G. **Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii* C.DC., *Ottonia martiana* MIQ. and *Piper diospyrifolium* Kunth (Piperaceae).** **Gayana Botánica**. v. 61, p. 6-17. 2004.
- SOUZA, L. A. *et. al.* Estudo morfoanatômico da folha e do caule de *Piper arboreum* Aubl. (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 28, p. 103-107. 2009.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. “Botânica sistemática - Guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II”. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa**. 2005.
- TAIZ, L. *et. al.* **Fisiologia e Desenvolvimento vegetal**. 6ª. Ed. Artmed Editora LTDA. Santana. 2017
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
- THE PLANT LIST. 2013. Version 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Piperaceae/>. Acesso em: 17/06/2019.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais**. 2a. Ed. São Paulo, SP. Editora Ceres. 1992.
- VYVYAN, J. R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron, Philadelphia**, v. 58, n. 1, p. 1631-1646, jan. / mar. 2002.
- YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil - **I. Hoehnea**. v. 2, p. 19-366. 1972.
- YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil - **II. Hoehnea**. v. 3, p. 29-284. 1973.
- ZHOU Y. H; YU, J. Q. Allelochemicals and photosynthesis. **In: Reigosa MJ, Pedrol N, González L (Eds.). Allelopathy: A physiological process with ecological implications**, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p.127-39. 2006.