BIBLIOTECA *inédita*
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
1993/6

Recebido em 28/03/02
[assinatura]

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**METABOLISMO SECUNDÁRIO EM TECIDOS
DIFERENCIADOS E SUSPENSÕES
CELULARES DE *Piper cernuum* Vell.**

MARA BEATRIZ COSTANTIN¹¹

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR:

Dr. MASSUO JORGE KATO

SÃO PAULO

2001

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

“Metabolismo Secundário em Tecidos Diferenciados e Suspensões Celulares de *Piper cernuum* Vell”

MARA BEATRIZ CONSTANTIN

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Orgânica.

Aprovada por:

Prof. Dr. MASSUO JORGE KATO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
IQ – USP

Prof. Dr. JOSEF WILHELM BAADER
IQ – USP

Profa. Dra. DEBORAH YARA ALVES CURSINO DOS SANTOS
IB – USP

Profa. Dra. MARCIA REGINA BRAGA
IBt – SP

SÃO PAULO
30 DE OUTUBRO 2001.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

“ Plant biochemistry in its most exclusive form might consider only those aspects of the chemical operations of plants that are unique to plants. Thus, photosynthesis, synthesis of cellulosic cell walls, lignification, the metabolism of secondary compounds, and systems for the mass movement of water and photosynthates would constitute the bulk of plant biochemistry. However, plant biochemistry in its most inclusive form would consider all chemical operations that occur in plants. If, for example, a particular metabolic pathway appears to be the same in plants and mammals, it is still a part of plant biochemistry. Plant biochemistry in its most inclusive form not only must include the new concepts and methods of biochemistry but also must recognize that these concepts and methods also apply to and/or are derived from physiology, cell biology, molecular biology and genetics. Progress toward this understanding is driven largely by our intellectual curiosity.”

JOSEPH E. VARNER, 1995

*Try to realize it's all within yourself,
no one else can make you change
and to see you're really only very small
and life flows on within you and without you.
...When you've seen beyond yourself
then you may find piece of mind is waiting there
and the time will come when you see we're all one
and life flows on within you and without you.*

G. HARRINSON, 1967

AOS MEUS AMORES:
J. ELPÍDIO, LINA, BETO, JÚNIOR E MARTIN

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Massuo J. Kato por conceder-me a oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e desenvolver esta tese e também pela compreensão e confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo R. H. Moreno pelas sugestões apresentadas durante o trabalho experimental e auxílio na discussão dos resultados.

Aos Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto, alunos (em especial: Patrícia Lopes) e funcionários de seu laboratório pela gentileza em cooperar, deixando-nos à disposição aparelhos e reagentes necessários ao andamento deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Vicente P. Emerenciano e Marcelo J. P. Ferreira pelo apoio prestado durante a elaboração final desta tese.

Às Renata P. Limberger e Profa. Dra. Amélia T. Henriques pela análise em CG-EM do óleo volátil.

À Profa. Dra. Mitsuko T. Ohara pelo auxílio durante a análise microbiológica do óleo volátil.

Ao Dr. Guillermo Delgado pela indução de calos e estabelecimento das suspensões celulares de *Piper cernuum*.

Aos funcionários da Central Analítica Fernando M. de Oliveira e Márcio N. Wandermuren.

Ao colegas e funcionários do B11T pela agradável convivência diária, além da ajuda, e um obrigada especial para o Leandro R. Latorre, Sérgio M. Nunomura, Karine C. da Silva e José Antônio Joaquim.

Aos amigos Ana Paula Danelutte, Ana Paula Santos, Alessandra, Angélica, Antônio Jedson, Fátima, Francimeiry, Isabel, Marcelo, Melânia, Patrícia, Roberto e Sérgio Galdino pelo carinho e atenção.

Aos Felipes, Elaine e Luciana pela ajuda indispensável oferecida durante os momentos iniciais de permanência nesta cidade.

Aos Drs. Antônio, Elza e Rodrigo, Gabriel, Davi e Pedro pela hospedagem, paz, afeto e alegria que me proporcionaram nos momentos finais da execução desta tese.

Às famílias Steppe, Fantucci, Passetto, Cattani & Costantin pelo apoio constante.

A todos que anônimos colaboraram de alguma maneira na execução desta tese.

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o metabolismo secundário de *Piper cernuum* (Piperaceae) através do isolamento e caracterização dos principais produtos acumulados e a associação com a atividade enzimática da PAL (fenilalanina-amônia-liase) na planta diferenciada (adulta e plântulas) e nas suspensões celulares. Das folhas foram isolados diversos derivados do ácido cinâmico e a lignana cubebina. Entretanto, na análise do óleo volátil das folhas, através de CG-EM, observou-se somente a presença de mono- e sesquiterpenos, sendo que os mais abundantes foram biciclogermacreno (21,88%) e β -cariofileno (20,60%). O óleo apresentou atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. As suspensões celulares foram caracterizadas quanto à produção de biomassa, variação de pH e captação de açúcar. Os principais metabólitos foram isolados e caracterizados como sendo tiramina e dopamina que foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência através de seus derivados dansilados. As atividades da PAL nas plântulas cultivadas *in vitro* foram superiores às das plântulas cultivadas em campo e observou-se uma oscilação rítmica da sua atividade enzimática com picos às 6 e 18 horas.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the secondary metabolism of *Piper cernuum* (Piperaceae) by means of isolation and characterization of major secondary compounds accumulated in association to the enzymatic activity of PAL in the differentiated plant material (adult and seedlings) and cell suspension cultures. The major compounds in leaves were derivatives of cinnamic acid and the lignan cubebin. Nevertheless, the analysis of essential oil from leaves by GC-MS indicated the presence of only mono- and sesquiterpenes, among which bicyclogermacrene (21.88%) and β -cariophyllene (20.60%) were the predominant ones. The oil was active against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The cell suspension cultures had their growth cycle characterized by means of evaluation of biomass production, pH variation and sugar uptake. The major secondary compounds in the cells were characterized as tyramine and dopamine which were quantified by HPLC as their dansylated derivatives. The PAL activities in the seedlings cultivated *in vitro* were higher than those in the seedlings growing in field conditions and a rhythmic oscillation of enzyme activity was clearly observed with peaks at 6a.m. and 6p.m.

SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	01
1.1 Metabolismo das plantas.....	01
1.2 Cultura de células vegetais.....	03
1.3 <i>Piper cernuum</i>	05
1.4 Objetivos.....	06
2. Revisão da Literatura.....	07
2.1 Introdução geral: gênero <i>Piper</i>	07
2.2 Química do gênero <i>Piper</i>	09
2.3 Atividade biológica e uso na medicina popular de espécies do gênero <i>Piper</i>	37
3. Material e métodos.....	52
3.1 Material biológico.....	52
3.1.1 Material vegetal.....	52
3.1.2 Obtenção de plântulas estéreis de <i>P. cernuum</i> por germinação de sementes.....	52
3.1.3. Cultura de calos.....	52
3.1.4 Suspensões celulares.....	53
3.2 Tamanho de inóculo.....	53
3.3 Determinação da curva de crescimento das suspensões celulares.....	53
3.4 Determinação dos valores de pH.....	54
3.5 Determinação das matérias fresca e seca das suspensões celulares.....	54
3.6 Doseamento de açúcares no meio de cultura.....	54
3.7 Determinação da atividade específica da PAL.....	55
3.7.1 Extração de proteína para ensaio enzimático.....	55
3.7.2 Ensaio enzimático da PAL.....	55
3.8 Determinação das proteínas totais.....	56
3.9 Quantificação da tiramina e dopamina.....	56
3.9.1 Extração das aminas.....	56
3.9.2 Derivatização das aminas.....	56
3.10 Óleo volátil.....	57
3.10.1 Extração do óleo.....	57
3.10.2 Identificação dos componentes.....	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Metabolismo das plantas

Uma vez incorporado pelas plantas autotróficas fotossintetizantes, o átomo de carbono participa de uma série de processos bioquímicos nas células vegetais até finalmente se transformar em metabólitos primários e secundários. Os primeiros são conhecidos por serem fundamentais ao crescimento e desenvolvimento do vegetal e compreendem basicamente os açúcares, lipídios e aminoácidos. Ao contrário dos metabólitos primários, os secundários não são essenciais ao crescimento das plantas e possuem uma imensa variedade de rotas metabólicas, que podem variar de acordo com a espécie vegetal ou ainda ser exclusivas para certas espécies. De acordo com Vickery & Vickery (1981), também são substâncias necessárias à vida da planta, pois muitas delas fornecem mecanismos de defesa contra contaminação por microrganismos de forma análoga ao sistema imunológico dos animais. Outras substâncias estão envolvidas em funções vitais em espécies vegetais atraindo insetos ou pássaros polinizadores através de sua cor ou cheiro. Do mesmo modo que as substâncias secretadas pelas plantas atraem, podem também repelir predadores (insetos ou herbívoros) devido ao sabor amargo, funcionando como antifágicas, ou mesmo devido à toxicidade apresentada pelas mesmas.

Alcalóides, terpenos, lignóides e flavonóides são alguns exemplos destas substâncias secundárias e muitas delas possuem importância econômica devido à utilização na indústria de cosméticos, alimentos e medicamentos (Mitani *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1999; Pino & Borges, 1999; Kubo *et al.*, 1999; Schelosky *et al.*, 1995; Parmar *et al.*, 1997).

As três principais rotas de formação de metabólitos secundários compreendem as vias acetato-malonato, acetato-mevalonato e chiquimato. A última é uma das maiores rotas biossintéticas em plantas superiores e engloba a formação de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. Estes aminoácidos são utilizados como precursores de proteínas e metabólitos secundários, entre eles os pigmentos e protetores de luz UV, enquanto que a fenilalanina origina a formação de lignina. Espécies vegetais diferentes sintetizam diversos metabólitos secundários aromáticos em quantidades variáveis, em tempo e compartimento sub-celular específicos (Herrmann, 1995).

A classe metabólica de interesse de estudo do LQPN (Laboratório de Química de Produtos Naturais do IQ-SP) compreende os lignóides (fenilpropanóides, lignanas, neolignanas e ligninas) formados inicialmente a partir do ácido *trans*-cinâmico, oriundo da

desaminação da fenilalanina catalisada pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) (E.C.4.3.1.5). Esta enzima, que liga o metabolismo primário ao secundário, é considerada enzima-chave e reguladora da biossíntese de uma variedade de substâncias aromáticas (Jones, 1984).

Camm & Towers (1973) relataram que os níveis da PAL são extraordinariamente sensíveis ao estado fisiológico da planta podendo oscilar durante a germinação e o desenvolvimento do vegetal.

A partir do *trans*-cinamato são formados os diferentes produtos secundários finais desta via e essa diversidade está estreitamente relacionada ao estágio de desenvolvimento do tecido vegetal (por ex., compartimentalização de enzimas importantes em níveis celulares ou sub-celulares), bem como estímulos ambientais fornecidos à planta (por ex., qualidade e intensidade de luz) (Jones, 1984).

De acordo com Dixon & Paiva (1995) alguns fenilpropanóides são sintetizados pela planta sob condições de estresse bióticas ou abióticas. Muitos deles são classificados como fitoalexinas, substâncias antimicrobianas produzidas em resposta a um ataque patogênico. Outros são sintetizados quando há baixa concentração de nitrogênio, fosfato e ferro no solo, baixa temperatura, ou ainda na presença de luz UV ou lesão de tecidos.

O gênero *Piper* (Piperaceae), objeto de estudo do LQPN, é reconhecido pela diversidade do seu metabolismo secundário. Além de acumular principalmente fenilpropanóides, amidas e alcalóides, este gênero constitui uma rica fonte de óleos voláteis, que são definidos por Bell & Charlwood (1980) como uma mistura complexa de substâncias com estruturas químicas diferentes e de baixo peso molecular.

Sob o ponto de vista quimiotaxonômico, Cronquist (1981) citou, entre outras angiospermas, a família Piperaceae relacionando-a com a produção de óleos voláteis, onde, nesta família são produzidos por células secretoras, osmóferos, (Craker, 1990) e localizam-se em células parenquimáticas diferenciadas (Limberger, 1998).

A grande maioria dos componentes dos óleos voláteis pertence à classe dos terpenos, derivados do ácido mevalônico, que quando fosforilado e seguido de descarboxilação, dá origem ao pirofosfato de isopentila (IPP). A princípio, acreditava-se que o IPP fosse formado unicamente a partir do ácido mevalônico, porém Schwender *et al.* (1996) relataram que a glicose, através da via do acetato, também pode dar origem ao IPP. Dos terpenos, os mono e sesquiterpenos são os constituintes mais abundantes dos óleos.

Os fenilpropanóides, como por exemplo, eugenol, safrol e miristicina são acumulados com menor frequência em óleos voláteis e formados geralmente a partir do ácido chiquímico, que origina a porção aromática da molécula enquanto que o fosfoenol piruvato gera a cadeia lateral propanoídica.

A composição e o teor de alguns constituintes do óleo volátil de uma mesma espécie podem ser alterados de acordo com a parte do vegetal que o produz, durante a fase de maturação do órgão vegetal, época do ano em que se realiza a coleta do óleo, fatores climáticos, estímulos mecânicos ou químicos e natureza e composição do solo. (Figueiredo, 1992).

Algumas funções específicas dos óleos nas plantas envolvem a ação antitranspirante (pois em concentrações elevadas, o óleo promove o fechamento dos estômatos, diminuindo a perda de água por evaporação), proteção contra aumento de temperatura, predadores e insetos, atração de polinizadores e alelopatia (Figueiredo, 1992).

Os óleos voláteis apresentam claramente atividade antimicrobiana, porém o modo de ação dos óleos sobre os microrganismos ainda não está totalmente elucidado (Dorman & Deans, 2000). Knobloch *et al.* (1986 e 1988) investigaram os efeitos dos terpenos de óleos voláteis, que possuem característica lipofílica, sobre membranas isoladas de bactérias. O sítio de ação dos terpenos parece ser na bicamada fosfolipídica da membrana, envolvendo mecanismos bioquímicos catalizados por esta bicamada, tais como: a inibição de transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas de fosforilação e outras reações enzimáticas. Deve-se ressaltar porém, que a atividade em células intactas parece ser mais complexa.

Entre os vários tipos de atividades biológicas (por ex., antiinflamatória, expectorante, estimulante gástrica e circulatória, etc) apresentadas pelos óleos voláteis, a antimicrobiana é a principal, quer defendendo o próprio vegetal contra contaminação bacteriana e fungos fitopatogênicos, (Siani *et al.*, 2000) ou segundo Hammer *et al.* (1999), como agente antimicrobiano na forma de medicamento, na preservação de alimento bruto ou processado, na medicina alternativa e terapias naturais.

1.2 Cultura de células vegetais

Quando surgiram hipóteses de importância ecológica e evolutiva de metabólitos secundários de plantas entre os anos 60 e 70, a compreensão da bioquímica e biologia molecular era ainda limitada. Este cenário alterou-se drasticamente nos últimos anos, através de muitos estudos relacionados à regulação da síntese de metabólitos secundários,

principalmente através de estudo da bioquímica do metabolismo vegetal em cultura de células (Matsuki, 1996).

Inicialmente, por volta dos anos 30, as culturas de células vegetais foram desenvolvidas para demonstrar a longevidade de meristemas de plantas, através da subcultura de calos. Aproximadamente 25 anos depois, a diferenciação celular tornou-se o principal objetivo de estudo de culturas celulares, com desdiferenciação celular a partir de um explante de tecido vegetal gerando formação de calos e com rediferenciação das células em calos formados (Constabel & Vasil, 1987). Mais tarde, a identificação de metabólitos secundários em espécies vegetais cultivadas tanto na forma de calos como em suspensões celulares foi sendo relatada por vários autores. Podem ser citadas a produção de sanguinarina em *Papaver somniferum* (Eilert *et al.*, 1985), berberina em *Coptis japonica* (Fukui *et al.*, 1982), ginsengosídeo em *Panax ginseng* (Furuya *et al.*, 1983a e 1983b), shikonina em *Lithospermum erythrorhizon* (Tabata *et al.*, 1978), catarantina em *Catharanthus roseus* (Smith *et al.*, 1987) entre outras, passando as suspensões celulares e cultura de calos então a constituir uma nova fonte de produção destes metabólitos.

Entretanto, vários autores observaram que pode haver diferenças na produção de metabólitos secundários pelas culturas de células e planta intacta da mesma espécie (Brown *et al.*, 1990, DiCosmo & Towers, 1984). Estas diferenças estão relacionadas às condições ambientais do cultivo de células bem como composição do meio de cultura. As culturas de células tanto podem sintetizar os metabólitos em concentrações muito baixas como podem até deixar de produzi-los. Ainda, a produção de metabólitos secundários pode também ser bastante comprometida em células morfológicamente desdiferenciadas (calos, suspensões celulares e células meristemáticas), pois normalmente é dependente da produção de algumas enzimas que, por sua vez, dependem da fase de desenvolvimento do vegetal (Sierra, 1991).

No início da década de 70, as culturas de células passaram a ser utilizadas no estudo de biossíntese de produtos naturais, graças à possibilidade de identificação, caracterização e purificação de enzimas viabilizando o conhecimento de muitos passos enzimáticos envolvidos no metabolismo secundário (Zenk, 1991; Kutchan, 1993). Desde então, inúmeros trabalhos têm sido realizados nesta área e, de acordo com Zenk (1991), as culturas de células tornaram-se uma ferramenta indispensável e central para o estudo da biossíntese de metabólitos secundários. Alguns exemplos incluem o uso de culturas de células de *Papaver somniferum* no estudo da redução enzimática de codeinona à codeína

(Lenz & Zenk, 1995), biossíntese de terpenóides em culturas de células de *Catharanthus roseus* (Arigoni *et al.*, 1997), biossíntese de paclitaxel em culturas de células de *Taxus chinensis* (Eisenreich *et al.*, 1996) e taxóides desta mesma espécie (Menhard *et al.*, 1998).

O estudo biossintético de metabólitos secundários utilizando-se culturas de células apresenta certas vantagens com relação ao uso de plantas diferenciadas tais como a disponibilidade constante de matéria-prima para o isolamento de enzimas, relativa homogeneidade, sincronia da fase de desenvolvimento, facilidade de transferência para repicagem e ausência de microrganismos interferentes (Charlwood & Rhodes, 1990; Zenk, 1991).

1.3 *Piper cernuum*

Piper cernuum Vell. (Piperaceae) é um arbusto de 6 m ou mais de altura com folhas grandes e largas, em torno de 30 cm de largura por 40 cm de comprimento, amplamente distribuído nas regiões amazônicas, SE e NE do Brasil (**figura 1, pág. 5**) (Yuncker, 1972).

Figura 1- *Piper cernuum* cultivada no Instituto de Química da USP de São Paulo.

1.4 Objetivos

Tendo em vista que até o momento não foram encontrados trabalhos na literatura sobre a composição química de *P. cernuum* e suas atividades biológicas, este trabalho teve como objetivo a descrição dos metabólitos secundários das folhas desta espécie, com ênfase em fenilpropanóides. Devido à reconhecida ocorrência de óleo volátil na família Piperaceae uma outra finalidade deste trabalho foi analisar a composição química e testar a atividade antimicrobiana do óleo volátil de folhas de *P. cernuum*.

Adicionalmente, objetivou-se a comparação da produção de metabólitos secundários de suspensões celulares de *P. cernuum* com a planta adulta desta espécie, bem como a quantificação das substâncias majoritárias acumuladas nestas suspensões celulares e a avaliação de alguns parâmetros de crescimento das culturas.

Considerando que a enzima PAL catalisa o primeiro passo na biossíntese dos lignóides, foi enfatizada a avaliação da atividade desta enzima em planta adulta, plântulas cultivadas *in vitro* (mantidas à temperatura e incidência de luz branca controladas) e em campo (mantidas em estufa, à temperatura ambiente e sob luz solar) e em suspensões celulares, incluindo a variação rítmica da atividade da PAL em plântulas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Introdução geral: gênero *Piper*

Entre as Angiospermae, Piperaceae constitui-se numa das mais primitivas famílias e abrange principalmente os gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*. O gênero *Piper* compreende aproximadamente 700 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, que são encontradas nas formas de trepadeiras ou ervas eretas, arbustos ou, em menor frequência como árvores (Parmar *et al.*, 1997).

Muitas espécies de *Piper* são utilizadas na medicina popular, principalmente na Índia e na América Latina. *P. amalago*, por exemplo, distribuída desde o México até o Brasil, é empregada no alívio de dores do peito e como agente antiinflamatório e os frutos e raízes de *P. chaba* são utilizados para abrandar dores no abdômen, febre, bronquite, asma, etc. Na medicina popular chinesa, os galhos de *P. futokadsura* são usados no tratamento de asma e artrite enquanto que, na África Ocidental, preparações de folhas, raízes e sementes são empregadas internamente no tratamento de bronquite, doenças gastrintestinais, venéreas e reumatismo (Parmar *et al.*, 1997).

Algumas espécies de *Piper* são cultivadas em jardins como plantas ornamentais devido à beleza de suas folhagens.

Sob o ponto de vista químico, foram investigadas cerca de 16% das espécies, entre as quais foi descrita uma grande variedade de classes de metabólitos secundários como por exemplo: amidas, alcalóides, flavonóides, lignanas, neolignanas, terpenos e outras de biossíntese mista (Parmar *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1993) (**figura 2, pág. 37**).

Apesar dessa diversidade de espécies, poucas têm uso popular consagrado. *Piper nigrum*, originária da Índia e conhecida como pimenta-do-reino, possui importância econômica no mercado das pimentas. De acordo com a coleta e tratamento dos frutos, a pimenta-do-reino pode ser classificada em preta e branca. A primeira é obtida a partir dos frutos verdes e imaturos que, secos ao sol, tornam-se quase negros. Os pigmentos pretos são formados através da oxidação de substâncias fenólicas presentes, como 3,4-di-hidróxi-feniletanol glicosídeo e 3,4-di-hidróxi-6-(*N*-etil-amino)-benzamida, pelas polifenol-oxidases (Parmar *et al.*, 1997; Pradhan *et al.*, 1999; Pino & Borges, 1999). Os frutos maduros de *P. nigrum*, que passam por um processo natural de clareamento, dão origem à pimenta branca após a secagem e retirada de suas cascas (Pino & Borges, 1999).

Os rizomas de *Piper methysticum* são utilizados na Oceania no preparo de uma bebida narcótica denominada kava-kava (Singh, 1992). Durante as últimas décadas, diversos produtos fitoterápicos contendo extratos de kava têm sido comercializados em vários países da Europa e no Brasil como ansiolíticos suaves e mais seguros. Apesar de várias triagens clínicas controladas e de outros relatos evidenciarem tais usos terapêuticos, Schelosky *et al.* (1995) chama a atenção para os possíveis efeitos adversos extra-piramidais (EPS) de preparações de kava, recomendando cuidado no seu uso especialmente em pacientes mais velhos. Baseado em observações realizadas em quatro pacientes que desenvolveram sinais clínicos sugestivos de antagonismo dopaminérgico central, após exposição a duas diferentes preparações de kava, entre elas o Laitan® (extrato padronizado de kava), os autores relataram que uma única dose de 100 mg deste extrato causou discinesia involuntária e outros sintomas clínicos de EPS em dois pacientes em quatro horas após a sua administração (Nöldner & Chatterjee, 1999).

A revisão sobre o gênero *Piper* foi baseada no levantamento realizado no *Chemical Abstract* no período de 1910 a 2000 e teve como objetivo evidenciar a química e a atividade biológica, além do uso na medicina popular (apresentadas respectivamente nos itens 2.2 e 2.3), em vários países, das espécies pertencentes ao gênero *Piper*.

Os trabalhos envolvendo cultura de tecidos de espécies de *Piper* são recentes e ainda escassos, abrangendo principalmente formação de calos e estabelecimento de suspensões celulares, regeneração da planta a partir de cultura de calos, micropropagação das espécies vegetais usando cultura de células e mudanças na composição dos meios de cultura (Bhat *et al.*, 1992; Aminuddin *et al.*, 1993; Philip *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1992; Madhusudhanan & Rahiman, 2000).

2.2 Química do gênero *Piper*

1. *P. aborescens*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	cefaradiona B; dímero A de piplartina; <i>N</i> -(3',4'-dimetóxi-cinamoil)- Δ^3 -piperidin-2-ona; <i>N</i> -(3'-metóxi-4',5'-metilenodióxi-cinamoil)- Δ^3 -piperidin-2-ona; <i>N</i> -(3'-metóxi-4',5'-metilenodióxi-di-hidrocinamoil)- Δ^3 -piperidin-2-ona; piplartina/piperlongumina; 1,2,3-trimetóxi-4,5-dioxo-6a,7-desidroaporfina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(+)-diaiangambina; (+)- <i>epi</i> -excelsina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

2. *P. acustileginum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperolactama B cefaradiona A; piperlonguminina; piperina	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998

3. *P. acutifolium*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	dilapiol; miristicina	Lognay <i>et al.</i> , 1996
terpenos	<i>alo</i> -aromadendreno; α - e δ -cadineno; α -copaeno; (<i>E</i>)- β -ocimeno	Lognay <i>et al.</i> , 1996

4. *P. aduncum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	aduncamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997
fenilpropanóides	asaricina; 1,3-dimetóxi-2-acetóxi-5-alilbenzeno; 2,6-dimetóxi-4-alilfenol; elemicina; pseudodilapiol miristicina; piperitona; safrol dilapiol 2-acetóxi-1,3-dimetóxi-5-(2-propenil)-benzeno; 2,6-dimetóxi-4-alilfenol; 5-metóxi-6-(2-propenil)-1,3-benzodioxol; 5-metóxi-6-(2-propenil)-1,3-benzodioxol; 1,2,3-trimetóxi-5-(2-propenil)-benzeno	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998; Maia <i>et al.</i> , 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1998
terpenos	cânfora; cariofilenol-II; cubebol; espatulenol; epóxido-I de humeleno; α -humeleno; óxido de cariofileno; <i>trans</i> -fitol; viridiflorol acetatos de bornila, nerila e geranila; cariofileno; <i>m</i> -cimenol; 1,8-cineol; copaeno; α -felendreno; mirceno; β -pineno; α -terpineno	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Moreira <i>et al.</i> , 1998a
esteróides	β -sitosterol estigmasterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998 Moreira <i>et al.</i> , 1998a
flavonóides	adunctinas A, B, C, D e E; asebogenina; metil-lindaretina;	Parmar <i>et al.</i> , 1997

	<p>piperaduncinas A, B e C; pinostrobina; sakuranetina 2',6'-di-hidróxi-4'-metóxi-di-hidrochalcona</p> <p>5-hidróxi-7-metóxi-flavona; 2',6'-di-hidróxi-4'-metóxi-chalcona; 2',4-di-hidróxi-4',6',3-trimetóxi-di-hidrochalcona; 2-hidróxi-4',6'-dimetóxi-di-hidrochalcona; 7-hidróxi-5-metóxi-di-hidroflavona; 2',4-di-hidróxi-4',6'-dimetóxi-di-hidrochalcona</p>	<p>Moreira <i>et al.</i>, 1998a; Parmar <i>et al.</i>, 1997; 1998 Moreira <i>et al.</i>, 1998a</p>
outras subst.	<p>ácido 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2<i>H</i>-cromeno-6-carboxílico; ácido-4-hidróxi-3,5-<i>bis</i>-(3-metil-2-butenil)-benzóico; ácido 4-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-benzóico; 2,2-dimetil-2<i>H</i>-1-benzopiran-6-carboxilato de metila; 3-(3,7-dimetil-2,6-octadienil)-4-metóxi-benzoato de metila; 3,5-<i>bis</i>-(3-metil-2-butenil)-4-metóxi-benzoato de metila; (5<i>Z</i>,6<i>Z</i>)- e (5<i>E</i>,6<i>E</i>)-fadienolida; 4-hidróxi-3,5-<i>bis</i>-(3-metil-2-butenil)-benzoato de metila; 8-hidróxi-2,2-dimetil-2<i>H</i>-cromen-6-carboxilato de metila; 3-(6'-hidróxi-3',7'-dimetil-2',7'-octadienil)-4-metóxi-benzoato de metila; 4-hidróxi-3-(2'-hidróxi-3'-metil-but-3'-enil)-benzoato de metila; 4-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-benzoato de metila; (2<i>E</i>)-6-hidróxi-2,6-dimetil-2,7-octadienoato de (6<i>S</i>) metila; luteína; benzoato de 1-(1-metil-etil)-4-metil-3-ciclo-hexenil-3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-hidróxi; benzoato de 1-(1-metil-etil)-4-metil-3-ciclo-hexenil-3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-metóxi nodendroato de metila; sacarose; α-tocoferol ácido 3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-metóxi-benzóico 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2<i>H</i>-cromeno-6-carboxilato de metila; eupatoriocromeno ácidos: 2,2-dimetil-2<i>H</i>-1-cromeno-6-carboxílico e 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metóxi-benzóico; 2,2-dimetil-2<i>H</i>-1-cromeno-6-carboxilato de metila; 2,2-dimetil-8-(3'-metil-2'-butenil)-2<i>H</i>-1-cromeno-6-carboxilato de metila; 8-hidróxi-2,2-dimetil-2<i>H</i>-1-cromeno-6-carboxilato de metila</p>	<p>Parmar <i>et al.</i>, 1997</p> <p>Parmar <i>et al.</i>, 1997; 1998 Moreira <i>et al.</i>, 1998a</p> <p>Baldoqui <i>et al.</i>, 1999</p>

5. *P. aequale*

Classes	Substâncias	Referências
neolignanas	<p>(2<i>R</i>,3<i>R</i>)-2,3-di-hidro-2-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-3-metil-5-(<i>E</i>)-propenil-benzofurano; (2<i>S</i>,3<i>S</i>)-2,3-di-hidro-2-(4-hidróxi-fenil)-3-metil-5-(<i>E</i>)-propenil-benzofurano; (2<i>R</i>,3<i>R</i>)-2,3-di-hidro-2-(4-hidróxi-fenil)-5-metóxi-3-metil-7-propenil-benzofurano; decurrenal; eupomatenóides: 3, 5 e 6; 2-hidróxi-4,4'-<i>bis</i>-[3-metil-5-(<i>E</i>)-propenil]-benzofuran-2-il]-difenil-éter (dímero de eupomatenóide-6); 2-(3,4-metilenodióxi-fenil)-3-metil-5-(2-oxopropil)-benzofurano; 2-(3,4-metilenodióxi-fenil)-5-(1,2-di-hidróxi-propil)-3-metil-benzofurano</p>	Maxwell <i>et al.</i> , 1999

6. *P. album*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

10. *P. arboreum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	acetato de linalila; biciclogermacreno; β -bourboneno; cadina-1,4-dieno; α - e T-cadinol; δ -cadineno; calacoreno; canfeno; cânfora; β -cariofileno; <i>p</i> -cimeno; α -copaeno; α -cubebeno; cubenol e <i>epi</i> -cubenol; β -elemeno; espatulenol; β -farneseno; farnesila cetona; β -felandreno; germacreno D; α - e γ -gurjuneno; α -humeleno; limoneno; linalool; mirceno; α - e γ -muuroleno; óxido de <i>iso</i> -cariofileno; 6-(<i>E</i>)-nerolidol; nerol; β -ocimeno; α - e β -pineno; sabineno; α -terpineno; α -terpineol; terpin-4-ol; terpinoleno; tricicleno; viridiflorol	Mundina <i>et al.</i> , 1998

11. *P. arboreumlatifolium*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	germacreno D	Parmar <i>et al.</i> , 1997

12. *P. arboricola*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	3-(3',4'-dimetóxi-fenil)-propionamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997
fenilpropanóides	ácido 3,4-dimetóxi-cinâmico ácido 3,4-dimetóxi-di-hidro-cinâmico	Parmar <i>et al.</i> , 1997 He <i>et al.</i> , 1981
outras subst.	3-(3,4-dimetóxi-fenil)propil-amina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

13. *P. arieianum*

Classes	Substâncias	Referências
outras subst.	ácido piperóico; arieianal; sargaquinal	Green <i>et al.</i> , 1999

14. *P. argyrophylum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butiloctadecadienamida; cefaranona B; <i>N</i> -cinamoilpirrol; <i>N</i> -cinamoilpirrolidina; piperina piperolactamas: A, B, C e D lactama-10-amino-4-hidróxi-3-metóxi-fenantreno-1 do ácido carboxílico; lactama-10-amino-2-hidróxi-3,4-dimetóxi-fenantreno-1 do ácido carboxílico; lactama-10-amino-4-hidróxi-2,3-dimetóxi-fenantreno-1 do ácido carboxílico; lactama-10-amino-2,3,4-trimetóxi-fenantreno-1 do ácido carboxílico; lactama-10-amino-3,4-dimetóxi-fenantreno-1 do ácido carboxílico; 1-cinamoilpirrolidina cefaradionas: A e B; (<i>E</i>)- e (<i>Z</i>)- <i>N</i> -formilnornuciferinas; (<i>Z</i>)- e (<i>E</i>)-formauregina; <i>N</i> -cis-e-trans-feruloil-tiramina; <i>N</i> - <i>p</i> -cumaroil-tiramina	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Singh <i>et al.</i> , 1996 Parmar <i>et al.</i> , 1997; Singh <i>et al.</i> , 1996
fenilpropanóides	apiol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	4-[2-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-hidróxi-1-metil-etil]-2,5-dimetóxi-2-(2-propenil)-3,5-ciclo-hexadieno-1-ona;	Parmar <i>et al.</i> , 1997

	(7R,8S,1'S)- Δ^8 -1',4'-di-hidro-5'-metóxi-3,4-metilenodióxi-4'-oxo-8.1',7.O.2'-lignana; 4',5'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-2'-oxo- $\Delta^{3',5',8'}$ -8.1-lignana; <i>iso</i> -futoquinol B; (7R,8R,1'S)- Δ^8 -1'-metóxi-3,4-metilenodióxi-1',6-di-hidro-6'-oxo-7.O.4',8.3'-lignana futoquinol/hancinona D; kadsurina A e B; (+)-lancifolina C e D <i>iso</i> -di-hidro-futoquinol B; 4-(2-piperonil-2-hidróxi-1-metiletil)-2,5-dimetóxi-2-(2-propenil)-3,5-ciclohexadien-1-ona; 6,2-(piperonil-1-metiletil)-3,4-dimetóxi-6-(2-propenil)-2,4-ciclohexadien-1-ona; (2R,3S,3aS)-2-piperonil-3,3a-di-hidro-5-metóxi-3-metil-3a-(2-propenil)-6(2H)-benzofuranona; (2R,3R,5S)-2-piperonil-3,5-di-hidro-5-metóxi-3-metil-5-(2-propenil)-6(2H)-benzofuranona	Singh <i>et al.</i> , 1996; Parmar <i>et al.</i> , 1997 Singh <i>et al.</i> , 1996
terpenos	β -bourboneno; cadina-1(10),4-dieno (δ -cadineno); 3-careno; β -cariofileno; <i>p</i> -cimeno; α -cubebeno; α -gurjuneno; limoneno; mirceno; (-)-muuroleno; α - e β -pineno; sabineno; α -tujeno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	α -tocoferol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

15. *P. attenuatum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	aristolactama A II; (2E,4E)- <i>N</i> -iso-butildecadienamida; cefaradiona A e B; cefaranona B; guineensina; 2-hidróxi-1-metóxi-4H-dibenzo-(de,g)quinolina-4,5-(6H)-diona; norcefaradiona B; piperadiona; piperina; piperlonguminina; piperolactama A	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(+)-galbelgina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	kadsurina A e B	Parmar <i>et al.</i> , 1998
terpenos	β -bisaboleno; β -cariofileno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998
outras subst.	ácido tetratriacontanóico; crotepóxido; 14-(3,4-metilenodióxi-fenil)-tetradecan-2-ol; pipóxido; pipóxido cloridrina 14-benzo[1,3]dioxol-5-il-tetradecan-2-ol; (+)-crotepóxido	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1998

16. *P. augustum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	lactama <i>N</i> -metil-10-amino-4-hidróxi-2,3-dimetóxi-fenantreno-1 do ácido carboxílico; cefaradiona A; cefaranona B	Delgado <i>et al.</i> , 1998
esteróides	estigmasterol	Delgado <i>et al.</i> , 1998

17. *P. aurantiacum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	auranamida e aurantiamida; acetato e benzoato de aurantiamida; ($\pm$)- <i>N</i> -benzoilfenilalanina; piperina; piperetina; sylvetina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	<i>epi</i> -friedelanol; friedelina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol; colestanol; colesterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácidos: vanílico, linoleico e esteárico; maltose; n-triacontano	Parmar <i>et al.</i> , 1997

21. *P. bartlingianum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	8,9-di-hidropiplartina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	α -cadinol; (1 <i>S</i>)- <i>cis</i> -calameneno; α -copaeno; <i>trans</i> -cariofileno; 1- <i>epi</i> -cubenol; β -elemeno; espatulenol; globulol; <i>trans</i> - β -guaieno; γ -muuroleno; α -muurolol e <i>epi</i> - α - muurolol; (<i>E</i>)-nerolidol; α -selineno	Acevedo-Rodríguez, 1990

22. *P. betel*

[illegible]

23. *P. boehmerifolium*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	aristolactama A II; cefaradiona A; 2-hidróxi-1-metóxi-4 <i>H</i> -dibenzo-(de,g)quinolina-4,5-(6 <i>H</i>)-diona; norcefardiona B; piperolactamas: A, B, C e D cefardiona B; cefaranona B	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; Zhang <i>et al.</i> , 1999

	braquistamida B; cefaranona A; guineensina; piperina; piperlonguminina; pipeylina	Zhang <i>et al.</i> , 1999
fenilpropanóides	(<i>E</i>)-3,4-metilenodióxi-fenil propenal	Zhang <i>et al.</i> , 1999
neolignanas	<i>iso</i> -di-hidrofutoquinol B; kadsurina A	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol; estigmast-4-en-6- β -ol-3-ona; peróxido de ergosterol	Zhang <i>et al.</i> , 1999
outras subst.	éster de α -palmitil-glicerina	Zhang <i>et al.</i> , 1999

24. *P. brachystachyum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	braquiamida A e B e braquistamida A e B; braquistina; guineensina; piperica; retrofractamida A; sylvetina 1-(3,4-dimetóxi- α,β -di-hidrocinamoil)-pirrol 3-(3,4-dimetóxi-fenil)-propanoilpirrol	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Kumar <i>et al.</i> , 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1998
fenilpropanóides	ácidos: (<i>E</i>) e (<i>Z</i>)-2,4,5-trimetóxi-cinâmico; (<i>E</i>)-2,4,5-trimetóxi-cinamato de metila elemicina apiol	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998
lignanas	fargesina; pluviatilol (+)-asarina; sesamina	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998
terpenos	óxido de cariofileno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998
flavonóides	6-C β -D-galactopiranosil-acacetina 7-O-glicosídeo; 6-C β -D-glicopiranosil-acacetina 7-O-glicosídeo	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	crotopóxido; pipatalina; <i>n</i> -triacontano e <i>n</i> -triacontanol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

25. *P. callosum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperina; pipericallosina e pipericallosidina; piperovatina; pipartina/piperlongumina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
fenilpropanóides	safrol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

26. *P. caninum*

Classes	Substâncias	Referências
flavonóides	5,7-dimetilflavona; 5,7-dimetóxi-flavona	Ahmad <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	(<i>E</i>)-1-(4'-metóxi-fenil)-2-(3',4',5'-trimetóxi-fenil)-eteno (+) <i>p</i> -cumarato e cafeato de bornila	Ahmad <i>et al.</i> , 1997 Setzer <i>et al.</i> , 1999

27. *P. capense*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	benzenopropanoatos de: metila e etila; metil-eugenol; miristicina	Martins <i>et al.</i> , 1998
neolignanas	<i>rel</i> -(7 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)- Δ^8 -3,4,3',4'-bis-metilenodióxi-7-O-2',8,3'-lignana; Δ^8 -1',2'-di-hidro-3,4,3',4'-bis-metilenodióxi-2'-oxo-8.1'-lignana; <i>iso</i> - Δ^8 -1',2'-di-hidro-3,4,3',4'-bis-metilenodióxi-2'-oxo-8.1'-lignana; Δ^8 -3',6'-di-hidro-3,4,3',4'-bis-metilenodióxi-6'-oxo-8.3'-lignana;	Parmar <i>et al.</i> , 1997

	Δ^8 -1',2'-di-hidro-4-hidróxi-3-metóxi-3',4'-metilenodióxi-2'-oxo-8.1'-lignana; <i>rel</i> -(7S,8S)- Δ^8 -4-hidróxi-3-metóxi-3',4'-metilenodióxi-7.O.2',8.3'-lignana; <i>rel</i> -(7S,8R)- Δ^8 -3,4,5'-trimetóxi-7-hidróxi-8.O.3'-lignana; wallichinina	
terpenos	capentina <i>alo</i> -aromadendreno; δ -cadineno; α -e τ -cadinol; canfeno; δ -3-careno; β -cariofileno; <i>p</i> -cimenol; α -copaeno; α -cubebeno; cubenol; β -elemol; δ -elemeno; 2Z,6Z-farnesol; α -e β -felandreno; fitol; germacreno D e germacreno D-4-ol; α -gurjuneno; hidrato de <i>cis</i> -sabineno; α -humuleno; ledeno; limoneno; linalool; mirceno; γ -muuroleno; τ -muurolol; (<i>E</i>)-nerolidol; (<i>Z</i>)- β -ocimeno; α -e β -pineno; piperitol; piperitona; <i>iso</i> -pulegol; sabineno; β -selineno; terpinoleno; α -tujeno	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Martins <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	(<i>E</i>)-2-tridecenal	Martins <i>et al.</i> , 1998

28. *P. cavalcantei*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	eugenol; metil-éter-eugenol; safrol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

29. *P. cenocladum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	cenocladamida; 4'-desmetil-piplotartina; piplotartina	Dodson <i>et al.</i> , 2000

30. *P. chaba*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	2,4-decadienoilpiperidina; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butildecadienamida; piperina; piperlonguminina; piperamina; sylvetina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	kusunokinina [8 <i>R</i> ,8' <i>R</i>]-9 α -hidróxi-3,4-dimetóxi-3',4'-metilenodióxi-9,9'-epóxi-lignana; [8 <i>R</i> ,8' <i>R</i>]-9 β -hidróxi-3,4-dimetóxi-3',4'-metilenodióxi-9,9'-epóxi-lignana	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Bhandari <i>et al.</i> , 1998

31. *P. chiadoense*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	cefaranona B	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	campesterol; estigmasterol; β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

32. *P. clarkii*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-diveratril-dimetil-tetra-hidrofurano	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	clarkinol; desnudatina B; (7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)- Δ^8 -1',4'-di-hidro-5'-metóxi-3,4-metilenodióxi-4'-oxo-8.1',7.O.2'-lignana; (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,1' <i>S</i>)- Δ^8 -1',6'-di-hidro-1',3,4-trimetóxi-6'-oxo-7.O.4',8.3'-lignana; (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,1' <i>S</i>)- Δ^8 -1'-metóxi-3,4-metilenodióxi-1',6-di-hidro-6'-oxo-7.O.4',8.3'-lignana;	Parmar <i>et al.</i> , 1997

	<i>rel</i> -(7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,1' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)- Δ^8 -5'-metóxi-3,4-metilenodióxi-1',2',3',4'-tetra-hidro-2',4'-dioxo-7.3',8.1'-lignana; (7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,3' <i>R</i>)- Δ^8 -3,3',4-trimetóxi-3',6'-di-hidro-6'-oxo-7.O.4',8.3'-lignana	
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	piperenol A; velutina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	5-acetóxi-piperenol; crotepóxido; 2-(3-metil-2-butenil)-3,4,5-trimetóxi-fenol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

33. *P. clusii*

Classes	Substâncias	Referências
lignanas	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-[2-(1,3-benzodioxol-5-il)-metil-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-metil]-butan-1,4-diol; (-)-clusina; (-)-cubebina, (-)-cubebinina, (-)-di-hidrocubebina e α - <i>O</i> -etilcubebina; (-)-cubebinolida; (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-[2-etóxi-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-metil-4-(1,3-benzodioxol-5-il)-metil]-tetra-hidrofuranol; (-)-hinokinina; (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-[2-(7-metóxi-1,3-benzodioxol-5-il)-metil-3-(3,4,5-trimetóxi-fenil)-metil]-butan-1,4-diol; sesamina; (-)-iateína I	Parmar <i>et al.</i> , 1997
fenilpropanóides	3-(2,4,5-trimetóxi-fenil)-2-acetóxi-1-hidróxi-propano; 3-(2,4,5-trimetóxi-fenil)-1,2-diacetóxi-propano; 3-(2,4,5-trimetóxi-fenil)-1,2-di-hidróxi-propano	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	(-)-ledol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

34. *P. cubeba*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	aschantina; (-)-clusina; (-)-cubebina; (-)-cubebinina; (-)-di-hidrocubebina α - e β - <i>O</i> -etilcubebina; (-)-cubebinolida; (-)-cubebinona; (-)-di-hidroclusina; hemiariensina; heterotropano; (-)-hinokinina; magnosalina; (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-2-(3'',4''-metilenodióxi-benzil)-3-(3',4'-dimetóxi-benzil)-butirolactona; (-)-5''-metóxi-hinokinina; sesamina; (-)-thujaplicatina trimetil éter; (-)-iateína I; (-)- <i>iso</i> -iateína	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	(-)-kadsurina A; (-)-piperenona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	biciclo-sesquifelandreno; cadina-4(14),5-dieno; (+)-4-careno; <i>p</i> -cimeno; 1,4- e 1,8-cineol; α -copaeno; α -cubebeno; cubebol; α - e β -felandreno; germacreno D; limoneno; mirceno; (-)-muuroleno; β -ocimeno; α - e β -pineno; sabineno; α -tujeno; terpinoleno; α - e γ -terpineno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	piperenol A, B e C; (+)-triacetato de piperenol A; 4- <i>iso</i> -propil-1-metil-ciclo-hex-1-en-4-ol; 2,4,5-trimetóxi-benzaldeído; (+)-zeilinol;	Parmar <i>et al.</i> , 1997

35. *P. cuneifolium*

Classes	Substâncias	Referências
lignanas	(-)-cubebinina; (+)-veraguensina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	cuneifolina; (-)-piperenona	Parmar <i>et al.</i> , 1997

36. *P. decurrens*

Classes	Substâncias	Referências
neolignanas	conocarpano; decurrenal; eupomatenóides-5 e 6	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	<i>trans</i> -fitol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

37. *P. demeraranum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	<i>N</i> -(3',4',5'-trimetóxi-di-hidrocinaoilo)- Δ^3 -piperidin-2-ona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácidos prenilados hidróxi-benzóicos	Parmar <i>et al.</i> , 1997

38. *P. dilatatum*

Classes	Substâncias	Referências
flavonóides	alpinetina; flavokawina; 2'-hidróxi-3',4',6'-trimetóxi-chalcona	Terreaux <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	ácido tabogânico; benzoato de 3-(2'-hidróxi-3'-metil-3'-butenil)-4-hidróxi-benzoato de metila; 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona metil éster; 2,2-dimetil-3-hidróxi-6-carboxicromano metil éster; 2,2-dimetil-6-carboxicromeno metil éster; taboganato de metila	Terreaux <i>et al.</i> , 1998

39. *P. divarucatum*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	γ -asarona; 4-hidróxi-2,5-dimetóxi-alil-benzeno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

40. *P. dukei*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	<i>trans</i> -cariofileno e óxido de cariofileno; α -copaeno; 1- <i>epi</i> -cubenol; α -, β - e γ -eudesmol; espatulenol; α -humuleno; α - e <i>epi</i> - α -muurolol; (<i>E</i>)-nerolidol	Santos <i>et al.</i> , 1998b

41. *P. elongatum*

Classes	Substâncias	Referências
flavonóides	asebogenina; 2',6'-di-hidróxi-4'-metóxi-di-hidro-chalcona	Masuoka <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácidos: 3-geranil-4-metóxi-benzóico, 3-geranil-4-hidróxi-benzóico e nervogênico; 2,2-dimetil-6-carboxil-8-prenil-cromeno	Masuoka <i>et al.</i> , 1997

42. *P. fadyenii*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	pseudodilapiol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	2',6'-di-hidróxi-4'-metóxi-di-hidrochalcona; pinostrobin	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácido 3,5- <i>bis</i> -(3-metil-2-butenil)-4-metóxi-benzóico; (5 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i>)- e (5 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-fadienolida	Parmar <i>et al.</i> , 1997

43. *P. falconeri*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butil-7-(3,4-metilenodióxi-fenil)-heptadienamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	nerolidol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	7,4'-dimetóxi-5-hidróxi-flavona; tectocrisina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

44. *P. fimbriulatum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	aromadendrano; acetato de linalila; biciclogermacreno; α -bisabolol; β -bourboneno; bourbonanol; cadina-1,4-dieno; α - e T-cadinol; δ - e γ -cadineno; calameneno; canfeno; β -cariofileno; <i>p</i> -cimeno; cipereno; α -copaeno; α -cubebeno; cubenol e <i>epi</i> - cubenol; β -elemol; β - e δ -elemeno; espatulenol; β -felandreno; germacreno B e D; geraniol; globulol; 6,9-guaiadieno; α - e δ -guaieno; α - e γ -gurjuneno; α -humuleno; limoneno; linalool; mirceno; α - e γ -muuroleno; neral e nerol; 6-(<i>E</i>)-nerolidol; (<i>Z</i>) e (<i>E</i>) β -ocimeno; óxido de <i>iso</i> -cariofileno; α -e β -pineno; sabineno; α -e β -selineno; α -terpineno; α -terpineol; terpinoleno	Mundina <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	2-undecanona	Mundina <i>et al.</i> , 1998

45. *P. futokadsura*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	futoamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	galgravina; (+)-galbelgina; (+)-veraguensina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	futoenona; futoquinol/hancinona D; <i>iso</i> -futoquinol A e B e <i>iso</i> -di-hidrofutoquinol A e B; (+)-kadsurenona; kadsurina A e B; (-)-piperenona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	canfeno; limoneno; α - e β -pineno; sabineno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	estigmasterol; β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	crotopóxido	Parmar <i>et al.</i> , 1997

46. *P. gaudichaudianum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	linalool; β -pineno α -acoreno; aromadendreno e alo-aromadendreno; cadina-1,4-dieno; δ - e γ -cadineno; α -cadinol e <i>epi</i> - α -cadinol; α -copaeno; α -cubebeno; 1- <i>epi</i> -cubenol e 1,10-di- <i>epi</i> -cubenol; β -elemeno; epóxido de humeleno II; espatulenol; β -farneseno; germacreno A, B e D; globulol; α -himacheleno; limoneno; <i>epi</i> - α -muurolol; γ -muuroleno; (<i>E</i>)-nerolidol; selina-3,7-(11)-dieno; α - e β -selineno; 7- <i>epi</i> - α -selineno; (<i>Z</i>)-sesquilavandulol β -cariofileno; α -humuleno	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Andrade <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	benzoato de benzila	Andrade <i>et al.</i> , 1998

47. *P. gibbilimum*

Classes	Substâncias	Referências
	gibbilimbóis A-D	Orjala <i>et al.</i> , 1998

48. *P. guanacastensis*

Classes	Substâncias	Referências
flavonóides	acacetina; crisina; pinostrobin	Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 1997

52. *P. hancei*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	ácido (<i>E</i>)-4-[(2-metilpropil)-amino]-4-oxo-2-butenóico; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> - <i>iso</i> -butil-decadienamida; 3-cloro-4-hidróxi-2-piperidona; futoamida; guineensina; piperina; piperlonguminina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	galgravina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	desnudatina B; futoquinol/hancinona D; hancinol; hancinona e hancinona B e C; (+)-kadsurenona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	crotepóxido; 2-metóxi-3- <i>iso</i> -butil-pirazina; piperato de metila	Parmar <i>et al.</i> , 1997

53. *P. hispidinervium*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	metil-éter-eugenol; safrol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

54. *P. hispidum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	<i>N</i> -[7-(3',4'-metilenodióxi-fenil)-2(<i>Z</i>),4(<i>Z</i>)-heptadienoil]-pirrolidina; <i>N</i> -[5-(3',4'-metilenodióxi-fenil)-2(<i>E</i>)-pentadienoil]-pirrolidina; <i>N</i> -[3-(3',4'-metilenodióxi-6'-metóxi-fenil)-2(<i>Z</i>)-propenoil]-pirrolidina	Alécio <i>et al.</i> , 1998
fenilpropanóides	pseudodilapiol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	canfeno; α -elemeno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	2',3'-di-hidróxi-4',6'-dimetóxi-chalcona; 2',6'-di-hidróxi-4'-metóxi-di-hidrochalcona; 2'-hidróxi-3',4',6'-trimetóxi-chalcona; 6-hidróxi-5,7-dimetóxi-flavanona; 8-hidróxi-5,7-dimetóxi-flavanona; pinostrobina; 5,7,8-trimetóxi-flavanona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácido 3,5-bis-3-metil-2-butenil)-4-metóxi-benzóico; (5 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i>) e (5 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-fadienolida; 4-[(5 <i>E</i>)- <i>n</i> -hexadecenil]-fenol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

55. *P. hookeri*

Classes	Substâncias	Referências
neolignanas	<i>iso</i> -di-hidrofutoquinol A e B hookerinona A hookerinona B; lancifolina C e D	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; Pradhan & Banerji, 1998 Pradhan & Banerji, 1998
terpenos	óxido de cariofileno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	benzoato de 1-fenil-etila; crotepóxido; pipóxido; pipóxido cloridrina; <i>n</i> -triacontanol e <i>n</i> -triacontano	Parmar <i>et al.</i> , 1997

56. *P. hostmannianum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	linalool	Parmar <i>et al.</i> , 1997

esteróides	sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	5,7-di-hidróxi-flavanona; 5-hidróxi-7-metóxi-6,8-dimetil-flavanona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-carboxilato de metila; 4-hidróxi-3-(2'-hidróxi-3'-metil-but-3'-enil)-benzoato de metila	Parmar <i>et al.</i> , 1997

57. *P. interruptum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	pipercallosina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
fenilpropanóides	eupomateno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	crotopóxido	Parmar <i>et al.</i> , 1997

58. *P. kadsura*

Classes	Substâncias	Referências
neolignanas	2'-acetóxi-4'-oxo-3,4,5'-trimetóxi- $\Delta^{5,8}$ -8,3',7,4'-lignana; (7R,8S,1'S)- Δ^8 -1',4'-di-hidro-5'-metóxi-3,4-metilenodióxi-4'-oxo-8.1',7.O.2'-lignana; 2'-hidróxi-4'-oxo-3,4,5'-trimetóxi)- $\Delta^{5,8}$ -8.1',7.3'-lignana; kadsureninas: B, C, I, J, K e L; (7R,8R,1'S)- Δ^8 -1'-metóxi-3,4-metilenodióxi-1',6'-di-hidro-6'-oxo-7.O.4',8.3'-lignana; (7R,8R,1'R)- Δ^8 -3,4-metilenodióxi-1'-metóxi-1',6'-di-hidro-6'-oxo-7.O.4',8.3'-lignana; (7R,8R,1'S)- Δ^8 -3,4-metilenodióxi-5'-metóxi-1',4'-di-hidro-4'-oxo-7.O.2',8.1'-lignana; (7S,8S,1'R)- Δ^8 -3,4,5'-trimetóxi-1',4'-di-hidro-4'-oxo-7.O.2',8.1'-lignana; (7S,8S,1'S)- Δ^8 -1',3,4-trimetóxi-1',6'-di-hidro-6'-oxo-7.O.4',8.3'-lignana	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	germacreno D	Parmar <i>et al.</i> , 1997

59. *P. khasiana*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperina; piperlonguminina piperlongumina	Parmar <i>et al.</i> , 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998
flavonóides	7,4'-dimetóxi-5-hidróxi-flavona apigenina dimetil éter	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1998

60. *P. lacunosum*

Classes	Substâncias	Referências
lignanas	(-)-cubebina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

61. *P. lenticellosum*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	elemicina; metil-éter-eugenol; (E)-2-metóxi-4,5-metilenodióxi-cinamaldeído; iso-safrol; sarisana	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	timol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	3,5-dimetóxi-tolueno; 2-metóxi-4,5-metilenodióxi-benzaldeído	Parmar <i>et al.</i> , 1997

62. *P. lhotzkyanum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	β - e 9- <i>epi</i> -cariofileno; carotol; γ -curcumeno; β -elemeno; β -farneseno; germacreno B;	Moreira <i>et al.</i> , 1998b

	terpinoleno; α -tujeno; zingibereno β -bisaboleno; β -cariofileno	Shankaracharya <i>et al.</i> , 1997
esteróides	estigmasterol β -sitosterol daucosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; Zhang <i>et al.</i> , 1996 Zhang <i>et al.</i> , 1996
outras subst.	ácido D-asparático; cisteína; <i>p</i> -metóxi-acetofenona; <i>n</i> -eicosano; β -fenil-etanol; <i>n</i> -heneicosano; <i>n</i> -hexa, <i>n</i> -hepta e <i>n</i> -octa-decano; <i>dl</i> -serina; <i>L</i> -tirosina; <i>n</i> -triacontano pentadecano (<i>Z</i>)-12-octadecenóico- α -glicerol-mono-éster eicosanil-(<i>E</i>)- <i>p</i> -cumarato; tridecil-di-hidro- <i>p</i> -cumarato 1-(3,4-metilenodióxi-fenil)-1 <i>E</i> -tetradeceno	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Shankaracharya <i>et al.</i> , 1997 Zhang <i>et al.</i> , 1996 Das <i>et al.</i> , 1998a Upadhyay <i>et al.</i> , 1999

65. *P. lowong*

Classes	Substâncias	Referências
lignanas	sesamina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

66. *P. macropodum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butileicosadienamida; piperina; tricostaquina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	daucosterol; β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

67. *P. magnibacum*

Classes	Substâncias	Referências
neolignanas	conocarpano; eupomatenóide-6; 2-(4-metóxi-fenil)-3-metil-5-(<i>E</i>)-propenilbenzofurano	Ahmad <i>et al.</i> , 1998

68. *P. manauense*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	cefadiona A	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	estigmasterol; β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	7,4'-dimetóxi-5-hidróxi-flavona	Parmar <i>et al.</i> , 1997

69. *P. manii*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	retrofractamida A	Parmar <i>et al.</i> , 1998
flavonóides	7,4'-dimetóxi-5-hidróxi-flavona tectocrisina di-O-7,4'-dimetil apigenina	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	tetratriacontanol	Parmar <i>et al.</i> , 1998

70. *P. marginatum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(<i>E</i> , <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butil-2,4-octadienamida	Santos & Chaves, 1999a

fenilpropanóides	anetol; dilapiol; elemicina e <i>iso</i> -elemicina; estragol; 2-hidróxi- e 2-metóxi-4,5-metilenodióxi-propiofenona; 3,4-metilenodióxi-propiofenona; metil-éter-eugenol; metil-éter- <i>iso</i> -eugenol; miristicina; safrol 2,4,5-trimetóxi-propiofenona apiol; 2,6-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-1-(2-propenil)-benzeno; <i>iso</i> -asarona; marginatina; piperargina croweacina	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Santos & Chaves, 1999b Santos <i>et al.</i> , 1998a Santos <i>et al.</i> , 1997
terpenos	β -bourboneno; cadina-1(10),4-dieno-(δ -cadineno); α -cadinol; 3-careno; β -cariofileno; 1,8-cineol; <i>p</i> -cimeno; α -copaeno; α -elemeno; α -elemol; β -eudesmol; α -felandreno; α -humuleno; limoneno; linalool; mirceno; (-)-muuroleno; nerolidol; β -ocimeno; α - e β -pineno; sabineno; terpinoleno; α - e γ -terpineno; α -tujeno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	marginatosídeo; vitexina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácidos: 3-farnesil-4-hidróxi-benzóico, 3-farnesil-4-metóxi-benzóico, galotânico e esteárico; etil-piperonil-cetona; piperonal; <i>n</i> -tridecano	Parmar <i>et al.</i> , 1997

71. *P. methysticum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	cefaradiona A; <i>N</i> -cinamoilpirrolidina; 1-(<i>o</i> -metóxi-cinamoil)-pirrolidina; pipermetistina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	<i>trans</i> -fitol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	campesterol; colesterol; estigmastanol; estigmasterol; β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
kavapironas	desmetóxi-yangonina; di-hidro-kavaína; di-hidro-kavain-5-ol; 11-metóxi-yangonina; tetra-hidro-yangonina 11,12-dimetóxi-di-hidro-kavaína; 11-hidróxi-12-metóxi-di-hidro-kavaína 5,6-desidro-kavaína; 7,8-di-hidro-kavaína di-hidrometisticina; kavaína; metisticina; yangonina 5,6,7,8-tetra-hidro-yangonina 5,6-desidrometisticina; 7,8- di-hidro-5-hidróxi-kavaína	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; He <i>et al.</i> , 1997 Lopez-Avila & Benedicto, 1997; He <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; Lopez-Avila & Benedicto, 1997; He <i>et al.</i> , 1997 Lopez-Avila & Benedicto, 1997 He <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	flavokavaína A, B e C	Parmar <i>et al.</i> , 1997; He <i>et al.</i> , 1997

72. *P. mikanianum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	biciclogermacreno; β -cariofileno; limoneno	Parmar <i>et al.</i> , 1997

73. *P. mullesua*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	chingchengenamida A;	Srivastava <i>et al.</i> , 1999a;

	retrofractamida A (-)-nectandrina A; nectandrina B <i>N</i> -iso-butyl-deca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienamida; <i>N</i> -iso-butyl-16-fenil-hexadeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -dienamida	Zhang <i>et al.</i> , 1998 Zhang <i>et al.</i> , 1998; Srivastava <i>et al.</i> , 1999a Srivastava <i>et al.</i> , 2000
fenilpropanóides	miristicina; safrol	Srivastava <i>et al.</i> , 1999b
lignanas	asarinina; fargesina; sesamina galgravina	Srivastava <i>et al.</i> , 1999a Srivastava <i>et al.</i> , 1999a; Zhang <i>et al.</i> , 1998
terpenos	<i>trans</i> - α -bergamoteno; β -bisaboleno; α - e τ -cadinol; β -cariofileno; β -cedreno; α -copaeno; α -cubebeno; cubenol; δ -elemeno; (<i>E</i>)- e (<i>Z</i>)- β -farneseno; germacreno D e germacreno D-4-ol; globulol; β - e γ -gurjuneno; α -humeleno; limoneno; mirceno; α -muuroleno; (<i>Z</i>)- β -ocimeno; óxido de cariofileno; β -pineno; valenceno; α -ylangeno	Srivastava <i>et al.</i> , 1999b
esteróides	β -sitosterol	Srivastava <i>et al.</i> , 1999a; Zhang <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	Nonaoatos de: 1,3-benzodioxol-5-(2,4,8-trieno- <i>iso</i> -butila e 1,3-benzodioxol-5-(2,4,8-trieno-metila 1-pentadecanol <i>iso</i> -butil 13-(1,3-benzodioxol-5)-trideca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>E</i> trienoato	Srivastava <i>et al.</i> , 1999a Srivastava <i>et al.</i> , 1999b Srivastava <i>et al.</i> , 2000

74. *P. murrayanum*

Classes	Substâncias	Referências
flavonóides	1-(2-hidróxi-4,6-dimetóxi)-fenil-3-(4-hidróxi)-fenil-2-propen-1-ona	Seeram <i>et al.</i> , 1996
outras subst.	ácidos (<i>E</i>)- e (<i>Z</i>)- 4-hidróxi-3-(3,7-dimetil-1-oxo)-2,6-octadienil-benzóico e (<i>E</i>)-4-hidróxi-3-(3,7-dimetil)-2,6-octadienil-benzóico	Seeram <i>et al.</i> , 1996

75. *P. nepalense*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyldecadienamida; piperina; piperlonguminina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	óxido de cariofileno	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	<i>n</i> -triacontanol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

76. *P. nigrum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	braquiamida B; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyldecadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-eicosadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-eicosatrienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-octadienamida; di-hidropiperidina; 3,4-di-hidróxi-6-(<i>N</i> -etilamino)-benzamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -dodecadienoil-pirrolidina; <i>N</i> -trans-feruloil-tiramina; <i>N</i> -formilpiperidina; guineensina; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -5-[(4-hidróxifenil)-pentadienoil]piperidina; (2 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)- <i>N</i> -9-(3,4-metilenodióxi-fenil)-nonadienoil-piperidina; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)- <i>N</i> -9-(3,4-metilenodióxi-fenil)-nonatrienoilpirrolidina; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,10 <i>E</i>)- <i>N</i> -11-(3,4-metilenodióxi-fenil)-undecatrienoilpiperidina; piperamida e piperamina; piperetina;	Parmar <i>et al.</i> , 1997

	<p>pipericida; piperoleína B; retrofractamida A; sarmentina e sarmentosina; tricoleína; tricostaquina <i>iso</i>-piperoleína B piperina</p> <p>pipericina 3,4-metilenodióxi-cinamoil-piperidina; pellitorina</p>	<p>Srinivas & Rao, 1999 Parmar <i>et al.</i>, 1997; Siddiqui <i>et al.</i>, 1997; Hu <i>et al.</i>, 1996 Siddiqui <i>et al.</i>, 1997 Hu <i>et al.</i>, 1996</p>
fenilpropanóides	<p>ácido <i>p</i>-cumárico; 3,4-metilenodióxi-cinamaldeído; metil-éter-eugenol ácido cinâmico; 1-alil-5-metóxi-3,4-metilenodióxi-benzeno; anetol; 5-<i>iso</i>-propil-2-metilfenol; cinamato de metila; 4-<i>iso</i>-propil-2-metóxi-1-metilbenzeno; metil-carvacrol; metil-eugenol eugenol; miristicina; safrol</p>	<p>Parmar <i>et al.</i>, 1997 Pino & Borges, 1999</p> <p>Parmar <i>et al.</i>, 1997; Pino & Borges, 1999</p>
lignanas	<p>(-)-cubebina; (-)-3,4-dimetóxi-3,4-desmetilenodióxi-cubebina; (-)-3',4'-dimetóxi-3',4'-desmetilenodióxi-cubebina</p>	<p>Parmar <i>et al.</i>, 1997</p>
neolignanas	(-)-piperenona	<p>Parmar <i>et al.</i>, 1997</p>
terpenos	<p>5,10(15)-cadienen-4-ol; cadina-1(10),4-dieno-(δ-cadineno); α-cadinol; 3-careno; carveol e di-hidro-carveol; curcumeno; α-elemeno; (2<i>Z</i>,6<i>E</i>)-farnesol; β-guaieno; 2,8(9)-<i>p</i>-mentadien-4-ol; 3,8(9)-<i>p</i>-mentadien-1-ol; (-)-muuroleno; β-ocimeno (<i>E</i>)-nerolidol</p> <p>τ-cadinol; α-cedreno; β-curcumeno; β-elemol; α-eudesmol; germacreno B; α-gurjuneno; óxido de β-cariofileno; terpin-4-ol; δ-terpineol</p> <p>α-bergamoteno; calameneno; <i>iso</i>-cariofileno; carvona; <i>p</i>-cimen-8-ol e metil-éter-<i>p</i>-cimen-8-ol; 1,8-cineol; citronelol; criptona; α-cubebeno; β-farneseno; guaiol; β-pinona; α-santaleno; sesquisabineno; terpinen-5-ol; α-terpineol; 1,1,4-trimetil-ciclo-hepta-2,4-dien-6-ona acetatos de: α-terpinila e terpinen-4-ila; álcool de cariofileno; <i>cis</i>-γ-bisaboleno; α- e β-bisabolol; borneol; 5,10(15)-cadinen-4-ol; γ-cadineno; δ-cadinol; cariofilen-2,7(15)dien-4-α-ol; cariofilen-2,7(15)dien-4-β-ol; cariofilen-3(12),7(15)dien-4-β-ol; (<i>Z</i>)-, (<i>E</i>)-carveol e di-hidrocarveol; cedreno; citronelato de metila; cubenol e <i>epi</i>-cubenol; α- e α-curcumeno; di-hidrocarvona; di-hidro-1,8-cineol; elemol; β- e γ-eudesmol; epóxidos de: humuleno, limoneno, α-pineno, 4,8-terpinoleno; (<i>Z,E</i>)-farnesol; felandral; geraniato de metila; geraniol; α- e δ-guaieno; ledeno; <i>p</i>-menta-2,8-dien-1-ol; <i>p</i>-menta-3,8-dien-1-ol; <i>p</i>-menta-1,8-dien-4-ol; <i>p</i>-menta-1,8-dien-5-ol; <i>p</i>-menta-1(7),2-dien-4-ol; <i>p</i>-menta-1(7),2-dien-6-ol; (<i>Z</i>)- e (<i>E</i>)- <i>p</i>-menta-2-en-1-ol; mirtenal e mirtenol; nerol; nerolidol; (<i>Z</i>)-β-ocimeno; óxido de cariofileno; pinocanfona e <i>iso</i>-pinocanfona;</p>	<p>Parmar <i>et al.</i>, 1997 Pino & Borges, 1999</p> <p>Parmar <i>et al.</i>, 1997; Martins <i>et al.</i>, 1998 Martins <i>et al.</i>, 1998</p> <p>Parmar <i>et al.</i>, 1997; Pino & Borges, 1999</p> <p>Pino & Borges, 1999</p>

	(<i>E</i>)-pinocarveol; pinol; piperitona; terpinen-4-ol; tujopsceno; viridiflorol β -bisaboleno; canfeno; β -cariofileno; <i>p</i> -cimeno; α -copaeno; α - e β -felandreno; α -humeleno; limoneno; linalool; mirceno; α - e β -pineno; sabineno; α - e β -selineno; α - e γ -terpineno; terpinoleno; α -tujeno δ -cadineno; δ -3-careno; β - e δ -elemeno; hidrato de <i>cis</i> - e <i>trans</i> -sabineno; γ -muuroleno; τ -muurolol; (<i>E</i>)- β -ocimeno; zingibereno	Parmar <i>et al.</i> , 1997; Martins <i>et al.</i> , 1998; Pino & Borges, 1999 Martins <i>et al.</i> , 1998; Pino & Borges, 1999
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	canferol 3-O-arabinosídeo-7-ramnosídeo; canferol 3-O- β -glicosídeo; quercetina 3-O- β -D-galactosídeo; quercetina 3-O- β -D-ramnosídeo; quercetina 3-O- β -D-rutinosídeo; <i>iso</i> -quercitrina; <i>iso</i> -ramnetina 3-O- β -D-rutinosídeo; ramnetina O-triglicosídeo	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	acetilcolina e colina; ácidos: cafeico, cáprico, esteárico, estercúlico, fenil-acético, láurico, linoleico, malvático, mirístico, oleico, palmítico e vernólico; <i>p</i> - e <i>m</i> -cresol; 2-(3,4-dihidróxi-fenil)-etanol; hentriacontano, hentriacontan-16-ol e hentriacontan-16-ona ácidos: benzóico, butírico, 2-fenil-acético, hexanóico e piperônico; alcanfor; benzaldeído; benzoato de metila; butanoato de metila; carvoacetona; 2-fenilacetato de metila; 1-fenilbutan-1-ona; hexa-, hepta- e octanoato de metila; 3-metil- e 4-metil-acetofenona; 3-metil-butanoato de metila; 2-metil-pentanoato de metila; metil-heptenona; 2-undecanona piperonal furanodieno	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Pino & Borges, 1999 Parmar <i>et al.</i> , 1997; Pino & Borges, 1999 Martins <i>et al.</i> , 1998

77. *P. novae hollandiae*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> - <i>iso</i> -butildecadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> - <i>iso</i> -butiloctadienamida; $\Delta^{\alpha,\beta}$ -di-hidropiperina; <i>N</i> -3',4'-metilenodióxi-cinamoil-piperidina; piperina; piperlonguminina	Parmar <i>et al.</i> , 1997;
fenilpropanóides	dilapiol e ω -hidróxi- <i>iso</i> -dilapiol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

78. *P. obliquum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	acetato de linalila; aromadendreno; β -bourboneno; β -bisaboleno; δ - e γ -cadineno; calacoreno; T-cadinol; cadina-1,4-dieno; β -cariofileno, óxidos de: cariofileno e <i>iso</i> -cariofileno; <i>p</i> -cimeno; <i>p</i> -cimen-8-ol; α -copaeno; α -cubebeno; cubenol; β - e γ -elemeno; 1,5-epóxi-salvial-4(14)-eno; espatulenol; 10- <i>epi</i> - γ -eudesmol; germacreno D; globulol; α -gurjuneno;	Mundina <i>et al.</i> , 1998

	α -humuleno; linalool; mirceno; α - e γ -muuroleno; α - e β -pineno	
outras subst.	ácido hexadecanóico	Mundina <i>et al.</i> , 1998

79. *P. officinarum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-eicosatrienamida; filifilina; guineensina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	piperato de metila	Parmar <i>et al.</i> , 1997

80. *P. pedicellosum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyldecadienamida cefaradiona A; piperlonguminina furacridona; pellitorina	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1998
fenilpropanóides	desidro-di-eugenol; dilapiol	Ahmad & Kadir, 2000
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998

81. *P. peepuloides*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyldecadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyldecadienamida; ciclobutano-2-(1,3-benzodioxol-5-metóxi-6-il)-4-(1,3-benzodioxol-4,5-dimetóxi-6-il)- 1,3-dicarboxapirrolidida; ciclobutano-2,4-bis-(1,3-benzodioxol-5-metóxi-6-il)-1,3-dicarboxapirrolidida; 2'-metóxi-4',5'-metilenodióxi- <i>cis</i> - e <i>trans</i> -cinamoilpiperidina; 2'-metóxi-4',5'-metilenodióxi- <i>trans</i> -cinamoil-pirrolidina; peepuloidina; piperina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(+)-diaeudesmina sesamina	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol daucosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; 1998 Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	7,4'-dimetóxi-5-hidróxi-flavona; 5-hidróxi-7,3',4'-trimetóxi-flavona di-O-7,4'-dimetil apigenina; luteolina 3',4',7-trimetil-éter	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	pipatalina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

82. *P. peltatum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	biciclogermacreno; β -cariofileno; fitol; germacreno D	Ciccio & Segnini, 1998

83. *P. permucronatum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	β -bourboneno; cadina-1,4-dieno; α - e δ -cadineno; α - e T-cadinol; α -calacoreno; <i>cis</i> -calameneno; cânfora; β -cariofileno e óxido de cariofileno; α -copaeno; α -cubebeno; β -, δ - e γ -elemeno; espatulenol; germacreno D; β -gurjuneno; α -humuleno; ledol; limoneno; α - e γ -muuroleno; T-muurolol; (Z)-nerolidol; α - e β -pineno; γ -selineno; valenceno; viridifloreno; α -ylangeno	Torquillo <i>et al.</i> , 1999

84. *P. pierrei*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	acetato de <i>o</i> -eugenila; benzoato de benzila; cinamatos de: benzila, metilbenzila e α -metilbenzila; (<i>Z</i>)-cinamatos de: heptila e pentila; dilapiol; eugenol	Leclerq <i>et al.</i> , 1997
terpenos	acetatos de: bornila, decila, octila; baekeol; <i>trans</i> α -bergamoteno; β -bisaboleno; α -bisabolol e <i>epi</i> - α -bisabolol; bornileno; α - δ - e τ -cadinol; <i>cis</i> -calameneno; cânfora; β -cariofileno e óxido de cariofileno; carotol; α -copaeno; <i>epi</i> -cubenol; α -curcumenol; espatulenol; (<i>Z,E</i>)- α -, (<i>E,E</i>)- α - e (<i>E</i>)- β -farneseno; globulol; α -humuleno e óxido de humuleno; junenol; linalool; 6-metil-5-hepten-2-ona; 3-(4-metil-3-pentenil)-furano; τ -muurolol; α - e γ -muuroleno; (<i>E</i>)-nerolidol; (<i>Z</i>)-oxaciclopentadec-6-en-2-ona; salicilato de benzila; α -santaleno; β -selineno; selin-11-en-4 α -ol; β -sesquifelandreno; α -terpineol; terpin-4-ol; terpinoleno; viridiflorol	Leclerq <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácidos: hexa e heptanóico; benzoato de 1-feniletila; benzoatos de: octila, hexila e (<i>Z</i>)-3-hexenila; ciclopentadecenona; dodecanal e dodecanol; hexadecanal e tetradecanal; 1-octanol; undecanal e undecanol	Leclerq <i>et al.</i> , 1997

85. *P. piscatorium*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	pipercallosidina; piperovatina	Mc Ferren & Rodriguez, 1998

86. *P. polysyphorum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	nectandrina B e <i>iso</i> -nectandrina B	Zhang <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(+)-grandisina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	hancinona C; (+)-lancifolina D; polisiforina; (+)-virolongina; walichinina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	crotepóxido; polisifosídeo A, B e C	Parmar <i>et al.</i> , 1997

87. *P. ponapense*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperpense	Patil <i>et al.</i> , 1997

88. *P. puberulum*

Classes	Substâncias	Referências
lignanas	galgravina; (+)-veraguensina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	(+)-burchelina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	daucosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácido cerótico	Parmar <i>et al.</i> , 1997

89. *P. puberullum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperina S; piperlactama S dímero de piplartina; 8,9-di-hidropiplartina; piplartina; puberulumina	Parmar <i>et al.</i> , 1997; Wu <i>et al.</i> , 1997 Wu <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	piperulina A, B e C	Parmar <i>et al.</i> , 1997

90. *P. regnellii*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	apiol; miristicina dilapiol	Benevides <i>et al.</i> , 1999 Benevides <i>et al.</i> , 1999; Andrade <i>et al.</i> , 1998
neolignanas	(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-4-hidróxi-4',7-epóxi-8,3'-neolignan-7'[<i>E</i>]-eno; (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-4-hidróxi-8',9'dinor-4',7-epóxi-8,3'-neolignan-7'-ato de metila; (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-3,4-metilenodióxi-4',7-epóxi-8,3'-neolignan-7'[<i>E</i>]-eno; (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-3-metóxi-4-hidróxi-4',7-epóxi-8,3'-neolignan-7'[<i>E</i>]-eno; conocarpano; decurrenal e <i>epi</i> -decurrenal; eupomatenóides-3, 5 e 6	Benevides <i>et al.</i> , 1999
terpenos	acetato de <i>iso</i> -bornila; cadaleno; α -cadinol; δ -cadineno; α -calacoreno; β -cariofileno e 14-hidróxi-7- <i>epi</i> -(β)-cariofileno; <i>p</i> -cimeno; α -copaeno; 1- <i>epi</i> -cubenol; espatulenol; <i>trans</i> - β -guaieno; germacreno D; globulol; α -himachaleno; α -humuleno; limoneno; linalool; mirceno; α -muurolol e <i>epi</i> - α -muurolol; (<i>E</i>)-nerolidol; 7- <i>epi</i> - α - e β -selineno; α -terpineol; valenceno; viridifloreno	Andrade <i>et al.</i> , 1998

91. *P. reticulatum*

Classes	Substâncias	Referências
	di-hidro-wisanidina	Maxwell <i>et al.</i> , 1998

92. *P. retrofractum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)- <i>N</i> - <i>iso</i> -butil-eicosatrienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>E</i>)- <i>N</i> - <i>iso</i> -butil-octadecatrienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -eicosadienoil-piperidina; (2 <i>E</i> ,14 <i>E</i>)- <i>N</i> -eicosadienoil-piperidina; guineensina; (2 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)- <i>N</i> -9-(3,4-metilenodióxi-fenil)-nonadienoil-piperidina; 1-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-octadecadienoil-piperidina; 1-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,12 <i>E</i>)-octadecatrienoilpiperidina; pipereicosalidina; piperoctadecalidina; piplartina/piperlongumina; retrofractamidas: A, C e D	Parmar <i>et al.</i> , 1997
	piperina	Parmar <i>et al.</i> , 1997; Pande <i>et al.</i> , 1997
	<i>N</i> - <i>iso</i> -butileicosa-2,4-dienamida; 3-metil-5-decanoilpiperidina	Pande <i>et al.</i> , 1997
fenilpropanóides	ácido 3,4,5-trimetóxi-di-hidrocinâmico	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	sesamina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997; Pande <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácido 28-metilenonacos-27-en-1-óico; β -D-glicopiranosídeo; piperato de metila	Parmar <i>et al.</i> , 1997

93. *P. ribesioides*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyldecadienamida; 4-hidróxi-3-metóxi- <i>N</i> -metilpiperolactama	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(-)-cubebina; (-)-hinokinina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	eupomatenóide-7	Parmar <i>et al.</i> , 1997
terpenos	α -elemol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácidos: esteárico e palmítico; crotepóxido; <i>p</i> -cumarato de bornila; (+)-3,7-dimetil-3-hidróxi-4-(<i>p</i> -cumaroil-óxi-1,6-octadieno); 2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -7-fenil-heptatrienoato de metila; piperato de metila; senediol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

94. *P. ridleyi*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	retrofractamida A; ridleyamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997

95. *P. rugosum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	8,9-di-hidropiartina; dímero A de piplartina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

96. *P. saltuum*

Classes	Substâncias	Referências
outras subst.	ácidos prenitados hidróxi-benzóicos	Parmar <i>et al.</i> , 1997

97. *P. sanctum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	cefaradiona A e B	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
kavapironas	(+)-(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5-acetóxi-4,6-dimetóxi-6- <i>E</i> -estiril-5,6-di-hidro-2 <i>H</i> -piran-2-ona; (+)-(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5-hidróxi-4,6-dimetóxi-6- <i>E</i> -estiril-5,6-di-hidro-2 <i>H</i> -piran-2-ona; metisticina; 5-metóxi-5,6-desidromethysticina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
piperolídeos	(-)- <i>treo</i> -(3 <i>Z</i>)-5-(2,3-di-hidróxi-1-metóxi-3-fenilpropilideno)-4-metóxi-2-(5 <i>H</i>)-furanona; piperolídeo, 7,8-epóxi-piperolídeo e metilenodióxi-piperolídeo	Parmar <i>et al.</i> , 1997

98. *P. sarmentosum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	<i>N</i> -(3-fenilpropanoil)-pirrol; sarmentina e sarmentosina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-octadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-dodecadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-tetradecadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-hexadecadienamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-octadecadienamida; <i>N</i> -2'-metilbutil-(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-decadienamida	Stöhr, <i>et al.</i> , 1999
	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -iso-butyl-decadienamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997; Stöhr, <i>et al.</i> , 1999
fenilpropanóides	ácido di-hidrocínâmico; 1-alil-2,6-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-benzeno; asaricina e α e γ -asarona	Parmar <i>et al.</i> , 1997

esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	ácido oxálico; 1-(3,4-metilenodióxi-fenil)-(1 <i>E</i>)-tetradeceno	Parmar <i>et al.</i> , 1997

99. *P. schmidtii*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	<i>N</i> -cinamoilpirrolidina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
fenilpropanóides	apiol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(+)-calopiptina; (-)-machilina G; (-)-zuonina A	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	<i>iso</i> -di-hidrofotoquinol A e B; (7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)- Δ^8 -1',4'-di-hidro-5'-metóxi-3,4-metilenodióxi-4'-oxo-8.1',7.O.2'-lignana; (7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)- Δ^8 -1',4'-di-hidro-3,4,5'-trimetóxi-4'-oxo- $\Delta^{2'}$,5',8'-8.1',7.O.2'-lignana; fotoquinol/hancinona D; kadsurina A e B; lancifolina C e (+)-lancifolina D; (-)-piperenona; schimiditina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	piperato de metila	Parmar <i>et al.</i> , 1997

100. *P. solmsianum*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	metil-eugenol	Moreira <i>et al.</i> , 1998b
neolignanas	eupomatenóide-6	Moreira <i>et al.</i> , 1995
terpenos	aristo-1,9-en-3-ol; azuleno; β -cubebeno; δ -cadineno; α -calacoreno; calameneno; <i>cis</i> -cariofileno; 2,6-dimetil-9(2-propenil)-10-hidróxi-biciclo[4.4.0]-ciclododec-2-eno; α -muuroleno; α -selineno; valenceno	Moreira <i>et al.</i> , 1995
	Δ^3 -careno; (<i>Z</i>)- β -cariofileno e 9- <i>epi</i> -cariofileno; carotol; <i>p</i> -e <i>o</i> -cimeno; espatulenol; α - e β -fameseno; α -felendreno; β - felendreno; germacreno B e D; guaioil; limoneno; mirceno; γ -muuroleno; α -pineno; α -e γ -terpineno; <i>iso</i> -terpinoleno	Moreira <i>et al.</i> , 1998b
flavonóides	5-hidróxi-4-metóxi-7-O-rutinosilflavona	Moreira <i>et al.</i> , 1995
outras subst.	hidrocarbonetos alifáticos não ramificados (C15-C22)	Moreira <i>et al.</i> , 1995

101. *P. steerni*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	<i>N</i> -(4-hidróxi-fenil)-etileno-cinamamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	5,7-di-hidróxi-flavanona; pinostrobin	Parmar <i>et al.</i> , 1997

102. *P. sumatranum*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	α -asarona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	andamanicina; (+)-asarinina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	3-(2,5-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-fenil)-1,2-di-hidróxi-propano; 3-(2,4,5-trimetóxi-fenil)-2-hidróxi-1-metóxi-propano; <i>n</i> -triacontano	Parmar <i>et al.</i> , 1997

103. *P. sylvaticum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	acetato de aurantiamida; (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> - <i>iso</i> -butildecadienamida; guineensina; piperina; piperlonguminina e pipartina/piperlongumina;	Parmar <i>et al.</i> , 1997

	sylvamida; sylvetina	
lignanas	(+)-diaeudesmina; sesamina; (+)-sylvatesmina; (+)-sylvona	Parmar <i>et al.</i> , 1997
flavonóides	7,4'-dimetóxi-5-hidróxi-flavona; 5-hidróxi-7,3',4'-trimetóxi-flavona; tectocrisina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	pipatalina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

104. *P. sylvestre*

Classes	Substâncias	Referências
fenilpropanóides	eugenol; safrol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

105. *P. taboganum*

Classes	Substâncias	Referências
esteróides	estigmasterol; β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	2,2-dimetil-2H-1-benzopiran-6-carboxilato de metila; 2,2-dimetil-6-carbóxi-2H-1-croman-4-ona metil éster; taboganato de metila	Parmar <i>et al.</i> , 1997

106. *P. thomsoni*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	piperina	Parmar <i>et al.</i> , 1998
lignanas	(+)-galbelgina; cefaradiona A; (-)-galbelgina	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1998
esteróides	β -sitosterol	Parmar <i>et al.</i> , 1998
outras subst.	tritriacontanol ácido dotriacontanóico; dotriacontanol	Parmar <i>et al.</i> , 1997 Parmar <i>et al.</i> , 1998

107. *P. trichostachyon*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	ciclo-piperstaquina; ciclostaquina A e B; 1-piperetil-pirrolidina; tricoleína; triconina; tricostaquina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(-)-cubebina e (-)-di-hidrocubebina; (-)-hinokinina e (-)-5''-metóxi-hinokinina; (-)-tricastina e (-)-di-hidro-tricastina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

108. *P. tuberculatum*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	4,5-di-hidropiperlonguminina; dímero A de piplartina; piplartina/piperlongumina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
	piperdardina; piperettina; piperina	Araújo-Jr <i>et al.</i> , 1997
	cefaranona B	Araújo-Jr <i>et al.</i> , 1999
fenilpropanóides	ácidos 3,4,5-trimetóxi-cinâmico e 3,4-metilenodióxi-cinâmico	Parmar <i>et al.</i> , 1997

109. *P. umbellatum*

Classes	Substâncias	Referências
terpenos	acetato de bornila; alo-aromadendreno; borneol; δ -cadineno; τ -cadinol; canfeno; β -cariofileno; <i>p</i> -cimeneno; <i>p</i> -cimenol; δ -elemeno; (<i>E</i>)- β -farneseno e (<i>E,E</i>)- α -farneseno; 2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> -farnesol 2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> -farnesol e 2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -farnesol; α -e β -felandreno; fitol; hidrato de <i>cis</i> e <i>trans</i> -sabineno; α -humuleno; limoneno; linalool;	Martins <i>et al.</i> , 1998

	1,3,8- <i>p</i> -mentratrieno; 6-metil-5-hepten-2-ona; mirceno; γ -muuroleno; τ -muurolol; (<i>Z</i>)- e (<i>E</i>)-nerolidol; 2-nonanona; (<i>Z</i>) e (<i>E</i>)- β -ocimeno; α -e β -pineno; α -terpineno; α -terpineol; terpin-4-ol; terpinoleno; α -tujeno; timol; <i>iso</i> -valerato de nerila	
outras subst.	(<i>E</i>)-2-tridecenal	Martins <i>et al.</i> , 1998

110. *P. verrucosum*

Classes	Substâncias	Referências
outras subst.	3,4-epóxi-8,9-di-hidropiartina	Parmar <i>et al.</i> , 1997

111. *P. villiramulum*

Classes	Substâncias	Referências
outras subst.	villiramulinas A e B	Parmar <i>et al.</i> , 1997

112. *P. wallichii*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutildecadienamida	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	galgravina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	desnudatina B; hancinona C; (+)-kadsurenona; wallichinina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	crotepóxido	Parmar <i>et al.</i> , 1997

113. *P. wightii*

Classes	Substâncias	Referências
amidas/alcalóides	cefaradiona A e B; cefaranona B; <i>N</i> -cinamoilpirrolidina; piperolactama A e C	Parmar <i>et al.</i> , 1997
lignanas	(+)-calopiptina; <i>rel</i> -(7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,7' <i>S</i> ,8' <i>S</i>)-3',4'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-7.O.7',8.8'-lignana; (+)-galbelgina; (-)-machilina G	Parmar <i>et al.</i> , 1997
neolignanas	(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-7-acetóxi-3',4'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-6'-oxo- $\Delta^{1',4',8'}$ -8.3'-lignana; (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-7-acetóxi-3,3',4,4'-tetrametóxi-6'-oxo- $\Delta^{1',4',8'}$ -8.3'-lignana; (+)-burchelina; fargesonas A e B; futoquinol/hancinona D; hancinona; <i>iso</i> -di-hidro-futoquinol A e B; kadsurinas A e B; (7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)- Δ^8 -1',4'-di-hidro-5'-metóxi-3,4-metilenodióxi-4'-oxo-8.1',7.O.2'-lignana; (7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)- Δ^8 -3',6'-di-hidro-3'-metóxi-3,4-metilenodióxi-6'-oxo-8.3',7.O.4'-lignana; (7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)- Δ^8 -1',4'-di-hidro-3,4,5'-trimetóxi-4'-oxo- $\Delta^{2',5',8'}$ -8.1',7.O.2'-lignana; 4',5'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-2'-oxo- $\Delta^{3',5',8'}$ -8.1-lignana; <i>iso</i> -4',5'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-2'-oxo- $\Delta^{3',5',8'}$ -8.1-lignana; 1',2'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-4'-oxo- $\Delta^{2',5',8'}$ -8.5'-lignana; (7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-7-hidróxi-3',4'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-6'-oxo- $\Delta^{1',4',8'}$ -8.3'-lignana; lancifolina C e (+)-lancifolina D; (-)-piperenona; (7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,3' <i>S</i> ,4' <i>R</i> ,6' <i>S</i>)- Δ^8 -3',4',5',6'-tetra-hidro-6'-hidróxi-3,3',4,4'-tetrametóxi-8.3',7.O.4'-lignana; <i>rel</i> -(7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,4' <i>S</i>)- Δ^8 -3',4',5',6'-tetra-hidro-6'-oxo-3,4-metilenodióxi-3',4'-dimetóxi-8.3',7.O.4'-lignana; wallichinina	Parmar <i>et al.</i> , 1997
outras subst.	crotepóxido; 3,4-diacetóxi-5-benzoil-oximetil-5,6-epóxi-ciclo-hexano-1,2-diol	Parmar <i>et al.</i> , 1997

1- Amidas e alcalóides	6- Esteróides
2- Fenilpropanóides	7- Kavapironas (anel lactônico de 6 átomos)
3- Lignanas	8- Piperolídeos (anel lactônico de 5 átomos)
4- Neolignanas	9- Flavonóides
5- Terpenos (óleos voláteis)	10- Outras subst.

Figura 2- Porcentagem de substâncias diferentes pertencentes às classes de metabólitos secundários do gênero *Piper*.

2.3 Atividade biológica e uso na medicina popular de espécies do gênero *Piper*

1. *P. aborescens*

A revisão sobre o gênero *Piper* realizada por Parmar *et al.* (1997) relata atividade significativa do extrato clorofórmico dos galhos de *P. aborescens* em um ensaio de inibição de crescimento de cultura de células KB e de células de leucemia linfocítica P-388.

2. *P. acustileginum*

O extrato diclorometânico de *P. acustileginum* apresentou atividade inseticida contra *Musca domestica* (mosca) e *Aedes aegyptii* (mosquito). Esta espécie também mostrou atividade na inibição de aflatoxina B1 - DNA ligante (Parmar *et al.*, 1997).

3. *P. acutifolium*

O óleo volátil das folhas foi testado contra *Callosobruchus maculatus*, um inseto que infesta grãos armazenados. Não houve efeito sobre a mortalidade, porém foi observada uma diminuição significativa na ovoposição (Lognay *et al.*, 1996).

4. *P. aduncum*

Na Jamaica, *P. aduncum* é empregada no alívio de dores estomacais e como repelente de insetos (Parmar *et al.*, 1997). Segundo Orjala *et al.* (1993a), o dilapiol isolado desta espécie possui atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*. A aduncamida apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e também atividade citotóxica contra células KB de carcinoma de nasofaringe (Orjala *et al.* 1993b).

Torres-Santos *et al.* (1999a e b) observaram atividade significativa *in vitro* da 2',6'-di-hidróxi-4'-metóxi-chalcona contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Os autores sugeriram que esta chalcona seja seletivamente tóxica ao parasita. A inibição intracelular de *Leishmania amazonensis* pela chalcona foi ainda aumentada após encapsulá-la em nanopartículas poliméricas. A chalcona encapsulada também apresentou atividade contra leishmaniose em camundongos infectados, como foi evidenciado por lesões significativamente menores, além da diminuição de parasitas.

O extrato aquoso de *P. aduncum* apresentou atividade supressora de radicais superóxido e hidroxila a 0,01% em sistemas *in vitro* e impediu o desenvolvimento de úlcera gástrica em ratos induzida por indometacina a 200 mg / rato, via oral. O extrato (a 4g / kg rato, v.o.) não mostrou atividade tóxica aguda em ratos (Watanabe *et al.*, 2000).

5. *P. amalago*

Conforme descrito por Parmar *et al.* (1997), esta planta é utilizada para aliviar dores no peito e também como agente antiinflamatório.

As amidas isoladas desta espécie por Jacobs *et al.* (1999) foram testadas contra larvas de *Aedes aegyptii* em uma concentração de 100 ppm. As isobutil-amidas apresentaram propriedades inseticidas enquanto que, entre as amidas pirrolidínicas, somente a nigrinodida apresentou atividade.

6. *P. angustifolium*

O óleo volátil de *P. angustifolium* apresentou atividade bacteriostática e fungistática contra *Trychophyton mentagrophytes* (10µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (30µg/mL),

Candida albicans (50µg/mL), *Cryptococcus neoformans* (50µg/mL), *Aspergillus flavus* (100µg/mL), *Aspergillus fumigatus* (100µg/mL) e *Escherichia coli* (100µg/mL) (Tirillini *et al.*, 1996).

7. *P. arboricola*

He *et al.* (1981) relataram os efeitos analgésicos do ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico em camundongos, isolado das folhas desta espécie.

8. *P. argyrophylum*

Raj *et al.* (1998) investigaram o efeito do extrato metanólico de folhas de *P. argyrophylum* na modulação de alterações de ciclos celulares, induzidos por aflatoxina B1 (que causa dano celular através da modificação de ácidos nucleicos) em células pulmonares e de medula óssea. A administração deste extrato aos ratos normalizou o efeito da aflatoxina B1 em células de medula óssea induzidas por aflatoxina B1.

9. *P. augustum*

Delgado *et al.* (1998) observaram atividade biológica moderada (LD₅₀ = 350 ppm) do extrato etanólico dos galhos de *P. augustum* de acordo com bioensaio realizado com *Artemia salina*.

10. *P. auritum*

De acordo com Saez *et al.* (1998a), o extrato acetato de etila de raízes de *P. auritum* mostrou controle moderado do inseto *Collaria oleosa*.

Através de fracionamento do extrato diclorometânico de *P. auritum*, que exibiu alta atividade inseticida contra *Drosophila melanogaster*, Saez *et al.* (1998b) isolaram e identificaram o safrol como a substância responsável por esta atividade. Estes autores ainda citam as propriedades galactagoga, emenagoga, oxitócica e balsâmica atribuídas a esta espécie, que também é indicada para gastralgia e dispepsia. Em alguns lugares do México esta planta é utilizada como condimento.

11. *P. bartlingianum*

Arbusto de larga distribuição no norte do Brasil, usado para envenenamento de peixe (Acevedo-Rodríguez, 1990).

12. *P. betle*

Segundo Jirovetz *et al.* (1999), estudos sobre a atividade farmacológica de *P. betle* incluem efeitos hipotensor, cardíaco, respiratório e relaxamento da musculatura lisa e esquelética. O extrato desta espécie apresentou atividade anti-hipertensiva (Parmar *et al.*, 1997).

Atividades fungicida e nematocida significativas foram atribuídas aos seguintes propenilfenóis isolados de folhas: diacetato de alilpirocatecol, chavibetol, acetato de chavibetol, chavicol e hidróxi-chavicol (Evans *et al.*, 1984). O eugenol exibiu atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e o pseudodilapiol apresentou forte atividade antimicrobiana (Parmar *et al.*, 1997).

De acordo com Yang & Chou (1997) os extratos clorofórmicos e etanólicos exibiram atividade contra *Streptococcus salivarius*, *Str. sanguis*, *Str. mutans*, *Neisseria sp*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*. Eugenol e hidróxi-chavicol são os componentes presentes no extrato responsáveis por esta atividade antimicrobiana.

Mackeen *et al.* (1997) observaram forte atividade (MED - dose efetiva mínima - de 0,625 mg) dos extratos de *P. betle* e *P. nigrum* contra o nematóide *Bursaphelenchus xylophilus*.

Zeng *et al.* (1997) relataram atividade antagonista eficaz *in vitro* das neolignananas piperbetol, metilpiperbetol, piperol A e piperol B em receptores dos fatores de agregação plaquetária (PAF).

O ato de mascar fumo de betel indica uma forte correlação com leucoplasia, fibrose sub-mucosa e câncer oral.

Com a finalidade de se estudar lesões de mucosa oral, Jeng *et al.* (1999) investigaram o efeito das substâncias presentes no extrato de inflorescências de *P. betle* no DNA em culturas de queratócitos de gengiva humana. Os resultados indicaram que o extrato de inflorescências de *P. betle* contribuiu na patogênese das lesões da mucosa oral provocadas pelo ato de mascar fumo de betel, possivelmente através de mecanismos genotóxicos. Em continuação ao estudo com mascadores de fumo de betel e sua relação com câncer, Jeng *et al.* (2000) observaram que os ingredientes de noz-de-areca induziram a produção de prostaglandinas (PGs), formação de proteínas e RNAm da ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Como os níveis de PGs e COX-2 são altos em câncer de pescoço e cabeça e são considerados importantes para imunossupressão localizada, além da inflamação de tecido anormal promover a ocorrência de

câncer e fibrose do tecido, concluíram então que o hábito de mascar fumo de betel contribui para a patogênese de fibrose submucosa oral e câncer oral através da indução na produção de PGs, na expressão de COX-2 e respostas associadas à inflamação de tecido.

Em Taiwan, o safrol, substância hepatocarcinogênica em roedores, é o único ingrediente presente nas inflorescências de *P. betle* (15 mg/g). O ato de mascar fumo de betel leva os humanos a uma exposição excessiva de safrol (420 µM safrol na saliva). Chen *et al.* (1999) sugeriram que esta substância forma adutos estáveis de safrol-DNA em tecido oral humano após mascar fumo de betel, que podem contribuir para carcinogênese oral.

Folhas de *P. betle* tanto podem estimular como inibir a função tiroideana, particularmente para geração de T3 e LPO (peroxidação de lipídios) em camundongos, dependendo da quantidade consumida. Enquanto que, a doses mais baixas, reduz T4 e aumenta concentrações séricas de T3, efeitos reversos foram verificados em doses mais altas, aumentando também LPO com concomitante redução nas atividades de superóxido dismutase e catalase (Panda & Kar, 1998).

Mitani *et al.* (2000) descreveram uma formulação de creme com ação preventiva de envelhecimento de pele contendo extratos de algumas espécies incluindo *P. betle*.

Murakami *et al.* (2000) avaliaram a atividade inibitória de 114 extratos metanólicos de 42 famílias de plantas comestíveis da Malásia frente ao promotor de tumor 12-*O*-hexadecanoilforbol-13-acetato (HPA)-induzido pelo vírus Epstein-barr (EBV) em células Raji. Entre estas plantas, *P. betle* mostrou-se uma das mais promissoras espécies na quimioprevenção de câncer.

Yamahara (1999) descreve um agente antialérgico que contém extrato de folhas de *P. betle*. As folhas são extraídas com água ou solventes orgânicos e os extratos obtidos contêm desmetileugenol.

13. *P. boehimerifolium*

Conforme relatado na revisão de Parmar *et al.* (1997) *P. boehimerifolium* apresenta propriedades inseticidas.

14. *P. brachystachyum*

Esta espécie também apresenta propriedades inseticidas (Parmar *et al.*, 1997).

15. *P. caninum*

Os nativos da Malásia peninsular possuem o hábito de mascar as folhas de *P. caninum* para tratamento de rouquidão, enquanto que a maceração das folhas é utilizada após o parto. Ahmad *et al.* (1997) citaram atividades anti-fúngica e anti-inflamatória da 5,7-dimetilflavona isolada desta espécie por estes autores.

De acordo com Setzer *et al.* (1999), o extrato bruto clorofórmico de cascas de *P. caninum* exibiu atividade contra bactérias Gram positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Os agentes antibacterianos presentes no extrato foram isolados através de técnicas cromatográficas usando ensaio biomonitorado e identificados como (+) *p*-cumarato de bornila e cafeato de bornila.

16. *P. capense*

Esta espécie é utilizada na República de S. Tomé e Príncipe (África) no tratamento de indigestão, flatulência e cólica por possuir propriedades estomáquicas e carminativas. O uso desta planta também provoca sudorese e sonolência (Martins *et al.*, 1998).

17. *P. chaba*

As raízes e frutos são utilizadas como estimulante além de serem úteis no tratamento de asma, bronquite, febre, dores no abdômen e hemorróidas (Parmar *et al.*, 1997).

18. *P. cubeba*

A patente de autoria de Sato *et al.* (2000) descreve a preparação de um tônico capilar contendo extratos de plantas incluindo *P. cubeba*, que inibe testosterona-5 α -redutase (IC₅₀ = 0,43 mg/mL) estimulando assim o crescimento capilar.

19. *P. decurrens*

Em um estudo visando a busca de substâncias com atividade inseticida desta espécie, foram isoladas as neolignanas conocarpano, eupomatenóides-5 e 6, via fracionamento biomonitorado. Eupomatenóide-6 apresentou toxicidade completa a 10 ppm em larvas de mosquito (Parmar *et al.*, 1997).

20. *P. dilatatum*

O extrato diclorometânico de *P. dilatatum* apresentou atividade contra *Cladosporium cucumerinum*, um fungo patogênico de plantas, em um ensaio bioautográfico em placas

cromatográficas. As substâncias responsáveis pela atividade anti-fúngica foram: ácido tabogânico, taboganato de metila, 2,2-dimetil-6-carboxicroman-4-ona metil éster e 2,2-dimetil-3-hidróxi-6-carboxicromano metil éster (Terreaux *et al.*, 1998).

21. *P. elongatum*

As folhas de *P. elongatum* são usadas na medicina popular da América do Sul. O trabalho de Masuoka *et al.* (1997) descreve a asebogenina com atividade anti-oxidante mais forte que a do α -tocoferol, enquanto que os ácidos 3-geranil-4-hidróxi-benzóico e nervogênico apresentaram atividade mais alta que BHA (*t*-butil-4-hidróxi-anisol) utilizando o método do tiocianato férrico.

22. *P. falconeri*

Os extratos hexânico e diclorometânico de folhas e galhos desta espécie apresentaram atividade inseticida contra *Musca domestica* (mosca) e *Aedes aegyptii* (mosquito) de acordo com Parmar *et al.* (1997).

23. *P. futokadsura*

Os galhos de *P. futokadsura*, também conhecida como *haifengteng*, são utilizados em prescrições da medicina natural chinesa para o tratamento de asma e artrite (Parmar *et al.*, 1997). O extrato benzênico das suas folhas apresentou atividade anti-fágica contra larvas de *Spodoptera litura* (Parmar *et al.*, 1997). Em uma busca visando encontrar antagonistas do PAF, testando-se (+)-kadsurenona, kadsurinas A e B, a (+)-kadsurenona foi a mais eficaz na inibição do receptor presente nas membranas das plaquetas do plasma de coelho. Esta neolignana inibiu também potencialmente a desgranulação induzida por PAF de neutrófilos humanos a 2,5 – 5 μ M sem nenhuma atividade agonista. Quando administrada oralmente, foi ativa a 25 – 50 mg/kg no bloqueio da permeabilidade cutânea induzida por PAF em cobaias. Também inibiu o aumento de enzimas lisossomais do plasma e hematócrito induzido por PAF em ratos (Parmar *et al.*, 1997).

24. *P. guanacastensis*

O extrato etanólico das partes aéreas apontou toxicidade ao mosquito *Aedes atropalpus* (LC_{50} = 127,5 μ g/mL). A fração solúvel em clorofórmio exibiu atividade inseticida considerável contra larvas de *Aedes atropalpus* (LC_{50} = 80,5 μ g/mL). Por outro lado, o

benzoato de 4-hidróxi-3-(3'-metil-2'-butenil)-metila revelou $LC_{50} = 20,5 \mu\text{g/mL}$ (Pereda-Miranda *et al.*, 1997).

25. *P. gibbilimbum*

Os gibbilimbóis A-D isolados das folhas desta espécie por Orjala *et al.* (1998) exibiram toxicidade frente a *Artemia salina* com LC_{50} de aproximadamente $5 \mu\text{g/mL}$, além de apresentarem citotoxicidade para células KB de carcinoma de nasofaringe (ED_{50} 7,8 - 2,1 $\mu\text{g/mL}$). Estas substâncias também mostraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus aureus*.

26. *P. guineense*

Enquanto que preparações de folhas, raízes e sementes são usadas internamente para o tratamento de bronquite, doenças gastrintestinais, venéreas e reumatismo, os frutos são utilizados como aromatizantes (Parmar *et al.*, 1997).

De acordo com Martins *et al.* (1998), as folhas desta espécie são largamente utilizadas como agente antibacteriano, especialmente para cicatrizar feridas. As suas sementes pulverizadas são usadas como inseticida.

O óleo volátil de *P. guineense* foi testado em *Tribolium castaneum* (Hbst) (besouro de farinha) que infesta milho granulado estocado e apresentou toxicidade significativa aos adultos e larvas deste inseto. Na dose de 100 mg / 5 g de sementes o óleo provocou 100% e 83,4% de mortalidade em adultos e larvas respectivamente. A aplicação de 80 mg de óleo / 5 g de sementes suprimiu completamente o desenvolvimento de larvas e adultos de *T. castaneum* em grãos de milho (Lale & Ajayi, 2000)

27. *P. hispidum*

Na Jamaica seu uso está relacionado com o alívio de dores estomacais, além de ser usado como repelente de insetos (Parmar *et al.*, 1997). Alécio *et al.* (1998) relataram a atividade anti-fúngica de *N*-[7-(3',4'-metilenodióxi-fenil)-2(Z),4(Z)-heptadienoil]-pirrolidina isolada desta espécie contra *Cladosporium sphaerospermum* através de ensaio bioautográfico.

28. *P. kadsura*

As neolignanas kadsureninas K e L isoladas de *P. kadsura* exibiram significativa atividade antagonista de PAF (Parmar *et al.*, 1997).

29. *P. lolot*

Além desta espécie ser usada como alimento no Vietnã, é também empregada no tratamento de reumatismo, ostealgia, lumbago, parestia, dor de cabeça, hiperidrose das extremidades, dispepsia, vômito, flatulência, diarreia, dor de dente, rinite catarral crônica, e edema. Também utilizada em combinação com outras plantas no tratamento de envenenamento por cogumelo e picada de cobra. A planta inteira possui atividade antiinflamatória e analgésica (Dũng *et al.*, 1996).

30. *P. longum*

Das & Kashinatham, (1998) relataram efeito carminativo e analgésico, além de uso no tratamento de problemas brônquicos de preparações de *P. longum*.

A amida desidropipernonalina isolada de frutos possui atividade vaso relaxante da coronária (Parmar *et al.*, 1997). Por outro lado, 1-(3,4-metilenodióxi-fenil)-1*E*-tetradeceno, isolado de *P. longum*, possui propriedade imunomodulatória e pode ser usado para tratar tumores e infecções. De acordo com Upadhyay *et al.* (1999), esta substância interrompeu significativamente o crescimento do tumor em células tumorais P851 em camundongos.

31. *P. magnibacum*

Ahmad *et al.* (1998) investigaram a atividade antibacteriana das substâncias isoladas das folhas de *P. magnibacum*.

32. *P. marginatum*

No Brasil suas sementes são usadas como agentes aromatizantes e as raízes como antídoto contra picada de cobra. Esta espécie também é comumente empregada pelos nativos da Amazônia no tratamento de doenças hepáticas e como espasmolítico (Santos & Chaves, 1999a).

Segundo D'Angelo *et al.* (1997), a injeção intraperitoneal de extrato aquoso de *P. marginatum* (0,1-1g/kg) em camundongos e ratos provocou piloereção, sialorréia, lacrimação, relaxamento muscular e dispnéia. Doses maiores que 1g/kg provocaram parada respiratória e morte. O extrato exibiu atividade simpatomimética, reduziu edema na pata de ratos induzido por carragenina, além de apresentar um pequeno efeito analgésico em camundongos que receberam injeção de ácido acético. A noradrenalina foi a substância vasoconstritora predominante detectada por HPLC, cuja atividade é aparentemente preservada no extrato bruto, produzindo vasoconstrição após administração oral.

33. *P. methysticum*

A kava-kava é uma bebida psicoativa que induz relaxamento, melhora a interação social, promove o sono e possui um importante papel na vida sociocultural dos habitantes das ilhas do Pacífico Sul (Singh, 1992). Por outro lado, extratos padronizados de raízes de kava-kava são usados na terapia de ansiedade, tensão e inquietação. As kavapironas, substâncias farmacologicamente ativas em humanos e animais, são os principais constituintes de *P. methysticum* (kava-kava). A inibição de MAO-B (monoamino-oxidase-B) por extratos enriquecidos de kavapironas pode ser um importante mecanismo da atividade psicotrópica. Uebelhack *et al.* (1998) investigaram efeito *in vitro* de extrato de kava-kava em MAO-B presente em plaquetas humanas em comparação com amitriptilina, imipramina e brofaromina. A kava-kava mostrou-se um agente inibidor reversível da MAO em plaquetas intactas e homogenizados de plaquetas rompidas.

Di-hidrometisticina e (+)-kavaína, isolados de *P. methysticum*, possuem propriedades analgésica, ansiolítica, anticonvulsivante e relaxante muscular. Walden *et al.* (1997) sugeriram a modulação da atividade do receptor de serotonina 1A pela kavaína e di-hidrometisticina, que pode ser importante na ação das kavapironas contra a ansiedade. Posteriormente Boonen *et al.* (1998) demonstraram que a (+)-di-hidrometisticina, quando administrada cronicamente em ratos, em uma única dose alta, não alterou significativamente os níveis dopaminérgicos ou serotoninérgicos.

Seitz *et al.* (1997) estudaram a inibição não estereoseletiva pirona específica da captação de noradrenalina pela (+)-metisticina e (+)-kavaína, que pode ser responsável por, ou no mínimo contribuir com as propriedades psicotrópicas das kavapironas.

Baum *et al.* (1998) relataram efeitos do extrato de kava e kavapironas individuais em ratos e sugeriram que o relaxamento e a ligeira euforia provocados por estas últimas substâncias podem ser causados pela ativação de neurônios dopaminérgicos mesolímbicos, enquanto que mudanças na atividade de neurônios serotoninérgicos poderiam explicar a ação indutora do sono.

Boonen & Harberlein (1998) estudaram a influência de kavapironas de *P. methysticum* em receptores GABA-A e observaram que a yangonina, a (+)-kavaína, a (+)-di-hidro-kavaína, a (+)-metisticina, e a di-hidro-metisticina aumentaram a ligação específica do [H-3]BMC (metocloridrato de [3-H]bicuculina) aos receptores GABA-A.

Gleitz *et al.* (1997) sugerem que a ação anti-trombótica da kavaína esteja ligada à inibição da ciclo-oxigenase (COX), suprimindo assim a geração de tromboxanas A₂ (TXA₂) que induz a agregação plaquetária através de sua ligação com seus receptores.

Kubo *et al.* (1999) patentearam uma formulação com extrato de *P. methysticum*, que contém inibidores da testosterona-5- α -redutase, usada para controle de acne. Outra patente japonesa (Matsuda *et al.* (1997) relata as preparações tópicas contendo yangonina como ingrediente ativo. Esta kavapirona, isolada dos rizomas de *P. methysticum*, exibe segurança e estabilidade frente à luz, além da alta capacidade de absorver luz UV.

Sotheeswaran *et al.* (1998) detectaram a presença de polímeros de glicose em extratos aquosos de kava. As unidades de glicose possuem ligação 1,4 com ramificação significativa nas posições O-6.

Nöldner & Chatterjee, (1999) realizaram experimentos com o objetivo de esclarecer a hipótese de que o extrato de kava potencializava o EPS de neurolépticos ou antagonistas dopaminérgicos em ratos tratados com haloperidol. Os autores observaram, surpreendentemente, que o extrato de kava enriquecido com kavapironas (~60%) inibiu completamente o efeito cataleptogênico do antagonista dopaminérgico. Os resultados preliminares permitiram concluir que o extrato de kava inibe as propriedades cataleptogênicas e sugerem que a co-administração do extrato com anti-psicóticos convencionais pode ser efetiva no combate aos efeitos colaterais extra-piramidais.

34. *P. nigrum*

P. nigrum (pimenta-do-reino) possui dois atributos particulares em seu uso como condimento: um está relacionado com o sabor e aroma característicos e outro com sua pungência. O aroma se deve ao conteúdo do óleo volátil, enquanto que alguns componentes não voláteis, particularmente a piperina, são a causa da sua pungência (Pino & Borges, 1999).

Hu *et al.* (1996) observaram atividade anti-convulsivante, sedativa e analgésica do extrato etanólico de raízes de *P. nigrum*, quando administrado a camundongos (2g/kg por via oral).

O extrato bruto de frutos secos desta espécie exibiu potente atividade inibitória da ciclo-oxigenase e prostaglandina sintase *in vitro*. O fracionamento do extrato monitorado através da atividade enzimática *in vitro* em sangue de cavalo levou ao isolamento de piperina (Venkateshwarlu, 1997).

A piperina é utilizada na formulação de comprimidos para a redução do colesterol sanguíneo, profilaxia e terapia de arteriosclerose. Esta ação ocorre através da inibição da acilcoenzima A: colesterolaciltransferase pela piperina (Sawada *et al.*, 1996). Por outro lado, Singh *et al.* (1997) relataram que a piperina aumenta seletivamente a biodisponibilidade de fármacos estrutural e terapeuticamente diferentes, aumentando a absorção ou retardando o metabolismo destes ou ainda, através da combinação de ambos os processos.

Estudos de Khajuria *et al.* (1998) sobre a dinâmica de absorção da piperina no intestino sugerem que a piperina seja absorvida rapidamente através da barreira intestinal. A piperina age como uma molécula apolar, formando complexos apolares com fármacos. Pode modular dinâmicas de membrana devido a sua partição eficiente através de barreiras celulares.

Estudos realizados por Badmaev *et al.* (1999) sugerem que a resposta sérica durante suplementação oral de β -caroteno com piperina seja aumentada pela última através de propriedades não específicas.

Em 1998 uma patente de autoria de Majeed *et al.* descreve administrações oral, tópica ou parenteral de piperina para melhor absorção gastrointestinal e utilização sistêmica de nutrientes e suplementos nutricionais, incluindo novo processo de extração e purificação da piperina.

Gupta *et al.* (1998) notaram o efeito sinérgico dose-dependente da piperina na antinocicepção de nimesulida em camundongos. A piperina é um inibidor de enzimas hepáticas e de outras envolvidas na biotransformação de fármacos.

Mujumdar *et al.* (1999) relataram o aumento da biodisponibilidade de oxifenilbutazona em ratos, utilizando o alcalóide piperina, potencializando assim sua atividade anti-inflamatória por causa da piperina. De acordo com os autores, isto é resultado do aumento de absorção no trato gastrointestinal e inibição de enzimas microssomais que metabolizam fármacos.

Durante uma triagem de plantas para encontrar potenciais agentes de repigmentação para o tratamento de vitiligo, Lin *et al.*, (1999) observaram que extrato de *P. nigrum* agia como estimulante de crescimento de culturas de melanócitos de camundongos. A piperina também estimulou o crescimento celular. Piperina e análogos de piperina são indicadas no tratamento de vitiligo e na repigmentação de pele despigmentada pós-trauma. Podem ser também utilizadas como cosméticos na promoção ou aumento da coloração natural da pele (Raman & Lin, 2000).

Pradhan *et al.*, (1999) avaliaram a atividade bacteriostática da 3,4-di-hidróxi-feniletanol glicosídeo e 3,4-di-hidróxi-6-(*N*-etilamino)-benzamida, presentes em grande quantidade na pimenta verde. A atividade inibitória de ambas as substâncias foi constatada frente a *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, sendo que a 3,4-di-hidróxi-6-(*N*-etilamino)-benzamida apresentou elevada atividade bacteriostática. A presença dessas duas substâncias na pimenta verde pode aumentar o seu valor medicinal, uma vez que essa pimenta possui valor limitado. Além deste trabalho, os autores também citam várias atividades biológicas relacionadas a estas substâncias como anti-oxidante, antibacteriana, anti-PAF, inseticida.

Nalini *et al.* (1998) relataram a supressão de carcinogênese de cólon em ratos induzido pela substância carcinogênica 1,2-dimetil-hidrazina por *P. nigrum*.

Em busca de supressores de superóxido e substâncias inibitórias de prolil endopeptidase, sendo estas últimas de grande interesse como medicamentos promissores no controle da doença de Alzheimer, Khanom *et al* (2000) investigaram plantas indígenas, entre elas *P. nigrum*, de Bangladeshi, para o desenvolvimento de novos fármacos na prevenção de doenças. Os resultados obtidos foram positivos para as espécies estudadas, ou seja, apresentaram atividades inibitórias de prolil endopeptidase e captação de superóxido. Segundo o Instituto de Medicina Herbal de Blangladeshi, *P. nigrum* é utilizada em dor abdominal, tosse, disenteria e hemorróidas.

Manosroi *et al.* (1999) sugeriram concentrações de 0,1 e 0,5% de extrato aquoso de frutos de pimenta branca (*P. nigrum*) em formulação de creme contendo hidroquinona, usada para tratar hiperpigmentação localizada da pele. A função do extrato seria de fornecer anti-oxidante solúvel em água para substâncias susceptíveis de oxidação.

Annis *et al.* (2000) avaliaram a atividade inibitória do extrato de *Piper nigrum* na transcrição dos genes envolvidos na biossíntese de aflatoxinas produzidas por *Aspergillus parasiticus*. Segundo os autores, uma amida do tipo piperina interferiu no mecanismo regulatório da produção de aflatoxina, causando inibição da sua biossíntese. Uma nova geração de estratégias de controle pode ser desenvolvida a partir de compostos naturais que afetam os processos de produção de toxinas em fungos micotoxigênicos. Os autores sugerem que o controle das micotoxinas pode ser efetuado através da aplicação desta amida em grãos estocados.

Broadhurst *et al.* (2000) investigaram a atividade hipoglicemiante de 49 ervas, temperos (incluindo *P. nigrum*), e extratos de plantas medicinais em adipócitos de ratos. Dentre as

espécies estudadas *P. nigrum* não apresentou nenhuma atividade similar à insulina, não causando alteração no grau de metabolismo da glicose.

De 25 gêneros diferentes de bactérias testados por Dorman & Deans (2000) apenas 3 não foram inibidos pelo óleo volátil de *P. nigrum*: *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Lactobacillus*.

Hammer *et al.* (1999) apresentaram valores de concentração inibitória mínima do óleo volátil dos frutos de *Piper nigrum* frente a 10 diferentes microrganismos.

Cumaperina foi isolada de pimenta branca e possui atividade anti-oxidante. Como seus efeitos sobre a carcinogênese ainda não estão esclarecidos, Kitano *et al.* (2000) investigaram a ação quimiopreventiva desta substância no estágio inicial de hepatocarcinogênese em ratos. Seus resultados sugerem que cumaperina fornece proteção contra a iniciação de hepatocarcinogênese e que sua atividade está relacionada à inibição de proliferação celular.

A patente de Chen (1997) apresenta a utilização de uma pomada contendo *P. nigrum*, entre outras substâncias, para tratamento de bromidrose.

35. *P. pedicellosum*

Dilapiol e desidro-di-eugenol isolados das folhas desta espécie apresentaram toxicidade frente a *Artemia salina* com $ED_{50} = 27,75$ ppm e 12,65 ppm respectivamente (Ahmad & Kadir, 2000).

36. *P. piscatorum*

Numerosas espécies de *Piper* são empregadas na América do Sul como estupefaciente de peixes (barbasco) e anestésicos locais. Galhos e raízes de *P. piscatorum* são utilizados na Amazônia para alívio de dor de dentes e como barbasco. Os índios Piaroa e Hoti (Venezuela) mascam uma pequena porção da raiz para aliviar dor de dentes e gengiva. O efeito dura por mais de dez minutos e é acompanhado por uma salivação intensa (Mc Ferren & Rodriguez, 1998). Em testes de toxicidade realizados por estes autores, o constituinte responsável por estas atividades biológicas, piperovatina, apresentou $LC_{50} = 115$ ng/mL em peixes.

37. *P. ponapense*

O fracionamento biomonitorado (através de danos em DNA, em um ensaio baseado em células) dos extrato acetato de etila de galhos e folhas *P. ponapense* levou ao isolamento do alcalóide piperpense (Patil *et al.*, 1997).

38. *P. puberulum*

As piperulinas A e C isoladas por Zhang *et al.* (1995) dos galhos inibiram receptores específicos de PAF com valores de IC₅₀ de 7,30 e 5,70 µM respectivamente.

39. *P. sarmentosum*

Esta planta tradicional chinesa tem sido utilizada no tratamento de tosse, resfriado comum, reumatismo, ferimento traumático e contra dor de dente quando aplicada topicamente (Stöhr *et al.*, 1999).

Conforme os autores citados acima, o extrato bruto inibiu as enzimas ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e 5-lipo-oxigenase (5-LO) em concentrações de IC₅₀=19 µg/mL e IC₅₀=10 µg/mL respectivamente. Os constituintes isolados mostraram apenas fraco efeito em ambos os sistemas testados.

As seguintes substâncias isoladas desta planta possuem atividade inibitória frente a *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*: asaricina, 1-alil-2,6-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-benzeno α- e γ-asarona (Parmar *et al.*, 1997).

40. *P. sylvaticum*

Na medicina popular indiana, as raízes desta espécie são empregadas como um antídoto eficaz contra veneno de cobra (Parmar *et al.*, 1997).

41. *P. tuberculatum*

No Brasil, a planta é empregada como agente sedativo, antídoto contra picada de cobra e os frutos são usados em dores de dente (Araújo-Jr *et al.*, 1997 e 1999).

Capron & Wiemer (1996) investigaram folhas desta espécie à procura de repelentes de formigas e identificaram piplartina, piplaróxido e desmetóxi-piplartina. As duas últimas substâncias demonstraram atividade significativa durante o estudo de repelência de formigas da espécie *Atta cephalotes*.

42. *P. umbellatum*

Martins *et al.* (1998), relataram o uso das folhas de *P. umbellatum* para cicatrizar feridas e para diminuir inchaço e irritação de pele.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 Material vegetal

A espécie *Piper cernuum* foi coletada em fevereiro de 1998, em Picinguaba, Ubatuba (SP). Sua exsicata (Kato-0137) está depositada no herbário do Instituto de Botânica.

Para a análise do óleo volátil as folhas foram coletadas de um exemplar cultivado no Instituto de Química da USP de São Paulo em junho de 2000.

Os itens 3.1.2 a 3.1.4 foram apresentados para informar o material e os métodos utilizados pelo Dr. Guillermo Delgado durante a iniciação da cultura de calos de *P. cernuum* bem como o estabelecimento e a manutenção das suspensões celulares.

3.1.2 Obtenção de plântulas estéreis de *P. cernuum* por germinação de sementes

As sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 2,5%, seguido pelo tratamento com uma solução contendo rifampicina (30 mg/L) e bayfidan (3 g/L) e mantidas sob agitação durante a noite e após procedimentos de lavagem, germinadas em meio basal MS (Murashige & Skoog, 1962).

As plântulas cultivadas *in vitro* no meio de cultura N1 deram origem aos calos e estes, a suspensões celulares. O meio N1, utilizado para a propagação das plântulas a partir de ápices e nós e para formação de raízes, possui a seguinte formulação: sais basais do meio B5 (Gamborg, 1968) suplementados com mio-inositol (100 mg/L); tiamina (1 mg/L); sacarose (30 g/L); IAA (ácido indolacético: 0,02 mg/L); GA₃ (ácido giberélico: 0,02 mg/L); fitagel (1,7 g/L).

3.1.3 Cultura de calos

As folhas das plântulas foram usadas como explantes para iniciar culturas de calos em meio sólido: MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo mio-inositol (100,0 mg/L); tiamina (1,0 mg/L); mistura anti-oxidante (50,0 mg/L); sacarose (20g/L); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxi-acético: 0,2 mg/L); GA₃ (0,5 mg/L) e fitagel (1,7 g/L). As placas de Petri

foram incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ sob fotoperíodo de 16/8 h. Os calos foram obtidos após um período de 4 semanas e subcultivados a cada 3 semanas, sob as condições descritas acima.

3.1.4 Suspensões celulares

Após um período de 5 semanas, os calos friáveis foram transferidos para o meio líquido MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo mio-inositol (100,0 mg/L); tiamina (1,0 mg/L); mistura anti-oxidante (50,0 mg/L); sacarose (30 g/L); 2,4-D (0,2 mg/L); GA₃ (0,5 mg/L); piridoxina (0,5 mg/L); ácido nicotínico (0,5 mg/L); glicina (2,0 mg/L); caseína hidrolizada (250,0 mg/L). Após autoclavagem (autoclave vertical Phoenix modelo AV75) do meio de cultura o valor do pH mantém-se em torno de 5,52. As culturas foram mantidas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ com iluminação contínua e em agitadores giratórios a 100 rpm. As suspensões celulares foram estabelecidas após 2 ou 4 subculturas e subcultivadas a cada 2 semanas em erlenmeyers de 1 L, mantendo-se 200 mL da cultura e adicionando-se 200 mL de meio novo. Todos os experimentos realizados com suspensões celulares foram mantidos sob as condições citadas neste item.

3.2 Tamanho de inóculo

O inóculo refere-se à quantidade de massa celular utilizada para a obtenção de suspensões celulares. Este ensaio foi realizado em triplicata e a variação da quantidade de inóculo foi fixada em 2 g, 4 g e 8 g de células frescas em 50 mL de meio de cultura. As suspensões celulares cultivadas foram filtradas, as células transferidas em condições assépticas na quantidade de 2 g, 4 g e 8 g para cada bateria de 3 erlenmeyers e mantidas em agitadores orbitais. Após 14 dias foi utilizado 1,0 mL de suspensão celular de cada erlenmeyer para obtenção dos pesos fresco e seco. As células frescas separadas do meio de cultura foram pesadas e posteriormente secas a 55°C até a obtenção do peso seco constante (Mills & Lee, 1996).

3.3 Determinação da curva de crescimento das suspensões celulares

Este experimento foi realizado em triplicata, com inóculo de 5,0 g de células frescas de 14 dias de cultivo (item 4.3.1.1), em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de

cultura. Após esta etapa, os 3 erlenmeyers correspondentes ao tempo inicial do ciclo de crescimento foram analisados na seguinte ordem:

a) filtração em funil de Büchner das suspensões celulares para separação das células do meio de cultura;

b) separação de 0,5 g de células frescas e congelamento em nitrogênio líquido para realização do ensaio da atividade enzimática da PAL;

c) separação de 2,0 g de células frescas e congelamento em nitrogênio líquido para quantificação da tiramina e dopamina;

e) determinação da matéria fresca das células;

f) determinação da matéria seca das células;

g) medida do pH do meio de cultura;

h) separação de 2 mL do meio de cultura para quantificação de sacarose, glicose e frutose.

O mesmo procedimento foi realizado para os 2º, 5º, 8º, 11º, 14º, 18º, 21º e 23º dias.

3.4 Determinação dos valores de pH

A medida do pH do meio de cultura das suspensões celulares foi realizada com o auxílio de pH-metro (pH-metro: TECNAL modelo TEC-2).

3.5 Determinação das matérias fresca e seca das suspensões celulares

O peso fresco das células foi determinado através de filtração em papel, a vácuo das suspensões celulares para separação das células frescas do meio de cultura. Estas células, secas em estufa a 55°C, até obtenção do peso constante, forneceram o peso seco.

3.6 Doseamento de açúcares no meio de cultura (Conrad & Palmer, 1976, adaptado)

O meio de cultura foi analisado em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) da SHIMADZU LC 10 - AD, equipado com uma bomba de fluxo, interface CBM - 10A, detector de índice de refração RID - 10A com temperatura controlada em 40°C, fluxo de 1,5 mL/min, volume de injeção de amostra de 80 µL Seringa Hamilton®, *loop* de 20 µL, injetor Rheodyne® 7725i, coluna Lichrosorb NH₂ (aminopropil) (Merck) 250 X 4 mm, 7 µ sistema isocrático contendo acetonitrila : água (9:1).

3.7 Determinação da atividade específica da PAL

3.7.1 Extração de proteína para ensaio enzimático

Células frescas e congeladas em nitrogênio líquido foram trituradas em gral, previamente resfriado, e em seguida foram adicionados PVPP (polivinilpolipirrolidona, Aldrich) na proporção de 0,05 g/g de células frescas e uma porção equivalente de sílica (descrita no item 3.12). A extração foi realizada com tampão borato 0,1 M (pH 8,8) na proporção de 0,2 g de células frescas/mL. A massa celular foi separada por filtração em gaze (2 vezes). A solução obtida foi centrifugada (Beckman Allegra 21R) a 4°C, a 10000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático da PAL e de Bradford na quantificação de proteínas totais.

3.7.2 Ensaio enzimático da PAL (Heide *et al.*, 1989, modificado)

Para cada amostra foram preparados ensaios em duplicata e um ensaio branco como controle negativo.

A atividade enzimática foi calculada em katal, que expressa a quantidade de enzima necessária para transformar 1 mol de substrato em 1 mol de produto por segundo. 1 katal é uma quantidade inconvenientemente grande quando comparada à unidade enzimática. 1 katal equivale a 6×10^7 UE.

Ensaio enzimático: em um tubo eppendorf de 2,0 mL foram adicionados na seguinte ordem, 1000 µL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8), 300 µL de fenilalanina 10 mM e 200 µL da preparação enzimática obtida conforme item anterior. Após a adição da preparação enzimática das células, os tubos contendo o ensaio branco e o ensaio enzimático foram incubados a 29°C durante 30 minutos. A reação do ensaio enzimático foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido clorídrico 12M.

Ensaio branco: O ensaio branco foi feito com adição de 100 µL de ácido clorídrico 12M no tempo zero.

Para a análise do ácido cinâmico formado através da conversão da fenilalanina pela enzima PAL, foram adicionados 50 µL de metilumbeliferona 1 mM (padrão interno) aos tubos teste e enzimático. Estas soluções foram centrifugadas a 9000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi analisado em CLAE (SHIMADZU LC 10 AD), equipado com duas

bombas de fluxo, interface CBM-10A, injetor automático SIL-10A, detector espectrofotométrico (UV-visível) SPD-10A, com o seguinte sistema: mistura de solventes contendo água : metanol : ácido acético (40:60:1), com detecção em UV a 275 nm, fluxo de 1 mL/min e volume de injeção, 20 µL, coluna C18 Econosil (Alltech) 250 X 4 mm, 5 µm.

As plântulas de *P. cernuum* cultivadas *in vitro* e em campo e planta adulta foram separadas em folhas, caule e raiz e a atividade específica da PAL foi determinada em cada uma destas partes. Antes da incubação o extrato enzimático foi dessalinizado em coluna PD 10 de filtração em gel (Sephadex G 25M, Pharmacia Biotech) com 3,5 mL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8).

3.8 Determinação das proteínas totais

Com a mesma preparação enzimática utilizada para a incubação da PAL foram feitos os doseamentos das proteínas totais através do método de Bradford, empregando ASB (albumina sérica bovina) como proteína padrão (Bradford, 1976). Este ensaio foi realizado em triplicata e incubado durante 5 minutos da seguinte maneira: 1.190 µL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8), 300 µL de corante *Coomassie Brilliant Blue* G 250 (Bio-rad) e 10 µL do extrato enzimático. A leitura foi obtida em espectrofotômetro de UV (Perkin Elmer, Lambda 3), $\lambda = 595$ nm, zerado com 1200 µL de tampão borato 0,1 M (pH 8,8) e 300 µL de corante.

3.9 Quantificação da tiramina e dopamina (Eerola *et al.*, 1993, modificado)

3.9.1 Extração das aminas

Células frescas (2,0 g) e congeladas foram transferidas para um tubo de centrífuga (50 mL) e em seguida foram adicionados 125 µL de dicloridrato de putrescina (padrão interno) e 10 mL de ácido perclórico 0,4 M. Posteriormente submeteu-se à extração em ultra-som durante 5 minutos. Após a extração, a amostra foi centrifugada a 10000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado e transferido para balão volumétrico de 25 mL. Esta etapa foi realizada 2 vezes, os sobrenadantes foram reunidos e o volume completado para 25 mL com ácido perclórico 0,4 M.

Figura 3- Derivatização das aminas com cloreto de dansila.

3.10 Óleo volátil

3.10.1 Extração do óleo

As folhas frescas (270g) de *P. cernuum* foram cortadas em pequenos pedaços e submetidas à extração conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV (1988).

3.10.2 Identificação dos componentes

A identificação das substâncias foi realizada através da comparação dos índices de retenção (determinado relativamente aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos) e espectro de massas com aquele disponível no sistema. Neste experimento, a comparação dos índices de retenção (índice de Kovats) foi definida como índice de retenção linear dos mono e sesquiterpenos com relação à cadeia homóloga de hidrocarbonetos. O índice de Kovats é usado para corrigir o tempo de retenção com relação a variações de metodologias e de equipamentos, para comparação com banco de dados (Collins *et al.*, 1997).

Cromatografia gasosa (CG): cromatógrafo a gás SHIMADZU GC – 17A equipado com programa SHIMADZU GC 10, com detector de ionização em chama. Temperatura do injetor e detector ajustadas a 220° e 250° C, respectivamente.

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM): SHIMADZU capillary GC - quadrupole MS system – (QP 5000) operando a 70 eV nas mesmas condições descritas acima.

Colunas capilares de sílica fundida DB-5 e CARBOWAX 20M (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm).

Temperatura do forno: temperatura programada a partir de 60° - 300°C a 3°C/min para coluna DB-5 e 60° - 250°C a 3°C/min para coluna CARBOWAX 20M.

Gás de arraste: hélio com fluxo de 1 mL/min para ambas as análises.

3.10.3 Atividade antimicrobiana

Para a realização do ensaio, foram utilizados os meios de cultura nº 1 e nº 2 de Grove- Randall. O primeiro foi empregado com o objetivo de prover a manutenção mensal dos microrganismos em tubos com meio inclinado e o segundo foi utilizado como camada base na preparação das placas de Petri.

Para a padronização do inóculo, as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619) foram repicadas para tubo contendo meio n° 1 inclinado. O repique foi mantido por 24 h em estufa de incubação microbiológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O crescimento obtido foi posteriormente ressuspensionado com 10,0 mL de solução de NaCl 0,9%. O inóculo foi padronizado a 580 nm em espectrofotômetro Micronal, obtendo-se a transmitância de $25\% \pm 2\%$ (FARMACOPÉIA Brasileira 4 ed). Após a padronização, o inóculo foi utilizado a 0,1% em meio n° 1 mantido em banho-maria a $47^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As placas de Petri receberam 20 mL de meio n° 2, que após solidificado, receberam mais 5 mL de meio n° 1 inoculado. Após solidificar, os poços foram perfurados e inoculados com DMSO, eugenol 1:1 v/v e 100 μL de óleo volátil. A solução de referência (eugenol) e o óleo volátil foram diluídos em DMSO. Ao final deste procedimento, as placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 16 h. Após este intervalo, a leitura dos diâmetros dos halos de inibição ao centésimo de milímetro foi feita com auxílio de paquímetro digital.

O meio de cultura Sabourand foi usado para o crescimento de *Candida albicans* (ATCC 10231) e o procedimento foi o mesmo descrito para as bactérias, porém o tempo para crescimento da levedura e análise do resultado foi de sete dias e a temperatura foi mantida a 25°C .

3.11 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados apresentaram grau analítico ou foram destilados no laboratório antes do uso. Os reagentes, de grau analítico, quando não especificados, foram obtidos da Sigma.

3.12 Cromatografia em coluna (CC), cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As frações resultantes das colunas foram analisadas por CCDC e aquelas análogas foram agrupadas.

Sílica para coluna: tamanho de partícula: 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh-ASTM, (Merck).

Placas de gel de sílica: sílica GF 254 (Merck), espessura de 0,5 mm para placas analíticas e 1,0 mm para placas preparativas.

Sistemas de eluentes CCDC e CCDP: clorofórmio: metanol (98:02) e (99:01) para frações mais polares, e hexano: acetato de etila (4:1) para as mais apolares.

A revelação das placas foi feita através de irradiação com luz UV a $\lambda = 254$ nm e/ou borrifação com sulfato cérico seguido de aquecimento.

3.13 RMN

Aparelho: Bruker DPX – 300 (300 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C) e Bruker AC – 200 (200 MHz ^1H , 50 MHz ^{13}C)

Solventes: DMSO- d_6 , CDCl_3 , CD_3OD e TMS (padrão interno)

3.14 Análise química da planta

3.14.1 Primeiro extrato bruto

Folhas secas e moídas de *P. cernuum* (131,0 g), coletadas em março de 1996 em Picinguaba - S.P., foram extraídas com diclorometano (3 X) gerando 4,6 g de extrato bruto.

3.14.2 Fracionamento do extrato bruto e isolamento dos constituintes

Do extrato bruto 1,5 g foram submetidos à cromatografia em coluna com gradiente de hexano-acetato de etila. As frações 37-40 (62,7 mg) foram purificadas através de cromatografia em camada delgada preparativa com clorofórmio:metanol (99:1) resultando em 2,2 mg de cubebina. A fração 41 (174 mg) foi submetida à cromatografia em coluna (20 g) eluída com gradiente de clorofórmio:metanol. As frações 12-14 provenientes desta coluna forneceram 22,6 mg de ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico (**figura 4, pág. 61**).

3.14.3 Segundo extrato bruto

Folhas secas e moídas de *P. cernuum* (500 g), coletadas em fevereiro de 1998 em Picinguaba - S.P., foram extraídas com metanol (5 X) fornecendo 90 g de extrato bruto. Esse extrato foi suspenso em solução de metanol:água 20% e o precipitado formado (18,1 g) foi filtrado em celite. Com o extrato hidroalcoólico resultante foi feita partição com hexano (1 X 300 mL) cuja concentração resultou na obtenção de 1,6 g de extrato hexânico. O extrato diclorometânico (8,4 g) foi obtido posteriormente com extrações sucessivas com diclorometano, a partir do extrato hidroalcoólico resultante da extração com hexano.

3.14.4 Fracionamento do extrato diclorometânico

Foram obtidos 8,4 g de extrato diclorometânico, onde 3,0 g foram separados e submetidos em cromatografia em coluna de gel de sílica (**figura 5, pág. 61**).

a) cromatografia em coluna de gel de sílica (300g) em hexano (fr. 1 a 12); hexano:acetato de etila 99:01 (fr. 13 a 15); 98:02 (fr. 16 a 18); 95:05 (fr. 19 a 22); 90:10 (fr. 23 a 25); 80:20 (fr. 26 a 28); 70:30 (fr. 29 a 37); 1:1 (fr. 38 a 40); acetato de etila (fr. 41); acetato de etila:metanol 1:4 (fr. 42 a 43); frações coletadas de 200mL.

b) cromatografia em coluna de gel de sílica (23g) clorofórmio (fr. 1 a 9); clorofórmio:metanol 99:01 (fr. 10 a 38); 95:05 (fr. 39 a 45); 90:10 (fr. 46 a 52); 80:20 (fr. 53 a 59); 1:1 (fr. 60 a 63); metanol (fr. 64 e 65); frações coletadas de 15mL.

F- fração de coluna; R- reunião de frações semelhantes.

Figura 4- Fracionamentos do extrato bruto diclorometânico de *P. cernuum*.

cromatografia em coluna de gel de sílica (260g) em clorofórmio (fr. 1 a 9); clorofórmio:metanol 99:01 (fr. 10 a 27); 95:05 (fr. 28 a 30); frações coletadas de 200mL.

Figura 5- Fracionamento do extrato diclorometânico obtido através do extrato metanólico bruto em folhas de *P. cernuum*.

3.14.5 Fracionamento de D5,6

As frações D5 e D6 (D5,6) foram reunidas e submetidas à cromatografia em coluna de gel de sílica conforme **figura 6 (pág. 62)**. As frações D8-7, D8-8 e D8-9 foram reunidas (D8-789) e a massa total foi submetida à cromatografia preparativa em clorofórmio:metanol (99:01), onde foram recolhidas 4 frações.

A primeira faixa continha aparentemente uma mistura de duas substâncias, codificadas como D8-789a e outra mais polar codificada como D8-789b, que após nova purificação em cromatografia preparativa em clorofórmio:metanol (99:01), foi analisada por RMN de ^1H e de ^{13}C , EM e identificada como mistura de: 3,5-dimetóxi-4-hidróxi-di-hidrocinamato de metila (**E1**) e 3,5-dimetóxi-4-hidroxicinamato de metila (**E2**). A substância D8-789a (3,4-dimetóxi-diidrocinamato de metila) foi isolada da fração anterior, D5,6. A segunda faixa continha a substância codificada como D8-789c, que através de comparação com amostra autêntica e análise por RMN de ^1H , foi identificada como sendo a lignana cubebina.

a) Fracionamento em coluna de gel de sílica em hexano:acetato de etila 9:1 (fr.1 a 19); hexano:acetato de etila 8:2 (fr. 20 e 21); acetato de etila (fr.22); frações coletadas de 50 mL.

Figura 6 - Fracionamento de D5,6.

3.14.6 Fracionamento de D8

O fracionamento dessa fração foi iniciado por uma cromatografia em coluna (item 3.14.4, **pág. 60**) e está descrito em detalhes na **figura 7 (pág. 63)**.

Fracionamento em coluna de gel de sílica (40g) em hexano (fr.1 a 5); hexano:acetato de etila 9:1 (fr. 6 a 9); hexano:acetato de etila 8:2 (fr. 10 a 27); hexano:acetato de etila 7:3 (fr. 28 a 41); hexano:acetato de etila 6:4 (fr. 42 a 45); hexano:acetato de etila 1:1 (fr. 46 a 49); acetato de etila (fr. 50 a 53); acetato de etila:metanol 1:1 (fr. 54); frações coletadas de 50 mL.

Figura 7- Fracionamento de D8.

3.15 Análise química das suspensões celulares

3.15.1 Preparação, fracionamento do extrato bruto e isolamento da tiramina a partir das células de *P. cernuum*

O extrato bruto foi preparado a partir de 30,0 g de células frescas que, extraídas com metanol, forneceram 170,0 mg, que posteriormente foram dissolvidos em água e extraídos com *n*-butanol. Uma fração (46,0 mg) obtida do extrato butanólico (82,3 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa com CHCl₃:MeOH (7:3) fornecendo 23,0 mg de tiramina. A dopamina foi identificada em mistura com tiramina por análise de espectro de RMN de ¹H da fração *n*-butanólica. A sequência do isolamento da tiramina está descrita na **figura 8 (pág. 64)**.

- a) solubilização em água e extração com n-butanol;
 b) solubilização em metanol;
 c) filtração em fase reversa;
 d) cromatografia em camada delgada preparativa em clorofórmio:metanol 7:3

Figura 8- Esquema do fracionamento do extrato bruto obtido das células de *P. cernuum*.

3.16 Análise de aminas no extrato bruto metanólico das folhas de *P. cernuum*

Com a finalidade de verificar a presença de tiramina e dopamina no extrato bruto metanólico proveniente das folhas de *P. cernuum* foi realizada a metodologia indicada na **figura 9** (pág. 65).

- a) ressuspensão do extrato bruto em 50 mL de solução aquosa de ácido fosfórico 0,1% (v/v);
 b) filtração e nova extração do precipitado com 50 mL de solução aquosa de ácido fosfórico 0,1%;
 c) neutralização com carbonato de sódio;
 d) extração com 3x50 mL de clorofórmio;
 e) extração com 5x50 mL de butanol.

Figura 9- Esquema do fracionamento do extrato bruto metanólico para extração da amina do extrato de folhas de *P. cernuum*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises dos metabólitos secundários das folhas de *P. cernuum*

4.1.1. Análise do óleo volátil das folhas por cromatografia gasosa (realizada pela Dra. Renata P. Limberger na Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Em angiospermas são 15 as famílias pertencentes à classe das dicotiledôneas capazes de elaborar óleos voláteis. Apesar da família Piperaceae estar incluída neste grupo e dos vários trabalhos publicados sobre óleos voláteis do gênero *Piper*, a espécie *P. cernuum* não apresentou bom rendimento de óleo volátil bruto. A partir de 270 g de folhas frescas foram extraídos 102 mg do óleo correspondendo a um rendimento de 0,038%.

Foram identificadas 37 substâncias, através de CG-EM (**figura 10, pág. 66**), representando 98,91% dos constituintes do óleo volátil, sendo a maioria constituída por sesquiterpenos (80,03%) (**figura 11, pág. 68**), seguida por monoterpenos (18,88%). Dos sesquiterpenos, os mais abundantes são biciclogermacreno (21,88%) e β -cariofileno (20,69%) seguidos por germacreno D (6,68%), germacreno A (4,15%), globulol (3,08%), α -cadinol (2,84%) e espatulenol (2,26%) (**tabela 1, pág. 67**). Apesar dos extratos de folhas de *P. cernuum* apresentarem fenilpropanóides em sua composição, não foi detectada nenhuma substância derivada da via do ácido chiquímico no óleo volátil de suas folhas.

Figura 10- Cromatograma do óleo volátil das folhas de *P. cernuum*, obtido em cromatógrafo a gás, equipado com coluna capilar DB-5, com temperatura de 60° a 300°C, 3°C/min.

Tabela 1- Constituintes químicos do óleo volátil de *P. cernuum* com seus respectivos índices de *kovats* e concentrações relativas analisados em CG-EM.

constituintes	Abundância relativa (%)	IKDB5	IKCW
α -pineno (2)	7,16	924	1039
sabineno (3)	0,27	961	1111
β -pineno (4)	6,15	966	1103
mirreno (5)	0,50	978	1147
α -terpineno (6)	0,97	1006	1165
<i>p</i> -cimeno (7)	0,61	1013	1252
limoneno (8)	0,52	1017	1184
(<i>Z</i>)- β -ocimeno (9)	0,14	1034	1218
(<i>E</i>)- β -ocimeno (10)	1,88	1045	1233
terpinoleno (11)	0,68	1074	1264
α -copaeno (13)	1,48	1357	1471
β -bourboneno (14)	0,20	1366	1495
β -cubebeno (15)	0,45	1371	1516
β -elemeno (16)	3,02	1374	1578
β -cariofileno (17)	20,69	1404	1584
aromadendreno (18)	0,36	1421	1588
α -humuleno (19)	1,74	1437	1649
alo-aromadendreno (20)	0,23	1444	1624
germacreno D (21)	6,68	1467	1692
viridifloreno (22)	0,62	1472	1706
biciclogermacreno (23)	21,88	1487	1721
α -muuroleno (24)	0,31	1489	1711
germacreno A (25)	4,15	1495	1747
δ -cadineno (26)	1,54	1509	1744
(<i>E</i>)-nerolidol (28)	1,28	1548	2020
ledol (29)	0,67	1551	1998
espatulenol (30)	2,26	1562	2098
óxido de cariofileno (31)	0,74	1566	1954
globulol (32)	3,08	1569	2047
<i>epi</i> -globulol (33)	2,21	1576	2057
eudesmol (isômero não identificado) (34)	0,82	1585	2027
1-10-di- <i>epi</i> -cubenol (35)	0,20	1610	---
<i>iso</i> -espatulenol (36)	0,26	1621	2200
τ -cadinol + τ -muurolol (37)	1,72	1626	2147
cubenol (38)	0,60	1630	---
não identificado (39)	0,49	1636	---
α -cadinol (40)	2,84	1640	2230
total		99,40	
não identificado		0,49	
identificado		98,91	

IKDB5- índice de kovats em coluna DB-5

IKCW- índice de kovats em coluna carbowax 20M

Figura 11- Estruturas químicas dos constituintes presentes no óleo volátil de *P. cernuum*.

4.1.1.1 Atividade antimicrobiana

Os diversos trabalhos citados em Dorman & Deans, (2000) relativos à inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas pelos óleos voláteis de plantas indicam que alguns óleos inibem indiferentemente os dois tipos de bactérias e são igualmente eficazes contra ambos os tipos de bactérias. Por outro lado, há autores que relatam maior resistência de bactérias Gram positivas frente à propriedade antibacteriana de óleos, observando-se também o inverso para outros óleos de diferentes espécies, onde bactérias Gram positivas são mais susceptíveis à inibição.

Dos 3 microrganismos testados para a análise antimicrobiana qualitativa apenas *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou sensibilidade frente ao óleo volátil de *P. cernuum* (tabela 2, pág. 69).

Embora a amostragem de microrganismos testados não seja significativa, pode-se especular a capacidade do óleo desta espécie de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e ser inativo contra Gram-negativas. Esta tendência pode ser melhor avaliada aumentando-se o número de cepas de microrganismos Gram positivos e negativos.

Tabela 2- Halos de inibição de crescimento em mm correspondentes à atividade antimicrobiana do óleo volátil de *P. cernuum* determinada pelo método de difusão em ágar.

Microrganismos	Eugenol Halo de inibição (média ± desvio padrão)	Óleo volátil Halo de inibição (média ± desvio padrão)
<i>Staphylococcus aureus</i>	21,6 ± 0,9	13,3 ± 0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0
<i>Candida albicans</i>	28,9 ± 1,3	12,2 ± 0,6

(n=média de 3 determinações)

4.1.1.2 Relação entre atividade antimicrobiana e componentes do óleo volátil

A atividade antimicrobiana do óleo está relacionada com a sua composição química, porcentagem relativa no óleo das substâncias que exercem a atividade e possível efeito sinérgico entre estas substâncias.

Na busca de dados na literatura sobre a atividade antimicrobiana de componentes isolados do óleo volátil, o α -pineno, presente em 7,2% do óleo bruto de *P. cernuum*, apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* segundo Raman *et al.* (1995). Não foram

encontradas informações com respeito à atividade antimicrobiana sobre os outros componentes majoritários (β -pineno 6,1%, β -cariofileno 20,7% e biciclogermacreno 21,9%) do óleo bruto de *P. cernuum*, que poderiam explicar esta atividade.

A presença de determinados grupos funcionais nas moléculas e estereoquímica influenciam esta atividade. Entre os grupos funcionais mais importantes que conferem a atividade antimicrobiana aos óleos (por ex. fenol, cetona, aldeído, acetato, álcool) somente álcoois de terpenos estão presentes no óleo volátil de *P. cernuum* (**figura 11, pág. 68**). Segundo Hinou *et al.* (1989) os isômeros α e *cis* dos terpenos são inativos com relação aos isômeros β e *trans*.

Dorman & Deans (2000) observaram em seus resultados a influência do tipo de substituinte alquila ligado em um anel não aromático. Os autores sugeriram que a inclusão de uma dupla ligação na cadeia lateral alquílica aumenta a atividade antimicrobiana principalmente frente a bactérias Gram negativas. Esta hipótese pode explicar a inatividade do óleo volátil das folhas de *P. cernuum* frente a *Peudomonas aeruginosa*, uma vez que os terpenos com cadeia lateral alquila estão presentes em maioria no óleo.

4.1.2. Análise da planta intacta

A análise preliminar do extrato diclorometânico bruto das folhas de *P. cernuum* através da RMN de ^1H indicou um predomínio de substâncias alifáticas e também a presença de substâncias aromáticas (δ 6,5 - 7,0), além de sinais de hidrogênios metoxílicos em (δ 3,8 - 4,0) conforme apresentado na **figura 12 (pág. 71)**.

Figura 12- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, em CDCl_3) do extrato bruto das folhas.

4.1.2.1 Identificação da substância A1

O espectro de RMN de ^1H da substância A1 (**figura 13, pág. 72**) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos (δ 6,6 - 6,8, 3H). Tais sinais apresentaram duas constantes de acoplamento relativas a hidrogênios em orto (δ 6,75 e δ 6,72, $J = 8,7$ Hz) (δ 6,72 e 6,69, $J = 8,8$ Hz). Os sinais em δ 3,79, indicativos de metoxilas, apresentaram integração relativa a 6 hidrogênios, portanto duas metoxilas. Os dois tripletos em δ 2,60 e 2,84 são característicos de metilenos α -carbonílicos ou benzílicos. O espectro de RMN de ^{13}C (**figura 14, pág. 73**) indicou a presença de onze carbonos, nos quais seis foram atribuídos aos carbonos aromáticos. O sinal observado em δ 177,98 corresponde ao carbono carboxílico enquanto que os sinais em δ 30,28 e 35,72 correspondem aos carbonos CH_2 α -carbonílicos ou benzílicos. Os deslocamentos químicos e multiplicidades desta substância estão descritos na **tabela 3 (pág. 83)**. A presença da carbonila foi confirmada através da análise do espectro no infravermelho, que apresentou banda em 1701 cm^{-1} (**figura 15, pág. 73**), enquanto que o espectro de massas (**figura 16, pág. 74**) indicou íon molecular em m/z 210. A substância A1 foi identificada como sendo o ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico.

Figura 13- Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) da substância A1 (ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico) e na figura abaixo, expansão da região δ 6,6 e 6,8.

Figura 14- Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, em CDCl_3) da substância A1.

Figura 15- Espectro no infra-vermelho da substância A1, realizado em disco de KBr.

Scan 33 (1.179 min) of DATA:455.D

ACIDO

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
50.95	12	70.95	2	95.05	2	125.05	1
51.95	6	72.95	1	95.95	1	133.05	1
52.80	7	73.95	1	97.05	1	134.20	1
53.95	1	74.95	1	99.05	1	135.05	4
54.95	7	76.95	20	101.95	1	136.05	2
55.95	1	77.95	11	103.05	4	137.05	2
56.95	3	78.95	12	104.05	1	138.05	1
57.95	1	79.95	2	105.05	7	139.05	1
58.80	1	81.05	2	106.05	5	149.05	8
59.95	1	82.05	2	107.05	14	151.05	100
60.95	1	82.95	6	108.05	5	152.05	8
61.95	2	84.05	1	109.05	2	153.05	1
62.95	6	84.95	4	111.05	1	163.05	1
63.95	2	86.95	1	117.95	1	164.05	2
64.95	12	88.95	3	119.05	3	165.05	1
65.95	3	89.95	3	120.05	1	179.05	1
66.95	3	90.95	14	121.05	8	195.20	1
67.95	1	91.95	3	122.05	2	210.20	24
68.95	2	93.05	3	123.05	1	211.20	3
70.05	1	93.95	1				

Figura 16- Espectro de massas da substância A1, a 70 eV.

4.1.2.2 Identificação da substância A2

Da fração D5,6-4 foi obtida a substância **A2**. A análise de RMN de ^1H (**figura 17, pág. 76**) desta substância indicou a presença de hidrogênios aromáticos (δ 6,71 - 6,82, 3H), 3 grupamentos metoxílicos em δ 3,66 (3H), δ 3,86 (3H) e δ 3,84 (3H). O sinal em δ 3,66 é indicativo de metoxila de ésteres. Por comparação dos sinais dos hidrogênios aromáticos desta substância com os sinais dos hidrogênios aromáticos do ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico, bem como de suas constantes de acoplamento, conclui-se que o padrão de substituição no anel aromático é idêntico ao caso anterior bem como as metoxilas (δ 3,86 e 3,84) nas posições 3 e 4. A possibilidade desta substância ser o éster metílico de **A1** foi confirmada pela obtenção do espectro de RMN de ^{13}C (**figura 18, pág. 77**) que apresentou sinal correspondente ao carbono carboxílico em δ 173,34 e banda em 1736 cm^{-1} em análise através no infra-vermelho (**figura 19, pág. 77**). A fórmula molecular foi obtida por espectrometria de massas, com m/z 224 (**figura 20, pág. 78**). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 12 sinais cujas multiplicidades dos carbonos e seus respectivos deslocamentos químicos, compatíveis com os sinais registrados para **A1**, correspondem ao éster metílico do ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico (**tabela 3, pág. 83**). A substância **A2** foi portanto identificada como sendo 3,4-dimetóxi-di- hidrocinamato de metila.

Figura 17- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, em CDCl_3) da substância **A2** (3,4-dimetóxi-di- hidrocínato de metila).

Figura 18- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, em CDCl_3) da substância A2.

Figura 19- Espectro no infra-vermelho da substância A2, realizado em KBr.

Scan 43 (1.547 min) of DATA:453.D

ESTER-DI

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
50.95	12	74.95	1	104.05	2	136.05	1
51.95	5	76.95	20	105.05	6	137.05	1
52.95	6	77.95	11	106.05	5	138.05	1
53.95	1	78.95	10	107.05	11	139.05	1
54.95	4	80.05	2	108.05	4	149.05	13
56.95	1	81.05	1	109.05	1	151.05	100
58.95	14	82.55	2	118.05	2	152.05	9
59.95	1	89.05	4	119.05	3	164.05	12
61.95	2	90.05	4	120.05	2	165.05	4
62.95	6	91.05	16	121.05	9	167.05	2
63.95	3	92.05	3	122.05	2	181.20	1
64.95	12	93.05	3	123.05	1	193.05	2
65.95	2	94.05	1	133.05	1	209.20	1
66.95	1	95.05	1	134.05	2	224.20	25
68.95	1	102.05	1	135.05	4	225.20	3
73.95	1	103.05	5				

Figura 20- Espectro de massas da substância A2 a 70 eV.

4.1.2.3 Identificação das substâncias **E1** e **E2**

A análise do espectro de RMN de ^1H (**figura 21, pág. 80**) indicou a presença de sinais referentes a **E1**, isolado em quantidade majoritária, e **E2**, em quantidade minoritária. Em δ 6,42 (2H) e δ 6,77 (2H) foram observados dois singletos, atribuídos respectivamente a **E1** e **E2**. Os singletos em δ 3,70 (6H) e δ 3,87 (6H) podem ser associados aos grupamentos metoxílicos de **E1**, enquanto que os singletos em δ 3,90 (6H) e δ 3,80 (3H) podem estar relacionados aos grupamentos metoxílicos de **E2**. Os 2 tripletos em δ 2,88 e δ 2,62 (2H) referem-se aos metilenos da cadeia lateral de **E1**.

Os prótons olefínicos da cadeia lateral de **E2** apresentaram 2 dupletos, um em δ 7,63 e δ 7,58 ($J=15,8$ Hz, 1H) para H7 e outro em δ 6,33 e δ 6,28 ($J=15,8$ Hz, 1H) para H8 com integração relativa a 1 hidrogênio para cada duplete. Os dados dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (**figura 22, pág. 81**) para as substâncias **E1** e **E2** estão apresentados na **tabela 4 (pág. 83)**. A banda em 1730 cm^{-1} confirma a carboxila de éster (**figura 23, pág. 81**). O espectro de massas indicou íon molecular em m/z 240 e em m/z 238 (**figura 24, pág. 82**). Estas substâncias foram identificadas como sendo 3,5-dimetóxi-4-hidróxi-di-hidrocinamato de metila e 3,5-dimetóxi-4-hidroxicinamato de metila respectivamente.

Figura 21- Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) das substâncias **E1** (3,5-dimetóxi-4-hidróxi-di-hidrocinamato de metila) e **E2** (3,5-dimetóxi-4-hidroxicinamato de metila).

Figura 22- Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em CDCl_3) das substâncias **E1** e **E2**.

Figura 23- Espectro no infra-vermelho das substâncias **E1** e **E2**, realizado em disco de KBr.

Scan 69 (2.569 min) of DATA:505.D
ESTER

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
26.80	7	63.95	3	103.95	2	150.05	2
27.95	2	64.95	9	104.95	6	151.05	4
28.80	10	65.95	6	106.05	4	152.05	2
30.80	4	66.95	6	107.05	4	163.05	4
37.80	3	68.95	5	108.05	2	165.05	10
38.80	11	75.95	2	109.05	3	167.05	100
39.95	2	76.95	15	119.05	6	168.05	10
40.95	9	77.95	7	120.05	3	175.05	6
41.80	5	78.95	8	121.05	9	177.05	3
42.95	13	80.95	4	122.05	5	178.05	2
44.80	4	83.05	2	123.05	8	179.05	5
49.95	4	85.05	2	124.05	2	180.05	19
50.95	9	88.95	2	133.05	3	181.05	6
51.95	4	90.95	9	134.05	10	207.05	8
52.80	10	91.95	3	135.05	6	208.20	2
53.95	2	93.05	4	136.05	3	209.20	4
54.95	10	93.95	3	137.05	9	238.05	21
56.95	5	95.05	4	147.05	3	240.20	39
58.95	9	97.05	2	149.05	8	241.20	5
62.95	4	103.05	3				

Figura 24- Espectro de massas das substâncias E1 e E2.

Tabela 3- Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico (A1) e do 3,4-dimetóxi-di-hidrocinamato de metila (A2).

A1	δ	A2	δ
C1 (Cq)	132,83	C1 (Cq)	133,24
C2 (CH)	111,78	C2 (CH)	111,83
C3 (Cq)	149,00	C3 (Cq)	149,01
C4 (Cq)	147,65	C4 (Cq)	147,62
C5 (CH)	111,48	C5 (CH)	111,51
C6 (CH)	120,12	C6 (CH)	120,16
C7 (CH ₂)	30,28	C7 (CH ₂)	30,61
C8 (CH ₂)	35,72	C8 (CH ₂)	35,98
C9 (CO ₂ H)	177,98	C9 (C=O)	173,34
C10/C11 (2 x OCH ₃)	55,95; 55,86	C10 (OCH ₃) (éster)	51,55
---	---	C11/C12 (2 x OCH ₃)	55,95; 55,85

Tabela 4- Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do 3,5-dimetóxi-4-hidróxi-di-hidrocinamato de metila (E1) e 3,5-dimetóxi-4-hidroxicinamato de metila (E2).

E1	δ	E2	δ
C1 (Cq)	131,67	C1 (Cq)	125,83
C2 (CH)	104,93	C2 (CH)	105,09
C3 (Cq)	147,00	C3 (Cq)	145,15
C4 (Cq)	133,17	C4 (Cq)	137,22
C5 (Cq)	147,00	C5 (Cq)	145,15
C6 (CH)	104,93	C6 (CH)	105,09
C7 (CH ₂)	31,23	C7 (CH)	147,20
C8 (CH ₂)	36,17	C8 (CH)	115,57
C9 (C=O)	173,39	C9 (C=O)	173,39
C10 (OCH ₃) (éster)	51,64	C10 (OCH ₃) (éster)	51,64
C11/C12 (2 x OCH ₃)	56,30; 56,30	C11/C12 (2 x OCH ₃)	56,30; 56,30

Figura 25- Estruturas do ácido 3,4-dimetóxi-di-hidrocinâmico (A1), de 3,4-dimetóxi-di-hidrocinamato de metila (A2), 3,5-dimetóxi-4-hidróxi-di-hidrocinamato de metila (E1), de 3,5-dimetóxi-4-hidroxicinamato de metila (E2) e da cubebina (C).

4.1.2.4 Identificação da substância C

Esta substância foi identificada através da análise dos dados obtidos por RMN de ^1H (**figura 26, pág. 84**), que apresentaram os seguinte sinais: δ 6,74 a δ 6,50, (m), δ 2,10 a δ 2,20 (2H, m), δ 2,40 a δ 2,64 (4H, 2m, H7, H7', H8, H8'), δ 3,55 a δ 3,82 (2H, m, H9'), δ 5,23 (1H, s, H9) 5,90 (4H, s, $-\text{O}_2\text{CH}_2$). A substância C foi identificada com sendo a cubebina, através da comparação por cromatografia em camada delgada comparativa com amostra autêntica.

Figura 26- Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância C (cubebina).

4.1.3 Análise química das suspensões celulares

O espectro de RMN de ^1H (**figura 27, pág. 85**) do extrato metanólico bruto das suspensões celulares apresentou sinais correspondentes a duas substâncias aromáticas majoritárias que foram isoladas e identificadas como tiramina (**S1**) e dopamina (**S2**). Estas aminas aromáticas são produzidas pelas células e excretadas em menor quantidade para o meio de cultura (**figura 28, pág. 86**). Elas são formadas através da descarboxilação da tirosina mediada pela enzima tirosina descarboxilase e não foram encontradas na planta intacta.

Figura 27- Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO- d_6) do extrato metanólico bruto das suspensões celulares.

A

B

Figura 28- Espectros de RMN de ^1H (300 MHz, em D_2O) dos extratos brutos das suspensões celulares (A) de *P. cernuum* e do meio de cultura (B).

4.1.3.1 Identificação da substância S1

O espectro de RMN de ^1H (**figura 29, pág. 87**) da substância **S1** apresentou dois dubletos (δ 7,00 a 6,64) correspondentes aos hidrogênios aromáticos, com relação *orto* entre esses. Os dois tripletos em δ 3,00 e 2,78 são correspondentes aos metilenos CH_2 -7 e CH_2 -8 e um singlete largo em δ 1,83 que foi atribuído ao grupo NH_2 . Os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (**figura 30, pág. 88**) (**tabela 5, pág. 88**) desta substância e o íon molecular indicado no espectro de massas (**figura 31, pág. 89**) possibilitaram confirmar a estrutura da tiramina.

Figura 29- Espectro de RMN de ^1H (300 MHz em D_2O) da substância **S1** (tiramina).

Figura 30- Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz em D_2O) da substância **S1** (tiramina).

Tabela 5- Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C da tiramina.

carbonos	δ
C1 (Cq)	128,52
C2 (CH)	130,77
C3 (CH)	116,70
C4 (Cq)	157,68
C5 (CH)	116,70
C6 (CH)	130,77
C7 (CH_2)	33,89
C8 (CH_2)	42,28

Figura 31- Espectro de massas da substância S1 (tiramina).

4.1.3.2 Identificação da substância S2

Esta substância foi identificada em mistura por RMN¹H e apresentou os seguintes sinais: δ 6,65 (1H, *d*, *J*=8,5, H5), δ 6,59 (1H, *d*, *J*=2,1, H2), δ 6,47 (1H, *dd*, *J*=2,1, 8,5, H6), 2,90 (2H, *t*, 6,5, H7), 2,78 (2H, *t*, 6,5, H8) (figura 32, pág. 90) e também por comparação com amostra autêntica através de CLAE conforme item 3.9.2 (pág. 56). A substância S2 foi identificada como sendo a dopamina.

Figura 32- Região expandida do espectro entre δ 6,4 e 7,1 de RMN de ^1H (300 MHz, em DMSO-d_6) obtido para o extrato bruto das suspensões celulares de *P. cernuum*.

Figura 33- Estruturas da tiramina (S1) e dopamina (S2).

4.1.3.3 Produção de tiramina e dopamina pelas suspensões celulares de *P. cernuum*

As feniletilaminas tiramina e dopamina são intermediárias na biossíntese de alcalóides benzoisoquinolínicos e de amidas derivadas do ácido hidrocínâmico (Facchini, 1998). Estas feniletilaminas foram isoladas das suspensões celulares de *P. cernuum* e não foram detectadas

na planta diferenciada. O isolamento da tiramina foi anteriormente descrito para algumas plantas tais como *Acacia berlandieri* (Clement *et al.*, 1997), *Pastinaca sativa* (Carter *et al.*, 1998), e *Pilosocereus maxonii* (Pummangura *et al.*, 1977).

Apesar das catecolaminas (dopamina) serem neurotransmissores em mamíferos, foram encontradas em 44 famílias de plantas, onde nenhuma função metabólica essencial está ainda estabelecida para estas substâncias (Kuklin & Conger, 1995). Um exemplo disto é a descrição feita por Wichers *et al.* (1993) nas análises do conteúdo de catecóis durante o crescimento de *Mucuna pruriens*, onde a dopamina está presente apenas nas folhas desta planta. Outro exemplo de acúmulo de dopamina em plantas é o citado por Kamo & Mahlberg, (1984) para *Papaver somniferum*. Em Piperaceae, a dopamina foi isolada de *Piper amalago* (pág. 11).

A produção de tiramina e dopamina pelas suspensões celulares de *P. cernuum* tem função ainda desconhecida. Especula-se que as catecolaminas estejam implicadas em uma possível ação protetora contra insetos predadores, lesões na planta e durante o processo de desintoxicação de nitrogênio (Kuklin & Conger, 1995). Segundo Dai *et al.* (1993) uma outra função das catecolaminas dopamina, norepinefrina e epinefrina seria estimular a produção de etileno em culturas de suspensões celulares de batata, sugerindo assim uma ligação entre estas aminas de ocorrência natural e o etileno em plantas.

Nenhum alcalóide benzoisoquinolínico foi detectado em extratos da planta diferenciada de *P. cernuum* e nem nos extratos das suspensões celulares ou meio de cultura por meio da espectroscopia de RMN¹ de H através da análise de sinais de hidrogênios aromáticos (**figura 28, pág. 86**). Isto pode indicar que as reações enzimáticas subseqüentes à formação da tiramina e dopamina, envolvidas na biossíntese destes alcalóides, deixam de ocorrer ou porque estas enzimas não estão ativadas ou devido à falta de expressão destas enzimas nas culturas de suspensões celulares de *P. cernuum*. Hara *et al.* (1993) relataram que a produção de berberina pôde ser induzida através da adição de 6-benzil-aminopurina (BAP) às células de *Thalictrum minus*, cultivadas em suspensão em um meio contendo ácido 2,4-diclorofenóxi-acético (2,4-D). Na presença de BAP, o precursor *L*-tirosina foi rapidamente convertido à berberina, enquanto que quantidades substanciais dos intermediários tiramina e dopamina acumularam em células cultivadas no mesmo meio de cultura, porém na ausência de BAP. Este é um exemplo de ativação das enzimas relacionadas com a produção de alcalóides que foi citado anteriormente.

Wichers *et al.* (1993) identificaram a dopamina em culturas de suspensões celulares de *Mucuna pruriens* e observaram que o seu nível foi drasticamente elevado com a adição do regulador de crescimento 2,4-D ao meio de cultura, sugerindo que a indução da produção de dopamina seja uma consequência específica provocada por este regulador. Como as células de *P. cernuum* também produzem dopamina e são cultivadas em meio suplementado com 2,4-D, pode-se considerar também esta outra hipótese como causa da produção desta catecolamina, considerando que ela não participa como precursor de alcalóides benzoisoquinolínicos nas suspensões de *P. cernuum*.

4.1.3.4 Metabolismo secundário de *P. cernuum*

A análise dos extratos brutos da planta intacta de *P. cernuum*, frações purificadas e substâncias isoladas indica que a origem biossintética dos metabólitos secundários desta espécie vegetal seja predominantemente fenilpropanoídica, com acúmulo de derivados do ácido cinâmico e somente uma lignana **figura 34 (pág. 94)**. Por sua vez, as suspensões celulares de *P. cernuum* apresentaram como principais metabólitos somente feniletilaminas que são derivadas da descarboxilação da tirosina. Esta última reação é catalisada pela enzima tirosina descarboxilase. A metodologia direcionada para extração de aminas do extrato bruto metanólico das folhas de *P. cernuum* (**figura 9, pág. 65**) corrobora com esta hipótese, uma vez que não foram encontrados sinais correspondentes à presença destas substâncias nos espectros de RMN de ^1H desta fração.

Resultado semelhante foi obtido por Danelutte (2001) onde a planta intacta de *Piper crassinervium* acumulou substâncias provenientes da via fenilpropanoídica, enquanto que as suspensões celulares apresentaram essencialmente alcalamidas, que são substâncias que têm como precursores as feniletilaminas. As alcalamidas produzidas por estas suspensões celulares são metabólitos mais complexos e requerem diversas etapas, incluindo a formação de ácidos aristolactâmicos como intermediários.

As diferenças nas vias biossintéticas em planta intacta e suspensões celulares podem ser associadas com os mecanismos de regulação da biossíntese de metabólitos secundários em culturas de células. Muitas vezes as células diferenciadas estão envolvidas na expressão de metabólitos secundários que não são acumulados em células não diferenciadas e *vice-versa*.

Existem evidências de correlação entre diferenciação morfológica da célula e produção de metabólitos secundários (van der Heijden, 1989, Sierra, 1991).

Esta diferenciação pode ser observada em dois níveis: a citodiferenciação, envolvendo mudanças na forma, estrutura e função de células individuais e o outro correspondente às mudanças na organização celular, formando estruturas mais ou menos reconhecidas morfológicamente. O primeiro nível abrange mudanças na velocidade e tipo de divisão celular resultando em mudanças na organização subcelular e no padrão do metabolismo (Sierra, 1991).

As suspensões celulares constituem-se freqüentemente de agregados de células sendo que o tamanho deles é um fator determinante do perfil de uma cultura. As células comportam-se de maneira diferente quando estão em agregados maiores ou menores possivelmente devido aos diferentes micro ambientes nos quais as células estão expostas. Agregados celulares muito compactados também mostram algum grau de organização morfológica ou exibem funções especializadas. Uma cultura de células vegetais é extremamente heterogênea e possui muitos tipos de células diferentes com características variadas em níveis fisiológico, morfológico e genéticos. A variação pode resultar da expressão genética diferencial de células em diferentes estados. Estes diferentes tipos celulares vão apresentar características diversas na produtividade de um determinado metabólito secundário (Otha & Verpoorte, 1992).

Fatores ambientais tais como composição do meio de cultura, pH, luz e temperatura de cultivo também podem influenciar a regulação do metabolismo secundário das suspensões celulares de plantas (van der Heijden, 1989).

Considerando que o curso biossintético dos metabólitos secundários em suspensões celulares seja afetado pelos fatores citados acima, e devido à complexidade em analisar tais fatores, não é ainda possível avaliar a causa da diferença da produção de metabólitos na planta intacta em suspensões celulares de *P. cernuum*.

As espécies brasileiras de *Piper* estudadas até o momento acumulam diferentes classes de metabólitos secundários. Alguns exemplos são citados para *Piper regnellii* que apresenta fenilpropanóides e neolignanas em sua composição química (Benevides *et al.*, 1999), *Piper solmsianum*, que contém fenilpropanóides e lignanas (Martins *et al.*, 2000), *Piper crassinervium*, flavonóides e hidroquinonas preniladas (Danelutte, 2001), *Piper aduncum*, que biossintetiza ácidos benzóicos prenilados, sesquiterpenos, flavonóides e esteróides (Baldoqui

et al., 1999, Moreira, *et al.*, 1998a, Torres-Santos *et al.*, 1999) e *Piper lhotzkyanum*, que contém flavonóides, cromeno, sesquiterpenos, derivados de ácido benzóico, metil-ferulato e di-hidro-ferulato (Moreira *et al.*, 1998, Moreira *et al.*, 2000). Os alcalóides e amidas foram isolados de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum* (Navickiene *et al.*, 2000, de Araújo-Júnior *et al.*, 1997, Júnior *et al.*, 1999, Alécio *et al.*, 1998). Um exemplo curioso ocorre com a espécie *Piper marginatum*, que ao contrário das outras espécies de *Piper* citadas anteriormente, inclui rotas metabólicas direcionadas tanto para a produção de fenilpropanóides e fenilalcanóides como para síntese de amidas (Santos & Chaves, 1999a e 1999b, Santos *et al.*, 1997, Santos *et al.*, 1998a).

P. cernuum apresenta um metabolismo secundário relativamente simples quando comparado com as outras espécies, uma vez que nesta espécie foram encontrados somente fenilpropanóides e a lignana cubebina em reduzida quantidade relativa nas folhas, além dos mono e sesquiterpenos, a maioria não oxigenados, no óleo volátil das mesmas.

Figura 34- Metabolismo secundário de *P. cernuum* (planta e suspensões celulares).

4.2 Atividade específica da PAL em plântulas e planta adulta de *P. cernuum*

4.2.1 Plântulas cultivadas em campo e *in vitro*

A enzima PAL foi descrita originalmente por Koukol & Conn (1961) em plântulas de cevada. A sua reação de catálise consiste na eliminação de amônia e hidrogênio pró-*S* da *L*-fenilalanina, sendo este o primeiro passo envolvido na biossíntese de fenilpropanóides em plantas superiores (Hanson & Havir, 1981).

Vários trabalhos relacionaram a atividade da PAL com a formação de metabólitos secundários (Harrison & Dixon, 1993, Wink & Lehmann, 1996, Biagioni *et al.* 1997, Lavola *et al.*, 2000). Apesar de ser considerada uma enzima reguladora do metabolismo fenilpropanoídico, nem sempre um aumento na sua atividade está diretamente relacionado com a produção de um determinado fenilpropanóide (Camm & Towers, 1977).

A excisão e lesões inferidas no tecido vegetal, bem como transferência do tecido vegetal para um ambiente diferente, infecção por patógenos de plantas (vírus, fungos ou polissacarídeos derivados deles) são alguns fatores que induzem a atividade da PAL, refletindo a relação do aumento da atividade enzimática com a formação de substâncias envolvidas no mecanismo de defesa da planta (Camm & Towers, 1977, Smith & Rubery, 1979, Duchesne *et al.*, 1977, Hahlbrock & Griesbach, 1979).

Vários estudos relacionados à indução da PAL por diferentes tipos de luz têm sido descritos. Em 1965, Zucker observou que a luz branca induziu a atividade da PAL em fatias de batata. Castaneda & Quintero (1991) avaliaram a atividade da PAL sob diferentes condições de luz em culturas de *Gomphrena globosa*. A atividade da PAL foi induzida sob luz azul e branca, sendo a primeira a mais significativa. A luz vermelha estimulou a atividade da PAL em plântulas de tomate (Goud *et al.*, 1991). Por outro lado, a atividade da PAL foi induzida pela luz UV em mais de 30 vezes em plântulas, culturas de calos e suspensões celulares de *Picea abies* (Messner *et al.*, 1991). Suspensões celulares de cevada apresentaram uma resposta enzimática dependente de UV resultando na formação de flavonóides (Hahlbrock *et al.*, 1976).

Os experimentos de medida da atividade da PAL para as várias partes das plântulas de *P. cernuum* foram realizados no período vespertino, em horário fixo, pois a atividade da PAL apresenta flutuações em resposta a determinados fatores ambientais, além de ter exibido ritmicidade circadiana em *Lemna perpusilla* (Lemnaceae) (Gordon & Koukkari, 1978).

A análise das atividades específicas da PAL de plântulas cultivadas *in vitro* e plântulas cultivadas em campo **tabela 6 (pág. 97)** indicou um perfil semelhante entre caules e raízes. No entanto, as plântulas cultivadas *in vitro* apresentaram valores da atividade enzimática muito superiores aos das plântulas cultivadas em campo para caules e raízes e inferiores para folhas. De modo geral, caules e raízes apresentaram maior atividade enzimática que as folhas das plântulas.

Baseado em vários relatos de literatura sobre a indução da PAL por luz, provavelmente esta enzima está mais ativada em plântulas cultivadas *in vitro* devido à exposição direta da luz branca, em fotoperíodo de 12 horas claro / escuro. As plântulas cultivadas em campo ficaram abrigadas em estufa, onde não havia incidência direta de luz (solar ou artificial).

Na busca do(s) horário(s) que apresentasse(m) pico máximo da atividade enzimática da PAL, durante o período de 24 horas, foi realizado um experimento, com intervalo de coleta a cada 3 horas, envolvendo plântulas cultivadas em campo e sob incidência de luz solar.

Os resultados apresentados na **figura 35 (pág. 98)** indicam que os níveis da atividade da PAL flutuaram significativamente, durante os horários de coleta, de acordo com a análise estatística da variância (ANOVA), para um nível de significância de 5% (**tabela 7, pág. 98**).

A atividade enzimática da PAL, extraída do caule das plântulas, apresentou oscilações rítmicas com períodos de aproximadamente 12 horas, atingindo atividades máximas às 6 e 18 horas. Este perfil sugere que a ritmicidade da PAL de *P. cernuum* não seja ativada somente pela presença de luz, visto que os picos máximos observados da atividade ocorrem em horários onde a intensidade de luz solar é menor. Este comportamento da PAL pode indicar uma ritmicidade relacionada com o relógio biológico endógeno da plântula e regulada por outro(s) mecanismo(s) mais complexo(s). Como a maioria dos organismos (desde as cianobactérias até os mamíferos), as plantas possuem relógios biológicos endógenos que coordenam eventos internos com ambientes externos. Um exemplo disto é a coordenação de suas atividades com o ciclo natural de 24 horas luz/escuro (Harmer *et al.*, 2000; Jarillo *et al.*, 2001).

Algumas vezes o relógio biológico pode ser capaz de barrar os efeitos indutivos da luz, como é o caso do gene da enzima nitrato redutase em *Arabidopsis* (Pilgrim *et al.*, 1993). Os ritmos circadianos da expressão dos genes foram observados pela primeira vez nas plantas há

mais de 13 anos atrás, porém os mecanismos de controle destes ritmos não estão ainda compreendidos (Kreps *et al.*, 2000).

A hipótese do relógio biológico endógeno para plântulas de *P. cernuum* poderia ser melhor avaliada repetindo-se o experimento descrito acima, além da utilização de modelos experimentais seguindo o acompanhamento das flutuações de atividade enzimática durante exposição à luz contínua e escuro contínuo. Porém, isto não foi possível neste trabalho devido à enorme quantidade de plântulas necessárias para o ensaio e ao tempo requerido para extração das proteínas e análise dos resultados.

Os estudos envolvendo ritmicidade da enzima PAL em plântulas são de grande relevância, visto que a atividade desta enzima está relacionada com o crescimento, desenvolvimento e defesa da planta além de ser influenciada pelas condições ambientais. Ainda, Cumming & Wagner (1968) associaram as oscilações e ritmos da PAL aos processos de crescimento e desenvolvimento de plantas.

Tabela 6- Média e desvio padrão da atividade da PAL em plântulas e planta adulta.

	planta adulta (nKat/mg proteína)	plântulas cultivadas em campo (nKat/mg proteína)	plântulas cultivadas <i>in vitro</i> (nKat/mg proteína)
Folha jovem	1,087 ± 0,008	-	-
Folha	0,037 ± 0,040	0,419 ± 0,127	0,240 ± 0,014
Caule	0,038 ± 0,202	0,912 ± 0,040	2,533 ± 0,155
Caule lignificado	0	-	-
Raiz	0,387 ± 0,014	0,899 ± 0,028	2,658 ± 0,807

Figura 35- Atividade enzimática da PAL em plântulas de *P. cernuum*, com 6 meses de idade e cultivadas em campo.

Tabela 7 - ANOVA dos valores experimentais médios de atividade enzimática da PAL das plântulas.

Fontes de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Variância	F
Entre horários	7	20,7109	2,9587	57,05*
Resíduo	136	7,0529	0,0519	
Total	143	27,7638	-	

* significativo para $p < 0,05$

4.3 Culturas de células em suspensão de *P. cernuum*

A opção pelo estudo de suspensões celulares de *P. cernuum* ao invés de cultura de calos foi feita em função do rápido crescimento das células em suspensão e devido à relativa alta homogeneidade e menor diferenciação celular, tornando-as ideais para a obtenção de grandes volumes de células. Além disso, a melhor interação das células com meio de cultura e a possibilidade de excreção dos metabólitos secundários para o meio contribuíram para esta escolha (Banthorp, 1994). Esses fatores permitem a realização de diversos ensaios com grande número de amostras visando investigar variáveis que controlam a produção de determinados metabólitos secundários. O trabalho aqui realizado com suspensões celulares de *P. cernuum* é inédito para esta espécie.

4.3.1 Caracterização das suspensões celulares de *P. cernuum*

4.3.1.1. Tamanho de inóculo de células frescas

A densidade de inóculo varia de acordo com a espécie vegetal cultivada e com o meio de cultura utilizado. Por outro lado, o comportamento da cultura de células vegetais também é dependente da quantidade de inóculo (Figueiredo, 1992).

Para o cultivo de suspensões celulares é necessário inocular uma densidade mínima de células, visto que um número mínimo de células (ou os produtos de seus metabolismos) deve(m) estar presente para que ocorra a divisão celular. No caso de este número mínimo de células não ser alcançado, a fase *lag* pode se estender durante todo o tempo em que os metabólitos requeridos para a divisão celular sejam sintetizados (Stafford & Warren, 1991).

No intuito de evidenciar os intervalos do tamanho adequado de inóculo de células frescas para *P. cernuum*, foi realizado um experimento com um aumento progressivo de quantidade de células frescas em escala exponencial compreendendo 2, 4 e 8 g / 50 mL de meio de cultura. Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios no intervalo de 2 a 4 g de acordo com os valores indicados na **tabela 8 (pág. 99)**, que duplicaram a densidade celular num período de 14 dias. Porém, 2g foram considerados insuficientes para a realização dos experimentos de caracterização das suspensões celulares. A quantidade de inóculo escolhida neste intervalo foi de 5 g, um valor próximo do intervalo e que apresentou menor oxidação no final da cultura. Com esta densidade de inóculo foi também possível obter biomassa suficiente para os experimentos relacionados às suspensões celulares de *P. cernuum*.

Tabela 8- Valores médios obtidos das matérias fresca e seca das células.

inóculo de células frescas (g/50mL)	matéria fresca (g/mL) inicial	média da matéria fresca (g/mL)	média da matéria seca (g/mL)
2	0,040	0,089 ± 0,007	0,005 ± 0,001
4	0,080	0,163 ± 0,029	0,010 ± 0,003
8	0,160	0,228 ± 0,040	0,012 ± 0,002

4.3.1.2 Acúmulo de matéria fresca e seca durante o ciclo de crescimento das suspensões celulares *P. cernuum*

Os resultados dos experimentos relativos à cultura de tecidos vegetais são expressos em descrições qualitativas bem como em medidas de natureza quantitativa. O crescimento de uma cultura durante um certo período de tempo, seja ela de calos ou de suspensão celular é caracterizado por um aumento no número de células, volume ou massa celular e também por mudanças na complexidade celular e bioquímica (Dodds & Roberts, 1995).

As culturas de células vegetais exibem uma grande diversidade de formas e tamanhos celulares. Culturas que possuem alta taxa de crescimento celular apresentam células com citoplasma denso, pequeno e rico em amido enquanto que em culturas de fase estacionária há o predomínio de células maiores e com vacúolos aumentados. As culturas de células são naturalmente anacrônicas com relação ao ciclo mitótico e em qualquer momento a cultura pode conter uma combinação de células em diferentes fases do ciclo celular (Otha & Verpoorte, 1992).

Entre as várias técnicas de medida de aumento celular, foram selecionadas a filtração a vácuo e a centrifugação para *P. cernuum*, com a finalidade de separar a massa celular do meio de cultura para posterior pesagem. Estas medidas são analisadas durante um período de tempo, chamado de ciclo de crescimento celular, que compreende algumas fases. Estas fases refletem a alteração contínua do ambiente, onde o crescimento das células vegetais definitivamente esgota os nutrientes no meio de cultura e os metabólitos são produzidos. A duração das fases varia para cada espécie vegetal estudada e dentro da mesma espécie, as modificações realizadas na formulação do meio de cultura podem alterar o período relativo a cada uma delas, aumentando-o ou não.

A fase *lag*, anterior a qualquer sinal de divisão celular, com duração de 5 dias, considerando-se a matéria fresca das células de *P. cernuum*, foi seguida de um aumento exponencial da quantidade de número de células durante 16 dias. A fase estacionária, período em que as células não mais se dividem, e a decrescente, refletindo um esgotamento de nutrientes do meio e morte celular, prolongaram-se por 2 dias.

Através da comparação das curvas das matérias fresca e seca, foi observado o crescimento máximo da matéria fresca cerca de 3 dias depois do crescimento máximo da

matéria seca. Esta diferença está relacionada com o alongamento e aumento do volume celular conforme relatado por Figueiredo (1992).

A estabilidade de uma cultura é de grande importância para a reprodutibilidade experimental. Uma vez caracterizadas as várias fases do ciclo de crescimento celular, recomenda-se a realização de subculturas no período coincidente ao final da fase exponencial. A subcultura é utilizada somente para a manutenção da cultura, devendo ser feita em intervalos regulares com a finalidade de minimizar possíveis variações do metabolismo celular (Dodds & Roberts, 1995).

Neste trabalho, o ciclo de crescimento das suspensões celulares foi determinado para a obtenção do período regular das subculturas que correspondeu a intervalos de aproximadamente 18 dias. A máxima densidade celular, considerando a matéria fresca, foi triplicada e verificada em torno de 21 dias. Este período é similar à maioria das culturas de suspensões celulares (Stafford & Warren, 1991). Na **figura 36** (pág. 101) observam-se as curvas características do acúmulo de biomassa (matéria fresca e seca) das suspensões celulares de *P. cernuum*.

Figura 36- Variação das matérias fresca e seca durante o cultivo de *P. cernuum*.

4.3.1.3 Variação do pH do meio de cultura durante o cultivo de *P. cernuum*

O pH das culturas de células de plantas, em geral, não é controlado com exceção do ajuste do valor do pH inicial entre 5 e 6 antes da inoculação. Após esta etapa o pH pode flutuar, variando de 4 a 5 logo após a inoculação e aumentando lentamente para 5 a 6 ou acima à medida que o ciclo de crescimento prossegue. Estas mudanças são devidas à captação preferencial de certos íons do meio de cultura pelas células ou ao efluxo de H^+ causado por esta captação (Stafford & Warren, 1991). Os resultados obtidos para suspensões celulares de *P. cernuum*, com relação à variação de pH durante o seu ciclo de crescimento celular, são semelhantes à descrição citada acima e estão indicados na **figura 37 (pág. 103)**. O pH do meio de cultura antes da autoclavagem foi inicialmente corrigido para $5,5 \pm 0,3$, observando-se o valor de 5,52 após a autoclavagem.

De acordo com o gráfico da **figura 37 (pág. 103)**, após a inoculação das células, o pH do meio diminuiu de 5,3 para 4,9 durante a fase *lag*. Esta queda pode estar relacionada com a liberação do conteúdo vacuolar, consistindo de uma solução de sais e substâncias solúveis que as células vegetais armazenam. Nesta fase ocorre a absorção de amônio do meio de cultura pelas células e liberação de H^+ para o meio. Ainda na fase *lag* o pH aumentou para aproximadamente 5,0, permanecendo durante 13 dias. Esta estabilidade que se seguiu após a fase *lag* pode ser explicada pela absorção inicial efetuada pelas células de nitrato presente no meio de cultura e excreção de OH^- (McDonald & Jackman, 1989, Cresswell *et al.*, 1989, Banthorpe & Brown, 1990), resultando em um aumento de 1,8 unidade de pH nas fases finais da curva de crescimento. Este aumento também pode ser interpretado pela excreção das aminas aromáticas sintetizadas pelas células para o meio de cultura.

O padrão de variação do pH das suspensões celulares de *P. cernuum* não segue as mesmas características apresentadas para outras culturas de células vegetais de diversas espécies como *Tabernaemontana pandacqui*, *T. divaricata* e *T. elegans* (van der Heijden, 1989), *Psychotria leiocarpa* e *Psychotria carthagenensis* (Lopes, 1998), *Piper crassinervium* (Danelutte, 2001), *Achillea millefolium* (Figueiredo, 1992) e que também diferem entre si. Estas diferenças podem estar relacionadas com a espécie vegetal e a composição do meio de cultura em que são cultivadas.

Figura 37- Variação do pH durante o ciclo de crescimento celular de *P. cernuum*.

4.3.1.4 Captação dos carboidratos do meio de cultura durante o ciclo de crescimento celular de *P. cernuum*

Com exceção das culturas autotróficas, todos os meios de cultura de tecidos vegetais requerem a presença de um fonte de carbono e energia e quase todas as culturas parecem responder ao crescimento ótimo na presença de sacarose (Dodds & Roberts, 1995), que é amplamente distribuída entre as plantas superiores e por hidrólise produz 1 mol de D-glicose e 1 mol de D-frutose.

O gráfico da **figura 38 (pág. 105)**, obtido através da análise dos açúcares por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) (**figura 39, pág. 105**), indica que em 2 dias a sacarose foi total e rapidamente invertida em glicose e frutose. Esta hidrólise é o resultado da ação de uma invertase ácida que está normalmente presente na membrana celular (Daie, 1987, Goldner *et al.*, 1991). Esta enzima, ensaiada em pH 5,5, exibiu alta atividade no início do ciclo de crescimento de células em suspensão de cana de açúcar (Goldner *et al.*, 1991). Embora a atividade desta enzima não tenha sido avaliada em suspensões celulares de *P. cernuum*, os resultados da conversão da sacarase ácida, no início do ciclo de crescimento, onde o pH variou em torno de 5,0, facilitando a conversão da sacarose em glicose e frutose, são similares aos citados por Goldner *et al.* (1991). Isto indica que a captação de açúcar pelas

células de *P. cernuum*, cultivadas em meio suplementado com sacarose, seja feita principalmente na forma de hexoses. Comparada com a frutose, a glicose resultante foi consumida a uma velocidade maior do que a frutose, revelando a preferência das células de *P. cernuum* pela glicose. Durante o período final do ciclo de crescimento celular (entre 14 e 23 dias), a frutose era o único açúcar presente no meio de cultura e o seu consumo aumentou durante a baixa concentração de glicose. Estes dados são semelhantes aos observados nos trabalhos de culturas de células de outras espécies de plantas (Wickremesinhe & Arteca, 1994, van der Heijden, 1989, Lopes, 1998, Figueiredo, 1992). Botha & O'Kennedy (1998) observaram em estudos sobre sistema de captação de açúcares por suspensões celulares de feijão que as células possuem uma afinidade maior por glicose do que por frutose e que a captação máxima é similar. A principal diferença envolvida nas propriedades cinéticas da captação de hexose consiste na forte inibição da absorção de frutose pela glicose e no pouco efeito em se tratando de situação inversa. Entretanto, quando glicose ou frutose são fornecidas individualmente para culturas de células, ambas são eficientemente utilizadas e com crescimento melhor no meio rico em frutose.

Apesar de ser prática comum autoclavar a sacarose com o meio de cultura, esta, por ser termolábil, termina por sofrer hidrólise parcial para glicose e frutose. (Dodds & Roberts, 1995). Tal fato justifica a presença de pequenas concentrações de glicose e frutose no tempo zero, no meio de cultura, como pode ser observado na **figura 38 (pág. 105)**.

Finalmente a análise das **figuras 36 e 38 (pág. 101 e 105 respectivamente)** evidencia o sincronismo do consumo total de açúcares pelas células com a fase final do ciclo de crescimento celular de *P. cernuum*.

Figura 38- Consumo de sacarose, glicose e frutose pelas células de *P. cernuum* durante o ciclo de crescimento celular.

Figura 39- Cromatograma dos carboidratos presentes no meio de cultura, obtido por CLAE, em coluna Lichrosorb NH₂, sistema de eluente isocrático contendo acetonitrila: água (9:1), detector de índice de refração, (40°C), fluxo de 1,5 mL/min e volume de injeção de 20 µL. frutose- tr = 5,98 min; glicose- tr = 7,15 min; sacarose- tr = 14,68 min.

4.3.1.5 Análise quantitativa da tiramina e dopamina

O perfil da curva de produção de tiramina pelas células (**figura 40, pág. 107**), obtida através de CLAE (**figura 41, pág. 107**) apresenta-se bastante semelhante ao da curva de crescimento das mesmas (**figura 36, pág. 101**). À medida que aumenta a massa celular, observa-se também um acréscimo crescente da concentração de tiramina no interior das células, partindo-se de aproximadamente 16 µg de tiramina / g de células frescas e atingindo um valor máximo em cerca de 300 µg de tiramina / g de células frescas em torno de 21 dias.

Por outro lado, a curva de produção de dopamina pelas células mostra variações irregulares durante a fase *lag* do ciclo de crescimento celular. Este fato pode estar associado à imediata captação e/ou consumo da dopamina por outra rota metabólica, quando esta amina atinge níveis mais altos, servindo como precursor de outro metabólito secundário ou à instabilidade das catecolaminas que, por serem estáveis a baixas temperaturas e ausência de luz, podem ter sido degradadas durante o trabalho experimental. Do quinto ao décimo primeiro dia do ciclo de crescimento celular o perfil da curva de produção de tiramina e dopamina são bastante similares, assim como durante as fases estacionárias e decrescentes. Através da comparação das concentrações de dopamina e tiramina sintetizadas pelas células, observa-se que a dopamina está presente em menor quantidade.

Figura 40- Produção de tiramina e dopamina (em mg/g de células frescas) durante o cultivo de suspensões celulares de *P. cernuum*.

Figura 41- Cromatograma das aminas dansiladas extraídas das células de *P. cernuum*, obtido por CLAE, em C18 (250 X 4 mm), em acetato de amônio 0,1M : acetonitrila 25:75 até 10:90, detecção a 245 nm, fluxo de 1 mL/min e vol. de injeção, 20 μ L.
putrescina - tr = 6,52 min; tiramina - tr = 11,02 min; dopamina - tr = 17,23 min.

4.3.1.6 Atividade específica da PAL

A atividade enzimática da PAL está estreitamente relacionada com o grau de diluição das células no meio de cultura. As subculturas realizadas com densidades celulares iniciais mais baixas resultam em uma maior atividade induzida da PAL. (Jones, 1984). Porém, para avaliar se este fato estava relacionado com a densidade celular *per se*, Hahlbrock & Schröder (1975) diminuíram a densidade de células cultivada *in vitro*, sem contudo transferir para meio novo e não observaram nenhuma indução, sugerindo que o estímulo depende da diminuição da concentração de uma determinada substância de origem celular na subcultura. Jones (1984) propôs que o choque sofrido pelas suspensões celulares após subcultura pode ser comparável, em efeito, com o trauma seguido da excisão de tecidos vegetais intactos. Além disso, Hahlbrock & Wellman (1973) detectaram um aumento na atividade da PAL quando suspensões celulares de cevada que estavam na fase linear final de crescimento eram transferidas para um meio de cultura novo.

De acordo com a **figura 42 (pág. 109)**, obtida através de CLAE (**figura 43, pág. 109**), a partir do segundo dia do ciclo do crescimento de células de *P. cernuum* foi observado um aumento lento da atividade específica da PAL, alcançando aproximadamente o dobro do valor inicial (em torno de 1,0 nkat/mg proteína) e mantendo oscilações durante as fases exponencial e linear. Nestas fases há a coincidência da intensa divisão celular com aumento de atividade específica da PAL. O máximo valor obtido para a atividade enzimática foi de 1,60 nkat/mg proteína. Entretanto, após o décimo oitavo dia ocorreu uma queda brusca da atividade enzimática, atingindo cerca de metade do valor da atividade específica inicial do ciclo. O valor da atividade enzimática máxima obtido para as células cultivadas *in vitro* (1,60 nkat/mg de proteína), está próximo ao valor da atividade observada para folha jovem da planta adulta, 1,10 nkat/mg de proteína.

A **figura 44 (pág. 110)** mostra as relações das curvas de variação da atividade enzimática da PAL e proteínas solúveis durante o ciclo de crescimento celular de *P. cernuum*.

Apesar da PAL não participar na geração de metabólitos secundários nas suspensões celulares de *P. cernuum*, a análise de sua atividade específica durante o ciclo de crescimento celular permitiu avaliar sua oscilação durante o cultivo *in vitro*, que pode estar relacionada com fatores de estresse (temperatura, luz, subcultura em meio novo, entre outros).

Figura 42- Atividade específica da PAL durante o ciclo de crescimento celular de *P. cernuum*.

Figura 43- Cromatograma do ácido cinâmico e metil-umbeliferona, obtido por CLAE, em coluna C18 (250 X 4 mm), sistema de eluente: água : metanol : ácido acético (40:60:1), detecção a 275 nm, fluxo de 1 mL/min e vol. de injeção, 20 µL.
metil-umbeliferona- tr = 5,97 min; ácido cinâmico - tr = 8,99 min.

Figura 44- Atividade enzimática da PAL e proteínas solúveis durante o ciclo de crescimento celular de *P. cernuum*.

5. CONCLUSÕES

Os extratos provenientes das folhas de *Piper cernuum* apresentaram em sua composição os seguintes derivados do ácido cinâmico: ácido 3,4-dimetóxi-dihidrocinâmico, 3,4-dimetóxi-dihidrocinamato de metila, 3,5-dimetóxi-4-hidróxi-dihidrocinamato de metila e 3,5-dimetóxi-4-hidroxicinamato de metila, além da lignana cubebina, resultante da dimerização de fenilpropanóides por acoplamento oxidativo. Por outro lado, o óleo volátil das folhas desta espécie apresentou somente terpenos, principalmente sesquiterpenos, e exibiu atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

A enzima PAL apresentou diferença de atividade quanto à parte vegetal analisada, idade da planta e incidência de luz. A atividade da PAL das plântulas cultivadas em campo e submetidas apenas à luz solar apresentou oscilações rítmicas com período de 12 horas e atividade máxima correspondendo aos horários de 6 e 18 horas.

A partir das suspensões celulares de *P. cernuum* foram isoladas tiramina e dopamina. A função das feniletilaminas nas suspensões celulares ainda não é clara e pode ser uma resposta às condições de estresse de cultivo, ou no caso específico da dopamina, estar relacionada com a presença de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenóxi-acético) no meio de cultura.

O perfil da curva de crescimento das suspensões celulares apresentou-se semelhante ao perfil da maioria das culturas celulares vegetais, com ciclo celular de aproximadamente 21 dias. Estas suspensões celulares foram capazes de hidrolizar a sacarose presente no meio de cultura e consumiram a glicose preferencialmente à frutose. O pH do meio de cultura manteve-se relativamente constante durante o ciclo de crescimento aumentando na fase final do ciclo.

Pode-se concluir que o metabolismo secundário das folhas e das suspensões celulares de *P. cernuum* é completamente divergente. Enquanto as folhas da planta intacta mostraram o acúmulo de fenilpropanóides formados através da conversão de fenilalanina em ácido *E*-cinâmico pela PAL, nas suspensões celulares foram detectadas somente feniletilaminas, como a tiramina e dopamina, derivadas da descarboxilação da *L*-tirosina catalisada pela TYDC. Além disso, foi observado nas folhas o acúmulo da lignana cubebina.

Muitos outros estudos envolvendo sistemas enzimáticos devem ser realizados para se compreender por que a via de produção de lignanas e fenilpropanóides está ativa somente na planta intacta e não em suspensões celulares. A atividade específica da PAL foi detectada nas últimas, mas somente o acúmulo de tiramina e dopamina foi observado. As enzimas intermediárias tais como, cinamato 3- e 4-hidroxilases, *O*-metiltransferases, *etc*, envolvidas na rota fenilpropanoídica, podem não estar ativadas por alguma razão. Isto poderia ser avaliado medindo-se as atividades destas enzimas nas suspensões celulares.

Além do mais, mudanças na composição do meio de cultura e uso de elicitadores também podem ser úteis no estudo de possíveis interferências no metabolismo secundário de suspensões celulares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. The occurrence of piscicides and stupefactants in the plant kingdom. *Adv. Econ. Bot.*, v.8, p.1-23, 1990.
- AHMAD, F., BAKAR, S.A., IBRAHIM, A.Z., READ, R.W. Constituents of the leaves of *Piper caninum*. *Planta Med.*, v.63, n.2, p.193-194, 1997.
- AHMAD, F., BAKAR, S.A., IBRAHIM, A.Z., READ, R.W. Benzofurans from the leaves of *Piper magnibacum* C. DC. *ACGC Chem. Res. Commun.*, v.7, p.33-37, 1998.
- AHMAD, F., KADIR, F.A. Chemical constituents from *Piper pedicellosum*. *ACGC Chem. Res. Commun.*, v.10, p.63-66, 2000.
- ALÉCIO, A.C., BOLZANI, V.S., YOUNG, M.C.M., KATO, M.J., FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.*, v.61, n.5, p.637-639, 1998.
- AMINUDDIN, J.J.K., ANIS, M., BALASUBRAHMANYAM, V.R. Regeneration *Piper betle* from callus tissue. *Curr. Sci. India*, v. 65, n. 10, p. 793-796, 1993.
- ANDRADE, E.H.A., ZOGHBI, M.G.B., SANTOS, A.S., MAIA, J.G.S. Essential oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. *J. Essent. Oil Res.*, v.10, n.4, p.465-467, 1998.
- ANNIS, S.L., VELASQUEZ, L., XU, H., HAMMERSCHMIDT, R., LINZ, J., TRAIL, F. Novel procedure for identification of compounds inhibitory to transcription of genes involved in mycotoxin biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.4656-4660, 2000.
- ARAÚJO-JR, J.X., DA-CUNHA, E.V.L., CHAVES, M.C.O., GRAY, A.I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochem.*, v.44, n.3, p.559-561, 1997.
- ARAÚJO-JR, J.X., CHAVES, M.C.O., CUNHA, E.V.L., GRAY, A.I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v.27, n.3, p.325-327, 1999.
- ARIGONI, D., SAGNER, S., LATZEL, C., EISENREICH, W., BACHER, A., ZENK, M.H. Terpenoids biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, n.20, p.10600-10605, 1997.
- BADMAEV, V., MAJEED, M., NORKUS, E.P. Piperine, an alkaloid derived from black pepper increases serum response of β -carotene during 14-days of oral β -carotene supplementation. *Nutr. Res.*, v.19, n.3, p.381-388, 1999.
- BALDOQUI, D.C., KATO, M.J., CAVALHEIRO, A.J., DA SILVA BOLZANI, V., YOUNG, M.C.M., FURLAN, M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochem.*, v.51, n.7, p.899-902, 1999.

- BANTHORPE, D.V. Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations. *Nat. Prod. Rep.*, v.11, n.3, p.303, 1994.
- BANTHORPE, D.V., BROWN, G.D. Growth and secondary metabolism in cell cultures of *Tanacetum*, *Mentha* and *Anethum* species in buffered media. *Plant Science*, v.67, p.107, 1990.
- BAUM, S.S., HILL, R., ROMMELSPACHER, H. Effect of kava extract and individual kavapyrones on neurotransmitter levels in the nucleus accumbens of rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v.22, n.7, p.1105-1120, 1998.
- BELL, E.A., CHARLWOOD, B. *Secondary Plants Products*. New York: Springer Verlag, 1980.
- BENEVIDES, P.J.C., SARTORELLI, P., KATO, M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochem.*, v.52, n.2, p.339-343, 1999.
- BHAT, S.R., KACKAR, A., CHANDEL, K.P.S. Plant regeneration from callus cultures of *Piper longum* by organogenesis. *Plant Cell Rep.*, v. 11, n. 10, p. 525-528, 1992.
- BHANDARI, S.P.S., BABU, U.V., GARG, H.S. A lignan from *Piper chaba* stems. *Phytochem.*, v.47, n.7, p.1435-1436, 1998.
- BHUYAN, P., MISHRA, P.K. Occurrence and distribution of important keto-acids in *Piper betle*. *Acta Cienc. Indica, Chem.*, v.22, n.3, p.99-100, 1996.
- BIAGIONI, M., NALI, C., HEIMLER, D., LORENZINI, G. PAL activity and differential ozone sensitivity in tobacco, bean and poplar. *J. Phytopathol.*, v.145, n.11-12, p.533, 1997.
- BOONEN, G., HAEBERLEIN, H. Influence of genuine kavapyrones enantiomers on the GABA-A binding site. *Planta Med.*, v.64, n.6, p.504-506, 1998.
- BOONEN, G., FERGER, B., KUSCHINSKY, K. HAEBERLEIN, H. *In vivo* effects of kavapyrones (+)-dihydromethysticin and (±)-kavain on dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in striatal and cortical brain regions. *Planta Med.*, v.64, n.6, p.507-510, 1998.
- BOTHA, F.C., O'KENNEDY, M.M. Carbohydrate utilisation by cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plantarum*, v.102, n.3, p. 429, 1998.
- BRADFORD, M.M., Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- BROADHURST, C.L., POLANSKY, M.M., ANDERSON, R.A. Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, n.3, p.849-852, 2000.

- BROWN, G., EDE, R.M., SIMOLA, L.K., LEMMETYINEN, J. Lignins released from *Picea abies* suspension cultures - true native spruce lignin? *Phytochem.*, v.29, p.2535-2538, 1990.
- CAMM E.L., TOWERS, G.H.N. Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochem.*, v.12, n.5, p.961-973, 1973.
- CAMM, E.L., TOWERS, G.H.N. *Prog. Phytochem.*, v.4, p.169, 1977.
- CAPRON, M.A., WIEMER, D.F. Piplaroxide, an anti-repellent piperidine-epoxide from *Piper tuberculatum*. *J. Nat. Prod.*, v.59, n.8, p.794-795, 1996.
- CARTER, M., SACHDEV-GUPTA, K., FEENY, P. Tyramine from the leaves of wild parsnip: a stimulant and synergist for oviposition by the black swallowtail butterfly. *Physiol. Entomol.*, v.3, n.4, p.303, 1998.
- CASTANEDA, J.L., QUINTERO, A. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (EC4315) activity by light in *Gomphrena-globulosa* tissue-culture. *Phyton - Int. J. Exp. Bot.*, v.52, n.2, p.151-154, 1991.
- CHARLWOOD, B.V., RHODES, M.J.C. *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, Clarendon Press, 1990.
- CHEN, S. Liquid and paste for treatment of bromidrosis. CN. Pat. 1156030, 1997, 5p. Apud: *Chem. Abstr.*, v.132, abstr.n. 15498, 2000.
- CHEN, C.L., CHI, C.W., CHANG, K.W., LIU, T.Y. Safrole-like DNA adducts in oral tissue from oral cancer patients with a betel quid chewing history. *Carcinogenesis*, v.20, n.12, p.2331-2334, 1999.
- CICCIO, J.F. Volatile compounds of *Piper auritum* (Piperaceae) spikes from Costa Rica. *Ing. Cienc. Quim.*, v.16, n.2, p.78-79, 1996.
- CICCIO, J.F. SEGNINI, M. Essential oil of leaves and spikes of *Piper peltatum* L. from Costa Rica. *Ing. Cienc. Quim.*, v.18, n.2, p.55-56, 1998.
- CLEMENT, B.A., GOFF, C.M., FORBES, T.D.A. Toxic amines and alkaloids from *Acacia berlandieri*. *Phytochem.*, v.46, n.2, p.249, 1997.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7.ed. Campinas: editora da UNICAMP, 1997, 279p.
- CONRAD, E., PALMER, J.K. Rapid analysis of carbohydrates by high pressure liquid chromatography. *Food Technology*, v.30, n.10, p.84, 1976.
- CONSTABEL, F., VASIL, I.K. Cell culture in phytochemistry. Volume 4 In: VASIL, IK (ed in chef) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Academic Press, 1987.

- CRAKER, L.E. Herbs and volatile oils. *The Herb, Spice and Medicinal Plant Digest*, v. 8, p.5, 1990.
- CRESSWELL, R.C., FOWLER, M.W., STAFFORD, A., STEPAN-SARKISSIAN, G. Inputs and outputs: primary substrates and secondary metabolism. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures, (ed. WGW Kurz) Springer-Verlag, Berlin 1989.
- CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University, 1981.
- CUMMING, B.G., WAGNER, E. Rhythmic processes in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v.19, p.381, 1968.
- DAI, Y.R., MICHAELS, P.J., FLORES, H.E. Stimulation of ethylene production by catecholamines and phenylethylamine in potato cell suspension cultures. *Plant Growth Regul.*, v.12,n.3, p.219-222, 1993.
- DAIE, J. Sucrose uptake in isolated phloem of celery is a single saturable transport system. *Planta*, v.171, n.4, p.474, 1987.
- DANELUTTE, A.P. Estudo do metabolismo secundário em *Piper crassinervium* (Piperaceae). São Paulo, 2001, 116p. (Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo).
- D'ANGELO, L.C.A., XAVIER, H.S., TORRES, L.M.B., LAPA, A.J., SOUCCAR, C. Pharmacology of *Piper marginatum* a folk medicinal plant used as analgesic, antiinflammatory and hemostatic. *Phytomedicine*, v.4, n.1, p.33-40, 1997.
- DAS, B., KASHINATHAM, A., SRINIVAS, K.V.N.S. Alkamides and other constituents of *Piper longum*. *Planta Med.*, v.62, n.6, p.582, 1996.
- DAS, B., KASHINATHAM, A. Studies on phytochemicals: futoamide from *Piper longum*. *Fitoterapia*, v.69, n.6, p.548, 1998.
- DAS, B., KASHINATHAM, A., MADHUSUDHAN, P. Long chain esters and alkamides from *Piper longum*. *Boll. Chim. Farm.*, v.137, n.8, p.319-320, 1998a.
- DELGADO, A.W., AUVELLA, M.E., DE DIAZ, A.M.P. Benzyloquinoline alkaloids from the stem of *Piper augustum* Rudge. *Rev. Colomb. Quim.*, v.27, n.1, p.13-21, 1998.
- DICOSMO, F., TOWERS, G.H.N. Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. *Recent Adv. Phytochem.*, v.18, p.97-175, 1984.
- DIXON, R.A., PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, v.7, n.7, p.1085-1097, 1995.
- DODDS, J.H., ROBERTS, L.W. *Experiments in plant tissue culture*. 3^a ed. Cambridge, 1995.

- DODSON, C.D., DYER, L.A., SEARCY, J., WRIGHT, Z., LETOURNEAU, D.K. Cenocladamide, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. *Phytochem.*, v.53, n.1, p.51-54, 2000.
- DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, v.88, p.308-3016, 2000.
- DUCHESNE, M., FRITIG, B., HIRTH, L. Phenylalanine ammonia lyase in *Tobacco* mosaic virus infected hypersensitive *Tobacco* – density labelling evidence of *de novo* synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, v.485, n.2, p.465, 1977.
- DŨNG, N.X., THANH, L., KHÔI, T.T. Compositional analysis of the leaf, stem and rhizome oils of *Piper lolot* C. DC. from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.*, v.8, n.6, p.649-652, 1996.
- EEROLA, S., HINKKANEN, R., LINDFORS, E., HIRVI, T. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. AOAC Int.*, v.76, n.3, p.575-577, 1993.
- EILERT, U., KURZ, W.G.W., CONSTABEL, F. Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *J. Plant Physiol.*, v.119, p.65, 1985.
- EISENREICH, W., MENHARD, B., HYLANDS, P.J., ZENK, M.H., BACHER, A. Studies on the biosynthesis of taxol: The taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, n.13, p.6431-6436, 1996.
- EVANS, P.H., BOWERS, W.S., FUNK, E.J. Identification of fungicidal and nematocidal components in the leaves of *Piper betel* (Piperaceae) *J. Agric. Food Chem.*, v.32, n.6, p.1254-1256, 1984.
- FACCHINI, P.J. Temporal correlation of tyramine metabolism with alkaloid and amide biosynthesis in elicited opium poppy cell cultures. *Phytochem.*, v.49, n.2, p.481, 1998.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I
- FIGUEIREDO, ACS *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*: Produção de metabólitos secundários in vivo e in vitro. Lisboa, 1992. 208p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências – Universidade de Lisboa).
- FUKUI, H., NAKAGAWA, K., TSUDA, S., TABATA, M. Production of isoquinoline alkaloids by cell suspension cultures of *Coptis japonica*. In *Plant Tissue and Cell Culture 1982* (A. Fujiwara, ed.), p. 313-314. Maruzen Co., Tokyo.
- FURUYA, T., YOSHIKAWA, T., ISHII, T., KAJII, K. Studies on plant tissue cultures. 38. Regulation of saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Planta Med.*, v.47, n.4, p.200-204, 1983a.

- FURUYA, T., YOSHIKAWA, T., ORIHARA, Y., ODA, H. Studies on plant tissue cultures. 39. Saponin production in cell suspension cultures of *Panax ginseng*. *Planta Med.*, v.48, n.2, p.83-87, 1983b.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, v.50, p.151, 1968.
- GLEITZ, J., BEILE, A., WILKENS, P., AMERI, A., PETERS, T. Antithrombotic action of the kavapyrone (+)-kavain prepared from *Piper methysticum* on human platelets. *Planta Med.*, v.63, n.1, p.27-30, 1997.
- GOLDNER, W., THOM, M., MARETZKI, A. Sucrose metabolism in sugarcane cell suspension cultures. *Plant Science*, v.73, n.2, p.143-147, 1991.
- GORDON, W.R., KOUKKARI, W.L. Circadian rhythmicity in the activities of phenylalanine-ammonia-lyase from *Lemna perpusilla* and *Spirodela polyrhiza*. *Plant Physiol.*, v.68, p.612-615, 1978.
- GOUD, K.V., SHARMA, R., KENDRICK, R.E., FURUYA, M. Photoregulation of phenylalanine ammonia-lyase is not correlated with anthocyanin induction in photomorphogenetic mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Physiol.*, v.32, n.8, p.1251-1258, 1991.
- GREEN, T.P., TREADWELL, E.M., WIEMER, D.F. Arieianal, a prenylated benzoic acid from *Piper arieianum*. *J. Nat. Prod.*, v.62, n.2, p.367-368, 1999.
- GUPTA, S.K., VELPANDIAN, T., SENGUPTA, S., MATHUR, P., SAPRA, P. Influence of piperine on nimesulide-induced antinociception. *Phytother. Res.*, v.12, n.4, p.266-269, 1998.
- HAHLBROCK, K., WELLMAN, E. Light independent induction of enzymes related to phenylpropanoid metabolism in cell suspension cultures from parsley. *Biochim. Biophys. Acta*, v.304, n.3, p.702-706, 1973.
- HAHLBROCK, K., SCHRÖDER, J. Light induced changes of enzyme activities in parsley cell suspension cultures - increased rate of synthesis of phenylalanine ammonia lyase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.166, n.1, p.47-53, 1975.
- HAHLBROCK, K., KNOBLOCH, K.H., KREUZALER, F., POTTS, J.R.M., WELLMAN, E. Coordinated induction and subsequent activity changes of 2 groups of metabolically interrelated enzymes- light induced synthesis of flavonoid glycosides in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.*, v.61, n.1, p.199-206, 1976.
- HAHLBROCK, K., GRIESEBACH, H. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, v.30, p.105-130, 1979.
- HAMMER, K.A., CARSON, C.F., RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. *J. Appl. Microbiol.*, v.86, n.6, p.985-990, 1999.

- HANSON, K.R., AND HAVIR, E.A. (1981) in Secondary Plant Products (Conn, E. E., ed.), Ch. 20, p. 577 [vol. 7 of The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise (Stumpf, P. K. and Conn, E. E. eds in chief)]. Academic Press, New York. In: JONES, D.H. Phenylalanine ammonia lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochem.*, v. 23, n.7, p. 1349-1359, 1984.
- HARA, M., KITAMURA, T., FUKUI, H., TABATA, M. Induction of berberine biosynthesis by cytokinins in *Thalictrum minus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, v.12,n.2, p.70-73, 1993.
- HARMER, S.L., HOGENESCH, L.B., STRAUME, M., CHANG, H.S., HAN, B., ZHU, T., WANG, X., KREPS, J.A., KAY, S.A. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, v.290, n.5499, p.2110-2113, 2000.
- HARRISON, M.J., DIXON, R.A. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe In.*, v.6, n.5, p. 643-654, 1993.
- HE, Q., LU, Y., CAI, D., CUI, Y., LAI, J., WANG, H. Analgesic principles from Maoju (*Piper arboricola*). *Zhongcaoyao*, v.12, p.433-435, 1981.
- HE, X.G., LIN, L.Z., LIAN, L.Z. Electrospray high performance liquid chromatography-mass spectrometry in phytochemical analysis of kava (*Piper methysticum*) extract. *Planta Med.*, v.63, n.1, p.70-74, 1997.
- HEIDE, L., NISHIOKA, N., FUKUI, H., TABATA, M. Enzymatic regulation of shikonin biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Phytochem.*, v.28, n.7, p.1873-1877, 1989.
- HERRMANN, K.M. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell*, v.7, n.7, p. 907-919, 1995.
- HINOUE, J.B., HARVALA, C.E., HINOUE, E.B. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie*, v.44, n.4, p.302-303, 1989.
- HU, S.L., AO, P., TAN, H.G., Pharmacognostical studies on the roots of *Piper nigrum* L. II.: Chemical and pharmacological studies. *Acta Hort.*, v.426, p.175-178, 1996.
- JACOBS, H., SEERAM, P.N., NAIR, G.M., REYNOLDS, W.F., McLEAN, S. Amides of *Piper amalago* var. *nigrinodum*. *J. Indian Chem. Soc.*, v.76, p.713-717, 1999.
- JARILLO, J.A., CAPEL, J., TANG, R.H., YANG, H.Q., ALONSO, J.M., ECKER, J.R. CASHMORE, A.R. An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, v.410, n.6827, p.487-490, 2001.
- JENG, J.H., HAHN, L.J., LIN, B.R., HSIEH, C.C., CHAN, C.P., CHANG, M.C. Effects of areca nut, inflorescence *Piper betel* extracts and arecoline on cytotoxicity, total and unscheduled DNA synthesis in cultured gingival keratinocytes. *J. Oral Pathol. Med.*, v.28, n.2, p.64-71, 1999.

- JENG, J.H., HO, Y.S., CHAN, C.P., WANG, Y.J., HAHN, L.J., LEI, D., HSUH, C.C., CHANG, M.C. Areca nut extract up-regulates prostaglandin production, cyclooxygenase-2, mRNA and protein expression of human oral keratinocytes. *Carcinogenesis*, v.21, n.7, p.1365-1370, 2000.
- JENSEN, S., HANSEN, J., BOLL, P.M. Lignans and neolignans from Piperaceae. *Phytochem.*, v.33, n.3, p.523-530, 1993.
- JIROVETZ, L., PUSCHMANN, C., BUCHBAUER, G., FLEISCHHACKER, W., SHAFI, P.M., ARIF, M.M. Analysis of the essential oil of *Piper betel* L. leaves from South India using GC/FID, GC/MS and olfactometry. *Sci. Pharm.*, v.67, n.4, p.305-311, 1999.
- JONES, D.H. Phenylalanine ammonia lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochem.*, v. 23, n.7, p. 1349-1359, 1984.
- JUNIOR, J.X.D., CHAVES, M.C.D., DA-CUNHA, E.V.L., GRAY, A.I. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, v.27, n.3, p.325, 1999.
- KAMO, K.K., MAHLBERG, P.G. Dopamine biosynthesis at different stages of plant development in *Papaver somniferum*. *J. Nat. Prod.*, v.47, n. 4, p. 682, 1984.
- KHAJURIA, A., ZUTSHI, U., BEDI, K.L. Intestinal permeability characteristics of piperine: an active alkaloid from peppers and a bioavailability enhancer. *Indian J. Exp. Biol.*, v.36, n.1, p.46-50, 1998.
- KHANOM, F., KAYAHARA, H., TADASA, K. Superoxide-scavenging and prolyl endopeptidase inhibitory activities of Bangladeshi indigenous medicinal plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.64, n.4, p.837-840, 2000.
- KITANO, M., WANIBUCHI, H., KIKUZAKI, H., NAKATANI, N., IMAOKA, S. FUNAE, Y. HAYASHI, S. FUKUSHIMA, S. Chemopreventive effects of coumapherine from pepper on the initiation stage of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, v.91, n.7, p.674-680, 2000.
- KNOBLOCH, K., WEIGAND, N., WEIS, H.M. AND VIGENSCHOW, H. (1986) *Progress in Essential Oil Research* ed. Brunke E.J., pp.429. Berlin: Walter de Gruyther. Apud: DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterail activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, v.88, p. 308-3016, 2000.
- KNOBLOCH, K., PAULI, A., IBERL, N., WEIS, H.M. AND WEIGAND, N. (1988) Modes of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests. In *Bioflavour* ed. Schreier P. pp. 287-299. Berlin: Walter de Gruyther. Apud: DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterail activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, v.88, p. 308-3016, 2000.
- KOUKOL, J., CONN, E.E. Metabolism of aromatic compounds in higher plants. 4. Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.*, v.236, n.10, p.2692, 1961

- KREPS, J.A., MURAMATSU, T., FURUYA, M., KAY, S.A. Fluorescent differential display identifies circadian clock-regulated genes in *Arabidopsis thaliana* *J. Biol. Rhythm.*, v.15, n.3, p.208-217, 2000.
- KUBO, M., MATSUDA, H., INUMA, M. Testosterone 5- α -reductase inhibitors from *Piper methysticum* for acne. JP Pat. 11189540, 1999, 5p.
- KUKLIN A.I., CONGER B.V. Catecholamines in plants. *J. Plant Growth Regul.*, v.14, n.2, p.91, 1995.
- KUMAR, R., PARMAR, V.S., ERRINGTON, W., WENGEL, J., OLSEN, C.E. 1-(3,4-dimethoxy- α,β -dihydrocinnamoyl)-pyrrole, a novel amide from *Piper brachystachyum*. *Acta Crystallogr., Sect C: Cryst. Struct. Commun.*, v.C54, n.3, p.363-365, 1998.
- KUTCHAN, T.M. Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene. *Phytochem.*, v.32, n.3, p.493-505, 1993.
- LALE, N.E.S., AJAYI, F.A. Suppressing infestation of stored pearl millet *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. by *Tribolium castaneum* (Herbst) with insecticidal essential oils in Maiduguri, Nigeria. *Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*, v.107, n.4, p.392-398, 2000.
- LAVOLA, A., JULKUNEN-TIITTO, R., DE LA ROSA T.M., LEHTO T., APHALO P.J. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiol. Plantarum*, v.109, n.3, p.260, 2000.
- LECLERQ, P.A., VAN GENDEREN, M.H.P., THAN, L., KHIÊN, P., DŨNG, N.X. Composition of the essential oil from the aerial parts of *Piper pierrei* C. DC. from Vietnam. *J. Essent. Oil Res.*, v.9, n.6, 721-724, 1997.
- LENZ, R., ZENK, M.H., Purification and properties of codeinone reductase (NADPH) from *Papaver somniferum* cell cultures and differentiated plants. *Eur. J. Biochem.*, v.233, n.1, p.132-139, 1995.
- LIMBERGER, R. P. Estudo de óleos voláteis de espécies do gênero *Mikania* (Asteraceae) e da subtribo Myrtinae (Myrtaceae) de ocorrência no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1998. 121p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Farmácia – UFRGS).
- LIN, Z., HOULT, J.R.S., BENNETT, D.C., RAMAN, A. Stimulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloid, piperine. *Planta Med.*, v.65, n.7, p.600-603, 1999.
- LOGNAY, G.C., BOUXIN, P., MARLIER, M., HAUBRUGE, E., GASPAR, C., RODRIGUEZ, A. Composition of the essential oil of *Piper acutifolium* Ruiz. and Pav. from Peru. *J. Essent. Oil Res.*, v.8, n.6, p.689-691, 1996.
- LOPES, S.O. (1998) Análise química e cultivo *in vitro* de *Psychotria leiocarpa* Cham. et Schlecht. e *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) Dissertação de mestrado. Faculdade de Farmácia, UFRGS.

- LOPEZ-AVILA, V., BENEDICTO, J. Supercritical fluid extration of kava lactones from *Piper methysticum* (kava) herb. *J. High Resol. Chromatogr.* , v.20, n.10, p.555-559, 1997.
- MADHUSUDHANAN, K., RAHIMAN, B.A. The effect of activated charcoal supplemented media to browning of *in vitro* cultures of *Piper* species. *Biol. Plantarum*, v.43, n.2, p.297-299, 2000.
- MAIA, J.G.S., ZOGHBI, M.G.B., ANDRADE, E.H.A., SANTOS, A.S., SILVA, M.H.L., LUZ, A.I.R., BASTOS, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour Fragrance J.*, v.13, n.4, p.269-272, 1998.
- MAJEED, M., BADMAEV, V., RAJENDRAN, R. Use of piperine as a bioavailability enhancer. US. Pat. 5744161 A, 28 April 1998, 13p.
- MANOSROI, A., ABE, M., MANOSROI, J. Comparison of antioxidant activity of extract from seeds of white pepper (*Piper nigrum*) to commercial antioxidants in 2% hydroquinone cream. *J. Cosmet. Sci.*, v.50, n.4, p.221-229, 1999.
- MARTINS, A.P., SALGUEIRO, L., VILA, R., TOMI, F., CAÑIGUERAR, S., CASANOVA, J., CUNHA, A.P., ADZET, T. Essential oils from four *Piper* species. *Phytochem.*, v.49, n.7, p.2019-2023, 1998.
- MARTINS, R.C.C., LATORRE, L.R., SARTORELLI, P., KATO, M.J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochem.*, v.55, n.7, p.843-846, 2000.
- MASSON, F., TALON, R., MONTEL, M.C. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, v.32, p.199-207, 1996.
- MASSUOKA, C., ONO, M., ITO, Y., NOHARA, T. Antioxidative constituents from the aerial part of *Piper elongatum* Vahl. *Food Sci. Technol. Int.*, v.3, n.3, p.285-289, 1997.
- MATSUDA, H., TANIGUCHI, K., IINUMA, M. TSUJIMOTO, T. UV absorbers and topical preparations containing yangonin. JP 09067238, 1997, 11p.
- MATSUKI, M. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. *Aust. J. Bot.*, v. 44, p.613-634, 1996.
- MAXWELL, A., DABIDEEN, D., REYNOLDS, W.F., McLEAN, S. Two 6-substituted 5,6-dihydropyran-2-ones from *Piper reticulatum*. *J. Nat. Prod.*, v.61, n.6, p.815-816, 1998.
- MAXWELL, A. DABIDEEN, D., REYNOLDS, W.F., McLEAN, S. Neolignans from *Piper aequale*. *Phytochem.*, v.50, n.3, p.499-504, 1999.
- McDONALD, K.A., JACKMAN, A.P. Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfafa suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, v.8, n.8, p.455-458, 1989.

- Mc FERREN, M.A., RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *J. Ethnopharmacol.*, v.60, n.2, p.183-187, 1998.
- Mc KEEN, M.M., ALI, A.M., ABDULLAH, M.A., NASIR, R.M., MAT, N.B., RAZAK, A.R., KAWASU, K. Antinematodal activity of some Malaysian plant extracts against the pine wood nematode, *Bursaphelencus xylophilus*. *Pestic. Sci.*, v.51, n.2, p.165-170, 1997.
- MENHARD, B., EISENREICH, W., HYLANDS, P.J., BACHER, A., ZENK, M.H. Taxoids from cell cultures of *Taxus chinensis*. *Phytochem.*, v.49, n.1, p.113-125, 1998
- MESSNER, B., BOLL, M., BERNDT, J. L-phenylalanine ammonia-lyase in suspension culture cells of spruce (*Picea abies*) – induction by UV light and fungal elicitor. *Plant Cell Tiss. Org.*, v.27, n.3, p.267-274, 1991.
- MEYER, H.J., VANSTADEN, J., ALLEN, S. The use of antibiotics to control systemic bacteria in *in vitro* cultures of *Piper nigrum* CV Kuching. *S. Afr. J. Bot.*, v.58, n.6, p.500-504, 1992.
- MILLS, D.R., LEE, J.M. A simple, accurate method for determining wet and dry weight concentrations of plant cell suspension cultures using microcentrifuge tubes. *Plant Cell Rep.*, v.15, n.8, p.634-636, 1996.
- MITANI, H., SODA, M., OSHIMA, K. Skin aging-preventing compositions. JP 2000290165, 2000. 9p. Apud: Chem. Abstr., v. 133, abstr.n.300935, 2000.
- MOREIRA, D.L., KAPLAN, M.A.C., GUIMARÃES, E.F. Constituintes químicos de *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae) *Rev. Bras. Farm.*, v.76, n.4, 1995.
- MOREIRA, D.L., GUIMARÃES, E.F., KAPLAN, M.A.C. A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochem.*, v.48, n.6, p.1075-1077, 1998a.
- MOREIRA, D.L., KAPLAN, M.A.C., GUIMARÃES, E.F. Essential oil analyses of two *Piper* species (Piperaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.*, v.70, n.4, Pt.1, p.751-754, 1998b.
- MOREIRA, D.L., GUIMARÃES, E.F., KAPLAN, M.A.C. Non-polar constituents from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochem.*, v.49, n.5, p.1339-1342, 1998c.
- MOREIRA, D.L., GUIMARÃES, E.F., KAPLAN, M.A.C. A C-glucosylflavone from leaves of *Piper lhotzkyanum*. *Phytochem.*, v.55, n.7, p.783, 2000.
- MUJUMDAR, A.M., DHULEY, J.N., DESHMUKH, V.K., NAIK, S.R. Effect of piperine on bioavailability of oxyphenylbutazone in rats. *Indian Drugs*, v.36, n.2, p.123-126, 1999.
- MUNDINA, M., VILA, R., TOMI, F., GUPTA, M.P., ADZET, T., CASANOVA, J., CAÑIGUERAL, S. Leaf essential oils of three Panamanian *Piper* species. *Phytochem.*, v.47, n.7, p.1277-1282, 1998.

- MURAKAMI, A., ALI, A.M., MAT-SALLEH, K., KOSHIMIZU, K., OHIGASHI, H. Screening for the *in vitro* anti-tumor-promoting activities of edible plants from Malaysia. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, v.64, n.1, p.9-16, 2000.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NAVICKIENE, H.M.D., ALECIO, A.C., KATO, M.J., BOLZANI, V.D., YOUNG, M.C.M., CAVALHEIRO, A.J., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochem.*, v.55, n.6, p.621-626, 2000.
- NALINI, N., SABITHA, K., VISWANATHAN, P., MENON, V.P. Spices and glycoprotein metabolism in experimental colon cancer rats. *Med. Sci. Res.*, v.26, n.11, p.781-784, 1998.
- NELSON, D.L., COX, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152p.
- NÖLDNER, M., CHATTERJEE, S.S. Inhibition of haloperidol-induced catalepsy in rats by root extracts from *Piper methysticum* F. *Phytomedicine*, v.6, n.4, p.285-286, 1999.
- ORJALA, J., ERDELMEIER, C.A.J., WRIGHT, A.D., RALI, T., STICHER, O. 5 new prenylated *p*-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med.*, v.59, n.6, p.546-551, 1993a.
- ORJALA, J., WRIGHT, A.D., RALI, T., STICHER, O. *Nat. Prod. Letters*, v.2, p.231, 1993b.
- ORJALA, J., MIAN, P., RALI, T., STICKER, O. Gibbilimbols A-D, citotoxic and antibacterial alkenylphenols from *Piper gibbilimum*. *J. Nat. Prod.*, v.61, n.7, p.939-941, 1998.
- OTHA, S., VERPOORTE, R. Some accounts of variation (heterogeneity and / or instability) in secondary metabolites production by plant cell cultures. *Annu. Rep. Nat. Sci. Home Econ.*, n.32, p.9-23, 1992.
- PANDA, S., KAR, A. Dual role of betel leaf extract on thyroid function in male mice. *Pharmacol. Res.*, v.38, n.6, p.493-496, 1998.
- PANDE, A., SHUKLA, Y.N., SRIVASTAVA, R., VERMA, M. 3-Methyl-5-decanoylpyridine and amides from *Piper retrofractum*. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, v.36B, n.4, p.377-379, 1997.
- PARMAR, V.S., JAIN, S.C., BISHT, K.S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O.D., PRASAD, A.K., WENGEL, J., OLSEN, C.E., BOLL, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochem.*, v.46, n.4, p.597-673, 1997.
- PARMAR, V.S., JAIN, S.C., GUPTA, S., TALWAR, S., RAJWANSHI, V.K., KUMAR, R., AZIM, A., MALHOTRA, S., KUMAR, N., JAIN, R., SHARMA, N.K., TYAGI, O.D., LAWRIE, S.J., ERRINGTON, W., HOWARTH, O.W., OLSEN, C.E., SINGH, S.K., WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochem.*, v.49, n.4, p.1069-1078, 1998.

- PATIL, A.D., FREYER, A.J., REICHWEIN, R., HOFMANN, G., JOHNSON, R.K. Piperpense, a tetrahydropyridine alkaloid from *Piper ponapense* stems and leaves. *Nat. Prod. Lett.*, v.9, n.3, p.217-223, 1997.
- PEREDA-MIRANDA, R., BERNARD, C.B., DURST, T., ARNASON, J.T., SÁNCHEZ-VINDAS, P., POVEDA, L., SAN ROMÁN, L. Methyl 4-hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl) benzoate, major insecticidal principle from *Piper guanacastensis*. *J. Nat. Prod.*, v.60, n.3, p.282-284, 1997.
- PHILIP, V.J., JOSEPH, D., TRIGGS, G.S., DICKINSON, N.M. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn) through shoot tip cultures. *Plant Cell Rep.*, v.12, n.1, p.41-44, 1992.
- PILGRIM, M.L., CASPAR, T., QUAIL, P.H., MCCLUNG, C.R. Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, v.23, n.2, p.349-364, 1993.
- PINO, J.A., ROSADO, A., RODRIGUEZ, M., GARCIA, D Composition of leaf oil of *Piper auritum* H. B. K. grown in Cuba. *J. Essent. Oil Res.*, v.10, n.3, p.333-334, 1998.
- PINO, J.A., BORGES, P. Los componentes volatiles de las especias. II. Pimienta negra. *Alimentaria*, p.47-53, 1999.
- PRADHAN, P., BANERJI, A. Stereochemistry of diastereomeric neolignans from *Piper hookeri* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Phytochem. Anal.*, v.9, n.2, p.71-74, 1998.
- PRADHAN, K.J., VARIYAR, P.S., BANDEKAR, J.R. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.). *Lebensm. Wissu. - Technol.*, v.32, p.121-123, 1999.
- PUMMANGURA, S., NICHOLS, D.E., McLAUGHLIN, J.L. Cactus alkaloids XXXIII: β -phenylethylamines from the Guatemalan cactus *Pilosocereus maxonii*. *J. Pharm. Sci.*, v.66, n.10, p.1485-1487, 1977.
- RAJ, H.G., GUPTA, K., ROHIL, V., BOSE, M., BISWAS, G., SINGH, S.K., JAIN, S.C., PARMAR, V.S., OLSEN, C.E., WENGEL, J. Aflatoxin B1-induced micronuclei and cell cycle alterations in lung and bone marrow cells and their modulation by *Piper argyrophyllum* extract. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, v.18, n.5, p.249-261, 1998.
- RAMAN A, WEIR U, BLOOMFIELD SF Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 242, 1995.
- RAMAM, A., LIN, Z. Piperine and piperine analogs for treatment of skin depigmentation disorders. WO. Pat. 2000002544, 2000, 36p. Apud: Chem. Abstr., v. 132, abstr.n. 113057, 2000.

- SAEZ, J., GRANADOS, H., ESCOBAR, G., CARDONA, W., ATEHORTUA, L., CALLEJAS, R., CORTES, D., GONZALES, C. Piperlonguminine and stigmasterol, compounds from roots and stems of *Piper auritum*, an insecticidal activity of the extracts. *Rev. Colomb. Quim.*, v.27, n.1, p.77-81, 1998a.
- SAEZ, J., GRANADOS, H., MORENO, M.E., PELÁEZ, C.A. Modelo matricial *in vitro* para la evaluación de la actividad insecticida de hojas de *Piper auritum* (Piperaceae). *Afinidad*, v.55, n.477, p.363-368, 1998b.
- SANTOS, B.V.O., CUNHA, E.V.L., CHAVES, M.C.O., GRAY, A.I. Croweacin from *Piper marginatum*. *Biochem. System. Ecol.*, v.25, n.5, p.471, 1997.
- SANTOS, B.V.O., CUNHA, E.V.L., CHAVES, M.C.O., GRAY, A.I. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. *Phytochem.*, v.49, n.5, p.1381-1384, 1998a.
- SANTOS, A.S., ANDRADE, E.H.A., ZOGHBI, M.G.B., LUZ, A.I.R., MAIA, J.G.S. Sesquiterpenes of Amazonian *Piper* species. *Acta Amazonica*, v.28, n.2, p.127-130, 1998b.
- SANTOS, B.V.O., CHAVES, M.C.O. (*E,E*)-*N*-isobutyl-2,4-octadienamide from *Piper marginatum*. *Biochem. System. Ecol.*, v. 27, n.1, p.113-114, 1999a.
- SANTOS B.V.O., CHAVES M.C.O. 2,4,5-trimethoxypropiophenone from *Piper marginatum*. *Biochem. System. Ecol.*, v.27, n.5, p.539-541, 1999b.
- SATO, Y., KIDA, H., NAKAHAYASHI, Y., MURASUGI, S. Testosterone-5 α -reductase inhibitors, hair growth stimulants, and prostatic hypertrophy inhibitors. JP. Pat. 2000095649, 2000, 5p. Apud: Chem. Abstr., v. 132, abstr.n.255741, 2000.
- SAWADA, H., OOISHI, K., YOSHIDA, Y., CHATANI, T., MORI, C., WATANABE, T., YOKOKURA, T. Acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitors containing a piperidine derivative. JP 08310949, 1996, 7 pp.
- SCHELOSKY, L., RATTAUF, C., JENDROSKA, K., POEWE, W. Kava and dopamine antagonism. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.58, n.5, p.639-640, 1995.
- SCHWENDER, J., SEEMANN, M., LICHTENTHALER, H.K., Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. *Biochem. J.*, v.316, p.73-80, Part 1 1996.
- SEERAM, N.P., JACOBS, H., Mc LEAN, S., REYNOLDS, W.F. Prenylated hydroxybenzoic acid derivatives from *Piper murrayanum*. *Phytochem.*, v.43, n.4, p.863-865, 1996.
- SEITZ, U., SCHUELE, A., GLEITZ, J. [³H]-Monoamine uptake inhibition properties of kavapyrones. *Planta Med.*, v.63, n.6, p.548-549, 1997.

- SETZER, W.N., STEZER, M.C., BATES, R.B., NAKKIEW, P., JACKES, B.R., CHEN, L., MCFERRIN, M.B., MEEHAN, E.J. Antibacterial hydroxycinnamic esters from *Piper caninum* from Paluma, North Queensland, Australia. The crystal and molecular structure of (+)-bornyl coumarate. *Planta Med.*, v.65, n.8, p.747-749, 1999.
- SHANKARACHARYA, N.B., RAO, L.J., NAIK, J.P., NAGALAKSHMI, S. Characterization of chemical constituents of Indian long pepper (*Piper longum* L.) *J. Food Sci. Technol.*, v.34, n.1, p.73-75, 1997.
- SIANI, A.C., SAMPAIO, A.L.F., SOUSA, M.C., HENRIQUES, M.G.M.O., RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, p.38-43, 2000.
- SIDDIQUI, B.S., BEGUM, S., GULZAR, T., FARHAT, N.F. An amide from fruits of *Piper nigrum*. *Phytochem.*, v.45, n.8, p.1617-1619, 1997.
- SIERRA, M.I. Aspects of indole alkaloid accumulation in *Tabernaemontana* tissue cultures: differentiation, peroxidases and stability. Leiden, 1991. 132p. (Tese de Doutorado – Leiden Universiteit).
- SINGH, A., SHARMA, S.C., ZUTSHI, U., BEDI, K.L. Improved bioavailability of dapsone in the presence of piperine in rats. *Pharm. Sci.*, v.3, n.40, p.189-191, 1997.
- SINGH, S.K., PRASAD, A.K., OLSEN, C. E., JHA, A., JAIN, S.C., PARMAR, V.S., WENGEL, J. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. *Phytochem.*, v.43, n.6, p.1355-1360, 1996.
- SINGH, Y.N. Kava - an overview. *J. Ethnopharmacology*, v. 37, n.1, p.13-45, 1992.
- SMITH, B.G., RUBERY, P.H. Modifications of wound-induced changes in phenylalanine ammonia lyase activity. *Plant Sci. Letters*, v.15, n.1, p. 29-33, 1979.
- SMITH, J.I., SMART, N.J., MISAWA, M., KURZ, W.G.W., TALLEVI, S.G., DICOSMO, F. Increased accumulation of indole alkaloids by some cell lines of *Catharanthus roseus* in response to addition of vanadyl sulfate. *Plant Cell Rep.*, v.6, n.2, p.142-145, 1987.
- SOTHEESWARAN, S., SHARIF, M.R., MABUSELA, W.T. Studies on kava carbohydrates. *A.C.G.C. Chem. Res. Commun.*, v.7, p.25-28, 1998.
- SRINIVAS, P.V., RAO, M. Isopiperolein B: an alkamide from *Piper nigrum*. *Phytochem.*, v.52, n.5, p.957-958, 1999.
- SRIVASTAVA, S., VERMA, R.K., GUPTA, M.M., KUMAR, S. Reversed-phase liquid chromatography of 1,3-benzodioxanes in *Piper mullesua*. *J. Chromatogr., A*, v.841, n.1, p.123-126, 1999a.
- SRIVASTAVA, S., GUPTA, M.M., KUMAR, S. Volatile constituents of the essential oil of *Piper mullesua* from Manipur (India). *J. Essent Oil Res.*, v.11, p.563-564, 1999b.

- SRIVASTAVA, S., VERMA, R.K., GUPTA, M.M., KUMAR, S. Chemical constituents of *Piper mullesua*. *J. Indian Chem. Soc.*, v.77, n.6, p.305-306, 2000.
- STAFFORD, A., WARREN, G. *Plant Cell and Tissue Culture* Open University Press, 1991.
- STÖHR, J.R., XIAO, P.G., BAUER, R. Isobutylamides and a new (methylbutyl)amide from *Piper sarmentosum*. *Planta Med.*, v.65, n.2, p.175-177, 1999.
- TABATA, M., OGINO, F., YOSHIOKA, K., YOSHIKAWA, N., HIRAOKA, N. Selection of cell lines with higher yield of secondary products, 1978. *In* *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978* (T. A. Thorpe, ed.), pp. 213-222. University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.
- TERREAUX, C., GUPTA, M.P., HOSTETTMANN, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochem.*, v.49, n.2, p.461-464, 1998.
- THANH, L., DUNG, N.X., BIGHELLI, A., CASANOVA, J., LECLERQ, P.A. Combination of capillary GC, GC/MS and ¹³CNMR for the characterization of the rhizome oil of *Piper betle* L. (Piperaceae) from Vietnam. *Spectroscopy*, v.13, n.2, p.131-136, 1997.
- TIRILLINI, B., VELASQUEZ, E.R., PELLEGRINO, R. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. *Planta Med.*, v.62, n.4, p.372-373, 1996.
- TORQUILHO, H.S., PINTO, A.C., GODOY, R.L.O., GUIMARÃES, E.F. Essential oil of *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Essent. Oil Res.*, v.11, p.429-430, 1999.
- TORRES-SANTOS, E.C., MOREIRA, D.L., KAPLAN, M.A.C., MEIRELLES, M.N., ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxy-chalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, n.5, p.1234-1241, 1999a.
- TORRES-SANTOS, E.C., RODRIGUES, J.M.JR, MOREIRA, D.L., KAPLAN, M.A.C., ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxy-chalcone by entrapment in poly (DL-lactide) nanoparticles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, n.7, p.1776-1778, 1999b.
- UEBELHACK, R., FRANKE, L., SCHEWE, H.J. Inhibition of platelet MAO-B by kavapyrone-enriched extract from *Piper methysticum* forster (kava-kava). *Pharmacopsychiatry*, v.31, n.5, p.187-192, 1998.
- UPADHYAY, S.N., VISHWAKARMA, R.A., GHOSAL, S., SHUKLA, S., BOSE, C., KAMRA, A. Process for isolation and synthesis of 1-(3,4-methylenedioxy-phenyl)-1E-tetradecene and its analogs and their activities against tumors and infections. U.S. Pat. 5962515A 5 oct 1999, 11p.

- VAN DER HEIJDEN, R. Indole alkaloids in cell and tissue cultures of *Tabernaemontana* species. Leiden, 1989. 184p. (Tese de Doutorado – Leiden Universiteit).
- VENKATESHWARLU, V. Cyclo-oxygenase inhibitors from spices. *Indian Drugs*, v.34, n.8, p.427-432, 1997.
- VICKERY, M.L., VICKERY, B. *Secondary Plant Metabolism*. Macmillan Press, 1981.
- WALDEN, J., VON WEGERER, J., WINTER, U., BERGER, M., Actions of kawain and dihydromethysticin on ipsapirone-induced field potential changes in the hippocampus. *Hum. Psychopharmacol.*, v.12, n.3, p.265-270, 1997.
- WATANABE, J., KASAI, K., KANEGAE, R., SAITO, M., ISHIKAWA, H., NAGASAKI, K., NAGANO, S., ARIGA, T., TOBE, K. JP. Pat. 2000297042, 2000, 6p. Apud: Chem. Abstr., v. 133, abstr.n. 295746, 2000.
- WICHES, H.J., VISSER, J.F., HUIZING, H.J., PRAS, N. Occurrence of L-DOPA and dopamine in plants and cell cultures of *Mucuna pruriens* and effects of 2,4-D and NaCl on these compounds. *Plant Cell Tiss. Org.*, v. 33, n.3, p. 259, 1993.
- WICKREMESINHE, E.R.M., ARTECA, R.N., *Taxus* cell-suspension cultures - Optimizing growth and production of taxol, *J. Plant Physiol.*, v.144, n.2, p.183-188, 1994.
- WINK, M., LEHMANN, P. Wounding- and elicitor-induced formation of coloured chalcones and flavans (as phytoalexins) in *Hippeastrum hortorum*. *Bot. Acta*, v.109, n.5, p.412-421, 1996.
- WU, Q.L., WANG, S.P., TU, G.Z., FENG, Y.X., YANG, J.S. Alkaloids from *Piper puberulum*. *Phytochem.*, v.44, n.4, p.727-730, 1997.
- YANG, J.N., CHOU, C.C. Antimicrobial activity of variuos solvent extracts of betel quid ingredients. *Shipin Kexue*, v.24, n.5, p.497-505, 1997. CA: 128: 84076
- YAMAHARA, J. Allergy inhibitors containing extracts of *Piper betel*. JP 11130685, 1999, 5p.
- YUNCKER, T. G. (1972) The Piperaceae of Brazil. I. *Piper* - Group I, II, III, IV. *Hoehnea* 2, 19-366.
- ZHANG, S.X., CHEN, K., LIU, X.J., ZHANG, D.C., TAO-WIEDMANN, T.W., LEU, S.L., MCPHAIL, A.T., LEE, K.H. The isolation and structural elucidation of 3 new neolignans, puberulin A, puberulin B, and puberulin C, as platelet activating factor receptor antagonists from *Piper puberulum*. *J. Nat. Prod.*, v.58, n.4, p.540-547, 1995.
- ZHANG, K., CHEN, C., WANG, D., WU, Y. A new amide dimer from *Piper longum*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, v.18, n.3, p.353-355, 1996.

- ZHANG, K., CHEN, C., CHEN, D. Chemical constituents of *Piper polysiphorum*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, v.19, n.2, p.211-212, 1997. CA 127: 343877.
- ZHANG, K., NI, W., CHEN, C., LIU, Y. Chemical constituents of *Piper mullesua*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, v.20, n.3, p.374-376, 1998. CA 130: 234631.
- ZHANG, K., NI, W., CHEN, C. Chemical constituents of *Piper boehmeriaefolium* var. *Tonkinense*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, v.11, n.1, p.44-47, 1999. CA: 131: 167707.
- ZENG, H.W., JIANG, Y.Y, CAI, D.G., BIAN, J. LONG, K., CHEN, Z.L. Piperbetol, methylpiperbetol, piperol A and piperol B: a new series of highly specific PAF receptor antagonists from *Piper betle*. *Planta Med.*, v.63, n.4, p.296-298, 1997.
- ZENK, M.H. Chasing the enzymes of secondary metabolism: Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochem.*, v.30, n.12, p.3861-3863, 1991.
- ZUCKER, M. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol*, v.40, n.5, p.779, 1965.