

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA – ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ILCA FABIANE NOGUEIRA AMANCIO

Avaliação da resposta fisiológica de *Fusarium* sp. exposto a extratos brutos, frações e amida isolada de espécies do gênero *Piper*.

Araraquara
2023

ILCA FABIANE NOGUEIRA AMANCIO

Avaliação da resposta fisiológica de *Fusarium* sp. exposto a extratos brutos, frações e amida isolada de espécies do gênero *Piper*.

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Regildo Marcio
Gonçalves da Silva
Co-orientador: Profa. Dra Maysa
Furlan

A484a

Amancio, Ilca Fabiane Nogueira

Avaliação da resposta fisiológica de *Fusarium* sp. exposto a extratos brutos, frações e amida isolada de espécies do gênero *Piper* / Ilca Fabiane Nogueira Amancio. -- Araraquara, 2023
97 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Regildo Marcio Gonçalves da Silva

Coorientadora: Maysa Furlan

1. *Fusarium*. 2. Estresse Oxidativo. 3. Extratos vegetais. 4.
Fungicidas. 5. Antioxidantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

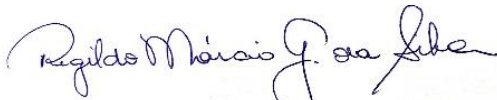
TÍTULO DA TESE: "Avaliação da resposta fisiológica de *Fusarium* sp exposto a extratos brutos, frações e amida isolada de espécies do gênero *Piper*."

AUTORA: ILCA FABIANE NOGUEIRA AMANCIO

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

COORIENTADORA: MAYSIA FURLAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



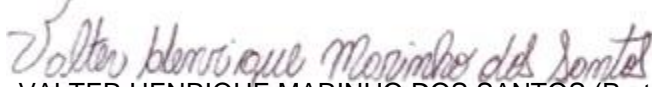
Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP - Assis



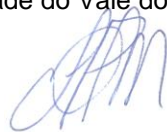
Prof. Dr. MATHIAS AHI CHIA (Participação Virtual)
Department of Botany / Ahmadu Bello University - ABU - Nigéria



Prof.^a Dr.^a PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro



Prof. Dr. VALTER HENRIQUE MARINHO DOS SANTOS (Participação Virtual)
Universidade do Vale do Sapucaí - UNIVAS - Pouso Alegre



Prof. Dr. LEVI POMPERMAYER MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro

Araraquara, 03 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES

Endereço profissional

Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista
Rua Prefeito Jayme Monteiro, 791
Centro - Paraguaçu Paulista
19700000, SP - Brasil

Endereço eletrônico

lfn.amancio@unesp.br
i.f.n.amancio@gmail.com

Formação acadêmica

- 1993 - 1996 Graduação
Licenciatura em Ciências Biológicas.
Faculdade de Ciências e Letras de Assis.
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
(UNESP)-FCL-Câmpus de Assis.
- 1999 - 2002 Mestrado
Microbiologia Aplicada
Instituto de Biociências (IB) - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Câmpus de Rio Claro.
Título: Efeito dos Parâmetros Físicos e Químicos no
metabolismo dos carboidratos de reserva de *Saccharomyces*
cerevisiae.
Orientador: Dr. Pedro de Oliva Neto
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo
- 2018 - 2023 Doutorado
Biotecnologia Industrial e Ambiental
Instituto de Química (IQ) - Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” (UNESP) Câmpus de Araraquara.
Título: Avaliação da resposta fisiológica de *Fusarium* sp exposto
a amidas isoladas de espécies do gênero *Piper*.
Orientador: Dr. Regildo Marcio Gonçalves da Silva
Co-orientador: Dra. Mayza Furlan
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior– Processo nº 88887.471750/2019-00

Formação complementar

- 2020 - 2020 Curso de curta duração em Introdução à Nanobiotecnologia.
(Carga horária: 4h). EMBRAPA-Recursos Genéticos e
Biotecnologia.
- 2019 - 2019 Curso de curta duração em Redação de Patentes, além dos guias
+ oficinas práticas. (Carga horária: 12h). Faculdade de Ciências
e Letras-Câmpus de Assis.

Atuação profissional

- 2002 - Atual Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista (ESAPP)
Vínculo: Professor
Informações: Ensino, Pesquisa e Desenvolvimento
- 2018-2019 Escola Técnica Pedro D'Arcadia Neto (ETEC)
Vínculo: Professor
- 2020 -2022 UNESP-Faculdade de Ciências e Letras de Assis (UNESP)
Vínculo: Bolsista-doutorado
Outras informações: Biotecnologia de Produtos naturais

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Silva, R. M. G.; Amâncio, I. F. N.; Andrade, A. R.; Marinho, V. H. S.; Santiago, P. S.; Oliveira, F. O.; Figueiredo, C. C.M.; Silva, L, P. Phytotoxic, cytogenotoxic, and insecticidal activities of compounds from extracts of freshwater *Lyngbya* sp. JOURNAL OF TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL HEALTH-PART A-CURRENT ISSUES., v.85, p.881 - 895, 2022.

Apresentação de trabalho e/ou palestra

1. AMANCIO, I.F.N.; SILVA, R. M. G. Avaliação de extratos vegetais de *Piper arboreum* com possível ação fungicida em *Fusarium* sp., 2022. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. AMANCIO, I.F.N.; REZENDE, G. C.; BERTAO, M. R. Prospecção de fungos micorrizicos em *Cattleya nobilior.*, 2022. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. AMANCIO, I.F.N.; Silva, R.M.G.; FIGUEIREDO, C. C. M. Potencial antioxidante e composição polifenólica de extrato de *Lyngbya majuscula.*, 2020. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. NOGUEIRA, I. F.; MECINA. G.F.; Andrade, A.R.; Silva, L.P.; Silva, R.M.G. Evaluation of Phytotoxic Potential of Extracts of *Lyngbya Majuscula*, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

1. AMANCIO, I.F.N. Parecerista do XXXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2022.
2. NOGUEIRA, I. F. Parecerista do XXXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2019.

Participação em bancas

Graduação

1. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Felipe Fernandes Canos. Atividade antioxidante e microencapsulação do extrato enriquecido em antocianinas do fruto (casca e polpa) de *Chrysophyllum cainito* L., 2022. (Engenharia Biotecnológica) Universidade Estadual Paulista- FCL Campus de Assis.

2. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Fernanda Borda Attie Vieira. Comparação entre tecnologias de produção de etanol a partir do milho e da cana-de-açúcar, 2022. (Engenharia Biotecnológica) Universidade Estadual Paulista- FCL Campus de Assis.

3. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Jade Francisco Weinem. Estudo de viabilidade econômica para diferentes pré-tratamentos da biomassa da cana-de-açúcar na produção de etanol de segunda geração., 2022. (Engenharia Biotecnológica) Universidade Estadual Paulista- FCL Campus de Assis.

4. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Gustavo Wolfarth Silva. Estudos biotecnológicos do Chichá (*Sterculi striata* A. St. Hill. & Naudin): metodologias para obtenção de plantas e calos in vitro., 2022. (Engenharia Biotecnológica) Universidade Estadual Paulista- FCL Campus de Assis.

5. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Debora Sayuri Yamada. O uso dos óleos essenciais na estética., 2022. (Engenharia Biotecnológica) Universidade Estadual Paulista- FCL Campus de Assis.

6. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Henrique Magosso Ribeiro Homem. Uso de fotoprotetores para a prevenção de desordens cutâneas e correlações com a produção de vitamina D, 2022. (Engenharia Biotecnológica) Universidade Estadual Paulista- FCL Campus de Assis.

7. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Tamiris Machado Kobayase. Caracterização da mucilagem de ora-pro-nobis e produção de filmes biodegradáveis em combinação com aditivos glicerol e sorbitol., 2021. (Engenharia Biotecnológica) UNESP-FCL-Câmpus de Assis.

8. AMANCIO, I.F.N. Participação em banca de Lucas da Silva Visoná. Desenvolvimento de método de obtenção de explante de sementes e plântulas de *Glycine max* como fonte de compostos ativos com potencial antioxidante e antiglicante., 2021. (Engenharia Biotecnológica) Universidade Estadual Paulista- FCL Campus de Assis.

9. NOGUEIRA, I. F.; Lourenço, C.R.; SILVA, A. J. Participação em banca de Fernando da Silva Soares. Análise da incidência do fungo *Fusarium* sp em sementes de milho (*Zea mays*) tratadas com extrato aquoso de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-india)., 2018. (Engenharia Agrônômica) Faculdades Gammon.

Participação em eventos científicos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) III Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas, 2022. Avaliação de extratos vegetais de *Piper arboreum* com possível ação fungicida em *Fusarium* sp.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXXIV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2022. Prospecção de fungos micorrizicos em *Cattleya nobilior*.

3. BIOFITO-Congresso Internacional Online de Biocosméticos e Fitoprodutos., 2020.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) CONAC-Congresso Online Nacional de Cosmetologia, 2020. Potencial antioxidante e composição polifenólica de extrato de *Lyngbya masjuscita*.
5. II CONDEQUI-Congresso Online Nacional de Química, 2020.
6. XV Symposium of Biosciences and Biotechnology Applied to Pharmacy., 2020.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) 7th Brazilian Biotechnology Congress, 2018. Evaluation of Phytotoxic Potential of Extracts of *Lyngbya Majuscula*.

Apresentação de trabalho e palestra

1. AMANCIO, I.F.N.; SILVA, R. M. G. Avaliação de extratos vegetais de *Piper arboreum* com possível ação fungicida em *Fusarium* sp., 2022. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. NOGUEIRA, I. F.; MECINA. G.F.; Andrade, A.R.; Silva, L.P.; Silva, R.M.G. Evaluation of Phytotoxic Potential of Extracts of *Lyngbya Majuscula*, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) III Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas, 2022. Avaliação de extratos vegetais de *Piper arboreum* com possível ação fungicida em *Fusarium* sp.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) CONAC-Congresso Online Nacional de Cosmetologia, 2020. Potencial antioxidante e composição polifenólica de extrato de *Lyngbya masjuscita*.

Orientações

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Fernando da Silva Soares. Análise da incidência do fungo *Fusarium* sp em sementes de milho (*Zea mays*) tratadas com extrato aquoso de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-india). 2018. Curso (Engenharia agrônômica) - Faculdades Gammon.
2. Guilherme Gomes de Lima. Avaliação do Potencial Fungicida de Extrato Aquoso de *Syzygium aromaticum* (cravo da índia) sobre o Fungo *Fusarium* sp. 2018. Curso (Engenharia Agrônômica) - Faculdades Gammon.

Dedico e agradeço aos meus pais, Lourdes (in memoriam) e Nelson (in memoriam), aos meus irmãos e sobrinhos, ao meu esposo José Amâncio Neto e ao meu filho Thiago, por todo exemplo, apoio e confiança que sempre recebi de todos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo alento e força recebidos nos momentos de dificuldades.

A Nossa Senhora por sua proteção e intercessão.

Aos meus pais (*in memoriam*), meus irmãos e sobrinhos que sempre me incentivaram e apoiaram para que eu alcançasse meus objetivos.

A meu esposo que sempre foi o melhor companheiro e me passou muita força, equilíbrio e serenidade para que eu pudesse transpassar pelos obstáculos que surgiram.

Ao meu orientador, Dr. Regildo Marcio Gonçalves da Silva, e a minha coorientadora, Dra. Maysa Furlan, que abriram as portas, mostrando-me a magnitude da área da biotecnologia em especial aos produtos naturais e fazendo com que meu caminho profissional tomasse um novo rumo.

A toda equipe do Fitolab em especial à Célia Cristina Malagutti Figueiredo, que foi companheira não somente de pesquisa, mas principalmente nas dificuldades, e que foram imensas. E aos alunos do Nubbe, no Instituto de Química, pelas contribuições.

A todos os funcionários e professores da Faculdade de Ciências e Letras de Assis e do Instituto de Química, por serem tão solícitos e gentis em todos os momentos em que necessitei de vossas colaborações. Em especial a professora Dra. Monica Rosa Bertão e os Funcionários Allan Chiea de Souza e Sérgio Pereira de Moraes por toda contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Aos meus amigos, em especial a Daniele Cristina Ferrarezi Barbosa que me deu apoio e incentivo para que esse sonho se realizasse.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e torceram por mim, meus sinceros agradecimentos,

Muito obrigada!

Amancio, Ilca Fabiane Nogueira. **Avaliação da resposta fisiológica de *Fusarium* sp. exposto a extratos brutos, frações e amida isolada de espécies do gênero *Piper***. 2023. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2023.

RESUMO

As espécies do gênero *Piper* caracterizam-se por apresentar alta diversidade química relacionada as diferentes classes de metabólitos secundários, tais com amidas isobutílicas, piperidínicas e pirrolidínicas, cromenos, derivados prenilados do ácido benzoico, flavonoides, lignanas, fenilpropanoides, terpenos, entre outros. Várias amidas foram isoladas de espécies do gênero *Piper* e estas atraem interesse para aplicação agrícola, pois tem demonstrado propriedades inseticidas e fungicidas. *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* contém amidas que apresentaram atividade antifúngica contra o fungo do gênero *Cladosporium*. Diante disso este estudo teve por objetivo avaliar o potencial antifúngico dos extratos brutos, frações e amida isolada de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* sobre cultura *in vitro* de fungo do gênero *Fusarium* sp. Investigou o mecanismo de ação antifúngico por meio da determinação da atividade pró e oxidativa dos extratos, frações e compostos isolados sobre cultura de *Fusarium* sp. exposta aos mesmos, por meio da determinação das enzimas antioxidantes. Na avaliação antifúngica por meio de cultura em placas os extratos e frações inibiram o crescimento das culturas expostas aos mesmos. Estes, resultados corroboram com os ensaios de microdilução e fermentação submerça, destacando-se a espécie *P. tuberculatum*. Os ensaios pró-oxidantes e de determinação das enzimas antioxidantes em cultura de *Fusarium* sp. expostas aos extratos, fração e amida isolada de *P. tuberculatum* resultaram em um possível mecanismo de ação para estes compostos, pois tanto a ação pró como a oxidativa foi aumentada nas culturas tratadas, o que resultou na diminuição considerável do crescimento micelial e da biomassa final da cultura. Perante o exposto é possível concluir que as espécies do gênero *Piper* avaliadas neste estudo apresentaram potencial para inibição do crescimento micelial em cultura de *Fusarium* sp. Os extratos, frações e amida demonstraram atividades antifúngicas e/ou fungistáticas, sendo a atividade pró-oxidativa e oxidante possivelmente seu principal mecanismo de ação.

Palavras chave: Crescimento Micelial, Estresse Oxidativo, Fungistático, Fungicida, Piplartina.

Amancio, Ilca Fabiane Nogueira. **Avaliação da resposta fisiológica de *Fusarium* sp. exposto a extratos brutos, frações e amida isolada de espécies do gênero *Piper*.** 2023. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2023.

ABSTRACT

Species of the genus *Piper* are characterized by high chemical diversity related to different classes of secondary metabolites, such as isobutyl, piperidine and pyrrolidine amides, chromenes, prenylated derivatives of benzoic acid, flavonoids, lignans, phenylpropanoids, terpenes, among others. Several amides have been isolated from species of the genus *Piper* and these are of interest for agricultural application, as they have demonstrated insecticidal and fungicidal properties. *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* contain amides that showed antifungal activity against the fungus of the genus *Cladosporium*. Therefore, this study aimed to evaluate the antifungal potential of crude extracts, fractions and isolated amide of *P. arboreum* and *P. tuberculatum* on in vitro culture of fungus of the genus *Fusarium* sp. Investigated the mechanism of antifungal action by determining the pro and oxidative activity of extracts, fractions and compounds isolated on *Fusarium* sp. culture exposed to them, by means of the determination of antioxidant enzymes. In the antifungal evaluation through plate culture, the extracts and fractions inhibited growth in cultures exposed to them, similar results were also observed for the microdulation and submerged fermentation assays, with emphasis on the *P. tuberculatum* species. The pro-oxidant assays and determination of antioxidant enzymes in *Fusarium* sp. culture exposed to extracts, fraction and isolated amide of *P. tuberculatum* resulted in a possible mechanism of action for these compounds, since both the pro and oxidative action was increased in the treated cultures, which resulted in a considerable decrease in mycelial growth and in the final biomass of the culture. Given this, it is possible to conclude that the species of the genus *Piper* evaluated in this study showed potential for inhibiting mycelial growth in *Fusarium* sp. The extracts, fractions and amide demonstrated antifungal and/or fungistatic activities, with pro-oxidative and oxidant activity possibly being its main mechanism of action.

Keywords: Mycelial Growth, Oxidative Stress, Fungistatic, Fungicide, Piplartine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Vista parcial do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil, e espécies de *Piper* inventariadas. (a= vista do Alto Mourão e Costão de Itacoatiara; b= *P. aduncum*; c= *P. amalago*; d= *P. amplum*; e= *P. anisum*; f= inflorescência de *P. anisum*; g. lâmina foliar de *P. arboreum* var. *arboreum*; h= base da lâmina foliar de *P. arboreum* var. *arboreum*; i= *P. arboreum* var. *hirtelum*; j= *P. divaricatum*; k= *P. hoffmannseggianum*; l= *P. hoffmannseggianum*; m= *P. klotzschianum*; n= *P. mollicomum*; o= *P. rivinoides*; p= *P. tuberculatum*.)..... 25
- Figura 2** - *Piper arboreum* var. *arboreum*. Bainha sulcada, estendendo-se até o nível basal da lâmina, nota-se extremidade superior da bainha sobreposta à lâmina foliar (2, 3. *Piper tuberculatum* var. *tuberculatum*. Bainha circinada vista pela face abaxial e base assimétrica da lâmina foliar. Face adaxial da bainha com emergências secretoras. Barras: **Fig.1** = 1 cm; **Figs 2, 3** = 5 mm) 27
- Figura 3** - Características macroscópicas das drogas vegetais foliares de *Piper arboreum* (Piperaceae) (Fotomicrografias (A-E; M). Fotomicrografias estereoscópicas por contraste de interferência diferencial (F). Desenho em planta baixa (G). Fotomicrografias estereoscópicas por luz refletida (H; J-L). Fotomicrografias por luz transmitida (I). A. Aspecto morfológico geral. B-E. Drogas vegetais hidratadas. B. Visão geral da folha. C. Ápice. D. Margem. E. Base, notar inserção do pecíolo (seta). F. Superfície de fratura da lâmina foliar. G-I. Padrões de venação foliar. G. Padrão geral de venação, notar arco de nervuras secundárias (elipse) e nervuras intersecundárias (setas). H. Detalhe das aréolas e vênulas. I. Venação última marginal, notar vênulas livres (setas). J. Visão geral da face abaxial do pecíolo e bainha foliar, notar fissuras (asteriscos) e estrias longitudinais (setas). K. Secção transversal do pecíolo, notar elementos lignificados (asteriscos). L. Detalhe da bainha foliar, notar protuberâncias (setas). M. Droga vegetal pulverizada. Face adaxial (fad). Face abaxial (fab). Fratura (f). Superfície de fratura (sf). Bainha foliar (baf). Vênula simples linear (l). Vênula simples curva (c). Vênula ramificada uma vez (b1), duas vezes (b2) e três vezes (b3). Margem (mg). Esta figura é colorida na versão eletrônica) 29
- Figura 4** - Características macroscópicas das drogas vegetais foliares de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae). (Fotomicrografias (A-E; O). Fotomicrografias estereoscópicas por contraste de interferência diferencial (F). Desenho em planta baixa (G). Fotomicrografias por luz transmitida (H; I). Fotomicrografias estereoscópicas por luz refletida (J-N). A. Aspecto morfológico geral. B-E. Drogas vegetais hidratadas. B. Visão geral da folha. C. Ápice. D. Margem. E. Base, notar inserção do pecíolo (seta). F. Superfície de fratura da lâmina foliar. G-I. Padrões de venação

	foliar. G. Padrão geral de venação, notar nervuras intersecundárias (setas). H. Detalhe das aréolas e vênulas. I. Venação última marginal, notar lóbulo (seta). J e K. Visão geral do pecíolo e bainha foliar, notar emergências (setas). Pecíolos reto (J) e curvo (K). L e M. Detalhes do pecíolo. L. Superfície da face abaxial, notar estrias longitudinais (setas). M. Secção transversal, notar elementos lignificados (asteriscos). N. Detalhe da face adaxial da bainha foliar, notar estrias longitudinais (setas). O. Droga vegetal pulverizada. Face abaxial (fab). Fratura (f). Superfície de fratura (sf). Bainha foliar (baf). Vênula simples curva (c). Vênula ramificada uma vez (b1), duas vezes (b2) e três vezes (b3). Margem (mg). Esta figura é colorida na versão eletrônica)	30
Figura 5	- Antifungal metabolites isolated from <i>Piper tuberculatum</i> (Piperina (1), 4,5-diidropiperlonguminina (2), fagaramida (3), diidropiplartina (4) e pellitorina (5)	32
Figura 6	- Amidas isoladas de Piper.....	33
Figura 7	- Estruturais químicas das amidas detectadas por CLAE-EM/EM...	35
Figura 8	- Fungos isolados de <i>Fusarium</i> sp.....	36
Figura 9	- Conídios de <i>Fusarium</i> sp.....	37
Figura 10	- Esquema geral do ciclo de vida do gênero <i>Fusarium</i> sp.....	38
Figura 11	- Sintomas das doenças provovadas por <i>Fusarium</i> sp. nas principais culturas. ((A, B e C) Fusariose e podridão das raízes do milho; (D) Fusariose em trigo; (E) Fusariose em tomate; (F) Mal do Panamá em banana; (G) <i>Fusarium</i> sp. em couve; (H) Podridão dos bulbos de alho; (I) <i>Fusarium</i> sp. em cenoura)	39
Figura 12	- Parte arbórea (A) e detalhes das partes aéreas (folhas e frutos) (B) de <i>Piper arboreum</i> , parte arbórea (C) e detalhes das partes aéreas (folhas) (D) de <i>Piper tuberculatum</i>	42
Figura 13	- Processo de obtenção do extrato bruto das duas espécies estudadas. (A) raiz (B) caule e (C) folhas secas em estufa, (D) material pulverizado em moinho de facas, (E) extração em álcool etílico, (F) filtração sob pressão, (G) concentração do extrato em rotaevaporador e (H) extrato bruto.....	43
Figura 14	- Esquema dos poços perfurados próximos a extremidade da placa e preenchidos com alíquotas de 10 µL, 20 µL e 50 µL de extratos diluídos em DMSO e solução fisiológica nas concentrações de 50 e 100 mg/mL de extratos bruto etanólico e fracionados (hidrometanólico, hexânico e acetato de etila) de ambas as espécies.....	47

- Figura 15 -** Resumo das etapas adotadas no bioensaios com *Fusarium* sp.... 49
- Figura 16 -** Esporos (conídios) de *Fusarium* sp..... 55
- Figura 17 -** Crescimento micelial de *Fusarium* sp., aos 7 dias de avaliação com frações de *P. arboreum*. (1 - Controle Solvente (DMSO/Soro+inóculo); 2 - Controle positivo (inóculo+fungicida); 3 - Controle Negativo (inóculo). Extratos bruto etanólico de *P. arboreum*, (A1) caule 100 mg/mL e (A2) 50 mg/mL, (A3) folha 100 mg/mL e (A4) 50 mg/mL, (B1) raiz 100 mg/mL e (B2) 50 mg/mL. Extrato hidrometanólico (C1) de caule 100 mg/mL e (C2) 50 mg/mL, extrato hexânico (C3) de caule 100 mg/mL e (C4) 50 mg/mL. Extrato acetato de etila (D1) de raiz 100 mg/mL e (D2) 50mg/mL. Extrato hidrometanólico (E1) de folha 100 mg/mL e (E2) 50 mg/mL, extrato hexanico (E3) de folha 100 mg/mL e (E4) 50 mg/mL, extrato acetato de etila (E5) de folha 100 mg/mL e (E6) 50 mg/mL..... 57
- Figura 18 -** Crescimento micelial de *Fusarium* sp., aos 7 dias de avaliação com frações de *P. tuberculatum*. (1 - Controle Solvente (DMSO/Soro+inóculo); 2 - Controle positivo (inóculo+fungicida); 3 - Controle Negativo (inóculo). Extratos bruto etanólico de *P. tuberculatum*, (A1) folha 100 mg/mL e (A2) 50 mg/mL, (A3) caule 100 mg/mL e (A4) 50 mg/mL, (A5) raiz 50 mg/mL. Extrato hidrometanólico, (B1) caule 100 mg/mL e (B2) 50 mg/mL. Extrato hexanico (B3) caule 100 mg/mL e (B4) 50 mg/mL. Extrato acetato de etila (B5) caule 100 mg/mL e (B6) 50 mg/mL. Extrato hidrometanólico (D1) de raiz 100 mg/mL e (D2) 50 mg/mL. Extrato acetato de etila (D3) 100 mg/mL e (D4) 50 mg/mL. Extrato hidrometanólico (E1) de folha 100 mg/mL e (E2) 50 mg/mL, extrato acetato de etila (E3) de folha 100 mg/mL e (E4) 50 mg/mL) 59
- Figura 19 -** Placa de teste de microdiluição após aplicação do revelador TTC, com esxtrato bruto de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* em *Fusarium* sp. **CN**= Controle negativo (meio de cultivo+inóculo). (**A** = extrato bruto etanólico de *P. arborium*; **A1** = caule+meio de cultivo; **A1'**= caule+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **A2** = folha+meio de cultivo; **A2'**= folha+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **A3** = raiz+ meio de cultivo; **A3'**= raiz+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL). (**B** = extrato bruto etanólico de *P. tuberculatum*; **B1** = caule+meio de cultivo; **B1'**= caule+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **B2** = folha+meio de cultivo; **B2'**= folha+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **B3**= raiz+ meio de cultivo; **B3'**= raiz+meio de

cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL) 62

Figura 20 - Placa de teste de microdiluição após aplicação do revelador TTC, com extrato bruto de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* em *Fusarium* sp. **CN**= Controle negativo (meio de cultivo+inóculo). (**C, D e E** = *P. tuberculatum*; **C1** = folha (hidrometanólico)+meio de cultivo; **C1'**= folha (hidrometanólico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **C2** = folha (hexanico)+ meio de cultivo; **C2'**= folha (hexanico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **C3** = folha (acetato de etila)+ meio de cultivo; **C3'**= folha (acetato de etila)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **D1** = caule (hidrometanólico)+meio de cultivo; **D1'**= caule (hidrometanólico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **D2** = caule (hexanico)+ meio de cultivo; **D2'**= caule (hexanico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **D3** = caule (acetato de etila)+ meio de cultivo; **D3'**= caule (acetato de etila)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **E1** = raiz (hidrometanólico)+meio de cultivo; **E1'**= raiz (hidrometanólico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **E2** = raiz (hexanico)+ meio de cultivo; **E2'**= raiz (hexanico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **E3** = raiz (acetato de etila)+ meio de cultivo; **E3'**= raiz (acetato de etila)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL)..... 64

Figura 21 - Gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue que mostra degradação oxidativa da albumina (BSA) na presença de frações de *P. arboreum*. (A = Controle negativo (BSA 2 mg/mL); B = BSA + Cu; C = Controle negativo (BSA+Cu+H₂O₂); 1= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTC; 2= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTC2; 3= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTF; 4= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTF3; 5) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTR2; 6) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTR3; 7) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAC)..... 66

Figura 22 - Gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue que mostra degradação oxidativa da albumina na presença de frações de *P. arboreum*. A= Controle negativo (BSA 2 mg/mL); B= BSA + Cu; C) Controle negativo (BSA+Cu+H₂O₂); 1= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAR; 2= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAR3; 3= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAR1; 4=BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAF3; 5) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAF2..... 67

Figura 23 -	Efeito das frações de <i>P. tuberulatum</i> no crescimento de <i>Fusarium</i> sp. Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração.....	69
Figura 24 -	Efeito das frações de <i>P. arboreum</i> no crescimento de <i>Fusarium</i> sp. Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração.....	70
Figura 25 -	Efeito da Piplartina (<i>P. tuberulatum</i>) no crescimento de <i>Fusarium</i> sp. Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada amostra.....	70
Figura 26 -	Determinação do conteúdo de MDA em cultura de <i>Fusarium</i> sp. exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B); Fração acetoetílica do extrato da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C) e Amida isolado de <i>P. tuberulatum</i> (Piplartina 10 mg/mL) (D). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração.....	72
Figura 27 -	Determinação do teor de H ₂ O ₂ em cultura de <i>Fusarium</i> sp. exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B) e Fração acetoetílica do extrato da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração.....	74
Figura 28 -	Determinação do teor de proteínas totais em cultura de <i>Fusarium</i> sp. exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B); Fração acetoetílica do extrato da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C) e Amida isolado de <i>P. tuberulatum</i> (Piplartina 3 e 10 mg/mL) (D). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração.....	75
Figura 29 -	Determinação da atividade da enzima catalase (CAT) em cultura de <i>Fusarium</i> sp. exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B) e Fração acetoetílica do extrato da folha de <i>P. tuberulatum</i> (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração.....	77
Figura 30 -	Determinação da atividade da enzima peroxidase (POD) em cultura de <i>Fusarium</i> sp. exposta a diferentes concentrações de	

extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B) e Fração acetotélica do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração..... 79

Figura 31 - Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em cultura de *Fusarium* sp. exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B) e Fração acetotélica do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração..... 81

Figura 32 - Determinação da atividade da enzima glutathione transferase (GST) em cultura de *Fusarium* sp. exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração..... 82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Rendimento em gramas dos extratos brutos etanólicos obtidos diretamente das partes vegetais, folhas, caules e raízes de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*. Rendimento em gramas do fracionamento por partição dos extratos brutos..... 54
- Tabela 2** - Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios/mL) de *Fusarium* sp. em dois meios de cultura sob dois regimes de luminosidade: escuro contínuo (EC) e fotoperíodo 12 horas (FP)..... 56
- Tabela 3** - Avaliação da atividade fungicida dos extratos brutos e fracionados de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* pelo método de difusão em ágar com perfuração em poços com 10 μ L, 20 μ L e 50 μ L nas concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL..... 60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Principais caracteres anatômicos da lâmina foliar que diferenciam <i>Piper arboreum</i> de <i>P. tuberculatum</i>	27
Quadro 2.	Siglas dos extratos brutos das espécies e da parte da planta....	44
Quadro 3.	Siglas dos extratos brutos e fracionados das espécies e da parte da planta.....	44

SUMARIO

1	Introdução	21
2	Revisão de Literatura	23
2.1	Espécies estudadas.....	23
2.1.1	<i>Piper arboreum</i> e <i>Piper tuberculatum</i>	26
2.2	Fungo <i>Fusarium</i> sp.....	35
3	Objetivo	41
4	Material e Métodos	41
4.1	Coleta e preparação do extrato.....	41
4.1.1	Coleta e preparação do Material vegetal.....	41
4.1.2	Preparo do extrato bruto etanólico.....	42
4.1.3	Fracionamento por partição do extrato bruto.....	44
4.1.4	Amidas (piperinas) dos extratos etanólicos de <i>Piper tuberculatum</i> (parte aérea)	45
4.2	Obtenção e manutenção da cepa do fungo <i>Fusarium</i> sp.....	45
4.3	Análise das condições para cultivo e esporulação do fungo <i>Fusarium</i> sp.....	45
4.4	Avaliação da atividade antifúngica dos extratos.....	46
4.4.1	Avaliação da ação inibitória no crescimento micelial.....	46
4.4.2	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC).....	47
4.4.3	Bioensaio em fermentação submersa da cepa de <i>Fusarium</i> sp. com as frações e amidas para extração bioquímica e avaliação do crescimento micelial.....	48
4.5	Determinação do estresse oxidativo em cultura de <i>Fusarium</i> sp. expostos aos extratos e compostos isolados.....	49
4.5.1	Extrações bioquímicas.....	49
4.5.2	Peroxidação Lipídica.....	49
4.6	Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio intracelular (H ₂ O ₂)	50
4.7	Determinação de proteínas totais.....	50
4.8	Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	50
4.9	Avaliação da atividade oxidativa dos extratos.....	52
4.9.1	Preparo das amostras.....	52
4.9.2	Preparo do gel de eletroforese unidirecional (SDS-PAGE)	53
4.10	Análise estatística.....	53
5	Resultados e Discussão	53
5.1	Rendimento do extrato bruto etanólico e do fracionamento por partição do extrato bruto.....	53
5.2	Isolamento e manutenção do fungo <i>Fusarium</i> sp.....	54
5.3	Avaliação da melhor condição de esporulação do fungo <i>Fusarium</i> sp.....	54
5.4	Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de <i>P. arboreum</i> e <i>P. tuberculatum</i>	56
5.5	Concentração Inibitória Mínima (MIC) por microdiluição.....	60
5.6	Avaliação da atividade oxidativa pela degradação da albumina.....	65
5.7	Efeito das frações e amidas de <i>Piper arboreum</i> e <i>Piper tuberculatum</i> no crescimento de <i>Fusarium</i> sp.....	68
5.8	Determinação da Peroxidação lipídica.....	72
5.9	Determinação de Peróxido Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	73
5.10	Proteínas totais	75
5.11	Determinação da atividade da enzima catalase (CAT).....	76

5.12	Determinação da atividade da peroxidase (POD).....	78
5.13	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	80
5.14	Determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST).....	82
	Conclusão	83
6	Referências	83

1. Introdução

A família Piperaceae é representada no Brasil por quatro gêneros: *Zippelia*, *Piper*, *Peperomia* e *Manekia*, dentre estes, o gênero *Piper* é o que possui maior número de representantes (BARROSO, 1978; SANTOS *et al.*, 2012).

Diversas espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas na medicina popular em várias partes do mundo e têm sido relatadas por produzirem compostos com propriedades biológicas e farmacológicas diversas (SANTOS *et al.*, 2012). Uma das características das espécies de *Piper* é possuírem um sabor forte e um cheiro aromático, característica esta que faz as tais serem listadas entre as especiarias, principalmente em temperos picantes, além se destacarem como fármacos e no controle de pragas e insetos (SENGUPTA; RAY, 1987; PARMAR *et al.*, 1997).

As espécies do gênero *Piper* são predominantemente de crescimento rápido, apresentam-se como arbustos, são plantas aromáticas e muitas delas possuem atividade antisséptica, inseticida, tripanocida e antimicrobiana (GUERRINE *et al.*, 2009; FELIPPE *et al.*, 2008).

Este gênero caracteriza-se por apresentar alta diversidade química relacionada a diferentes classes de metabólitos secundários, tais com amidas isobutílicas, piperidínicas e pirrolidínicas, cromenos, derivados prenilados do ácido benzoico, flavonoides, lignanas, fenilpropanoides, terpenos, entre outros (CORREA; STERNER; ECHEVERRI, 2011; COSTA; BITTENCOURT; MALHEIROS, 2013; JENSEN; HANSEN; BOLL, 1993; LAGO *et al.*, 2004; PARMAR *et al.*, 1997; SENGUPTA E RAO, 1987;).

A piperina é o alcaloide em maior proporção em algumas espécies deste gênero (CHAUDHRY, TARIQ, 2006; FANI, 1992; PISSINATE 2006; ROGER, 1998) e exerce efeito terapêutico sobre o sistema imunológico (CARDOSO *et al.*, 2005), apresenta atividade citotóxica, anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antioxidante, antitumoral, antifúngico e bactericida (BOMTEMPO, 2007).

Várias amidas foram isoladas de espécies de *Piper* e estas geram interesse para aplicação agrícola, pois têm demonstrado propriedades inseticidas e fungicida (NAVICKIENE *et al.*, 2000). Silva *et al.*, (2001) isolaram várias amidas de espécies de *Piper* especificamente da *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*, principalmente as amidas que contêm isobutilo, pirrolidina, partes

di-hidropiridona e piperidina, as quais apresentaram atividade antifúngica contra fungos do gênero *Cladosporium*.

O gênero *Fusarium* sp. por sua vez compreende alguns dos mais devastadores patógenos de plantas, levam a centenas de milhões de dólares em perdas anualmente na agricultura, ocasionando até mesmo o deslocamento geográfico de áreas de cultivo e até mesmo o desaparecimento completo da prática agrícola em locais afetados e de ocorrência destes fungos.

Atualmente as tentativas de supressão e combate às doenças causadas por este gênero de fungo apenas produziu um sucesso parcial. Nas últimas décadas uma variedade de programas de pesquisa e artigos dedicados a desenvolver novas estratégias para gerenciar o *Fusarium* sp. diminuiu à falta de recursos financeiros para explorar a longo prazo estratégias para avaliar padrões de rotação e para selecionar e desenvolver agentes de controle biológico (ELMER, 2015).

A utilização do controle biológico já é bastante empregada na horticultura e floricultura e sua aplicabilidade para grandes culturas está se tornando uma realidade (MILANESI, 2012).

Entretanto, ainda é preciso buscar conhecimento sobre novos compostos que atuem de forma efetiva para mitigar e/ou eliminar os diferentes danos causados pelo *Fusarium* sp. sobre as culturas de interesse econômico (PAGNUSSATT *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2012).

Somado a isso encontra-se a necessidade premente de se estabelecer estratégias de combate a este fitopatógeno, com compostos naturais que demonstrem seletividade e especificidade, e que apresentem um menor impacto ao ambiente, diminuindo assim os riscos que os antifúngicos atuais proporcionam tanto ao meio ambiente como à cadeia alimentar afetado desde animais como a seres humanos (ELMER,2015).

Diante disso compostos químicos naturais provenientes do metabolismo secundário vegetal e com atividade oxidante, que tenham a capacidade de doar elétrons para o oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio como superóxido (O_2^-), e levando ao estresse oxidativo com subsequente morte do patógeno (HAMMOND-KOSACK e JONES, 1996), podem surgir como alternativa para o controle de diferentes pragas, entre as quais os fungos do gênero *Fusarium* sp.

Assim, o estudo do estresse oxidativo por meio da avaliação e determinação das enzimas antioxidantes expressas por microrganismos em condições de estresse, tornou-se uma ferramenta importante para mensurar o possível mecanismo de morte e diminuição populacional dos patógenos expostos aos compostos oxidativos (DARIER *et al.*, 2012).

No que diz respeito às enzimas antioxidantes, estas são importantes na proteção contra diferentes radicais livres, originados durante o metabolismo celular normal.

Os microrganismos, entre eles os fitopatógenos, expressam e sintetizam tais enzimas para agir contra os compostos oxidantes como resposta primária de defesa. Caso a defesa antioxidante não seja suficiente para corrigir e/ou evitar os danos oxidativos, os fungos podem ter sua população reduzida e até eliminada do meio.

Estudos recentes demonstram que compostos de origem vegetal, com atividade oxidativa, podem controlar e/ou eliminar fungos patogênicos oriundos de diferentes culturas (FIALHO *et al.*, 2014; SIMON, 2016), avaliando principalmente as condições em estresse oxidativo.

Diante do exposto este estudo justifica-se pela importância de avaliar os extratos brutos (folhas, caule e raiz) e amidas isoladas de *Piper tuberculatum* e *Piper arboreum* com atividade antifúngica sobre a cultura *in vitro* de fungo do gênero *Fusarium* sp. Justifica-se também por possibilitar a elucidação do possível mecanismos de ação antifúngica através da atividade oxidativa dos extratos e compostos isolados destas espécies, agregando informações essenciais para se estabelecer uma estratégia de controle deste fitopatógeno, pela utilização de compostos naturais.

2. Revisão de Literatura

2.1 Espécies estudadas

A família Piperaceae, possui uma grande biodiversidade, encontra-se distribuída em áreas tropicais e subtropicais. É classificada em Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Piperales e Família Piperaceae (COSTA, 2011).

Apresenta cerca de 3.700 espécies, com destaque para o gênero *Piper* sp. Esse gênero possui cerca de 2.000 espécies no mundo e é um dos gêneros mais estudados. Possui potencial biotecnológico em diferentes áreas entre elas a saúde e a agrícola (OLIVEIRA *et al.*, 2020; QUEIROZ; BARROS; GUIMARAES, 2020; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2021).

No Brasil, representa cinco gêneros (*Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorhachis*). Possui em torno de 500 espécies, comuns nas florestas especificamente na Mata Atlântica Tropical. O gênero *Piper* possui cerca de 200-250 espécies, distribuídas na America Central, Norte dos Andes e no Brasil (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; STEYERMARK, 1984;).

Algumas espécies como a pimenta do reino (*Piper nigrum*) fazem parte do mercado mundial. Há espécies que são usadas como medicinais e outras como ornamentais, no caso do gênero *Peperomia* (COSTA, 2011).

Algumas espécies são conhecidas pelas propriedades aromáticas, e principalmente pela produção de óleos essenciais, como *P. arboreum*, *P. hispidum*, *P. crassinervium*, *P. lanceaefolium* e *P. auritum* (CYSNE *et al.*, 2005; PARMAR *et al.*, 1997; RIOS *et al.*, 2007).

Fazolin *et al.* (2007) apresentou resultados promissores com o uso de óleos essenciais de *P. hispidinervium* e *P. aduncum*. Ambas as espécies apresentaram ação inseticida, em concentrações acima de 3,0% (v/v) e 2,5% (v/v), respectivamente. A família Piperaceae é bastante utilizado na medicina popular, e seus óleos essenciais têm alto valor econômico e importância comercial. Mesquita *et al.* (2005) estudou espécies do gênero *Piper* amplamente utilizadas para fins medicinais, como as propriedades antitumorais de algumas espécies (DUH; WU; WANG, 1990). Salehi *et al.* (2019) estudou forte atividade antioxidante, em comparação com antioxidantes sintéticos, e demonstraram atividades antibacterianas e antifúngicas contra patógenos humanos.

Um levantamento realizado por Queiroz, Barros e Guimarães (2020) em remanescente de Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa Submontana), localizado na divisa dos municípios de Niterói e Maricá (RJ), foram encontradas 12 espécies do gênero *Piper*: *P. aduncum*, *P. amalago*, *P. amplum*, *P. anisum*, *P. arboreum* var. *arboreum*, *P. arboreum* var. *hirtelum*, *Piper corcovadensis* var. *corcovadensis*, *P. divaricatum*, *P. hoffmannseggianum*, *P. klotzschianum*, *P. mollicomum*, *P. rivinoides* e *P. tuberculatum* (Figura 1).



Fonte: QUEIROZ; BARROS, GUIMARAES, 2020.

Figura 1. Vista parcial do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil, e espécies de *Piper* inventariadas. (a= vista do Alto Mourão e Costão de Itacoatiara; b= *P. aduncum*; c= *P. amalago*; d= *P. amplum*; e= *P. anisum*; f= inflorescência de *P. anisum*; g. lâmina foliar de *P. arboreum* var. *arboreum*; h= base da lâmina foliar de *P. arboreum* var. *arboreum*; i= *P. arboreum* var. *hirtelum*; j= *P. divaricatum*; k= *P. hoffmannseggianum*; l= *P. hoffmannseggianum*; m= *P. klotzschianum*; n= *P. mollicomum*; o= *P. rivinoides*; p= *P. tuberculatum*.)

O gênero *Piper* apresenta-se como plantas herbáceas, arbustivas ou pequenas arvores, algumas espécies são trepadeiras outras são terrestres, com caule provido de nós. As folhas são alternas, opostas, verticiladas ou basais simples. Geralmente apresentam glândulas contendo óleo aromático. Pecíolo com ócrea, geralmente com bainha recobrindo o caule, projetando a margem, dando uma idéia de estípula. As estípulas são presentes, persistentes ou não. A

lâmina é inteira, palmada-lobada ou peninérvea, às vezes lobada na base, glabras ou pilosas (ICHASO E GUIMARES, 1977; MACHADO *et al.*, 2017; YUNCKER 1972, 1973).

A inflorescência é basicamente uma espiga pedunculada, simples, axilar ou terminal, oposta à folha ou variavelmente arranjada em inflorescências racemosas, espigadas, umbeladas ou paniculadas. As flores são pequenas, sem perianto, usualmente verdes, frequentemente esbranquiçadas ou amareladas, raramente vermelhas ou mais escuras. Os frutos são drupáceos, carnosos ou secos. (ICHASO E GUIMARES, 1977; YUNCKER 1972, 1973;).

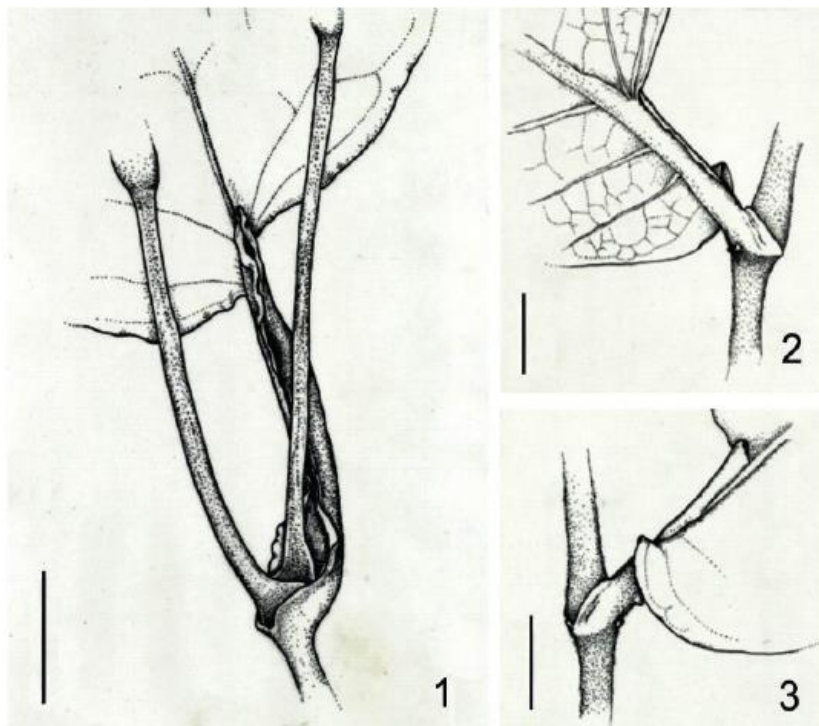
2.1.1 *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*

Um dos gêneros mais estudados é o *Piper*, pertence à família Piperaceae, que possui grande biodiversidade. Possuem diversas espécies que são utilizadas em áreas biológicas e químicas. (OLIVEIRA *et al.*, 2020). O gênero *Piper* inclui as espécies *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* (SILVA *et al.*, 2001). As espécies *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* apresentam-se como arbustos ou arvoretas e são distribuídas geograficamente nas Antilhas e Américas Central e do Sul. No Brasil, as espécies são encontradas desde a região Norte até a Sul (ANDRADE; GUIMARAES; MAIA, 2009; GUIMARAES; GIORDANO, 2004).

São conhecidas popularmente por pimenta longa. Na região Amazônica, ambas espécies são utilizadas como fins medicinais diversos. Obtidas por extrativismo, partes aéreas dessas espécies são comercializadas como produtos tradicionais fitoterápicos em mercados, feiras livres, farmácias de produtos naturais e ervanários. Populações naturais das duas espécies podem coexistir (SILVA *et al.*, 2016).

Machado *et al.* (2017) realizaram a descrição anatômica de *P. Arboreum* e *P. tuberculatum* (Quadro 1) de acordo com as técnicas usuais de anatomia e detectaram importantes diferenças entre os táxons. *P. arboreum* possui bainha sulcada e contém espaços intercelulares, lâmina foliar com hipoderme biestratificada, parênquima paliçádico uniestratificado e nervura principal côncavo-convexa (Figura 2). *P. tuberculatum* possui bainha de disposição circinada, com espaços intercelulares pequenos, lâmina foliar com hipoderme

uniestratificada, parênquima paliçádico bioestratificado e nervura principal biconvexa (Figura 2).



Fonte: MACHADO *et al.* (2017).

Figura 2. *Piper arboreum* var. *arboreum* (1). Bainha sulcada, estendendo-se até o nível basal da lâmina, nota-se extremidade superior da bainha sobreposta à lâmina foliar (2, 3. *Piper tuberculatum* var. *tuberculatum*. Bainha circinada vista pela face abaxial e base assimétrica da lâmina foliar. Face adaxial da bainha com emergências secretoras. Barras: **Fig.1** = 1 cm; **Figs 2, 3** = 5 mm).

Quadro 1. Principais caracteres anatômicos da lâmina foliar que diferenciam *Piper arboreum* de *Piper tuberculatum*.

Caracteres	Táxons	
Lâmina Foliar	<i>P. arboreum</i>	<i>P. tuberculatum</i>
Estomatos	salientes	nivelados com a epiderme
Extratos hipodérmicos	biestratificados	uniestratificado
Parequima paliçádico	concavo-convexo	biestratificado
Nervura principal	retas	biconvexa
Paredes periclinais externas	esparços	levemente papilhosas
Maciços colenquimáticos na nervura principal	mais prolongada	faixa contínua
Margem foliar		menos prolongada

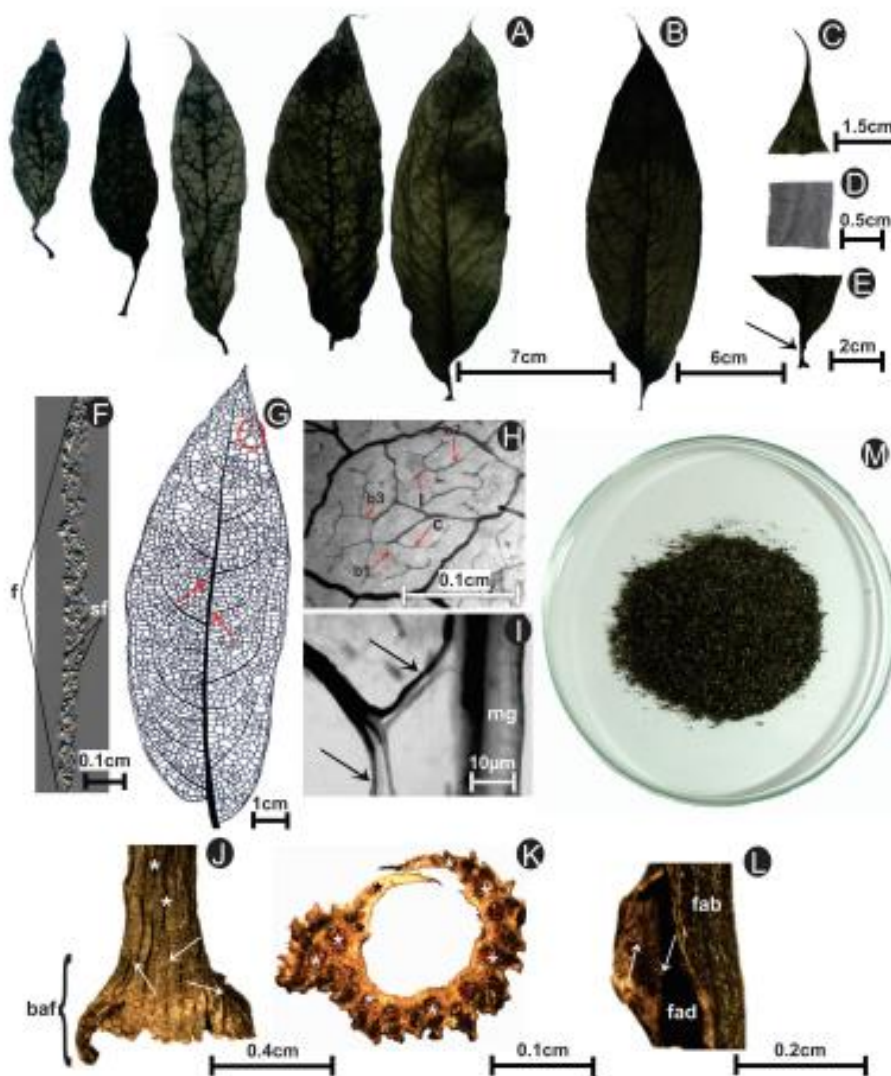
Fonte: MACHADO *et al.* (2017)

Análises fitoquímicas apresentaram grande quantidade de metabólitos secundários em espécies do gênero *Piper*. Dentre essas moléculas estão as aristolactanas, lignoides, cromenos, flavonoides e chalconas, terpeno, ácido benzóico prenilado e amidas (BALDOQUI; BOLZANI; FURLAN, 2009; CHAVES; OLIVEIRA; SANTOS, 2006; CHEN; LIAO; CHEN, 2007; LAGO; KATO, 2007; MORANDIM et al., 2005; RAMOS; KATO, 2009; SRINIVASAN, 2007; XUAN et al., 2008;).

Estudos mostraram atividades anti-leishmaniose, trypanocida e antifúngica para as duas espécies. Para a *P. tuberculatum* propriedades inseticida, larvicida, citotóxica, antitumoral, sedativa, analgésica, hipotensiva, ansiolítica, anticonvulsivante e anti-agregação plaquetária (ANDRADE, GUIMARAES, MAIA, 2009; FACUNDO et al., 2008; FERREIRA et al., 2010; PAES-GONÇALVES et al., 2012; PARMAR et al., 1997; REGASINI et al., 2009; TRINDADE et al., 2012).

Devido ao uso etnofarmacológico, tanto a *P. arboreum* quanto a *P. tuberculatum* possui potencial para serem registradas como medicamentos fitoterápicos (SILVA et al., 2016).

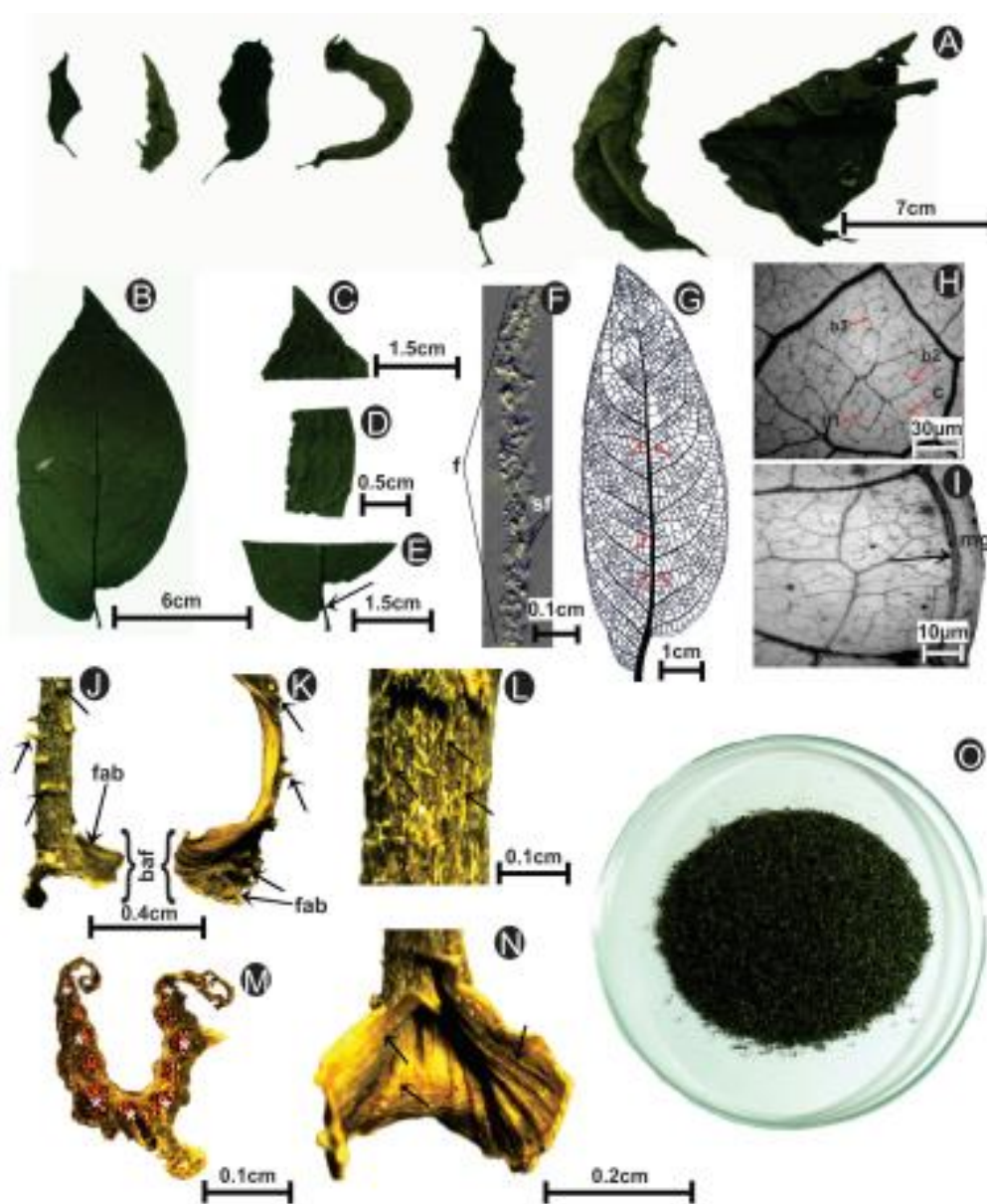
Espécies de *Piper* possuem atividades biológicas reconhecidas de seus fitoconstituintes. Silva e colaboradores (2016) avaliaram esses fitoconstituintes a partir de um controle de qualidade. Caracterizaram a estrutura (Figura 3 e 4) e os constituintes físico-químicos, denominando drogas vegetais foliares e caulinares obtidas a partir de *P. arboreum* var. *arboreum* e *P. tuberculatum* e estabeleceram parâmetros de autenticidade botânica e de grau de pureza dessas matérias-primas vegetais bem como a correta identificação de espécies, pois representam os primeiros passos para assegurar a qualidade de matérias-primas vegetais e são pré-requisitos para a produção e registro de fitomedicamentos (ANVISA 2010; CORTÉS et al., 2014).



Fonte: SILVA *et al.* (2016).

Figura 3. Características macroscópicas das drogas vegetais foliares de *Piper arboreum* (Piperaceae) (Fotomacrografias (A-E; M). Fotomicrografias estereoscópicas por contraste de interferência diferencial (F). Desenho em planta baixa (G). Fotomicrografias estereoscópicas por luz refletida (H; J-L). Fotomicrografias por luz transmitida (I). A. Aspecto morfológico geral. B-E. Drogas vegetais hidratadas. B. Visão geral da folha. C. Ápice. D. Margem. E. Base, notar inserção do pecíolo (seta). F. Superfície de fratura da lâmina foliar. G-I. Padrões de venação foliar. G. Padrão geral de venação, notar arco de nervuras secundárias (elipse) e nervuras intersecundárias (setas). H. Detalhe das aréolas e vênulas. I. Venação última marginal, notar vênulas livres (setas). J. Visão geral da face abaxial do pecíolo e bainha foliar, notar fissuras

(asteriscos) e estrias longitudinais (setas). K. Secção transversal do pecíolo, notar elementos lignificados (asteriscos). L. Detalhe da bainha foliar, notar protuberâncias (setas). M. Droga vegetal pulverizada. Face adaxial (fad). Face abaxial (fab). Fratura (f). Superfície de fratura (sf). Bainha foliar (baf). Vênula simples linear (l). Vênula simples curva (c). Vênula ramificada uma vez (b1), duas vezes (b2) e três vezes (b3). Margem (mg). Esta figura é colorida na versão eletrônica).



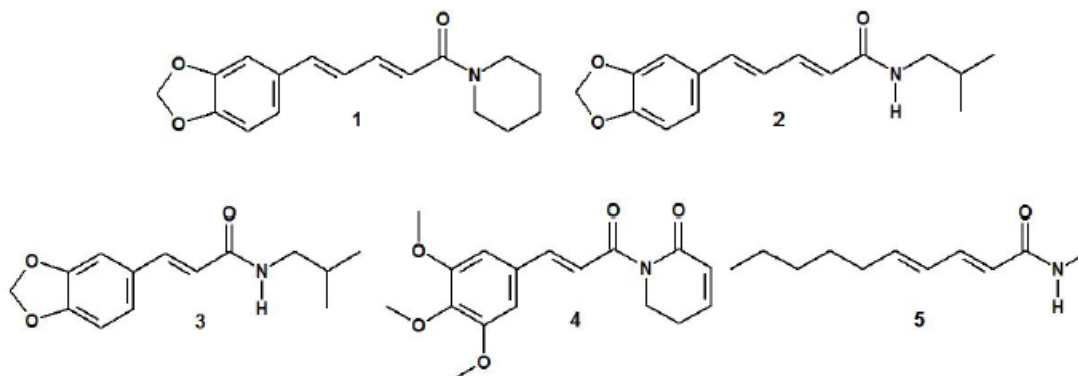
Fonte: SILVA *et al.* (2016).

Figura 4. Características macroscópicas das drogas vegetais foliares de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae). (Fotomicrografias (A-E; O). Fotomicrografias estereoscópicas por contraste de interferência diferencial (F). Desenho em planta baixa (G). Fotomicrografias por luz transmitida (H; I). Fotomicrografias estereoscópicas por luz refletida (J-N). A. Aspecto morfológico geral. B-E. Drogas vegetais hidratadas. B. Visão geral da folha. C. Ápice. D. Margem. E. Base, notar inserção do pecíolo (seta). F. Superfície de fratura da lâmina foliar. G-I. Padrões de venação foliar. G. Padrão geral de venação, notar nervuras intersecundárias (setas). H. Detalhe das aréolas e vênulas. I. Venação última marginal, notar lóbulo (seta). J e K. Visão geral do pecíolo e bainha foliar, notar emergências (setas). Pecíolos reto (J) e curvo (K). L e M. Detalhes do pecíolo. L. Superfície da face abaxial, notar estrias longitudinais (setas). M. Secção transversal, notar elementos lignificados (asteriscos). N. Detalhe da face adaxial da bainha foliar, notar estrias longitudinais (setas). O. Droga vegetal pulverizada. Face abaxial (fab). Fratura (f). Superfície de fratura (sf). Bainha foliar (baf). Vênula simples curva (c). Vênula ramificada uma vez (b1), duas vezes (b2) e três vezes (b3). Margem (mg). Esta figura é colorida na versão eletrônica).

As espécies do gênero *Piper* apresentam uma composição fitoquímica diversificada, tendo as amidas como sendo a classe de compostos mais característico. A amida mais conhecida é a piperina, que foi a primeira amida a ser isolada de *Piper nigrum* (PARMAR et al., 1997). Também foram isoladas outras amidas do gênero *Piper*, onde representam um grupo de compostos naturais promissores. Esse grupo de moléculas demonstraram em estudos grande potencial inseticida, moluscicida, antifúngico e antidepressivo (BERNARD et al., 1995; KATO; FURLAN, 2007; LAGO et al., 2004; LEE et al., 2001;). Várias amidas isoladas de espécies de Piperacea foram classificadas em isobutil, pirrolidina, dropiridona e piperidina (PARMAR et al., 1997).

Na figura 5, são apresentados alguns compostos que foram isolados e identificados de *P. tuberculatum*, como a piperina (1), piperlonguminina (2), fagaramida (3), piplartina (4) e a pellitorina (5) (COTINGUIBA et al., 2009; NAVICKIENE et al., 2000; RAJ et al., 2011; SILVA et al., 2001). Cotinguiba et al. (2018) apresentou um estudo proteômico dessa espécie, onde foram identificados mais de cem spots e vários peptídeos. As funções desses

peptídeos estão relacionadas a mecanismo de defesa como estresse biótico e abiótico.

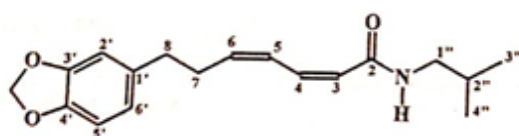


Fonte: NAVICKIENE *et al.* (2000).

Figura 5. Antifungal metabolites isolated from *Piper tuberculatum* (Piperina (1), 4,5-diidropiperlonguminina (2), fagaramida (3), diidropiartina (4) e pellitorina (5).

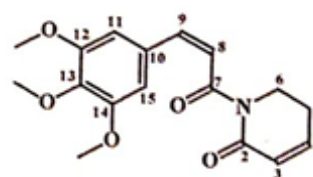
Navickiene *et al.* (2000) isolou, apresentou a estrutura e a atividade antifúngica de duas novas amidas (Figura 6) e de outras oito amidas já conhecidas. As amidas foram isoladas do caule de *Piper hispidum* (1, 3) e de sementes de *Piper tuberculatum* (2, 5-10) e foram ativos contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum*.

1



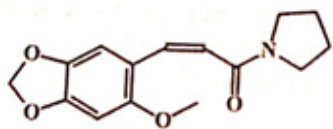
(3Z,5Z)-N-isobutil-8-(3',4'-metilenedioxi-fenil)-heptadienamida

2



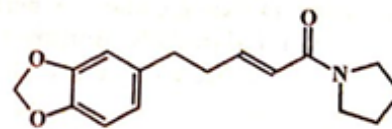
8(Z)-N-(12,13,14-trimetoxicinamoil)- Δ^3 -piridin-2-one
(*Piper tuberculatum*)

3



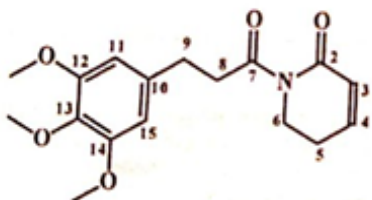
N-[3-(6'-metoxi-3',4'-metilendioxfenil)-
2(Z)-propenoil]pirrolidina

4



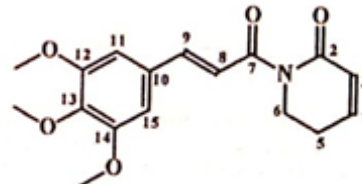
piper-amina

5



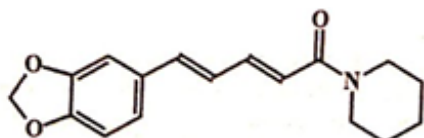
N-(12,13,14-trimetoxidihidrocinamoil)- Δ^3 -
piridin-2-one
(*Piper tuberculatum*)

6



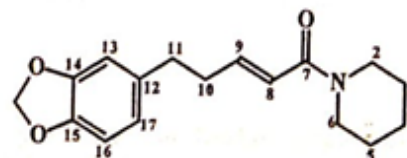
Piplartina
(*Piper tuberculatum*)

7



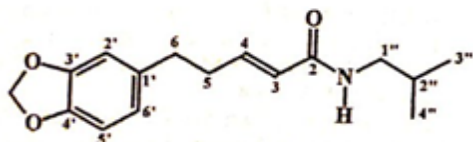
Piperina
(*Piper tuberculatum*)

8



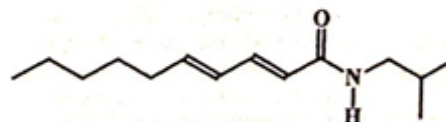
$\Delta^{\alpha,\beta}$ -diidropiperina
(*Piper tuberculatum*)

9



5,6-diidropiperlonguminina
(*Piper tuberculatum*)

10



Pellitorina
(*Piper tuberculatum*)

Fonte: Navickiene et al. (2000)

Figura 6. Amidas isoladas de Piper.

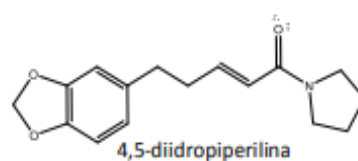
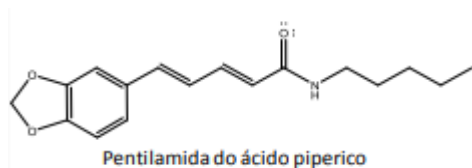
Piper arboreum é conhecida popularmente como pau-de-angola, jaborandi, pimenta do mato, é um arbusto glabro de altura entre 2 a 4 metros, de ocorrência da América Central até o Sul do Brasil. É utilizada como anti-reumática, sudorífera, afrodisíaca e emoliente (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006).

O óleo essencial de *Piper arboreum*, é especificamente obtido das folhas, apresenta grande quantidade de sesquiterpenóides, particularmente por hidrocarbonetos sesquiterpênicos e secundariamente por seus compostos oxigenados (SALEHI *et al.*, 2019). De acordo com Santos *et al.* (2001), o óleo essencial de *P. arboreum* obtido das folhas contém 65,85% de sesquiterpenos, 22,59% como hidrocarbonetos e 43,26% como oxigenados, e apenas 4,28% de monoterpenos.

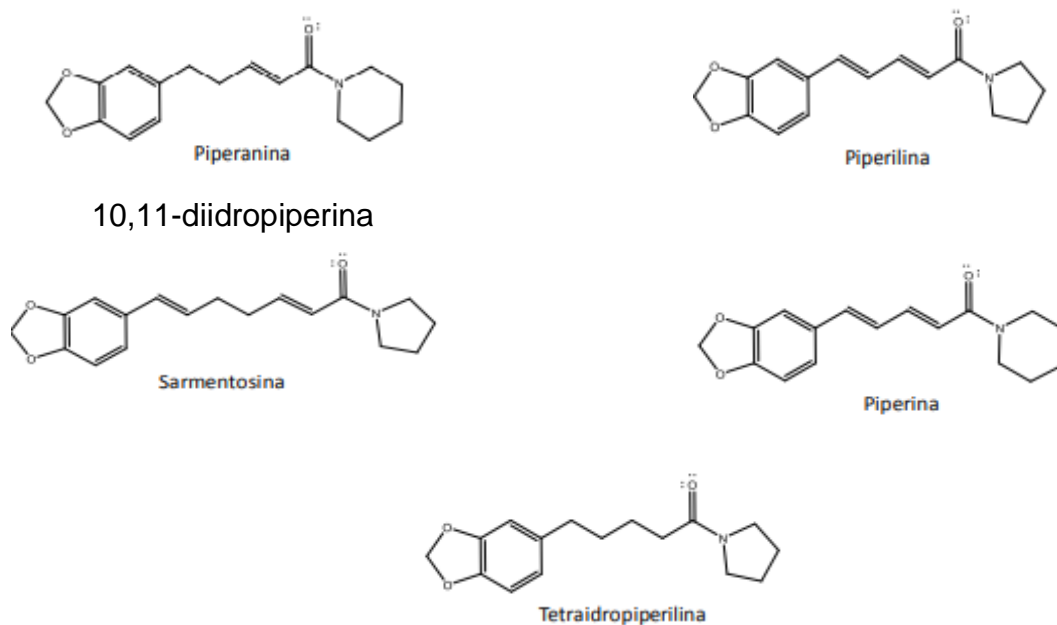
Estudos de Silva *et al.*, (2017) apresentaram a composição de óleo essencial de flores de espécies do Brasil e identificaram predomínio de hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Sendo os principais componentes o germacreno D (49,3%), linalol (10,4%), germacreno A (8,5%), β -cariofileno (6,6%), limoneno (6,3%) e β -elemeno (5,3%). Os mesmos autores, identificaram a composição de um óleo essencial obtido de caules de *P. arboreum*. Identificaram novamente a predominância de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, β -cariofileno (26,5%) e biciclogermacreno (21,1%), seguidos por δ -3-careno (18,7%) e α -copaeno (9,0%).

Navickiene *et al.* (2006) relatam que os frutos de *P. arboreum* contém 74,4% de sesquiterpenos e 22,6% de monoterpenos, enquanto a raiz contém 72,2% sesquiterpenos e 25,6% monoterpenos.

Rossi (2019) em uma análise de amidas produzidas por *P. arboreum*. Com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLEM/EM), propôs a estrutura das amidas presentes na espécie (Figura 7).



N-[10- (13,14-metilenedioxifenil)-7(E)-pentaenoil]- pirrolidina



Fonte: Rossi, *et al.*, (2019).

Figura 7. Estruturais químicas das amidas detectadas por CLAE-EM/EM.

Diante de todo exposto, as espécies vegetais de *Piper tuberculatum* e *Piper arboreum* vêm sendo estudadas com o propósito de serem candidatas à fornecedora de compostos bioativos capazes de serem utilizados no controle de pragas, entre eles fitopatógenos como o fungo do gênero *Fusarium* sp. que causa grandes danos econômicos na agricultura.

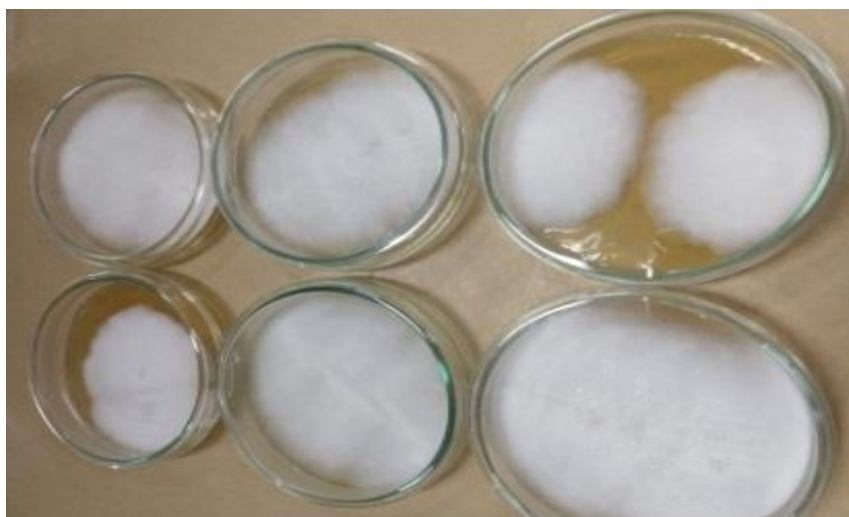
2.2 Fungo *Fusarium* sp.

O gênero *Fusarium* sp. pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, a classe Sordariomycetes, a ordem Hypocreales e a família Nectriaceae (INDEX FUNGORUM, 2022). Compreende alguns dos mais devastadores patógenos de plantas custando centenas de milhões de dólares em perdas anualmente. Uma pesquisa de 2012 classificou *F. oxysporum* e *F. graminearum* como o terceiro e quarto patógenos de plantas mais destrutivos, respectivamente. Muitos desses patógenos surgiu em novas culturas, como no caso da murcha de morango. A murcha da banana e do tomate, são ameaças antigas e persistentes (CASTRO *et al.*, 2008). O aparecimento de novas doenças causadas pelo *Fusarium* sp., no comércio de plantas ornamentais, ressalta a rapidez com os quais os

patógenos adquirem hospedeiros susceptíveis. Como no caso da *Heliconia* sp (CASTRO, *et al.*, 2008; ELMER, 2015).

Plantas resistentes ao fitopatógeno continua a ser a estratégia mais bem-sucedida para controlar doenças causadas por esse fungo. Porém, em muitos casos, a busca por germoplasma aceitável em horticultura não apresentou resultados efetivos. O que, por sua vez, tem forçado uma reavaliação das estratégias de manejo. Muitas vezes, essas tentativas de supressão da doença têm apenas sucesso parcial. Não tem sido incomum ver áreas produtivas sendo realocadas geograficamente ou desaparecer completamente como resultado de danos causado por doenças de *Fusarium* sp. (ELMER, 2015).

O fungo, pertence ao grupo dos filamentosos (Figura 1). São amplamente distribuídos no ambiente. Devido sua capacidade de se desenvolver em temperaturas em torno de 37°C, são seres considerados oportunistas. Podem causar infecções sistêmicas em humanos, com alta mortalidade em pacientes imunocomprometidos com alta mortalidade. Algumas espécies produzem toxinas que afetam humanos, animais e vegetais. Das mais de 100 espécies de *Fusarium* sp. descritas, somente 12 são consideradas patogênicas para humanos. Entre elas se destacam *F. solani*, *F. oxysporum* e *F. verticilloides* (AMARO, 2014).



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 8. Fungos isolados de *Fusarium* sp.

Pode ser encontrado habitando o solo, nas mais diversas regiões geográficas do mundo, em locais de climas tropicais e subtropicais. É capaz de sobreviver por longos períodos no solo pela formação de estruturas chamadas clamidósporos (TINOCO, 2010).

Esse fungo pode colonizar folhas, ramos, inflorescências e frutos por meio dos conídios (Figura 2), sendo estes disseminados pela água ou pelo ar (Lazarotto, 2013; PARRY, 1990; TINOCO, 2010;).



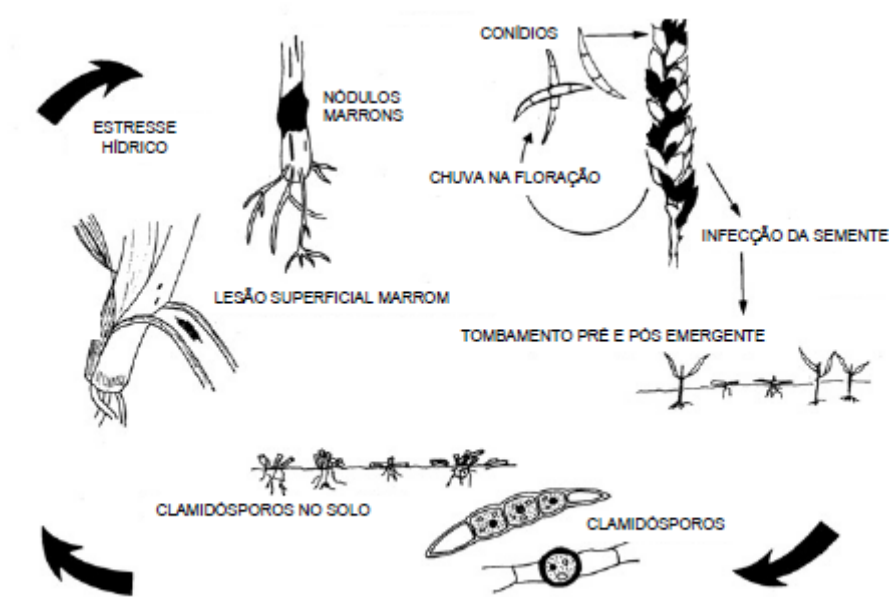
Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 9. Conídios de *Fusarium* sp.

Na Figura 10 é possível visualizar o ciclo de vida do gênero *Fusarium* sp. Os clamidósporos presentes no solo ou em restos de cultura ou em plantas daninhas infectam as sementes ou raízes causando infecção precoce da planta e tombamento (PARRY, 1990). A disseminação pode ocorrer através da água de irrigação e uso de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado pelo fitopatógeno (DAVIS *et al.*, 2006).

O *Fusarium* sp. consegue sobreviver no solo através de estruturas de resistência e de estruturas internas das sementes, como é o caso do embrião. Antes da semeadura, a diagnose preventiva e o tratamento químico de sementes, são medidas que ajudam no combate a doenças provocadas pelo fungo. A presença de microrganismos patogênicos, na maturidade e/ou no armazenamento, diminui o potencial fisiológico e a qualidade sanitária das sementes em maior velocidade. Outros fatores provocados pelo fungo, são:

queda do poder germinativo, decréscimo no desenvolvimento de plântulas nos seus primeiros estádios de desenvolvimento e transmissão patógeno para o sistema radicular e parte aérea da planta (RAMOS *et al.*, 2014).



Fonte: PARRY, (1990)

Figura 10. Esquema geral do ciclo de vida do gênero *Fusarium* sp.

Os fungos filamentosos do gênero *Fusarium* sp. são responsáveis por grandes problemas na agricultura, estando entre um dos principais fitopatógenos do mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Além de causar enormes perdas econômicas nas lavouras, algumas espécies de *Fusarium* sp. produzem uma ampla gama de micotoxinas nas lavouras de cereais que afetam a saúde humana e animal (OSBORNE, 2007; YANG, 2022;). Entre essas micotoxinas estão a tricoteceno, desoxinivalenol (DON), a nivalenol (NIV), a zearalenona (ZEA) e moniliformina (MON) (DESJARDIN, 2006; LESLIE E SUMMERELL, 2006; ROTTER *et al.*, 1996; SOUZA, 2017; SPANIC, 2017).

O genero *Fusarium* sp. apresenta uma expressiva importancia na agricultura por ser patógeno para várias culturas de interesse economico tais como milho, trigo, tomate, soja, feijão-caupi, causando doenças conhecidas por podridão das raízes, murcha e fusariose (TINOCO, 2010). A figura 11 ilustra os sintomas das doenças provocadas por *Fusarium* sp. nas principais culturas atingidas (TINOCO, 2010).

Os sintomas da doença caracteriza-se pela clorose e queda prematura das folhas, redução do crescimento e murcha e morte das plantas (POLTRONIERI *et al.*, 1994).



Fonte: TINOCO (2010).

Figura 11. Sintomas das doenças provocadas por *Fusarium* sp. nas principais culturas. ((A, B e C) Fusariose e podridão das raízes do milho; (D) Fusariose em trigo; (E) Fusariose em tomate; (F) Mal do Panamá em banana; (G) *Fusarium* sp. em couve; (H) Podridão dos bulbos de alho; (I) *Fusarium* sp. em cenoura).

Os patógenos mais relatados e que atacam as sementes de milho, produzindo micotoxinas, são do gênero *Fusarium* sp. O *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum*, *F. subglutinans*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum*. Dentre as espécies de *Fusarium* sp. a principal espécie que encontra nas sementes de milho no Brasil é o *F. verticillioides*, sendo que o mesmo, quando presente nas

sementes de milho, provoca redução da germinação e emergência das plântulas, especialmente quando estão sob condições adversas (SOUZA, 2017).

A cultura do trigo também é bastante afetada pela podridão da coroa (LIU *et al.*, 2023). Doença também causada por *Fusarium* sp., que é uma doença fúngica grave que ocorre em todo o mundo. A doença pode reduzir a produtividade em até 50% durante os anos epidêmicos (MCMULLEN *et al.*, 1997). A doença vem surgindo nas principais áreas de cultivo de trigo na China desde 2010. A espécie *Fusarium pseudogramineum* é o causador predominante da podridão da coroa do trigo na China. Uma das principais doenças do maracujazeiro, na maioria dos estados produtores do Brasil, é a podridão do colo, causada por *Fusarium solani* (BUENO, 2009).

Nos últimos anos, a sociedade vem se preocupando com o uso intensivo e indiscriminado de agrotóxicos que causam diversos problemas ao meio ambiente, como a contaminação de águas, solos, animais e alimentos; a intoxicação de agricultores; a eliminação de microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica ou de organismos utilizados em programas de controle biológico e a resistência de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas a certos agrotóxicos, entre outros (FIGHETO & TOYOKO, 2000; SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2003).

Por outro lado, tem se verificado o aparecimento de pesquisas sugerindo a utilização de produtos naturais, como substâncias de origem vegetal que apresentem efeito inibitório sobre os fitopatógenos e ao mesmo tempo, não causem danos aos ecossistemas (SOUSA *et al.*, 1991).

Bernardo *et al.* (2002) relatam que os extratos e produtos derivados de vegetais têm sido estudados quanto à eficácia no controle de doenças de plantas, para uso em sistemas de produção que busquem a redução ou eliminação do uso de agrotóxicos, sendo muito utilizado na agricultura orgânica (DAROLT, 2002). Muitas plantas apresentam propriedades antifúngicas em seus extratos. Essas propriedades são dependentes de uma série de fatores inerentes às plantas, como órgãos utilizados, idade e estágio vegetativo (SILVA *et al.*, 2005). A eficiência do produto também depende da espécie envolvida, do tipo de doença a ser controlada e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção e manipulação do extrato (SILVA *et al.*, 2005).

3. Objetivo

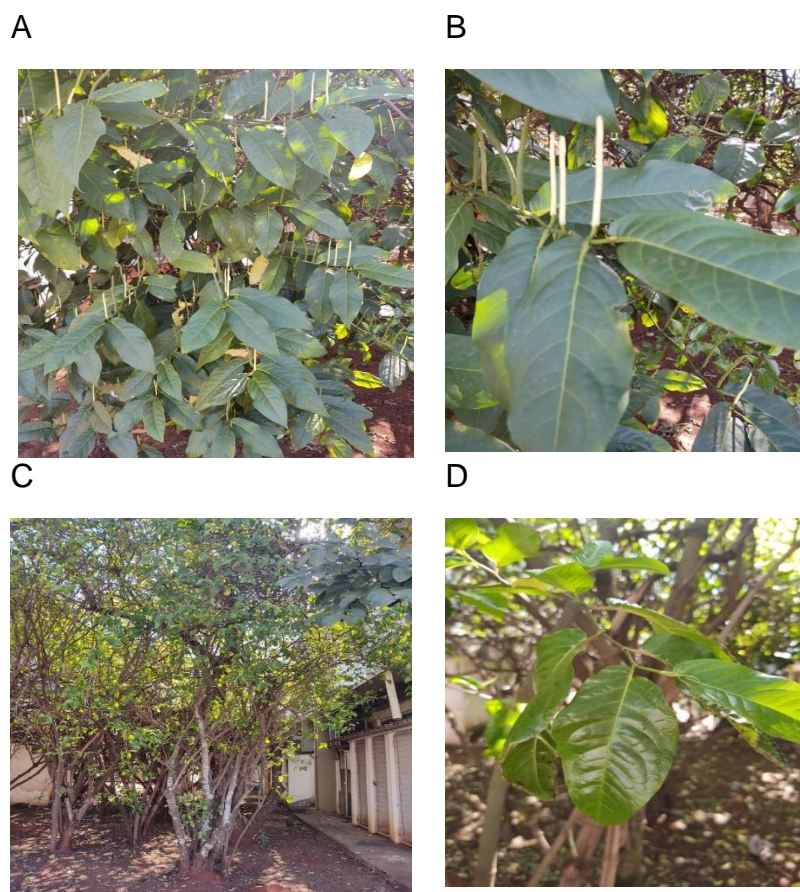
O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial antifúngico de extratos brutos, frações e amida isolada de *Piper arborium* e *Piper tuberculatum* sobre o crescimento micelial de *Fusarium* sp. Objetivou também investigar o mecanismo de ação antifúngico por meio das atividades pró e oxidativas e da determinação das enzimas antioxidantes em cultura de *Fusarium* sp. exposta aos extratos, frações e amida.

4. Material e Métodos

4.1. Coleta e preparação do extrato

4.1.1. Coleta e preparação do Material vegetal

O material vegetal (raiz, caule e folhas) de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* foram coletados na casa de vegetação do Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, Brasil (Coordenadas de GPS: -21.80698900; -48.19190900). As espécies (Figura 1) foram identificadas pelo professor Dr. Guillermo E. D. Paredes da Universidade Nacional Pedro Ruiz Gallo (UNPRG, Lambayeque, Perú) e suas exsiccatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Botânica (USP - SP) (Figura 12).



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

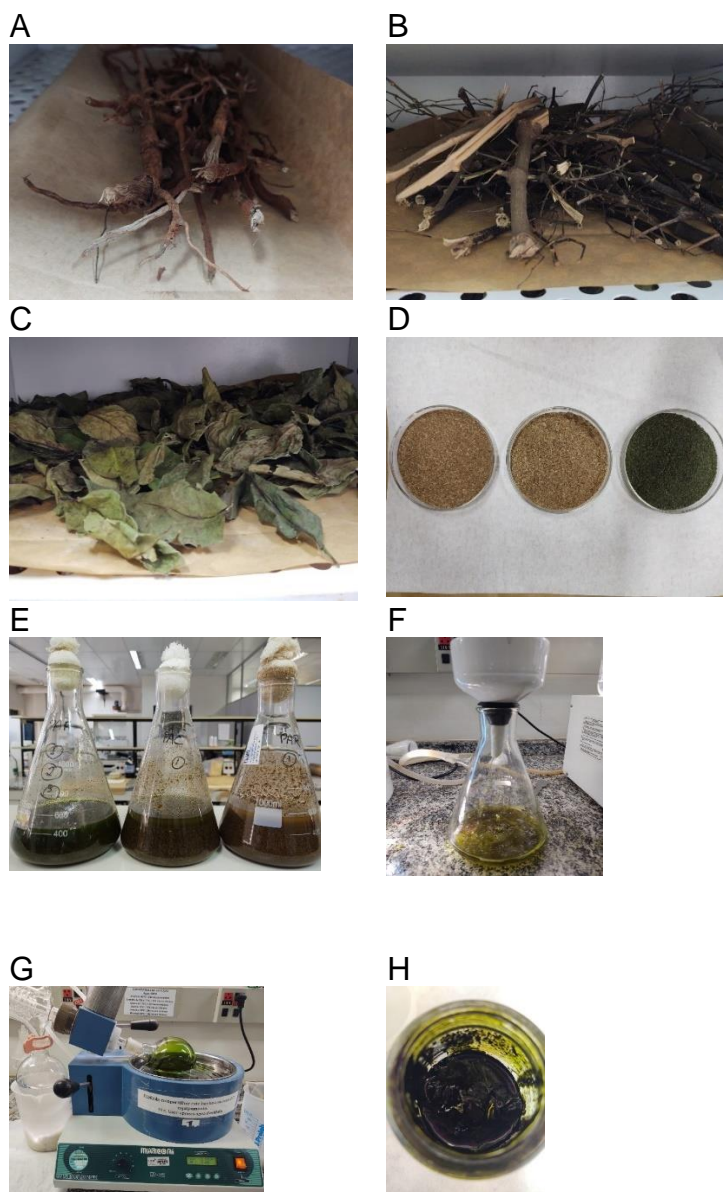
Figura 12. Parte arbórea (A) e detalhes das partes aéreas (folhas e frutos) (B) de *Piper arboreum*, parte arbórea (C) e detalhes das partes aéreas (folhas) (D) de *Piper tuberculatum*.

Inicialmente, o material vegetal das duas espécies (raiz, caule e folha) coletadas foi seco em estufa de ar circulante a temperatura média de 40°C e, após secagem foi pulverizado em moinho de facas. O pó (extrato seco) resultante foi utilizado para preparação dos extratos e frações. Nas etapas experimentais foram utilizados reagentes e solventes de grau analítico (P.A.).

4.1.2 Preparo do extrato bruto etanólico

O material vegetal (raízes, caules e folhas), pulverizado das duas espécies, foi extraído por extração estática, a temperatura ambiente, com etanol na proporção 1:3 (p/v). Após 24 horas os extratos individuais foram filtrados em papel de filtro sobre baixa pressão e os resíduos sólidos reextraídos a cada 24

horas, perfazendo três extrações consecutivas para cada segmento vegetal. Os extratos resultantes foram reunidos e concentrados em rotaevaporador (com rotação constante do balão de evaporação, com vácuo mínimo de 200, em banho de aquecimento na temperatura de 100°C) para obter os extratos etanólicos brutos, após concentração os extratos foram secos em capela até obter um aspecto pastoso (Figura 13).



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 13. Processo de obtenção do extrato bruto das duas espécies estudadas. (A) raiz (B) caule e (C) folhas secas em estufa, (D) material pulverizado em moinho de facas, (E) extração em álcool etílico, (F) filtração sob pressão, (G) concentração do extrato em rotaevaporador e (H) extrato bruto.

Os extratos secos brutos foram identificados de acordo com cada espécie e parte vegetal obtida, descrito no quadro 02.

Quadro 02. Siglas dos extratos brutos das espécies e da parte da planta.

Espécie	Partes da planta		
	Folha	Caule	Raiz
<i>Piper arboreum</i>	PAF	PAC	PAR
<i>Piper tuberculatum</i>	PTF	PTC	PTR

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

4.1.3 Fracionamento por partição do extrato bruto

Os extratos brutos etanólico de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* (raiz, caule e folha) foram particionados com o objetivo de obter frações, por meio do método de partição líquido-líquido. Os extratos etanólicos (400 mg) foram suspensos em 50 mL de solução hidrometanólica (8:2) em funil de separação de 125 mL. Logo após a solução foi particionada com 50 mL hexano em três repetições. Após a partição com hexano a solução hidrometanólica foi particionada com Acetato de etila (3 x 50 mL) obtendo-se 18 partes das frações hexânicas, acetato de etila e hidrometanólicas para raiz, caule e folha de ambas as espécies (Quadro 03).

Quadro 03. Siglas dos extratos brutos e fracionados das espécies e da parte da planta.

Solventes e Extratos	<i>Piper arboreum</i>		
	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico (bruto)	PAF	PAC	PAR
Solventes	Frações		
Solução hidrometanólica	PAF1	PAC1	PAR1
Hexano PA	PAF2	PAC2	PAR2
Acetato de Etila PA	PAF3	PAC3	PAR3
	<i>Piper tuberculatum</i>		
	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico (bruto)	PTF	PTC	PTR
Solventes	Frações		
Solução hidrometanólica	PTF1	PTC1	PTR1
Hexano	PTF2	PTC2	PTR2
Acetato de Etila	PTF3	PTC3	PTR3

Fonte: elaborado pelo autor (2022).

4.1.4 Amidas (piperinas) dos extratos etanólicos de *Piper tuberculatum* (parte aérea).

A amida utilizada foi cedida pelo Laboratório NuBBE - Biossíntese do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Câmpus de Araraquara.

4.2 Obtenção e manutenção da cepa do fungo *Fusarium* sp.

O isolado do fungo filamentosso *Fusarium* sp. foi cedida pelo Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis. A cepa foi mantida em meio BDA (batata dextrose ágar) com incubação por um período de 5-7 dias em Câmara BOD, à temperatura média de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após crescimento, a cepa foi mantida sob refrigeração e realizada a repicagem para manutenção. Os meios sólidos de propagação e de produção do inóculo, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121°C , durante 15 min.

4.3 Análise das condições para cultivo e esporulação do fungo *Fusarium* sp.

Foi realizado teste de crescimento do fungo *Fusarium* sp. em dois meios de cultivo e dois regimes de luminosidade, escuro contínuo (EC) e fotoperíodo de 12 horas (FT). O fungo foi cultivado no meio Batata Dextrose Agar (BDA) e Meat Extract Powder (MEP) com e sem adição de ágar, e nos regimes de luminosidade totalmente escuro e com fotoperíodo de 12 horas. Durante o período de incubação de 15 dias a temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Culturas de *Fusarium* sp., crescidas em placa de Petri contendo meio de BDA, com 14 dias de incubação a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro, foram utilizadas para multiplicação de inóculo. Da cultura pura do isolado, foram retirados discos de 5 mm de diâmetro e depositados no centro de cada placa de Petri com 20 mL de seus respectivos meios. As placas foram mantidas em incubadora e estufa, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob seus relativos regimes de luminosidades. Os meios de cultura avaliados foram: Batata dextrose-ágar (BDA) (extrato de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1000 mL água destilada) e MEP (80% de maltose e

1000 mL de água destilada). Após o preparo, todos os meios foram autoclavados a 120°C por 20 minutos.

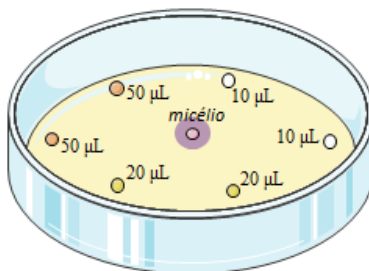
4.4 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos

4.4.1 Avaliação da ação inibitória no crescimento micelial

Os ensaios da atividade antifúngica por ação inibitória no crescimento micelial dos extratos de *P. tuberculatum* e *P. arboreum* foram realizados pelo método de difusão em ágar, com a técnica de perfuração de acordo com Lima *et al.* (2006b). Com auxílio de um cilindro de 6 mm, foi retirado o meio para a formação de poços, nos quais foi possível a aplicação dos extratos a serem analisados. Foram analisadas as concentrações de 50 e 100mg/mL de extratos bruto etanólico e fracionados (hidrometanólico, hexânico e acetato de etila) de ambas as espécies em diferentes placas (Figura 14). Em cada placa foram perfurados poços próximos a extremidade da placa e preenchidos com alíquotas de 10 µL, 20 µL e 50 µL de extratos diluídos em DMSO e solução fisiológica (9:1).

No centro da placa foram depositados discos de 6 mm de micélio fúngico crescidos em meio batata dextrose ágar (BDA) por um período de 7 dias consecutivos em temperatura média de 28°C. Como controle positivo foi aplicado fungicida comercial (Difeconazole 30 mL/L) nos poços com alíquotas de 10 µL, 20 µL e 50µL na concentração indicada na embalagem. No centro de cada placa foi colocado discos de micélio de 6mm. O controle negativo constituiu de meio de cultivo BDA e o inóculo do fungo.

Adicionalmente foi realizado o controle de crescimento do fungo na presença do solvente DMSO e solução fisiológica (9:1) com alíquotas de 10 µL, 20 µLe 50µL para avaliação de toxicidade. Todos os testes foram realizados em triplicada. As placas foram incubadas em câmara BOD por um período de 7 dias em uma temperatura média de 28°C. Após esse período foi possível avaliar a atividade antimicrobiana quanto a sensibilidade ou resistência do fitopatógeno *Fusarium sp.*



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 14. Esquema dos poços perfurados próximos a extremidade da placa e preenchidos com alíquotas de 10 µL, 20 µL e 50 µL de extratos diluídos em DMSO e solução fisiológica nas concentrações de 50 e 100 mg/mL de extratos bruto etanólico e fracionados (hidrometanólico, hexânico e acetato de etila) de ambas as espécies.

4.4.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), foi realizada por meio da técnica da microdiluição em caldo. Foram utilizadas microplacas com 96 poços em triplicada, seguindo os protocolos do Clinical Laboratory Standard Institute – para fungos filamentosos (CLSI, 2002) com modificações e de acordo com metodologia de Kanemaru, (2017) e Vargas (2017).

Este método consistiu na avaliação da capacidade de inibir o crescimento fúngico avaliando diferentes concentrações diluídas em série em uma microplaca de 96 poços. MIC é definida como a menor concentração do agente antifúngico que impede o crescimento visível do fungo no teste de microdiluição em caldo.

O resultado é avaliado pela mudança da coloração indicativa do pH presente no meio. Em cada poço da placa foram depositados 100 µL meio de cultura. O meio de cultivo, constituído por sacarose, nitrato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e sulfato de ferro e pH ajustado para $7,2 \pm 0,2$, com modificações de acordo com Guelfi (2001).

Nos poços foram adicionados 10 µL de suspensão fúngica (aproximadamente 10^4 esporos/mL) diluídos em solução aquosa de Tween 80% e também adicionou 100 µL das diluições seriais de extratos de *P. Arboreum* e *P. tuberculatum*, onde uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício foi

transferida para os orifícios subsequentes da coluna obtendo-se, assim, as diluições seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 nas seguintes concentrações decrescentes: (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL).

As três primeiras colunas da microplaca de 96 poços consistiram no controle da amostra sem micro-organismo. As demais foram acrescentadas 50 µL do extrato fúngico previamente diluído em DMSO e solução fisiológica (1:9) e 150 µL de meio de cultivo (sem inóculo) e foi realizada o controle do extrato com 10 µL de solução de esporos e 150 µL de meio de cultivo. As microplacas foram fechadas e incubadas em câmara BOD a uma temperatura média de 28°C por 24 horas. Decorrido esse tempo, foram acrescentados 20 µL do revelador 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% e após 2 horas foi realizada a leitura.

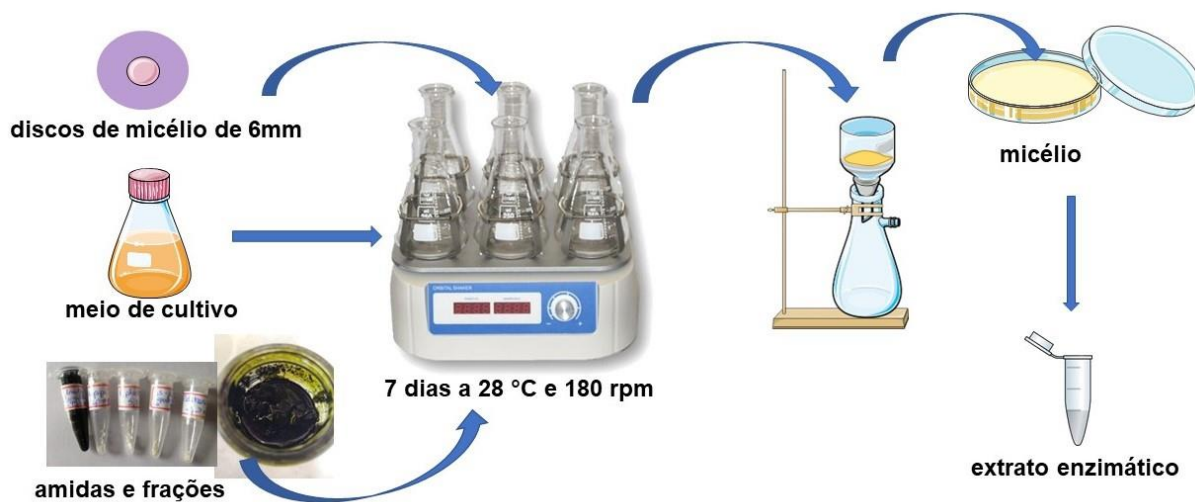
Os poços em que os extratos apresentaram atividade antimicrobiana permaneceram sem alteração de cor, enquanto aqueles que apresentaram crescimento microbiano modificaram a coloração para a cor avermelhada (CAVALCANTI *et al.*, 2011 e VARGAS, 2017).

4.4.3 Bioensaio em fermentação submersa da cepa de *Fusarium sp.* com as frações e amidas para extração bioquímica e avaliação do crescimento micelial

Como mostra a Figura 15, discos de micélio foram obtidos a partir de colônias crescidas em meio batata dextrose ágar (BDA) por um período de 7 dias consecutivos em temperatura média de 28°C.

Foi realizada a transferência de 3 discos de ágar e micélio de 6mm para erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio fermentativo constituído por sacarose, nitrato de sódio, fosfato dipotássico, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e sulfato de ferro. Os frascos contendo a cepa do fungo, o meio de cultivo e as frações e amidas, nas concentrações de 20, 50 e 100 mg/mL de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* foram mantidos por 7 dias a 28°C e 180rpm em sala de cultivo.

Após a fermentação o sobrenadante foi descartado e o micélio foi separado por filtração, obtido o peso úmido e na sequência foi realizada as extrações bioquímicas para as análises enzimáticas.



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

Figura 15. Resumo das etapas adotadas no bioensaio com *Fusarium* sp.

4.5 Determinação do estresse oxidativo em cultura de *Fusarium* sp. expostos aos extratos e compostos isolados

4.5.1 Extrações bioquímicas

A biomassa micelial obtida a partir da fermentação, foi filtrada, determinada o peso úmido. Em seguida homogenizada na proporção 2,5 g para cada 6 mL de tampão de fosfato 0,1 mol (pH 6,5) contendo 1% (w/v) de polivinilpirrolidona (PVP). Posteriormente centrifugadas a 15.000 x g e 0°C durante 10 min, sendo o sobrenadante obtido armazenado em criotubos a -20°C (MECINA *et al.*, 2019; LOURENÇÃO, *et al.*, 2021).

4.5.2 Peroxidação Lipídica

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada pelo método de quantificação do teor de malondialdeído (MDA). Foi utilizado o método de Madhava Rao; Sresty (2000) com modificações. Foi utilizado uma alíquota de 1 mL do material obtido da extração. As amostras foram transferidas para tubos de vidro e adicionados 4 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em ácido tricloroacético (TCA) a 20 % (p/v). A mistura foi aquecida a 95°C durante 30 min e posteriormente resfriada em banho com gelo. A mistura resultante foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 min e a absorbância da sobrenadante medida a 532 nm. As medições foram corrigidas para turbidez inespecífica pela

subtração da absorbância a 600 nm. A concentração de MDA será calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mmol/cm, de acordo com metodologia de Demiral; Türkan (2005). Os resultados foram apresentados em mmol/L.

4.6 Espécies reativas de oxigênio: formação do peróxido de hidrogênio intracelular (H₂O₂)

Foi utilizado o método de Jana e Choudhuri (1982) com modificações para quantificar a formação interna de H₂O₂.

Para quantificar a concentração de H₂O₂, 133 mL de cloreto de titânio 0,1% (em 20% H₂SO₄) foram adicionados a 400 mL do sobrenadante, e após 1 min de incubação, a absorbância da mistura de cor vermelho-laranja foi medida a 410 nm com um espectrofotômetro Biospectro SP-22.

O coeficiente de extinção de 0,28 L mmol⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para calcular a concentração de H₂O₂ em µmol/g.

4.7 Determinação de proteínas totais

A concentração total de proteínas foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e expressa em µg/mL, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A extração das enzimas realizada, no item 4.6.1, foi utilizada para a quantificação das proteínas totais.

4.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da enzima catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) foi determinada com base na sua função peroxidativa de acordo com Johansson e Borg (1988).

A metodologia utiliza o metanol como um doador de hidrogênio para a catalase. Resulta na formação de formaldeído que é quantificado colorimetricamente com o reagente Purpald.

Foi preparado uma solução mista com 100 mL de tampão fosfato de potássio (25 mmol, pH 7,0), 100 mL de metanol (P.A.) e 20 mL de peróxido de hidrogênio (0,27%, v / v). A reação foi iniciada em frascos ependorf, com a adição de 50 µL de extrato da enzima e 350 µL de água deionizada. Em seguida foi adicionado 500 µL da solução mista preparada previamente. Os frascos de ependorf foram incubados à temperatura de 28°C, com agitação contínua por 20

minutos. Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 250 μ L de hidróxido de potássio 7,8 M.

Em seguida, 500 μ L de Purpald 34,2 mmol (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) em HCl a 480 mmol foi adicionado, e a mistura reacional incubada novamente durante 10 min a temperatura de 28°C com agitação contínua. Após o período de incubação foi adicionado 250 μ L de solução de periodato de potássio 65,2 mmol. Os frascos foram deixados abertos para liberação de gases formados e em seguida foi centrifugado por 5 minutos, am 15.000 rpm à 4°C.

A amostra foi lida em absorvância de 550nm com um espectrofotômetro Biospectro SP-22. A atividade da enzima foi calculada a partir de curvas de calibração feitas com formaldeído (0-120 mmol). Uma unidade (U) de CAT é definida como a quantidade de enzima que causou a formação de 200 mmol de formaldeído nas condições do ensaio acima definidas. A atividade de CAT foi expressa em unidade (U)/mL de extração.

Atividade da peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7) foi determinada de acordo com Reddy *et al.* (1996).

Foi preparado uma solução mista com 250 μ L de solução de Pirogalol (0,05 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5) e 42 μ L de solução de H₂O₂ 1%. Foi adicionado em uma cubeta, e a reação foi iniciada pela adição de 100 μ L de extrato da enzima. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro em absorvância de 430nm. A alteração na absorvância por minuto é proporcional à atividade da enzima. A atividade foi apresentada em U/mL de extração.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) (EC 1.11.1.6) foi mensurada em espectrofotômetro de acordo com metodologia descritos por Mishra, Mishra e Singhal (1993). O meio de incubação ocorreu a partir de uma solução mista constituída por 240 mL de água deionizada e 40 mL de tampão de fosfato de potássio (67 mmol) (pH 7,8), 40 mL de solução de metionina (45mM), 40 mL de solução de riboflavina (5,3mM) e 40 mL de solução de cloreto de nitro azul de tetrazólio (NBT) (84 mmol).

Os tubos de reação contendo 2 mL da solução mista e 100 mL do extrato enzimático foram colocados em uma câmara forrada com folhas de alumínio e iluminados com duas lâmpadas fluorescentes de 15 W, a 25°C durante 10 min. Após a exposição à luz, a absorvância do meio de incubação foi medida por

espectrofotometria a 600 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que inibiu 50% da redução de NBT, de acordo com a equação: %Inibição = (Absorbância da amostra – Absorbância controle negativo/Absorbância controle negativo) x 100, onde o controle negativo não contém o extrato da enzima.

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) (E.C 2.5.1.18) foi determinada utilizando o modelo de substrato padrão do dinitrobenzeno 1-cloro-2,4- (CDNB) de acordo com metodologia descrita por Mauch e Dudler (1993).

A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de extrato da enzima e 2 mL da mistura reacional contendo 3,6 mmol de glutathione reduzida e 1 mmol de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,5). A atividade enzimática foi determinada através do monitoramento da variação da absorbância a 340 nm. A alteração na absorbância será diretamente proporcional à atividade de GST.

4.9 - Avaliação da atividade oxidativa dos extratos

4.9.1 Preparo das amostras

A mobilidade relativa em eletroforese (MRE) foi avaliada pelo método de acordo com Hsieh *et al.* (2005) com adequações e foram descritas a seguir.

Foram preparadas três soluções iniciais. A primeira solução constituída por Albumina de soro bovino (BSA 2 mg/mL), diluída em tampão fosfato (PBS) (10 mM, pH 7,4). A segunda solução foi preparada com CuCO₄ (1 mg/mL) adicionada de Tampão fosfato (10 mM, pH 7,4). A terceira solução foi constituída por H₂O₂ (10,3M) adicionada da segunda solução.

Os tratamentos foram preparados em uma concentração de 20 mg de extrato/mL da segunda solução CuCO₄ em Tampão fosfato. Para o preparo dos controles foram utilizados, o controle negativo (primeira solução) o controle 1 (1 mL da primeira solução adicionada de 1 mL da segunda solução) e controle positivo (1 mL da primeira solução adicionada de 1 mL da terceira solução).

Todos os tratamentos e controles foram incubados a 37°C durante 48 horas. A eletroforese de BSA foi realizada utilizando gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.9.2 Preparo do gel de eletroforese unidirecional (SDS-PAGE)

As partições dos extratos vegetais de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* foram analisadas por eletroforese unidirecional em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970; KOCHA *et al.*, 1997).

O gel de poliacrilamida nas concentrações de 12% (22,2% acrylamida/0,6 bis-acrylamida; 1M Tris-HCl pH 8,8; água destilada; SDS 10%; persulfato de amônio 10%; TEMED) foram montados em placas do sistema de eletroforese K33-10V (KASVI, Brasil) de dimensões 10 x 10 cm. As amostras juntamente com o tampão de amostra (1M Tris-HCl pH 6,8; SDS 4%; Glicerol 20%; B-mercaptoetanol 5%; Azul de bromofenol 0,2%) foram submetidos a 95°C por 5 minutos e posteriormente aplicadas ao gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).

A proteína BSA foi eletroforeticamente separada utilizando uma corrente de 200mA e voltagem de 100V. Após a corrida, os géis foram corados com solução de coomassie (Coomassie brilhant blue R-250 dissolvido em metanol 50% e ácido acético 10%) e mantidos em ácido acético 7% até a digitalização das imagens.

4.10 Análise estatística

Todas as análises e determinações foram realizadas em triplicata e os resultados foram avaliados por meio da análise de variância paramétrica ANOVA, complementada com o teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5. Resultados e Discussão

5.1 Rendimento do extrato bruto etanólico e do fracionamento por partição do extrato bruto

Na tabela 01 estão apresentados os resultados os rendimentos em grama dos extratos brutos etanólicos obtidos diretamente das partes vegetais, folhas, caules e raízes de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*, bem como o rendimento (em gramas) do fracionamento por partição dos extratos brutos vegetais de ambas as espécies.

Tabela 1. Rendimento em gramas dos extratos brutos etanólicos obtidos diretamente das partes vegetais, folhas, caules e raízes de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*. Rendimento em gramas do fracionamento por partição dos extratos brutos.

Solventes e Extratos	<i>Piper arboreum</i>		
	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico bruto de 50g de extrato seco	5,56g PAF	2,44g PAC	1,17g PAR
Solventes	Frações		
Solução hidrometanólica (80%) de 0,4g extrato bruto	0,02g PAF1	0,03g PAC1	0,15g PAR1
Hexano PA	0,22g PAF2	0,08g PAC2	0,12g PAR2
Acetato de Etila PA	0,12g PAF3	0,07g PAC3	0,10g PAR3
<i>Piper tuberculatum</i>			
	Folha	Caule	Raiz
Extrato etanólico bruto de 50g de extrato seco	3,83g PTF	1,45g PTC	3,06g PTR
Solventes	Frações		
Solução hidrometanólica (80%) de 0,4g extrato bruto	0,07g PTF1	0,14g PTC1	0,10g PTR1
Hexano	0,17g PTF2	0,10g PTC2	0,07g PTR2
Acetato de Etila	0,17g PTF3	0,06g PTC3	0,01g PTR3

5.2 Isolamento e manutenção do fungo *Fusarium* sp.

O isolado fúngico foi mantido em meio BDA de acordo com metodologia de Reis (1997) com adaptações. As placas foram incubas por um período de 5-7 dias à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$. Após crescimento, a cepa foi mantida sob refrigeração e realizada a repicagem para manutenção.

5.3 Avaliação da melhor condição de esporulação do fungo *Fusarium* sp.

Os resultados da esporulação (Tabela 2 e Figura 16) mostraram uma diferenciação de comportamento do fungo, em conformidade com as condições de luminosidade e nutricionais a que foi submetido. A maior produção de conídios foi constatada com relação à condição de escuro contínuo (EC) e com o meio de cultivo BDA que apresentou maior riqueza nutricional e maior quantidade de carboidratos complexos. Estas características são citadas por

diversos autores como capazes de induzir a reprodução de muitos fungos mitospóricos (LUKENS, 1963; STRANDBERG, 1987).

A luminosidade foi um fator fundamental na esporulação de *Fusarium* sp. uma vez que no regime escuro contínuo foram observadas as maiores médias diferindo estatisticamente do fotoperíodo de 12 horas (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com Bolkan *et al.* (1982), que observaram menores taxas de crescimento micelial de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, na presença de luz contínua e melhor esporulação no escuro contínuo a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$. Resultados opostos foram obtidos por Devi e Singh (1994), os quais observaram que *F. moniliforme* esporulou mais em luz contínua. Sabe-se que a luminosidade pode exercer efeito indutor ou inibidor sobre a formação de estruturas reprodutivas. Trione e Leach (1969) relataram que, para fungos cuja esporulação é induzida pela luz, este agente físico age diretamente na ativação de enzimas-chave envolvidas na esporogênese. Os mesmos autores afirmam ainda que a quantidade e a qualidade da luz necessária para induzir a formação de estruturas reprodutivas variam de acordo com a espécie fúngica. Com fotoperíodo de 12h *Fusarium* sp. apresentou as menores taxas de esporulação nos meios de cultivo. De acordo com Nozaki *et al.* (2004), nem sempre as condições que favorecem o crescimento do fungo são as mesmas para esporulação. A necessidade de luz para o crescimento e esporulação de fungos é muito variável, até mesmo entre isolados da mesma espécie (CARNAÚBA *et al.*, 2007). Alguns esporulam melhor na presença de luz contínua ou em escuro contínuo (COOPERMAN; JENKINS, 1986).



Figura 16. Esporos (conídios) de *Fusarium* sp.

Tabela 2. Produção de conídios ($\times 10^7$ conídios/mL) de *Fusarium* sp. em dois meios de cultura sob dois regimes de luminosidade: escuro contínuo (EC) e fotoperíodo 12 horas (FP).

Meios de cultura ¹		Regimes de luminosidade	
BDA*	1,35 ^a	EC	1,24a
MEP**	0,53 ^b	FP	0,63b
C.V. = 32,08%			

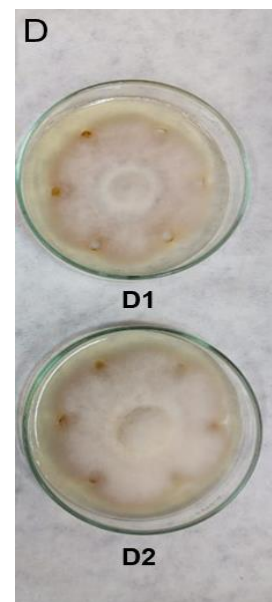
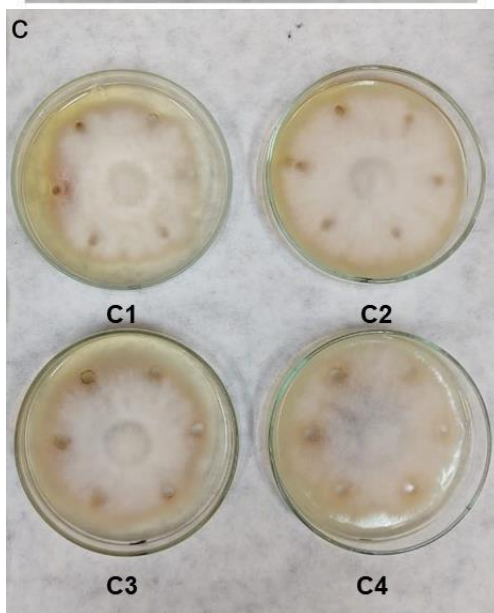
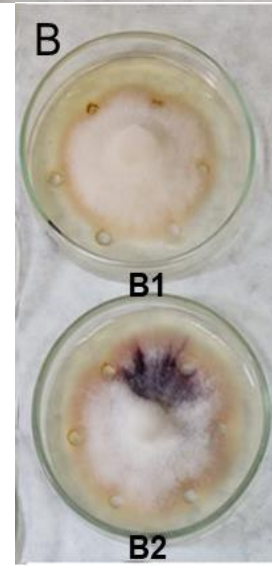
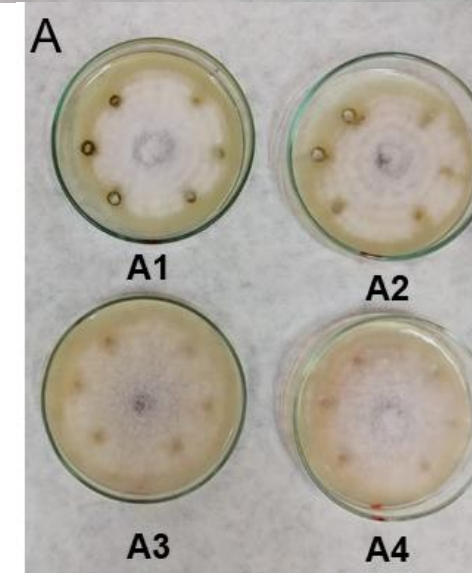
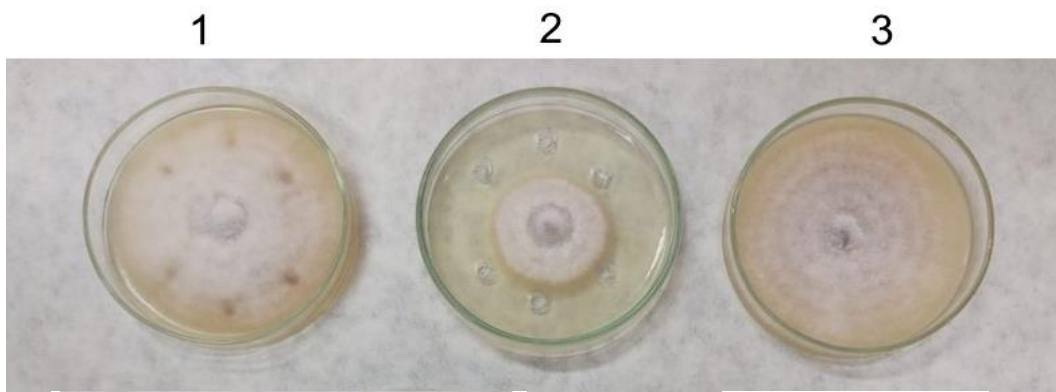
*BDA (Batata-dextrose-ágar); *MEP (Malt Extract Powder). EC = escuro contínuo e FP fotoperíodo de 12 horas. Médias seguidas pelas letras a e b diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.4 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos e frações de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*

Na avaliação da ação inibitória dos diferentes extratos *P. arboreum* e *P. tuberculatum* sobre cultura *Fusarium* sp., constatou-se que todas as concentrações dos extratos brutos apresentaram diferenças com relação aos controles (positivo e negativo). No entanto este efeito no crescimento do fungo foi dependente da concentração e da parte da planta (raiz, caule ou folha) da qual foi obtido o extrato bruto, além do tipo extração e solvente aplicado para obtenção. Contudo os diferentes extratos apresentaram comportamento concentração dependente (Figuras 17 e 18). Na Tabela 03 estão apresentados os dados de sensibilidade da cultura de *Fusarium* sp. à exposição a diferentes extratos e concentrações de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*, onde a sensibilidade foi avaliada tanto pelo crescimento micelial quanto a cor e aparência dos micélios em comparação com os padrões positivo e negativo da cultura.

Resultados antifúngicos semelhantes foram observados em um estudo realizado por Araújo *et al.* (2014), onde extratos metanólicos de folhas de *Piper marginatum*, inibiram o crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum scovillei*, sendo que o extrato obtido do fracionamento com acetato de etila reduziu significativamente o crescimento *in vitro* de *Colletotrichum scovillei*, o que está correlacionado com a presença de amidas.

Em estudos mais recentes realizado por Ciaccio *et al.* (2018); Keriene *et al.* (2019); Naqvi *et al.* (2019) e Mannal *et al.* (2021) foi registrado que extratos de origem vegetal são eficazes no controle do crescimento micelial e como antifúngicos sobre cultura de espécies do gênero *Fusarium* sp.



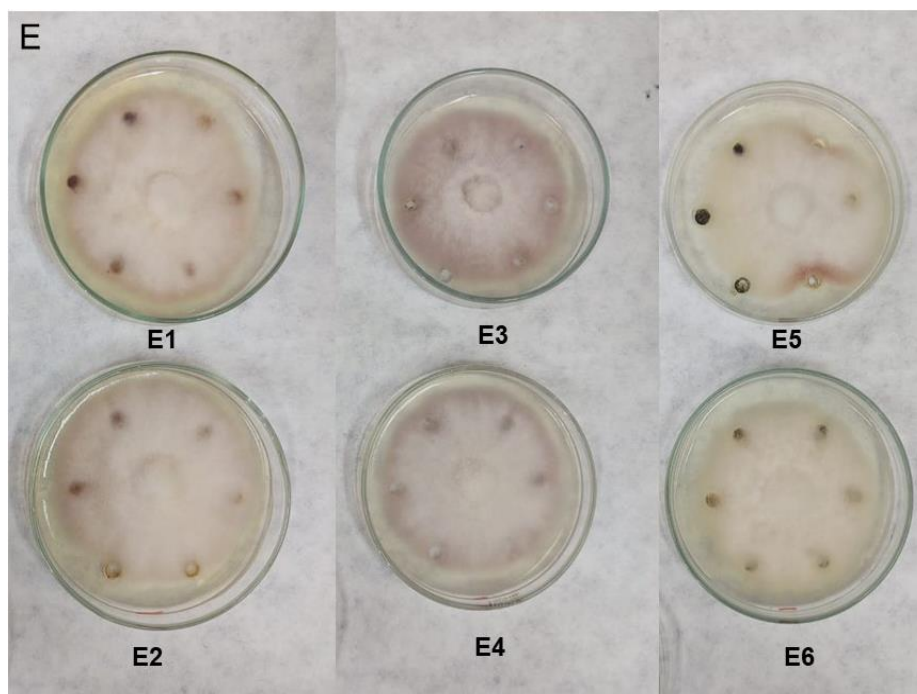
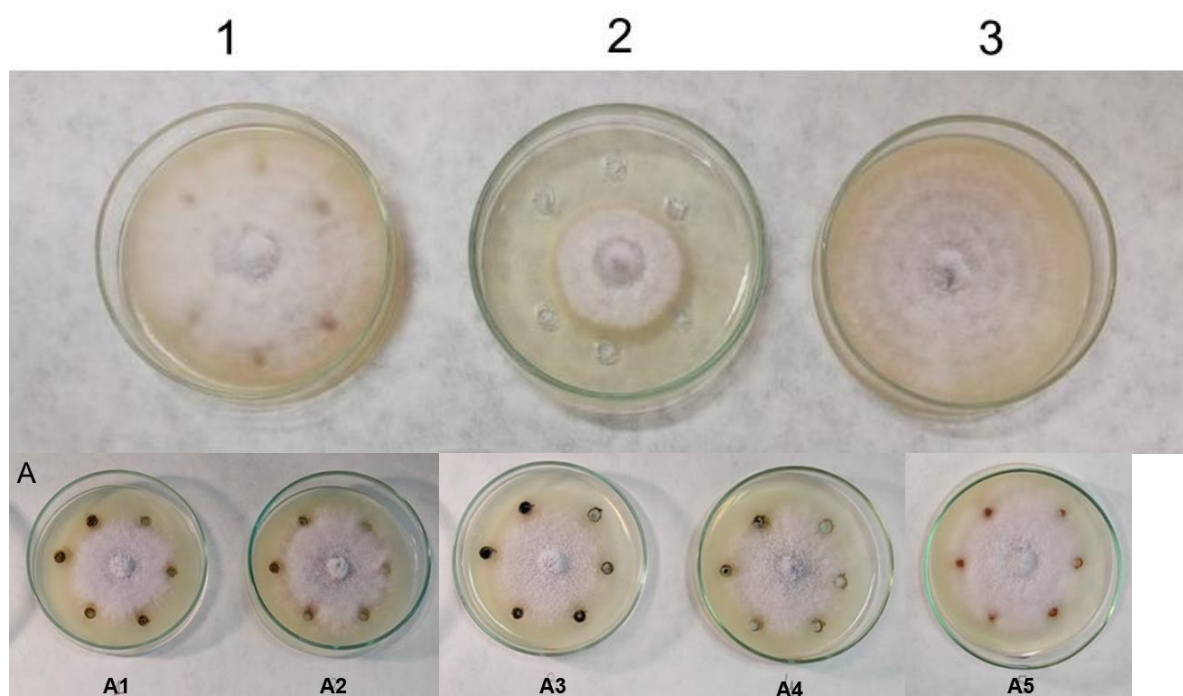


Figura 17. Crescimento micelial de *Fusarium* sp., aos 7 dias de avaliação com frações de *P. arboreum*. (1 - Controle Solvente (DMSO/Soro+inóculo); 2 - Controle positivo (inóculo+fungicida); 3 - Controle Negativo (inóculo). Extratos bruto etanólico de *P. arboreum*, (A1) caule 100 mg/mL e (A2) 50 mg/mL, (A3) folha 100 mg/mL e (A4) 50 mg/mL, (B1) raiz 100 mg/mL e (B2) 50 mg/mL. Extrato hidrometanólico (C1) de caule 100 mg/mL e (C2) 50 mg/mL, extrato hexânico (C3) de caule 100mg/mL e (C4) 50 mg/mL. Extrato acetato de etila (D1) de raiz 100 mg/mL e (D2) 50 mg/mL. Extrato hidrometanólico (E1) de folha 100mg/mL e (E2) 50 mg/mL, extrato hexânico (E3) de folha 100 mg/mL e (E4) 50 mg/mL, extrato acetato de etila (E5) de folha 100 mg/mL e (E6) 50 mg/mL.



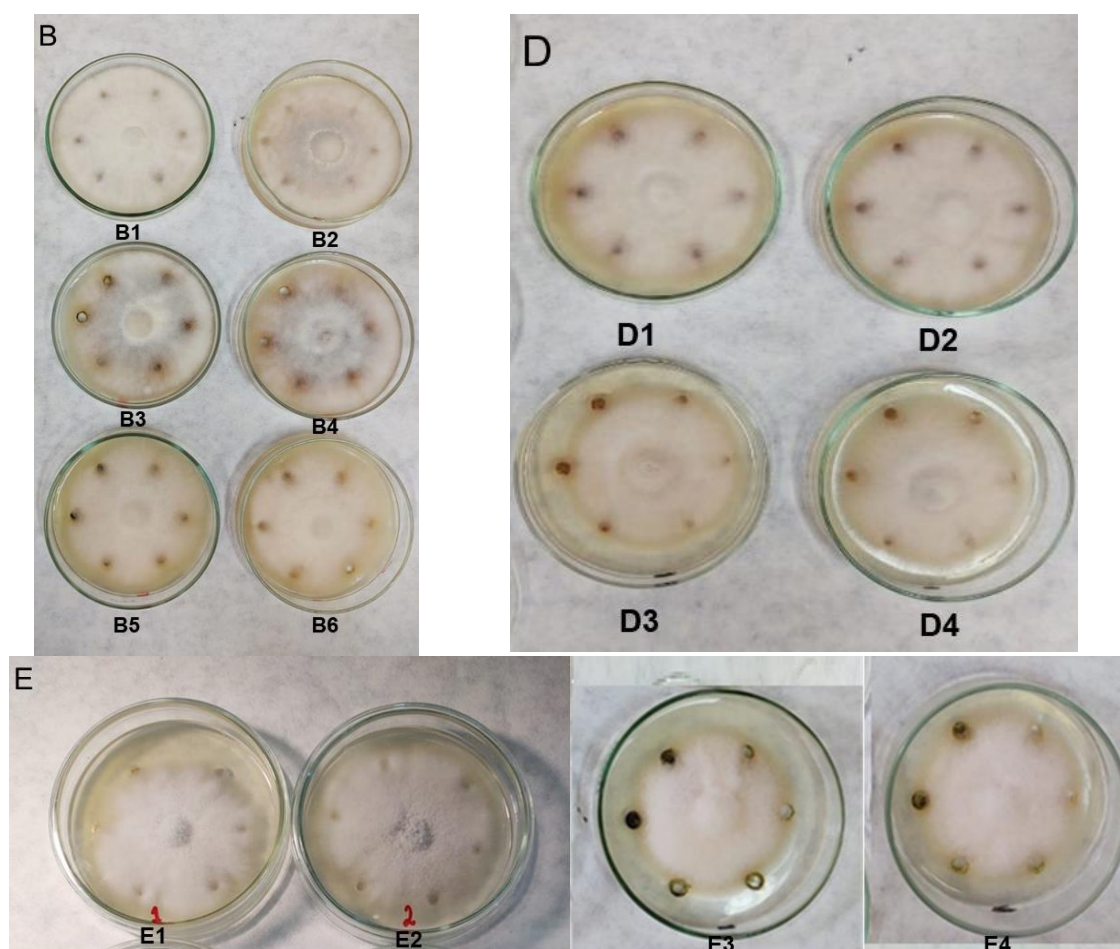


Figura 18. Crescimento micelial de *Fusarium* sp., aos 7 dias de avaliação com frações de *P. tuberculatum*. (1 - Controle Solvente (DMSO/Soro+inóculo); 2 - Controle positivo (inóculo+fungicida); 3 - Controle Negativo (inóculo). Extratos bruto etanólico de *P. tuberculatum*, (A1) folha 100 mg/mL e (A2) 50 mg/mL, (A3) caule 100 mg/mL e (A4) 50 mg/mL, (A5) raiz 50 mg/mL. Extrato hidrometanólico, (B1) caule 100 mg/mL e (B2) 50 mg/mL. Extrato hexânico (B3) caule 100 mg/mL e (B4) 50 mg/mL. Extrato acetato de etila (B5) caule 100 mg/mL e (B6) 50mg/mL. Extrato hidrometanólico (D1) de raiz 100mg/mL e (D2) 50 mg/mL. Extrato acetato de etila (D3) 100mg/mL e (D4) 50mg/mL. Extrato hidrometanólico (E1) de folha 100 mg/mL e (E2) 50 mg/mL, extrato acetato de etila (E3) de folha 100 mg/mL e (E4) 50 mg/mL).

Tabela 3. Avaliação da atividade fungicida dos extratos brutos e fracionados de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* pelo método de difusão em ágar com perfuração em poços com 10 μ L, 20 μ L e 50 μ L nas concentrações de 100 mg/mL e 50 mg/mL.

Fração	PAF	PAF1	PAF2	PAF3	PAC	PAC1	PAC2	PAC3	PAR	PAR1	PAR2	PAR3
100mg	S	S	S	S	S	S	S	-	S	-	-	S
50mg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Piper tuberculatum

Fração	PTF	PTF1	PTF2	PTF3	PTC	PTC1	PTC2	PTC3	PTR	PTR1	PTR2	PTR3
100mg	S	S	-	S	S	R	S	S	S	S	S	S
50mg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R = Resistente ao extrato, **S** = Sensível ao extrato;

PA = *P. arboreum*: PAF= folha (extrato bruto), PAF1= folha (extrato hidrometanólico), PAF2=folha (extrato hexânico), PAF3= folha (extrato acetato de etila); PAC= caule (extrato bruto), PAC1= caule (extrato hidrometanólico), PAC2= caule (extrato hexânico), PAC3= caule (extrato acetato de etila); PAR= raiz (extrato bruto), PAR1= raiz (extrato hidrometanólico), PAR2= raiz (extrato hexânico), PAR3= raiz (extrato acetato de etila);

PT = *P. tuberculatum*: PTF= folha (extrato bruto), PTF1= folha (extrato hidrometanólico), PTF2= folha (extrato hexânico), PTF3= folha (extrato acetato de etila), PTC= caule (extrato bruto), PTC1= caule (extrato hidrometanólico), PTC2= caule (extrato hexânico), PTC3= caule (extrato acetato de etila), PTR= raiz (extrato bruto), PTR1= raiz (extrato hidrometanólico), PTR2= raiz (extrato hexânico), PTR3= raiz (extrato acetato de etila).

5.5 Concentração Inibitória Mínima (MIC) por microdiluição

Nas Figuras 19 e 20 estão apresentados os resultados das microdiluições para a determinação do MIC antifúngico dos extratos etanólicos brutos e frações de *P. arborium* e *P. tuberculatum*.

O MIC corresponde à menor diluição na qual é verificada ausência de crescimento do fungo. Assim, quanto menor o MIC maior a eficácia da concentração e tipo de extrato analisado. As diluições dos diferentes extratos das duas espécies compreenderam as concentrações de 200 a 1,56 mg/mL. Após serem transferidas para a placa de análise contendo o meio de crescimento de *Fusarium* sp. foi adicionado o microrganismo.

Decorrido o tempo de crescimento do fungo (24 horas), foi adicionado aos poços o 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), um revelador indicador de oxirredução utilizado para detectar a presença de células vivas. O mecanismo do TTC tem base na redução enzimática do TTC, incolor, a 1,3,5- trifenilformazan, de coloração avermelhada. Este mecanismo só acontece em presença de células vivas (metabolicamente ativas) devido as enzimas desidrogenases, que

catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Assim, pode-se dizer que a coloração é uma indicação positiva de células vivas por meio da detecção de respiração a nível celular.

Os extratos de ambas as espécies na concentração 100 mg/mL mostraram-se efetivos no controle do crescimento de *Fusarium* sp. A concentração de 100 mg/mL apresentou nítida ação fungistática e a de 200 mg/mL apresentou atividade fungicida sobre *Fusarium* sp.

Gakuubi, Maina e Wagacha (2017) demonstraram que concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis*, inibiram o crescimento de *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*. Contudo, o óleo essencial não apresentou atividade fungicida contra *F. solani* em qualquer uma das concentrações de óleo essencial avaliadas.

Castellanos *et al.* (2020) avaliando a atividade antifúngica de óleos essenciais de pimenta (*Piper nigrum*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*) para determinar a concentração inibitória mínima (MIC) contra *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*, demonstraram que óleos essenciais e seus extratos são antifúngicos nas concentrações de 400 a 500 ppm após 10 dias de cultura.

Chacón *et al.* (2021) mostraram que o óleo essencial da parte aérea de *Piper auritum* apresentou efeito fungistático nos isolados fitopatogênicos de *Fusarium* sp., encontrando um MIC de concentração de extrato de 6 mg/mL para *F. oxysporum* (FCHA-T7) e 9 mg/mL para *F. oxysporum* (FCHJ-T6) e *F. equiseti* (FCHE-T8). Assim tais evidências corroboram os resultados obtidos no presente estudo pela metodologia de obtenção de MIC por microdiluição.

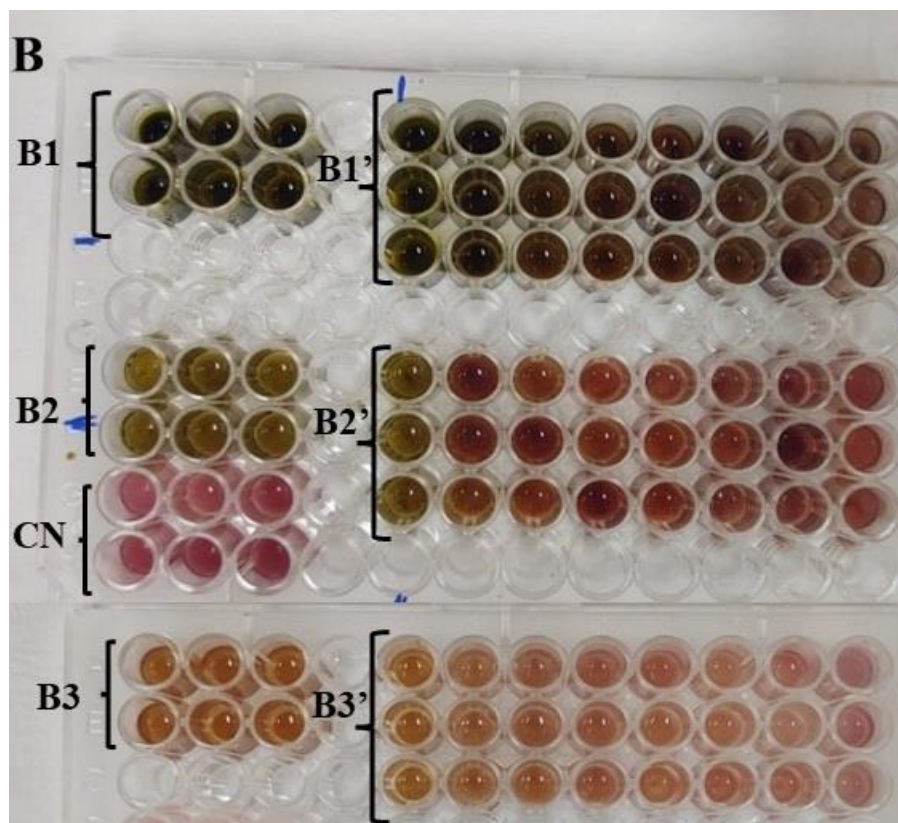
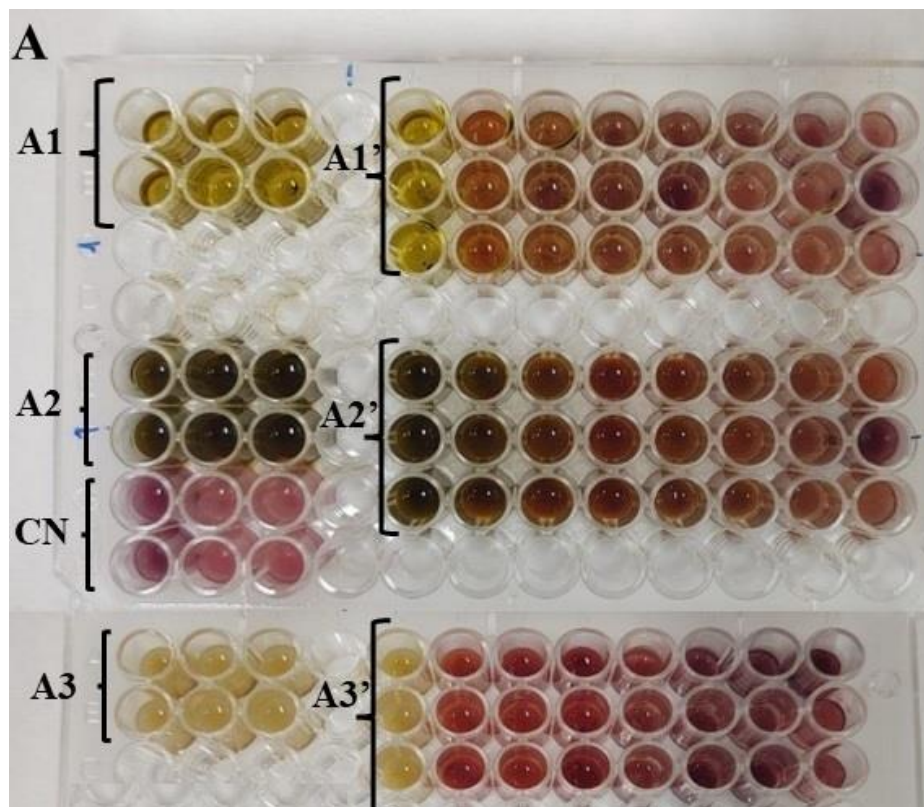
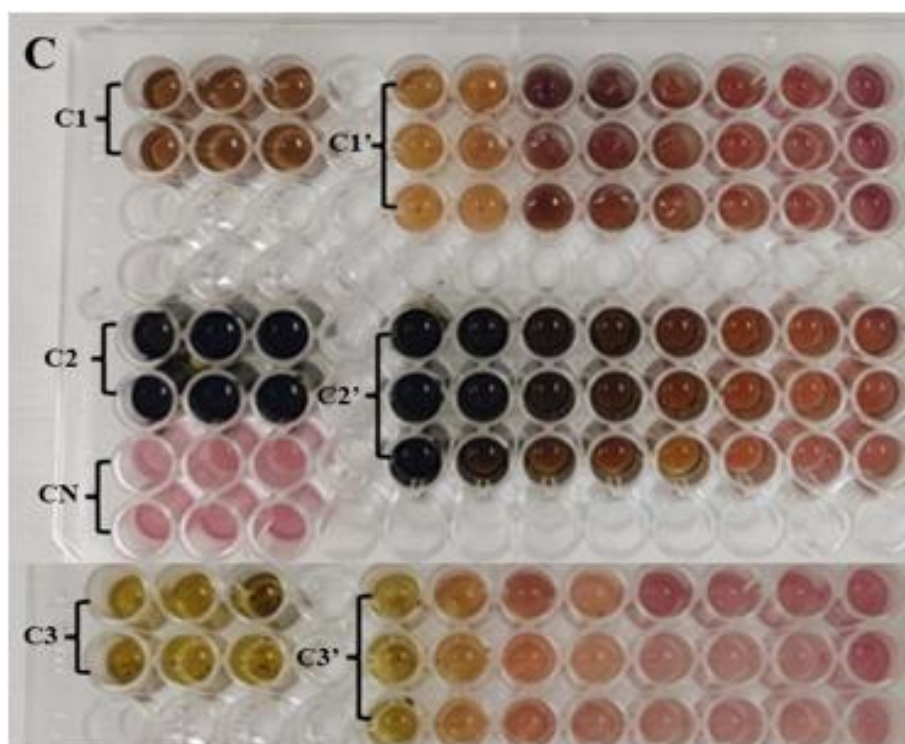


Figura 19. Placa de teste de microdiluição após aplicação do revelador TTC, com extrato bruto de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* em *Fusarium* sp. CN=

Controle negativo (meio de cultivo+inóculo). (**A** = extrato bruto etanólico de *P. arborium*; **A1** = caule+meio de cultivo; **A1'**= caule+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **A2** = folha+meio de cultivo; **A2'**= folha+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **A3** = raiz+ meio de cultivo; **A3'**= raiz+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL). (**B** = extrato bruto etanólico de *P. tuberculatum*; **B1** = caule+meio de cultivo; **B1'**= caule+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **B2** = folha+meio de cultivo; **B2'**= folha+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL. **B3**= raiz+ meio de cultivo; **B3'**= raiz+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL).



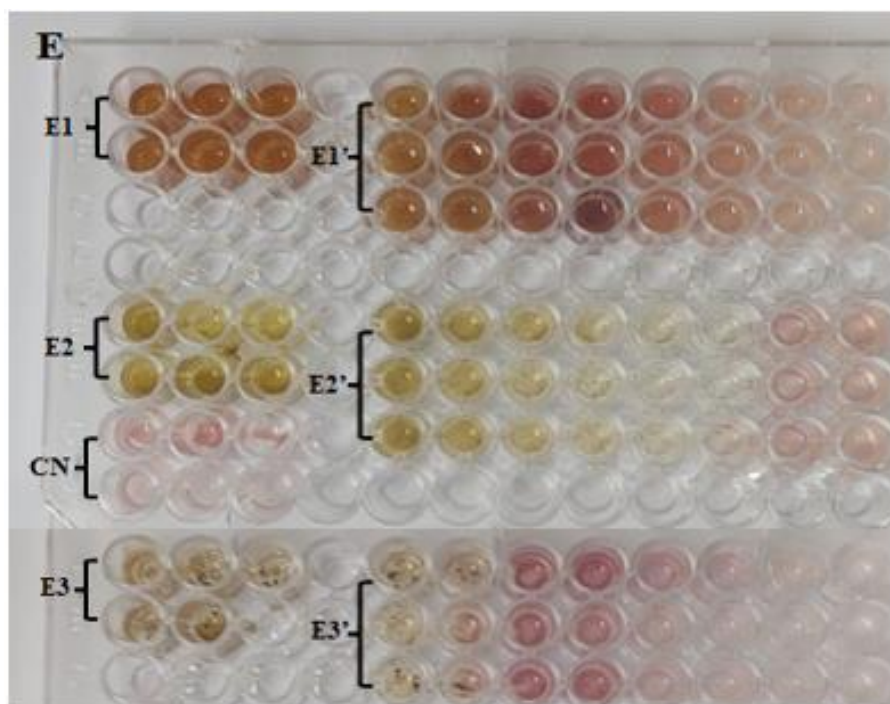
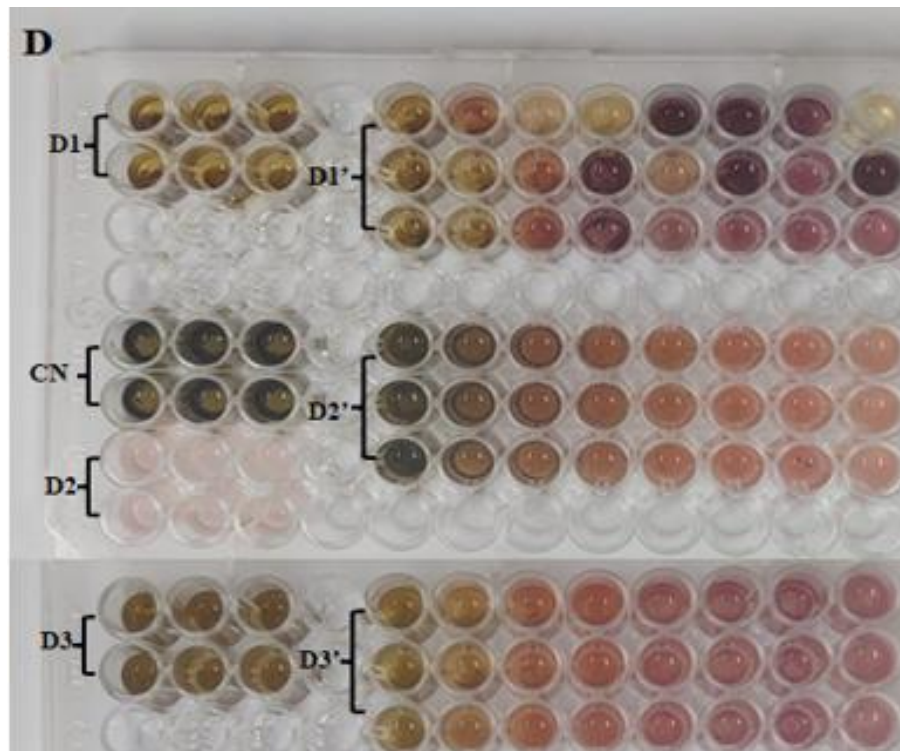


Figura 20. Placa de teste de microdiluição após aplicação do revelador TTC, com extrato bruto de *P. arboreum* e *P. tuberculatum* em *Fusarium* sp. **CN**= Controle negativo (meio de cultivo+inóculo). (**C, D e E** = *P. tuberculatum*; **C1** = folha (hidrometanólico)+meio de cultivo; **C1'**= folha (hidrometanólico)+meio de

cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **C2** = folha (hexânico)+ meio de cultivo; **C2'**= folha (hexânico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **C3** = folha (acetato de etila)+ meio de cultivo; **C3'**= folha (acetato de etila)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **D1** = caule (hidrometanólico)+meio de cultivo; **D1'**= caule (hidrometanólico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **D2** = caule (hexânico)+ meio de cultivo; **D2'**= caule (hexânico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **D3** = caule (acetato de etila)+ meio de cultivo; **D3'**= caule (acetato de etila)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **E1** = raiz (hidrometanólico)+meio de cultivo; **E1'**= raiz (hidrometanólico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **E2** = raiz (hexânico)+ meio de cultivo; **E2'**= raiz (hexânico)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL; **E3** = raiz (acetato de etila)+ meio de cultivo; **E3'**= raiz (acetato de etila)+meio de cultivo+inóculo nas concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL).

A partir da avaliação da atividade antifúngica das frações de *P. arboreum* e *P. tuberculatum*, juntamente com a avaliação da concentração Inibitória Mínima (MIC) por microdiluição, foi possível selecionar os melhores resultados e, elencar as frações mais eficientes com ação antifúngica.

5.6 Avaliação da atividade oxidativa pela degradação da albumina

Nas figuras 21 e 22 estão apresentados os géis de eletroforese evidenciando a degradação pró-oxidativa da proteína padrão BSA na presença do íon de cobre e o peróxido de hidrogênio como agente oxidante. Na figura 21 é possível observar que tanto os extratos como as frações de *P. tuberculatum* atuaram como pró-oxidante semelhantemente ao íon cobre, descrevendo o mesmo perfil eletroforético. No entanto a fração PTC2 (fração hexânica do caule) apresentou um perfil eletroforético semelhante ao do íon cobre em associação ao BSA, não agindo como agente oxidativo.

Quanto ao perfil eletroforético pró-oxidativo do BSA em associação com extratos e frações de *P. arboreum* (Figura 22), é possível observar que tanto os extratos como as frações atuaram como pró-oxidante semelhantemente ao íon cobre, descrevendo o mesmo perfil eletroforético. Já a fração PAR1 (fração hidrometanólico da raiz) apresentou um perfil eletroforético semelhante ao do íon cobre em associação ao BSA, não agindo como agente oxidativo.

Com a *Piper arboreum* os extratos e frações de números 8, 9, 11 e 12 também apresentaram atividade oxidativa (Figura 22).

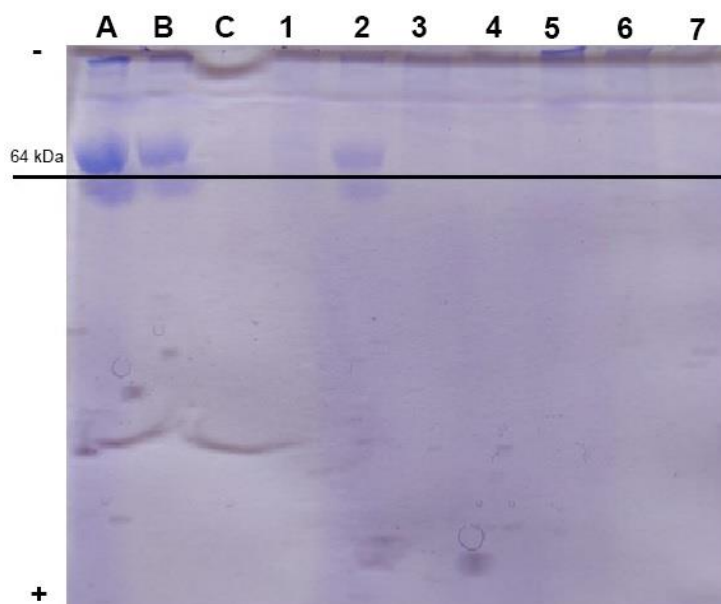


Figura 21. Gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue que mostra degradação oxidativa da albumina (BSA) na presença de frações de *P. tuberculatum*. (A = Controle negativo (BSA 2 mg/mL); B = BSA + Cu; C = Controle negativo (BSA+Cu+H₂O₂); 1= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTC; 2= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTC₂; 3= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTF; 4= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTF₃; 5) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTR₂; 6) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PTR₃; 7) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAC).

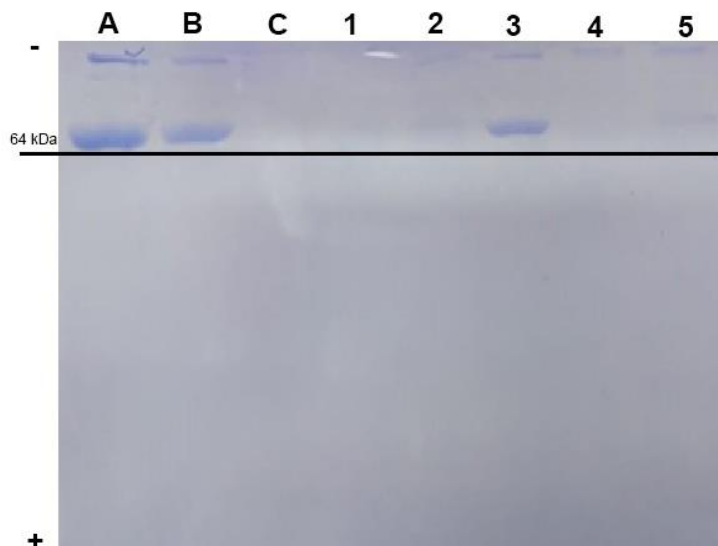


Figura 22. Gel de poliacrilamida corado com Comassie Blue que mostra degradação oxidativa da albumina na presença de frações de *P. arboreum*. A= Controle negativo (BSA 2mg/mL); B= BSA + Cu; C) Controle negativo (BSA+Cu+H₂O₂); 1= BSA + Cu + extrato (2mg/mL) PAR; 2= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAR3; 3= BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAR1; 4=BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAF3; 5) BSA + Cu + extrato (2 mg/mL) PAF2.

Na avaliação da atividade pró-oxidativa dos extratos e frações tanto de *P. arboreum* quanto de *P. tuberculatum*, foi possível observar danos oxidativos e degradação molecular do BSA. Estes danos ao BSA podem estar correlacionados com a presença de compostos provenientes de metabolismo secundários como alcaloides, compostos nitrogenados e ácidos fenólicos (ARAUJO, 2014; COTINGUIBA, 2018). Aguiar *et al.* (2007), demonstra que ácidos fenólicos são importantes agentes pró-oxidativos, com sua atividade direcionada a redução de Fe⁺³ e Cu⁺² e promotores da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentre ela principalmente as OH provenientes das reações de fenton e fenton cuproso.

De acordo com Mecina *et al.* (2019), extratos vegetais tem a capacidade de interferir em proteínas. A exposição dessas células a essas moléculas ocasiona condições estressantes, levando na produção e na concentração de ERO em células vivas, e a destruição dos componentes intracelulares. Somado a isso, Grant e Laoke (2000) relatam que os ERO, quando presente nos tecidos dos organismos alvo pode conduzir à morte celular. No presente estudo foi

possível constatar que os extratos e frações de ambas as espécies avaliadas comportam-se como agente oxidativos junto ao BSA e o íon cobre, atividade que pode levar a danos celulares e moleculares a diferentes organismos expostos aos mesmos.

5.7 Efeito das frações e amidas de *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum* no crescimento de *Fusarium* sp.

Foram realizadas análises preliminares para determinar a eficiência das frações e amidas previamente selecionadas com ação fungicida ou fungistática em fermentação submersa onde avaliou-se o crescimento micelial. O critério utilizado foi a determinação do peso úmido do micélio previamente fermentado juntamente com algumas frações e amida selecionada.

Na Figura 23 é possível verificar o efeito inibitório de crescimento das frações do extrato bruto do caule (PTC), folha (PTF) e extrato acetato de etila de folha (PTF3) de *P. tuberculatum* nas concentrações de 20, 50 e 100 mg/mL em 7 dias de fermentação. Na fração PTC a concentração de 50 mg/mL e 100 mg/mL apresentaram diferenças significativas em relação ao controle ($p > 0,05$), com média de 85% de inibição. As maiores reduções da biomassa ocorreram com PTF e PTF3 na concentração de 100 mg/mL, que apresentaram inibição acima de 70%. As concentrações 20 mg/mL tanto da fração PTF quanto a fração PTF3 não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

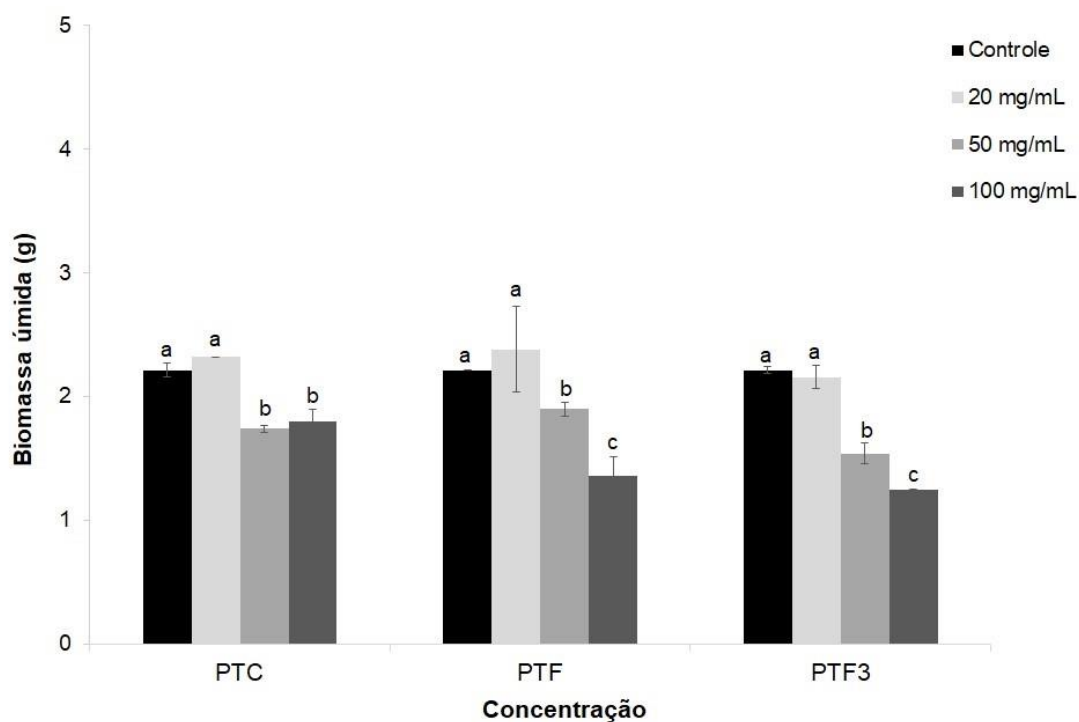


Figura 23. Efeito das frações de *P. tuberulatum* no crescimento de *Fusarium* sp. Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

Na Figura 24 foi possível observar que as frações obtidas de extrato bruto de caule (PAC) e extrato hexânico (PAF2) de *P. arboreum* não apresentaram efeito tóxico sobre o fungo nas três concentrações analisadas (20, 50 e 100 mg/mL). Ocorreu efeito inibitório somente quando realizou a fermentação sólida (item 5.5). Na fermentação em estado sólido o extrato não foi diluído em função do meio mantendo-se a concentração (100 mg/mL). Na fermentação submersa o extrato na concentração de 100 mg/mL, foi diluído também pela quantidade de líquido do meio de cultivo que foi de 50 mL.

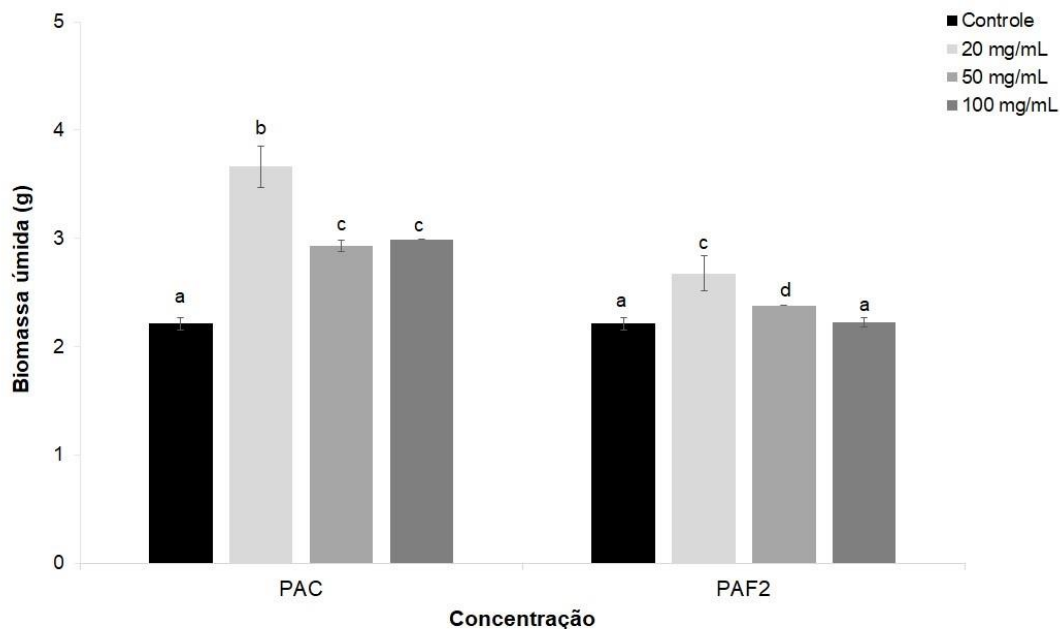


Figura 24. Efeito das frações de *P. arboreum* no crescimento de *Fusarium* sp. Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

A amida Piplartina (Figura 25) apresentou ação tóxica com cerca de 17% de ação fungistática sobre o crescimento de *Fusarium* sp em comparação com o controle, apresentando diferença significativa entre a concentração avaliada e o controle.

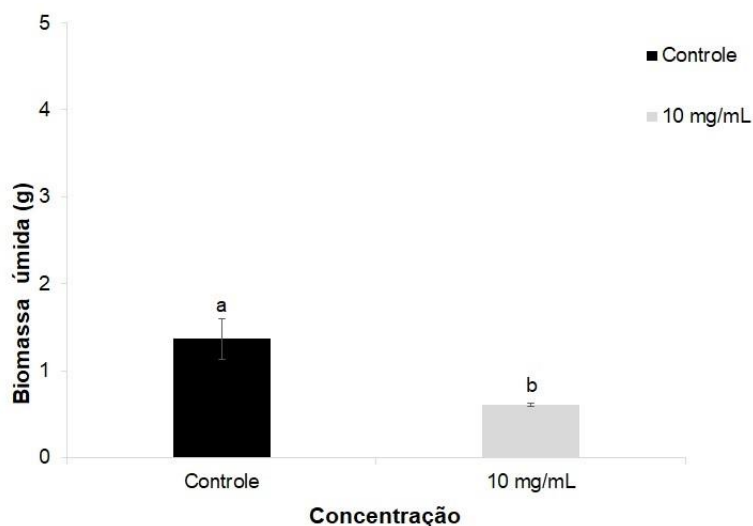


Figura 25. Efeito da Piplartina (*P. tuberculatum*) no crescimento de *Fusarium* sp. Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada amostra.

A ação fungicida e/ou fungistática de extratos e óleos de *Piper* sp. podem estar relacionadas com os constituintes químicos encontrados nos respectivos extratos ou óleos. Também pode ocorrer à atuação dos compostos que atuam de maneira sinérgica ou antagônica. A fermentação em estado sólido e a fermentação submersa podem apresentar resultados distintos. E isso pode estar relacionado a composição química do meio e a diluição final do extrato, sendo que na fermentação em estado sólido a concentração final permanece a mesma e na submersa a concentração inicial é diluída. Isso mostra a efetividade da ação do extrato que mesmo em uma diluição maior apresentou efeito tóxico para o fungo.

Oliveira *et al.* (2019) verificou inibição do crescimento micelial, com valores de 7,5% de inibição de *C. theobromicola*, na concentração 0,03% do óleo de *P. hispidum*, até valores de 56,2% de inibição com extratos *P. aduncum*. O mesmo autor constatou também que, a concentração 0,2% até 1% houve inibição acima de 50% do patógeno, exceto para a espécie *P. hispidum* e 100% de inibição do crescimento foi verificado na concentração de 1% utilizando óleo essencial de *P. callosum* e *P. marginatum*.

Constituintes químicos presentes em espécies do gênero *Piper* e representados em particular terpenoides, taninos, flavonoides e polifenóis (OOTANI *et al.*, 2013) podem afetar a permeabilidade e funcionamento de membranas dos microrganismos patogênicos. Eles também podem inibir a formação da parede celular, a divisão celular ou os processos de transcrição e tradução (MORAIS; MARINHO-PRADO, 2016; RAVEAU; FONTAINE; SAHRAOUI, 2020).

A partir desse estudo foi possível selecionar a espécie *P. tuberculatum*. Dando sequência ao estudo dos mecanismos de defesa do fitopatógeno *Fusarium* sp. Frente ao estresse ocasionado pela presença de constituintes químicos da planta. Nesse sentido com o objetivo de compreender o mecanismo de ação das frações e amida de *P. tuberculatum* foi investigado as mudanças fisiológicas e bioquímicas de *Fusarium* sp. Isso devido principalmente por que a maioria dos estudos sobre os efeitos dos componentes químicos das *Piper* estão restritos aos efeitos inibitórios de crescimento (SILVA *et al.*, 2001).

Para uma análise mais completa dos mecanismos de defesa deste fungo na presença das frações e amidas, prosseguiu-se com o estudo da peroxidação lipídica, a quantificação de H_2O_2 e das enzimas antioxidativas com a finalidade de elucidar os mecanismos de ação sobre a cultura de *Fusarium* sp.

5.8 Determinação da Peroxidação Lipídica

No processo de peroxidação lipídica da membrana celular o principal produto é o malondialdeído (MDA), assim sua concentração em culturas de fungos expostas aos extratos, frações e amida foram usadas como indicador de peroxidação. Como mostrado nas Figura 26, o conteúdo de MDA das células de *Fusarium* aumentou significativamente ($p < 0,05$) no grupo controle em comparação os tratamentos com diferentes amostras, durante todo período de observação. Já as culturas expostas às diferentes amostras não diferiram entre si em comparação às diferentes concentrações avaliadas.

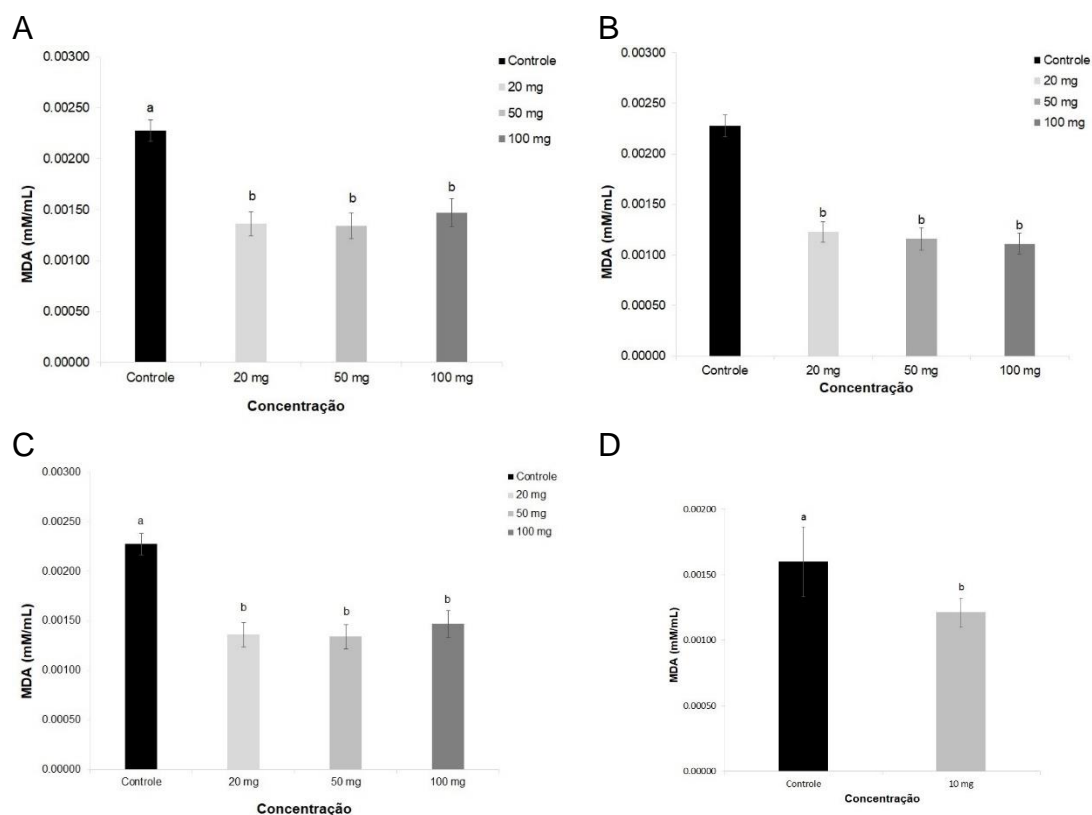


Figura 26. Determinação do conteúdo de MDA em cultura de *Fusarium* sp exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B); Fração acetoetílica do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL)

(C) e Amida isolado de *P. tuberculatum* (Piplartina 10 mg/mL) (D). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

No presente estudo é possível observar que as culturas expostas aos extratos, frações e amida de *P. tuberculatum*, durante 7 dias, promoveram menor peroxidação lipídica na cultura de *Fusarium* sp em comparação à controle. Em estudo realizado por Paraszkiwicz *et al.* (2010), onde avaliou a atividade pró-oxidativa em *Curvularia lunata* (fungo filamentoso), relata que o aumento inicial dos níveis de MDA se deve a fase estacionária inicial do crescimento geral do micélio, quanto há um aumento considerável da biomassa micelial, por modificações morfológicas e fisiológicas até alcançar a fase estacionária tardia, onde os níveis de MDA são diminuídos após redução da velocidade de crescimento micelial. Os dados obtidos no presente estudo sugerem que as culturas expostas às amostras testes manterão os níveis de MDA altos em comparação ao controle, mesmo após a fase estacionária tardia, resultando em maiores danos causados pelo estresse oxidativo.

5.9 Determinação de Peróxido Hidrogênio (H₂O₂)

Na figura 27 estão apresentadas as concentrações de H₂O₂ produzidas nas culturas de *Fusarium* sp expostas aos extratos e fração de *P. tuberculatum*, onde é possível observar o aumento da mesma na presença do extrato e fração. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na produção de H₂O₂ por *Fusarium* sp foram registradas durante todo o período de exposição quando comparado ao grupo controle.

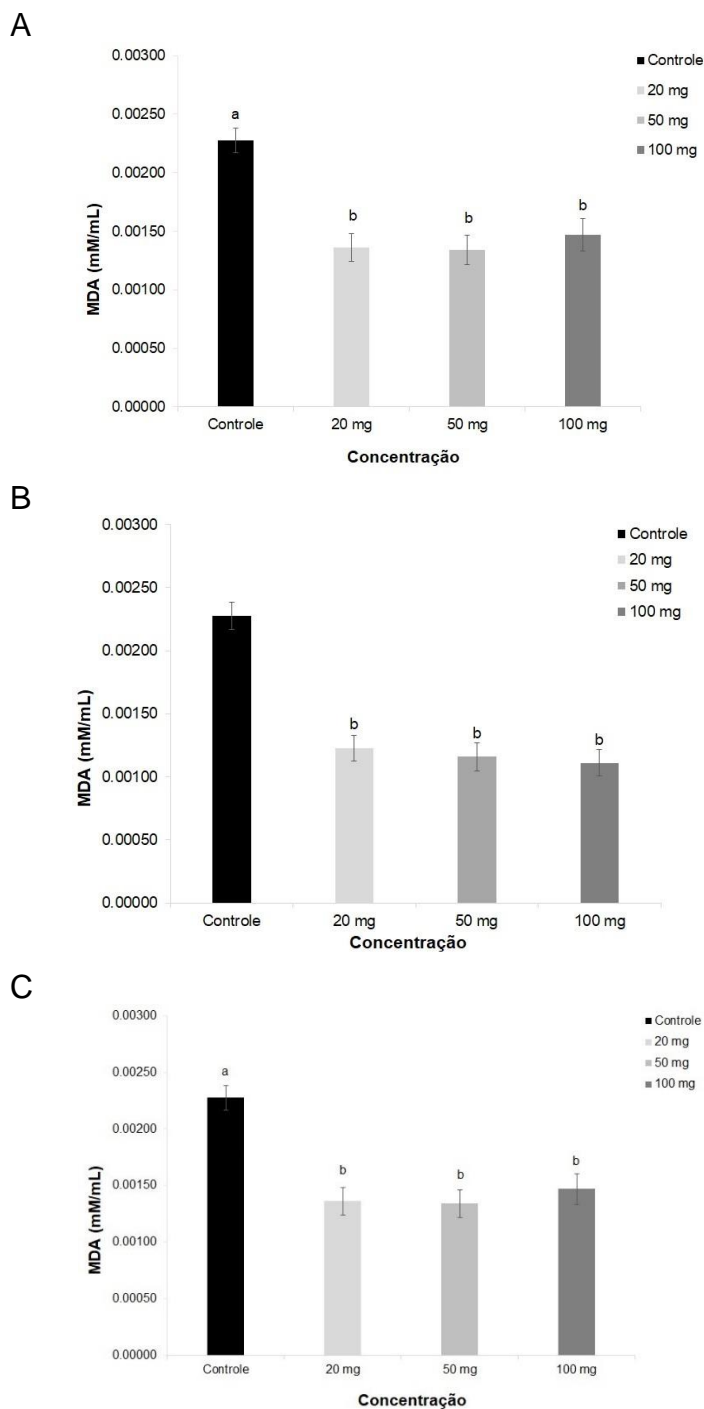
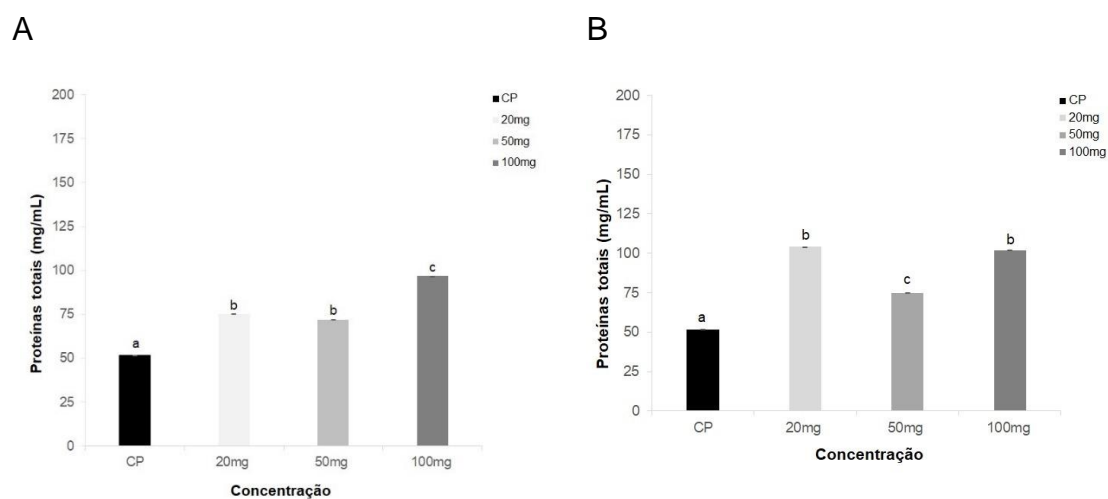


Figura 27. Determinação do teor de H_2O_2 em cultura de *Fusarium* sp exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B) e Fração acetoetílica do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

Quanto ao teor de H_2O_2 nas culturas de *Fusarium sp.* durante a exposição aos extratos e fração de *P. tuberculatum* foi possível constatar um aumento significativo da formação de H_2O_2 após exposição, apoiando o observado por Dummermuth *et al.* (2003), Pinto *et al.* (2003) e Halliwell (2007). Estes autores demonstraram que a indução do estresse oxidativo, acarreta e acelera os danos oxidativos, levando a alterações consideráveis na conformação de importantes biomoléculas como lípidos de membrana, proteínas, ácidos nucleicos. Além disso, Hatem *et al.* (2017) e Ferrigo *et al.* 2021 demonstram que o estresse oxidativo pelo aumento do H_2O_2 causa danos consideráveis no crescimento micelial e na diminuição da esporulação em *Fusarium sp.*, o que poderia explicar o declínio da biomassa das culturas de *Fusarium sp* expostas aos extratos e fração no presente estudo.

5.10 Proteínas totais

Na figura 28 estão apresentados os valores dos teores totais de proteínas das culturas de *Fusarium sp* expostas aos extratos, fração e amida de *P. tuberculatum*. Todas as concentrações dos extratos, fração e amida aumentaram significativamente ($p < 0,05$) as concentrações totais de proteínas nas culturas de *Fusarium sp* ao longo do estudo. O maior aumento foi observado para a maior concentração da fração (100 mg/mL).



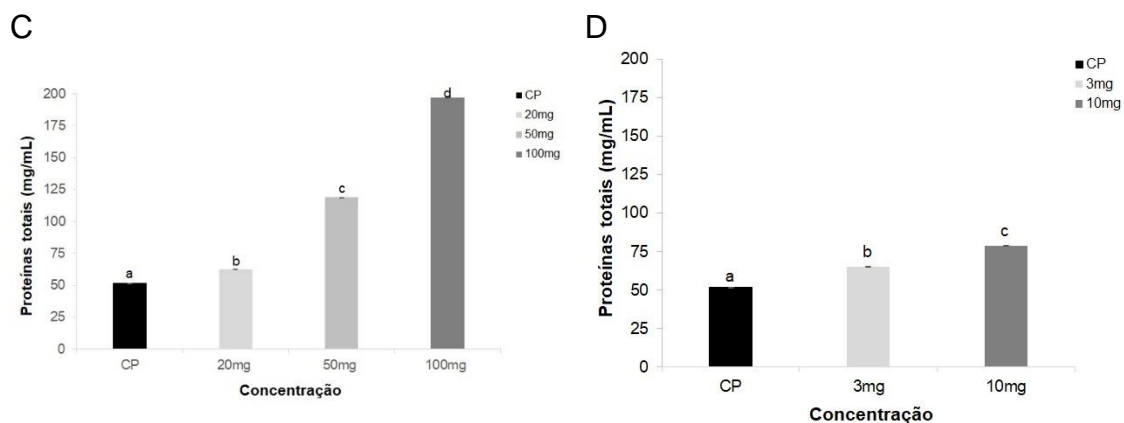


Figura 28. Determinação do teor de proteínas totais em cultura de *Fusarium* sp exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B); Fração acetotélica do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C) e Amida isolado de *P. tuberculatum* (Piplartina 3 e 10 mg/mL) (D). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

O teor de proteínas é um fator importante na determinação das taxas de atividade do metabolismo celular (ZHANG *et al.*, 2013). Neste estudo, o aumento dos teores de proteínas totais nas culturas de *Fusarium* sp. para os bioensaios utilizando extratos e fração de *P. tuberculatum*, pode, desta forma, ser explicada pela indução da síntese proteica. Possivelmente para sintetizar as enzimas correlacionadas às defesas antioxidantes entre outros produtos dependentes de ações enzimáticas e proteicas. Essa suposição está de acordo com estudo anterior de Medina-Mendoza *et al.* (2014) e Anita (2021) que demonstraram o aumento da síntese proteica em diferentes espécies de *Fusarium* submetidos a condições de estresse.

5.11 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

Na quantificação da atividade da catalase intracelular das culturas de *Fusarium* sp expostas aos extratos e fração, foi possível verificar aumento significativo ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle, tanto na presença do extrato, quanto da fração ao longo do experimento (Figura 29). Os maiores níveis na atividade da CAT foram verificados na concentração de 100 mg/mL em todos

os tratamentos, no entanto as diferentes concentrações não diferiram significativamente entre si.

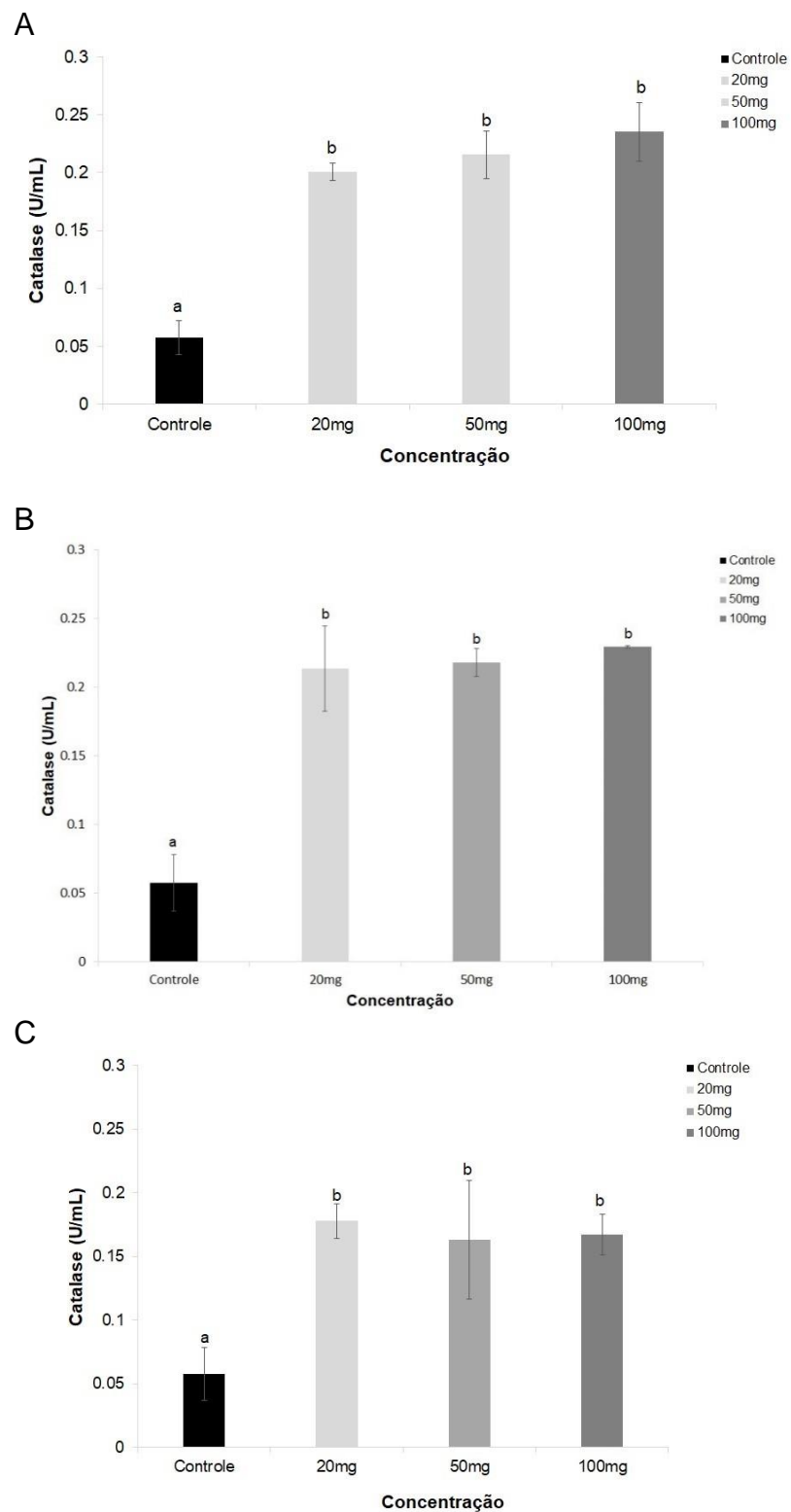


Figura 29. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT) em cultura de *Fusarium* sp exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20,

50 e 100 mg/mL) (**A**) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (**B**) e Fração acetotélica do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (**C**). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

Na determinação das concentrações de catalase (CAT) neste estudo, foi possível observar que a atividade foi elevada em comparação ao controle. De acordo com Qian *et al.* (2012), estas enzimas sequestram o excesso de H_2O_2 produzindo água e oxigênio, fato que pode explicar o aumento desta enzima nas diferentes concentrações aos extratos e fração. Os resultados deste estudo estão de acordo com Bueno *et al.* (2009) e Gao *et al.* (2018) que demonstraram que a exposição de espécies de *Fusarium sp* à extratos vegetais resultou em aumento na atividade de CAT. Além disso, de acordo com Murphy *et al.* (2000) esta enzima possui largo espectro de especificidade para o substrato, incluindo compostos fenólicos e nitrogenados, ácidos orgânicos e catecol, principais xenobióticos oxidantes em plantas.

5.12 Determinação da atividade da peroxidase (POD)

Na Figura 30 está apresentado a atividade da enzima POD das culturas de *Fusarium sp* após a exposição a diferentes concentrações do extrato e fração de *P. tuberculatum*. É possível observar que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de cada amostra avaliada, demonstrando uma diminuição concentração dependente, sendo que a menor atividade enzimática foi observada para as concentrações de 100 mg/mL para cada amostra avaliada.

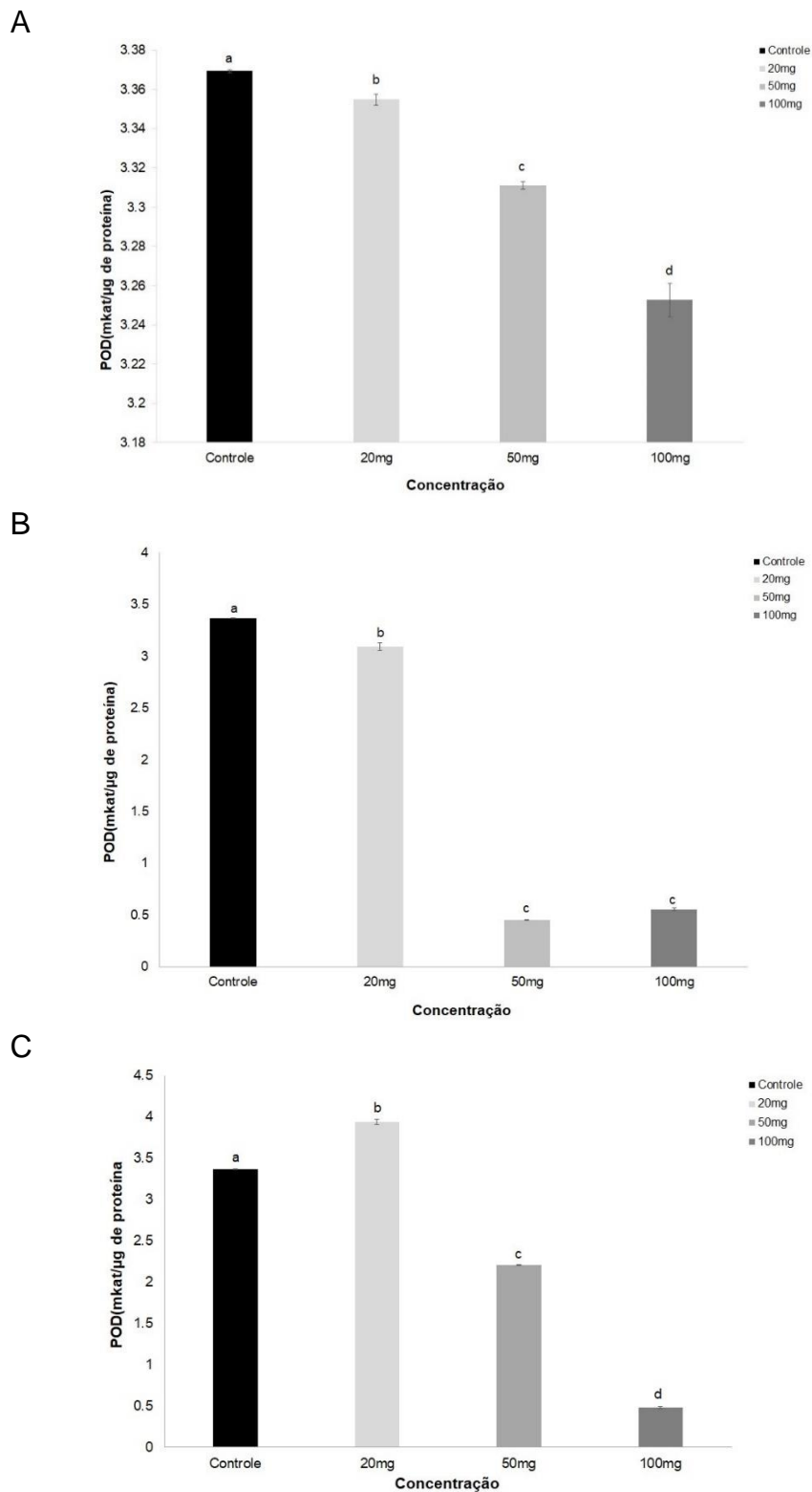


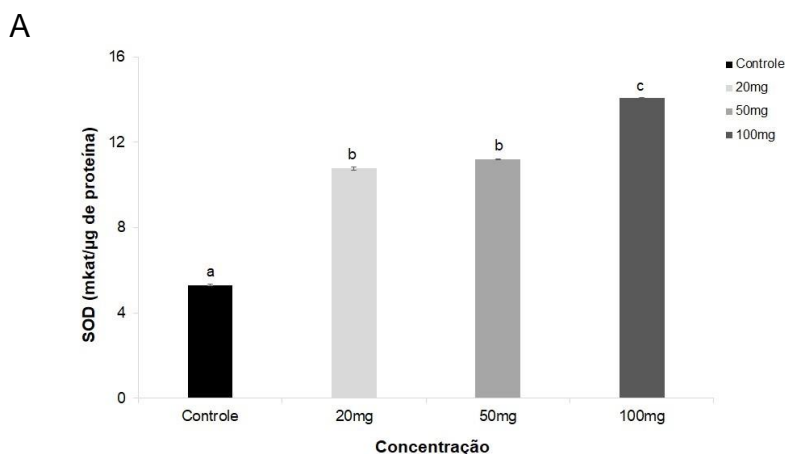
Figura 30. Determinação da atividade da enzima peroxidase (POD) em cultura de *Fusarium* sp exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B) e Fração acetoeólica do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 -

20, 50 e 100 mg/mL) (C). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

Já na determinação da concentração da enzima peroxidase (POD) neste estudo, foi possível observar, nas culturas expostas aos extratos e fração, que a atividade enzimática foi menor em comparação controle positivo. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Ponts *et al.* (2009) e Huy *et al.* (2018), onde demonstraram que esta enzima também está relacionada com a eliminação do H_2O_2 produzido, visando diminuir os danos causados em condições de estresse, fato que pode explicar a diminuição desta enzima nas diferentes concentrações, visto o aumento de radical peróxido nas culturas expostas aos tratamentos. Outro fato que corrobora com esta constatação são os estudos de Angelova *et al.* (2005) onde demonstrou a síntese e utilização de enzimas de defesa antioxidante em fungos filamentosos em superexposição ao peróxido de hidrogênio.

5.13 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

Na Figura 31 estão apresentados os resultados obtidos para a atividade da SOD em culturas de *Fusarium* sp expostas a extrato e fração de *P. tuberculatum*. É possível verificar aumento significativo nos níveis da enzima, assim como perfil de aumento dose dependente para as culturas expostas aos extratos de caule (PTC) e folhas (PTF), diferindo estatisticamente do grupo controle. Já a exposição à fração (PTF3) apresentou aumento significativo da atividade enzimática somente para a concentração de 50 mg/mL.



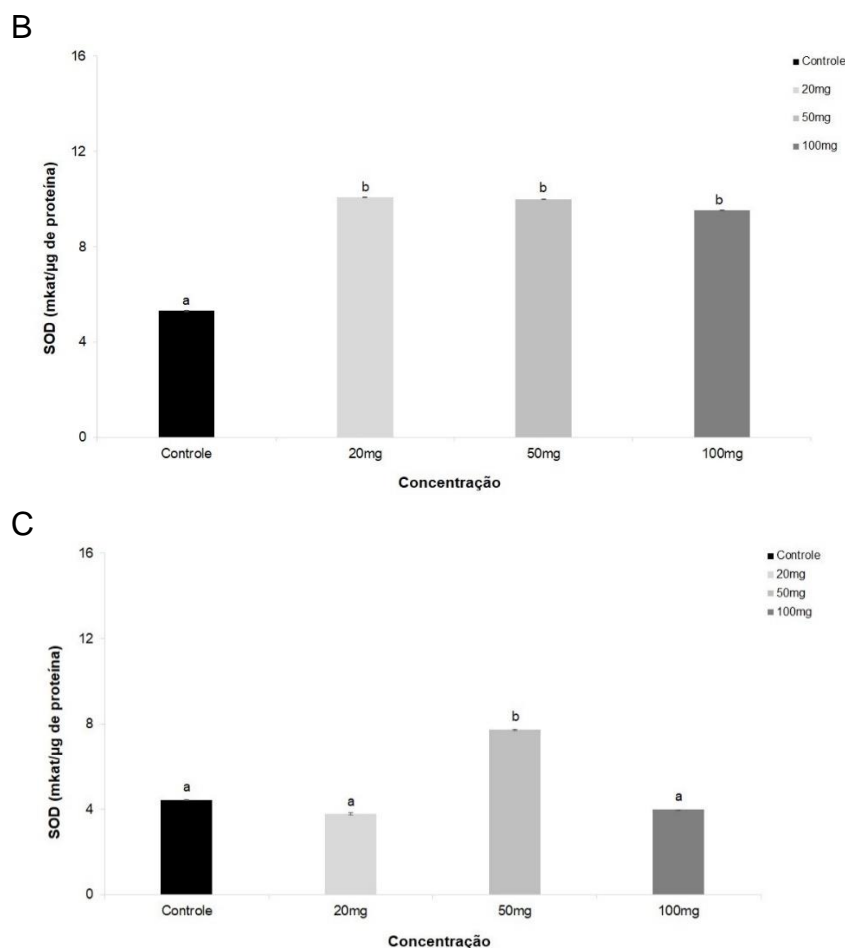


Figura 31. Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em cultura de *Fusarium* sp exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B) e Fração acetotética do extrato da folha de *P. tuberculatum* (PTF3 - 20, 50 e 100 mg/mL) (C). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – $P < 0.05$) na comparação entre cada concentração.

As mudanças na atividade de SOD registrada no presente estudo são indicativas do aumento da produção da molécula de O_2^- . A superóxido dismutase é responsável por catalisar a dismutação de O_2^- a H_2O_2 e O_2 (IGHODARO e AKINLOYE, 2018). O aumento da síntese de SOD observadas no presente estudo tem sido associada a rápida sobrecarga do substrato da enzima relatada anteriormente durante o estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2021). Além disso, nossos resultados demonstraram que o aumento do teor de ERO pode ser caracterizado por uma queda na eficiência das enzimas ou moléculas que seqüestram essas moléculas, em relação às defesas antioxidantes, resultando

assim em uma quebra do equilíbrio entre produção e remoção de ERO (AYAR-KAYALI *et al.*, 2002).

5.14 Determinação da atividade da glutathiona S-transferase (GST)

Na figura 32 (A), é possível verificar aumento significativo na atividade enzimática da GST de para as concentrações de 20 e 100 mg/mL do extrato do caule de *P. tuberculatum*. Já nas culturas expostas ao extrato da folha de de *P. tuberculatum* (Figra 32 – B) o aumento apresentou um perfil concentração dependente, sendo que a concentração de 100 mg/mL apresentou o dobro de atividade em comparação com o controle.

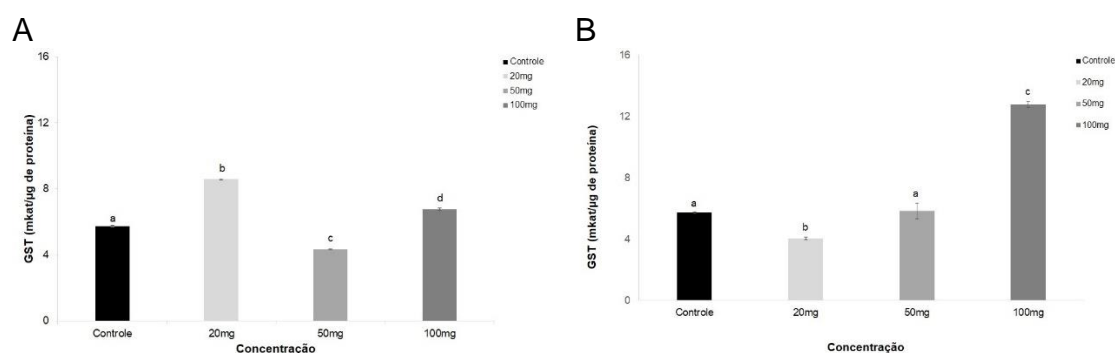


Figura 32. Determinação da atividade da enzima glutathiona transferase (GST) em cultura de *Fusarium* sp exposta a diferentes concentrações de extrato do caule (PTC - 20, 50 e 100 mg/mL) (A) e da folha de *P. tuberculatum* (PTF - 20, 50 e 100 mg/mL) (B). Letras iguais não diferem significativamente (Tukey – P<0.05) na comparação entre cada concentração.

No presente estudo, observa-se um aumento na atividade de GST em resposta à presença dos extratos e frações, indicando que a mesma esteja envolvida na biotransformação e/ou a desintoxicação do metabolismo do *Fusarium* sp em resposta aos extratos e fração. Isto ocorre como uma medida de proteção contra os danos oxidativos. Esta biotransformação e/ou desintoxicação é conseguida pelo processo de conjugação que utiliza a forma reduzida de glutathiona (GSH), catalisada pela GST (VESTENA *et al.*, 2011). Além disso, estudos anteriores realizados por Bártova *et al.* (2011) demonstraram que esta enzima é capaz de biotransformar e desintoxicar microorganismos,

espécies de fito-plâncton e as plantas vasculares contra ação de toxinas e compostos oxidativos.

Diante dos ensaios realizados e resultados obtidos por meio da avaliação antifúngica dos extratos brutos, fração e amida isolada de *P. arborium* e mais especificamente *P. tuberculatum* é possível observar uma ação inibidora do crescimento micelial de culturas de *Fusarium* sp expostas aos diferentes tratamentos. Essa inibição possivelmente está correlacionada com a indução do estresse oxidativo, causando, principalmente, danos celulares e moleculares nas células miceliais do fungo, que resultou na diminuição do crescimento e/ou morte celular, pois tanto a pró-oxidação como a resposta antioxidante, por meio do aumento das enzimas antioxidantes, foi observada no presente estudo, fato este que poderia explicar a ação antifúngica dos compostos presentes nos extratos, frações e amidas, como já demonstrado em trabalhos anteriores. No entanto, sem definição de um possível mecanismo de ação. Assim, o presente estudo oferece informações aprofundadas sobre a ação destes compostos no crescimento e desenvolvimento de cultura de *Fusarium* sp exposta a compostos fungicidas e/ou fungistático e descreve pela primeira vez o possível mecanismo de ação no controle de crescimento e na atividade antifúngica destes compostos.

Conclusão

As espécies do gênero Piper avaliadas neste estudo apresentaram potencial para inibição do crescimento micelial em cultura de *Fusarium* sp., avaliadas pelos métodos de crescimento em placa de cultura, microdiluição e fermentação submersa. Os extratos, frações e amida demonstraram atividades antifúngicas e/ou fungistáticas, sendo a atividade pró-oxidativa e oxidante possivelmente seu principal mecanismo de ação.

6. Referências

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRIGUES, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v.30, n.3, p. 623-628, 2007.

AMARO, J.; TAPIA, C. Género *Fusarium*. **Revista Chilena Infectologia**, v.31, n. 1, p. 85-86, p.85-86, 2014.

ANDRADE, H.E.A.; GUIMARÃES, E.F.; MAIA, J.G.S. 2009. Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia. FEC/ UFPA, Belém, 448p.

ANGELOVA, M.B., PASHOVA, S.B., SPASOVA, B.K., VASSILEV, S.V., SLOKOSKA, L.S. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. **Mycology Research**. 109 (2): 150–158, 2005.

ANITA, S. Quantification of Total Protein and Related Enzymes in *Fusarium* wilt infected *Lens culinaris medic*. **Research Article**, v. 5:2, 2021.

ANVISA. 2010. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Resolução de Diretoria Colegiada nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília em 5 de abril de 2010.

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

AYAR-KAYALI, OZER, H.A.N.B AND TARHAN, L. Intracellular superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities and membrane lipid peroxide levels in *Fusarium acuminatum* upon environmental changes in a defined medium. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 400, 265–272, 2002.

BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; KATO, M. J. MARQUES, M. O. M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1107-1109, 2009.

BARROSO, G.M. Sistemática de Angiosperma do Brasil. São Paulo: EDUSP, 1978.

BÁRTOVÁ, K.; HILSCHEROVÁ, K.; BABICA, P.; MARŠÁLEK, B. Extract of *Microcystis* water bloom affects cellular differentiation in filamentous cyanobacterium *Trichormus variabilis* (Nostocales, Cyanobacteria). **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 967–973, 2011.

BERNARD, C. B.; KRISHANMURTY, H. G.; CHAURET, D.; DURST. T.; PHILOGÈNE, B. J.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; HASBUN, C.; POVEDA, L.; SAN ROMÁN, L. ARNASON, J.T. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n.6, p. 801-14, 1995.

BERNARDO, R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; POVH, F. P.; SALVATORI, R. K.; STANGARLIN, J. R. Atividade antibacteriana de plantas medicinais. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 1, p. 110, 2002.

BOLKAN, H. A.; DIANESE, J. C.; SILVA, C. B.; ARAÚJO, J. C. A. Influence of carbon source, light, water potencial and temperatura on growth and sporulation

of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Revista de Microbiologia**, Brasília, v.13, n.3, p.264- 271, 1982.

BOMTEMPO, M. Pimenta e seus benefícios à saúde. São Paulo: Alaude, 2007.

BRADFORD, M., 1976.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.243-254, 1976.

BUENO, C. J.; FISCHER, I. H.; ROSA, D. D.; FURTADO, E. L. Produção de enzimas extracelulares por *Fusarium solani* de maracujazeiro amarelo. **Tropical Plant Pathology**, p. 343–346, 2009.

CARNAÚBA, J. P.; SOBRAL, M. F.; AMORIM, E. P.R.; SILVA, J. C.; SANTOS, V. B. S.; FÉLIX, K. C. S. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.199-200, 2007.

CARDOSO, J. F. R.; WARDINI, A. B.; EVANGELISTA, D. W.; VIANA, E. B.; LIMA, M. E. F. de; SOARES, B. A.; BARRETO JUNIOR, C. B.; BRITO, M. de F.; MAZUR, C.; DANELLI, M. das G. M. Avaliação do efeito tóxico da Piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos. **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida**, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n.1, p. 85-91 jan.-jun., 2005.

CASTELLANOS, L. M.; OLIVAS, N. A.; SOTO, J. A.; CONTRETRAS, C. M.; ORTEGA, M. Z.; SALAS, F. S.; OCHOA, L. H. In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oils and Functional Extracts Against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Microbiology**, v.2020, 2020.

CASTRO, N. R.; COELHO, R. S. B.; LARANJEIRA, D.; COUTO, E. F.; SOUZA, M. B. R. Ocorrência, métodos de inoculação e agressividade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em *Heliconia* sp. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p. 127-130, 2008.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W.N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida* Antifungal Activity of Three Essential Oils on *Candida* Strains. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 20, n. 52, 2011.

CHACÓN, C.; QUINTAL, E. B.; CHAN, G. C.; VALDIVIEZO, V.M. R.; MOLINA, J.A.M; RAMIREZ, E.R.G; ABARCA, L.M.R; LAU, N.R. In Vitro Antifungal Activity and Chemical Composition of *Piper auritum* Kunth Essential Oil Against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium equiseti*. **Agronomy**, v.11, n.1098, 2021.

CHAUDHRY, N.M.; TARIQ, P. Bactericidal activity of black pepper, bay leaf, aniseed and coriander against oral isolates. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.19, p. 214-218, 2006.

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

CHEN, Y. C.; LIAO, C. H.; CHEN, I. S. Lignans, an amide and anti-platelet activities from *Piper philippinum*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2101-2111, 2007.

CIACCIO, L.S.; SPOTORNO, V.G.; ESTEVEZ, M.M. C.; RIOS, D.J.L.; FORTUNATO, R. H.; SALVAT, A. E. Antifungal activity of *Parastrephia quadrangularis* (Meyen) Cabrera extracts against *Fusarium verticillioides*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, p. 244-251, 2018.

CLSI. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. CLSI document M38-A. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.

CORREA, E.; STERNER, O.; ECHEVERRI, F. Prenylhydroxybenzoic acid compounds with pungent activity from *Piper arieianum*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 238-241, 2011.

CORTÉS, N.; MORA, C.; MUÑOZ, K.; DÍAZ, J.; SERNA, R.; CASTRO, D.; OSORIO, E. Microscopical descriptions and chemical analysis by HPTLC of *Taraxacum officinale* in comparison to *Hypochaeris radicata*: a solution for misidentification. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, p.381-388, 2014.

COOPERMAN, C. J.; JENKINS, S. F. Conditions influencing growth sporulation of *Cercospora asparagi* blight development in Asparagus. **Phytopathology**, v. 76, p. 617-622, 1986.

COSTA, J. I. V. Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Piper arboretum* Aublet (Piperaceae). 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2011.

COSTA, M.C. BITTENCOURT, C.M.S., MALHEIROS, A. Investigação fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano por bioautografia da *Piper* sp (Piperaceae). 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2013.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; DUO, G.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, p. 703-711, 2009.

COTINGUIBA, F.; LÓPEZ, S.N.; BUDZINSKID, I.G.F.; LABATE, C.A.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Proteomic profile of *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v.78, n.1, p. 117-124, 2018.

CYSNE, J. B.; CANUTO, K. M. PESSOA, O.D.L. NUNES, E. P. SILVEIRA, E. R. Leaf essential oils Four Piper species from the State of Ceará – Northeast of Brazil. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1978-1381, 2005.

DARIER, S.M., TAMMAM, A.A. Potentially phytotoxic effect of aqueous extract of *Achillea santolina* induced oxidative stress on *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*, **Romanian Journal of Biology Plant Biology**, v.57, n.1, p. 08-25, 2012.

DAROLT, M. R. **Agricultura Orgânica: inventando o futuro**. Londrina: IAPAR, 2002.

DAVIS, R. M.; COLYER, P. D. ROTHROCK, C. S.; KOCHMAN, J. K. Fusarium wilt of cotton: Population diversity and implications for management. **Plant Disease**, v. 90, n. 6, 2006.

DEMIRAL, T., TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.53, p.247–257, 2005.

DESJARDINS, A. E. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 47-50, 2007.

DEVI, R. K. T.; SINGH, N. I. Effect of temperature and light on growth and sporulation of *Fusarium* rice sheath rot. **International Rice Research Notes**, v.19, n.3, p.28, 1994.

DU, C. Y.; WU, Y. C.; WAN, S. K. Citotoxic pyridine alkaloides from Piper aborescens. **Journal of Natural**, v. 53, n.6, p. 1575-1577, 1990.

ELMER, W. Introduction to the special issue of Management of *Fusarium* Diseases for Journal of Crop Protection. **Crop Protection**, v.73, 2015.

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

FANI, M. Funcionais nutracêuticos. São Paulo: **Insummus**, 1992.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. Propriedade inseticida dos óleos de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum SOBRE *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciências agrotécnicas**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J. BOLZANO, V. S. GUIMARAES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanicidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**. 69, 445-450, 2008.

FERREIRA, M.G.P.R.; KAYANO, A.M.; SILVA-JARDIM, I.; DA SILVA, T.O.; ZULIANI, J.P.; FACUNDO, V.A.; CALDERON, L.A.; ALMEIDA-E-SILVA, A.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R.G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-

trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20: 1003-1006, 2010.

FIALHO, M.B.; CARVALHO, G.; MARTINS, P.F.; AZEVEDO, R.A.; PASCHOLATI, S.E.F. Antioxidative response of the fungal plant pathogen *Guignardia citricarpa* to antimicrobial volatile organic compounds. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 20, p. 2077-2084, 2014.

FRIGHETO, S.; TOYOKO, R. Influência do manejo de agrotóxico no meio ambiente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 8, p. 232-233, 2000.

GAKUUBI, M. M.; MAINA, A. W.; WAGACHA, J. M. Antifungal Activity of Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against Selected *Fusarium* spp. **International Journal of Microbiology**, v.2017, 2017.

GAO, S., GOLD, S.E. AND GLENN, A.E. Characterization of two catalase-peroxidase-encoding genes in *Fusarium verticillioides* reveals differential responses to in vitro versus in planta oxidative challenges. **Molecular Plant Pathology**, 19(5), 1127–1139, 2018.

GRANT, J.J., LOAKE, G.J. Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. **Plant Physiology**, v.124, p. 21–29, 2000.

GOMES, A.S. Purificação, caracterização físico-química e biológica de proteínas ligantes à quitina presentes nas sementes de *Moringa oleifera* Lamarck. 2002. Monografia de graduação em Ciências biológicas, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GUERRINE, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADO, M. E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz e Pavon (Piperaceae) essential oils from eastern Ecuador. **Environmental toxicology and pharmacology**, v.27, p.39-48, 2009.

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

GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E.S.; QUEIROZ, G.A. 2014. Piperaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil>). Acesso em 11/01/2023.

GUIMARÃES, E.F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na reserva biológica de poço das antas, silva jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v.57, n.3, p.567-587, 2006.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES; J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. **Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1773-1791, 1996.

HSIEH, C.L., LIN, Y.C., KO, W.S., PENG, C.H., HUANG, C.N., PENG, R.Y. Inhibitory effect of some selected nutraceutic herbs on LDL glycation induced by glucose and glyoxal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 357-363, 2005.

HUY, N.D., TIEN, N.T.T., HUYEN, L.T., QUANG, H.T., TUNG, T.Q., LUONG, N.N., PARK, S.M. Screening and Production of Manganese Peroxidase from *Fusarium* sp. on Residue Materials. **Mycobiology**. 45(1): 52-56, 2018.

ICHASO, C.L.F., GUIMARÃES, E.F. & COSTA, C.G. Piperaceae do Município do Rio de Janeiro - I. O Gênero Piper L. **Separatas de Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 20, p.145-188, 1977.

IGHODARO, O.M., AKINLOYE, O.A. First line defense antioxidant-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**. 54, 287-293, 2018.

JANA, S., CHOUDHURI, M.A. Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperms during aging. **Aquatic Botany**, v.v12, p. 345–354, 1982.

JENSEN, S., HANSEN, J., BOLL, P.M. Lignan and neolignans from Piperaceae. **Phytochemistry**, v. 33, p. 523-530, 1993.

JOHANSSON, L.H., BORG, L.A.H. A Spectrophotometric Method for Determination of Catalase Activity in Small Tissue Samples. **Analytical Biochemistry**, v.174, p.331-336, 1988.

KANEMARU, M. Y. S. Determinação do efeito antifúngico de *Phaeosphaeria* sp. isolado de goiaba contra fungos de relevância agroalimentar. Campinas, SP, 2017.

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

KERIENE, I.; MANKEVICIENE, A.; BLAZYTE, J. The effect of antifungal extracts on the contamination of grain with microfungi. **Food Science Nutrition**, v. 2020, n. 8, p. 1375–1382, 2019.

KOCHA, T., YAMAGUCHI, M., OHTAKI, H., FUKUDA, T., AOYAGI, T., 1997. Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. **Biochimia et Biophysica Acta**, 1337, 319–326, 1997.

LAGO, J.H.G., RAMOS, C.S. CASANOVA, D.C.C. MORANDIM, A.A. 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, p.1783-1788, 2004.

LAGO, J. H.; KATO, J. M. 3 α ,4 α -Epoxy-2-piperidone, a new minor derivative from leaves of *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae). **Natural Products Reports**, v.21, n.10, p.910- 914, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEE, S. E.; PARK, B. S.; KIM, M. K.; CHOI, W. S.; KIM, H. T.; CHO, K. Y.; LEE, S. G.; LEE, H. S. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 20, n. 6, p. 523-528, 2001.

LESLIE, J.F. AND SUMMERELL, B. A. (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Hoboken, 1-2.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p.197-201, 2006b.

LOURENÇÃO, A.; MECINA, G. F.; MECINA, G. F.; CORDEIRO-ARAUJO, M. K.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; CHIA, M.A.; BRONZEL-JUNIOR, J. L.; GRANERO, F. O.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Characterization of allelochemicals from *Pistia stratiotes* extracts and their effects on the growth and physiology of *Microcystis aeruginosa*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 28, p. 57248–57259, 2021.

LUKENS, R. J. Photo-inhibition of sporulation in *Alternaria solani*. **American Journal of Botany, New York**, v.50, n.7, p.721-724, 1963.

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

MADHAVA RAO, K. V.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant science**, v.157, p.113–128, 2000.

MANNAI, S.; BENFRADI, N.; KAROUI, A.; SALEM, I.B.; FATHALLAH, A.; M'HAMDI, M.; BOUGHALLEB, N. Analysis of Chemical Composition and *In Vitro* and *In Vivo* Antifungal Activity of *Raphanus raphanistrum* extracts against *Fusarium* and *Pythiaceae*, Affecting Apple and Peach Seedlings. **Molecules**, v.26, p.2479, 2021.

MASANGKAY, R.F., PAULITZ, T.C. HALLETT, S.G. & WATSON, A.K. Characterization of Sporulation of *Alternaria alternata* f. sp. **Sphenocleae**. p. 385-397, 2000.

MAUCH, F.; DUDLER, R. Differential induction of distinct glutathione-S-transferase of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. **Plant Physiology**, v.102, p.1193–1201, 1993.

MCMULLEN, M.; JONES, R.; GALLENBERG, D. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81:1340-1348. 1997.

MISHRA H.P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical antioxidation of haemoglobin. **Journal Biological Chemistry**, v.247, p.6960-6962, 1972.

MECINA, G.F.; MATHIAS, A. C.; ARAUJO, M. K. C.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; VARELA, R. M.; TORRE, A. MOLINILLO, J. M. G.; MACIAS, F. A.; SILVA, R. M. G. Effect of flavonoids isolated from *Tridax procumbens* on the growth and toxin production of *Microcystis aeruginos*. **Aquatic Toxicology**, v. 211, p. 81-91, 2019.

MEDINA-MENDONZA, C., BELTRÁN-RIOS, G.M., LÓPEZ-LÓPEZ, A., ZELAYA-MOLINA, L.X., VALADEZ-MOCTEZUMA, E. Characterization and Identification of *Fusarium* Species complexes affecting chickpea with total protein profiles, EF-1 α Gen. **Annual Research Review in Biology**, v.4, n. 23, p. 3513-3523, 2014.

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

MILANESI, P. M. Aspectos biológicos da interação *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. Em solo compactado de aveia preta e soja sob plantio direto. 2012. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

MORAIS, L. A. S.; MARINHO-PRADO, J. S. Plantas com atividade inseticida. In: EMBRAPA. **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas**. Brasília: Embrapa, 2016. Cap. 19. p. 542-585.

MORANDIM, A. A.; BERGAMO, D. C. B., KATO, M. J.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S., FURLAN, M. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. **Phytochemistry Analysis**. v.16, p. 282, 2005.

MURPHY, C. D.; MOORE, R. M.; WHITE, R. L. Peroxidases from marine microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 507–513, 2000.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; Cavalheiro, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phitoquimistry**, v.55, p. 621-626, 2000.

NAVICKIENE, S.; RIBEIRO, M. L. A Simple and Rapid Extraction for Gas Chromatographic Determination of Thiabendazole and Imazalil Residues in Lemons. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 5, p.592-596, 2002.

NAVICKIENE, 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, p. 3, p. 467-470, 2006.

NAQVI, S.F.; JAVAID, A.; QURESHI, M.Z. Evaluation of antifungal potential of leaf extract of *Chenopodium murale* against *Fusarium oxysporum* F. SP. *Lycopersic*. **Planta Daninha**, v.37, 2019.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M. E.; BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 29-432, 2004.

OLIVEIRA, S. S.; HANADA, R. E.; CHAVES, F. C. M.; NASCIMENTO, G. O.; ASSIS, L. A. G.; OLIVEIRA, S. S.; OLIVEIRA, M. R. Fungitoxicidade de óleos essenciais de *Piper* spp. sobre *Colletotrichum theobromicola*. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 29-33, 2019.

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

OLIVEIRA, G. A.; MARTINS, W. S.; MURASHI, S. T.; MICHELIN, L. H. F.; MENDES, W. D.; SILVA, I. M.; SOUZA, M. P.; SOBRINHO, C. A. M.; ADAMS, G. S.; PEREIRA, D. D. Transmissibilidade de *Fusarium* spp. em sementes de milho sob diferentes tempos de exposição. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 16, P. 1-12, 2022.

OOTANI, M. A.; AGUIAR, R. W.; RAMOS, A. C. C.; BRITO, D. R.; SILVA, J. B.; CAJAZEIRA, J. P. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

OSBORNE, L.; STEIN, J. M. Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals. **Int J Food Microbiol.** 119(1-2):103-8, 2007.

PAES-GONÇALVES, H.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, D.M.F.; SILVA, A.G.C.; BALLICO, L.J.; LIMA, D.K.S.; STÁBELI, R.G.; SILVA-JARDIM, I. The leishmanicidal activity of a cyclopentenedione derivative isolated from the roots of a native Amazonian pepper (*Piper carniconnectivum*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, p.1018-1023, 2012.

PAGNUSSATT, F. A.; DEL PONTE, E. M.; BUFFON, J. G.; FURLONG, E. B. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.108, p.21-26, 2014.

PARASZKIEWICZ, K.; BERNAT, P.; NALIWAJSKI, M.; DŁUGONSKI, J. Lipid peroxidation in the fungus *Curvularia lunata* exposed to nickel. **Arch Microbiol**, 192:135–141, 2010.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, S.; JAIN, R.; TANEIA, 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.

PARRY, D.W. The incidence of *Fusarium* spp. in stem bases of selected crops of winter wheat in the Midlands, UK. **Plant Pathology**. v.39, (4), p. 619-622, 1990.

PISSINATE, K. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

POLTRONIERI, L.S.; TRINDADE, D. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; CARDOSO, S.S. Incidência de *Fusarium solani* em mandioca no estado do Pará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 544, 1994.

QUEIROZ, G. A.; BARROS, A. A.; GUIMARÃES, E. F.; *Piper* (Piperaceae) do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói / Maricá, RJ, Brasil. **Rodriguésia**, v.71, p. 1-13, 2020.

QIAN, H., PAN, X., CHEN, J., ZHOU, D., CHEN, Z., ZHANG, L., FU, Z. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants. **Ecotoxicology**. 21, 847–859, 2012.

RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Hidrólise do benzoato de metila de *Piper arboreum* pelo besouro *Naupactus bipes*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 560-563, 2009.

RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 44, n.1, p. 24-31, 2014.

RAJ, L., IDE, T., GURKAR, A.U., FOLEY, M., SCHENONE, M., LI, X., TOLLIDAY, N.J., GOLUB, T.R., CARR, S.A., SHAMJI, A.F., STERN, A.M., MANDINOVA, A., SCHREIBER, S.L. and LEE, S.W. Selective killing of cancer cells with a small molecule targeting stress response to ROS. **Nature**, v.475, n.7355, p.231-234, 2011.

RAVEAU, R.; FONTAINE, J.; SAHRAOUI, A. L-H. Essential oils as potential alternative biocontrol products against plant pathogens and weeds: A Review. **Foods**, v. 9, n. 365, p. 1-31, 2020.

REDDY, J.K., SUGA, T., MANNAERTS, G.P., LAZAROW, P.B. SUBRAMANI, S. Peroxisomes: biology and role in toxicology and disease, **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1996.

REIS, A; DIAS, R. C. S.; MENEZES, M. Efeito de meios de cultura e qualidades de luz sobre o crescimento micelial e esporulação de *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli. **Cadernos Ômega**, n. 10, p. 45-48, 1997.

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**, 19: 199-203, 2009.

RÍOS, A. G.; LEYVA, M. A.; MARTÍNEZ, M.; RENÉ, J.; STASHENKO, E. E. Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (piperaceae) difundida en la costa Colombiana. *Scientia et Technica*, v. 13, n. 33, p. 439-442, 2007.

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

ROGER, J.D.P. Plantas mágicas: enciclopédia de plantas medicinais. São Paulo: Planeta do Brasil, 1998.

ROSSI, I. F. Análise de amidas de *Piper arboreum* por espectrometria de massas: uma comparação entre as técnicas leaf-spray-EM e CLAE-EM/EM. 2019. Monografia (Bacharel em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

ROTTER, B. A., PRELUSKY, D. B., PESTKA, J. J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 48, p.1–34, 1996.

SALEHI B.; ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, T.; SHARIFI-RAD, J.; OZLEYEN, A.; TURKDONMEZ, E.; VALUSSI, M.; TUMER, T. B.; MONZOTE FIDALGO, L.; MARTORELL, M.; SETZER, W. N. *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p.1364, 2019.

SANTOS, P.R.D.; DE LIMA MOREIRA, D.; GUIMARÃES, E.F.; COELHO KAPLAN, M.A. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547–551, 2001.

SANTOS, T. G.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; GUEDES, A.; GASPER, A. L.; BELLA CRUZ, A.; SCHMIT, A. P.; BELLA CRUZ, R. C.; STEINDEL, M.;

NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum*. **Química Nova**, v.35, p. 477-481, 2012.

SENGUPTA, S.; RAY, A.B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 58, p. 147-165, 1987.

SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; MAEDA, M.C.M.Y.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, V.59, p.521-527, 2001.

SILVA, R.V.; NAVICKIENE, H.M.D.; KATO, M.J.; BOLZANI, V.S.; MAEDA, M.C.M.Y.; FURLAN, M., Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.

SILVA, M. B.; ROSA, M. B.; BRASILEIRO, B. G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C. A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENEZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: Epamig/CTZM, p. 221-246, 2005.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; FAIAL, K. C. F.; MENDONÇA, M. S. Caracterização farmacognóstica de *Piper arboreum* var. *arboreum* e *P. Tuberculatum* (Piperaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 2, p. 195-208, 2016.

SILVA, J.K.; DA TRINDADE, R.; ALVES, N.S.; FIGUEIREDO, P.L.; MAIA, J.G.S.; SETZER, W.N. Essential oils from Neotropical *Piper* species and their biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.2571, 2017.

SIMON, J.M.; SCHWAN, K.R.F. E.; JARDINETTI, V.A.; OLIVA, L.S.C.; SILVA, J.B.; SCARABELI, I.G.R. Atividade fungitóxica de extratos vegetais e produtos comerciais contra *Diplocarpon rosae*. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.4, p.351-356, 2016.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Campinas: UFC, 1991. 416 p.

SOUZA, M. M. Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da síntese de aflatoxinas dos extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis*. 2012. Tese 163 f. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2012.

SOUZA, N.G. M. Controle alternativo de *Fusarium* sp em sementes de milho. 2017. Dissertação (Mestre em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2017.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 129-137, 2000.

SPANIC, V.; VULETIC, M. V.; ABICIC, I.; MARCEK, T. Early response of wheat antioxidant system with special reference to *Fusarium* head blight stress **Plant Physiology and Biochemistry**, p. 115, p. 34-43, 2017.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its Pungent Principle Piperine: A review Diverse Physiological Effects. *Crit. Rev. Food Science and Nutrition*. v. 47, p. 735, 2007.

STRANDBERG, J. O. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. **Phytopathology**, v.77, n.7, p.1008- 1012, 1987.

STEYERMARK, J. A. 1984. Piperaceae. Flora de Venezuela, vol. 2. Editorial Fundación Caracas, Caracas. 619 p.

TINOCO, M. L. P. Silenciamento trans-específico in vitro entre fumo e o fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides*. 2010. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

TRINDADE, F. T. T.; STABELI, R. G.; FACUNDO, V. A.; CARDOSO, C. T.; DA SILVA, M. A.; GIL, L. H. S.; SILVA-JARDIM, I.; ALMEIDA E SILVA, A. Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of *Piper alatabaccum* branches and *P. tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, p. 979-984, 2012.

TRIONE, E. J.; LEACH, C. M. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. **Phytopathology**, v.59, n.8, p.1077-1083, 1969.

VARGAS, A. G. Influência da sazonalidade na composição química e nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller). 2017. Dissertação de mestrado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.

VESTENA, S.; CAMBRAIA, J.; RIBEIRO, C.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVA, M. A. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidant enzyme response in water hyacinth and Salvinia. **Brazilian Journal Plant Physiology**. 23, 131–139, 2011

XUAN, T. D.; FUKUTA, M.; WEI, A. C.; ELZAAWELY, A. A.; KHANH, T. D.; TAWATA, S. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum*) roots. **Journal Natural Medicine**, v. 62, p. 188-194, 2008.

WANG, Q.; POKHREL, A.; COLEMAN, J. J. The Extracellular Superoxide Dismutase Sod5 from *Fusarium oxysporum* is localized in response to external stimuli and contributes to Fungal Pathogenicity. **Frontier in Plant Science**, v.12, p. 1-13, 2021.

YANG, Y.; HUANG, P.; M.A. Y.; JIANG, C.; WANG, G. Insights into intracellular signaling network in *Fusarium* species. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p.1007–1014, 2022.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil I - Piper: Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, v.2, p. 19- 366, 1972.

ZHANG, W.; XIONG, B.; CHEN, L.; LIN, K.; CUI, X.; BI, H.; GUO, M.; WANG, W. Toxicity assessment of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* following exposure to Pb (II). **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 36, p. 51–57, 2013.