



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISOLDA DA SILVA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper spp.***

Recife

2023

ISOLDA DA SILVA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar

Coorientador (a): Prof. Dr. Marcilio Martins de Moraes

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Barbosa, Isolda da Silva.

Caracterização química e atividades antioxidante e citotóxica in vitro dos óleos essenciais de Piper spp. / Isolda da Silva Barbosa. - Recife, 2023.  
66 p. : il., tab.

Orientador(a): Jaciana dos Santos Aguiar

Cooorientador(a): Marcilio Martins de Moraes

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2023.

1. Caracterização química. 2. Antioxidante. 3. Câncer. I. Aguiar, Jaciana dos Santos. (Orientação). II. Moraes, Marcilio Martins de. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

ISOLDA DA SILVA BARBOSA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
CITOTÓXICA *IN VITRO* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 31/08/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Erwelly Barros de Oliveira (Examinador 1)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Bruno Iraquitan Miranda da Silva (Examinador 2)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a todas as meninas e mulheres que fazem ciência e ajudam a fazer deste mundo um lugar melhor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me levantar todos os dias e por me mostrar a luz em momentos sombrios. Agradeço também à Santíssima Virgem, que a todo tempo intercede por seus filhos.

Agradeço a minha família por todo suporte e incentivo. Obrigada, mãe, por doar sua vida inteiramente a suas filhas. Obrigada, pai, por não medir esforços para nos oferecer o melhor. Obrigada, Osiane, por ser a melhor irmã, amiga e confidente que eu poderia ter. Não seria metade do que sou sem vocês.

Agradeço aos amigos que estiveram comigo antes da graduação e aos que a UFPE me trouxe, particularmente, Luiza, Mari, Gabi, Marta, Mel, Lucas, Ray, Carol e Maria Bonilla. Mesmo por caminhos diferentes depois de alguns períodos, vocês tornaram minha rotina mais colorida desde o início. Agradeço a todos os integrantes do LEVI e do Departamento de Antibióticos, em especial a Jefferson, Livia e Erwelly por todo companheirismo e cumplicidade.

Agradeço a minha orientadora, professora Jaciana Aguiar, que me acolheu de braços abertos nos tempos conturbados da pandemia e sempre mostrou-se disponível para ajudar no que pudesse. Agradeço também ao professor Marcilio Martins pela orientação e pela disponibilização de recursos necessários para esta pesquisa. Agradeço igualmente aos integrantes do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da UFRPE pelo auxílio em algumas etapas deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Experimentação *In Vitro* e *In Vivo* pelo espaço e por proporcionar bons momentos e a construção de conhecimentos diversos. Do mesmo modo, ao Centro de Biociências, por ser um ambiente de acontecimentos inesquecíveis.

Agradeço, por fim, a Universidade Federal de Pernambuco por ter se tornado minha segunda casa e por ter aberto portas que me levaram a novos rumos na vida.

*“O que torna belo o deserto - disse o pequeno príncipe - é que ele esconde um poço em algum lugar.”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

O reino vegetal constitui uma importante fonte de recursos para o ser humano, principalmente no que se refere às terapias de saúde. Diversos fármacos disponíveis na clínica atualmente foram desenvolvidos a partir de compostos presentes em plantas, como os antineoplásicos paclitaxel, vincristina e vinblastina. Além disso, os óleos essenciais, advindos do metabolismo secundário vegetal, são alvos de muitos estudos por performar atividades biológicas interessantes para as muitas indústrias do mundo contemporâneo. Tendo em vista isso, o presente estudo possui o objetivo de analisar a constituição química, a atividade antioxidante e a atividade citotóxica *in vitro* dos óleos essenciais de *Piper spp.* Os óleos essenciais de *P. arboreum* (OEPA), de *P. corcovadensis* (OEPC) e de *P. marginatum* (OEPM) foram extraídos por hidrodestilação e submetidos a uma análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Após identificação dos compostos, foram avaliados como majoritários o  $\alpha$ -Zingibereno no OEPA, o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno no OEPC e a (E)-Isoeemicina no OEPM. A atividade antioxidante dos óleos se deu a partir do uso dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), e como padrão, foram utilizados o ácido ascórbico e o Trolox, respectivamente. As porcentagens de sequestro do DPPH foram de 13,39% com o OEPA, de 13,18% com o OEPC e de 11,55% com o OEPM, ao passo que com o ácido ascórbico, o sequestro do radical foi de 85,25%, todos a uma concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Quanto ao ABTS, a atividade foi avaliada a partir do cálculo da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), expressa em  $\mu\text{g/mL}$ . O OEPA apresentou TEAC de 0,0047  $\mu\text{g/mL}$ , o OEPC, de 0,0132  $\mu\text{g/mL}$  e o OEPM, de 0,0078  $\mu\text{g/mL}$ . O ensaio de citotoxicidade *in vitro* envolveu linhagens cancerígenas e não cancerígenas, se deu por meio do método do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), como controle positivo foi utilizado o paclitaxel (10 $\mu\text{g/mL}$ ) e os óleos foram testados em uma concentração máxima de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Na MCF-7 (câncer de mama humano), OEPA inibiu o crescimento em 76,44%, OEPC inibiu em 94,72% e OEPM inibiu em 23,31%. Na linhagem HL-60 (Leucemia Promielocítica Aguda), OEPA causou inibição de 90,63%, OEPC, inibição de 65,13% e OEPM, inibição de 61,34%. Na linhagem HT-29 (câncer colorretal humano), OEPA inibiu 81,52%, OEPC inibiu 81,74% e OEPM inibiu 85,06%. Na linhagem L929 (fibroblasto murino), OEPA inibiu 83,76%, OEPC inibiu 60,81% e OEPM inibiu 88,14%. Na linhagem Vero CCL-81 (epitélio de rim de *Cercopithecus aethiops*), OEPA provocou inibição de 64,28%, OEPC, inibição de 22,43% e OEPM, inibição de 18,77%. Foi estabelecida, também, a concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) dos óleos que provocaram inibição superior a 70%. A CI<sub>50</sub> das amostras variou entre 12,48 e 30,86  $\mu\text{g/mL}$ . Ademais, o cálculo do índice de seletividade mostrou maior seletividade de OEPA, OEPC e OEPM para as linhagens cancerígenas em relação a L929 e Vero CCL-81. Portanto, os óleos essenciais de *Piper* provocaram resultados promissores para os ensaios da citotoxicidade e podem contribuir na busca por novos tratamentos oncológicos. Para isso, são necessárias mais pesquisas que investiguem os mecanismos de ação de seus componentes.

**Palavras-chave:** *Piper*; caracterização química; antioxidante; citotoxicidade; câncer.



## ABSTRACT

The kingdom Plantae is an important origin of resources for human beings, especially regarding health therapies. Several drugs currently available in the clinic were developed from compounds present in plants, such as the antineoplastic agents paclitaxel, vincristine and vinblastine. In addition, essential oils, which derived from plant secondary metabolism, are the subject of many studies because they perform interesting biological activities for the many industries of the contemporary world. For this reason, the present study aims to analyze the chemical constitution, antioxidant activity and *in vitro* cytotoxic activity of essential oils from *Piper spp.* Then, the essential oils of *P. arboreum* (OEPA), *P. corcovadensis* (OEPC) and *P. marginatum* (OEPM) were extracted by hydrodistillation and submitted to an analysis by gas chromatography-mass spectrometry. After identifying the compounds,  $\alpha$ -Zingiberene in OEPA, 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene in OEPC and (E)-Isoelemicin in OEPM were evaluated as major. The antioxidant activity of the oils was due to the use of the radicals 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and as standard, ascorbic acid and Trolox were used, respectively. The percentages of DPPH scavenging were 13,39% with OEPA, 13,18% with OEPC and 11,55% with OEPM, whereas with ascorbic acid, radical scavenging was 85,25%, all at a concentration of 500  $\mu\text{g/ml}$ . As for ABTS, the activity was evaluated based on the calculation of the Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC), expressed in  $\mu\text{g/mL}$ . The OEPA presented TEAC of 0.0047  $\mu\text{g/mL}$ , the OEPC of 0.0132  $\mu\text{g/mL}$  and the OEPM of 0.0078  $\mu\text{g/mL}$ . The *in vitro* cytotoxicity assay involved cancer and non-cancer strains, using the 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method, as a positive control paclitaxel (10 $\mu\text{g/mL}$ ) was used and the oils were tested at a maximum concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ . In MCF-7 (human breast cancer), OEPA inhibited growth by 76.44%, OEPC inhibited it by 94.72%, and OEPM inhibited it by 23.31%. In the HL-60 strain (Acute Promyelocytic Leukemia), OEPA caused 90.63% inhibition, OEPC, 65.13% inhibition and OEPM, 61.34% inhibition. In the HT-29 strain (human colorectal cancer), OEPA inhibited 81.52%, OEPC inhibited 81.74% and OEPM inhibited 85.06%. In the L929 strain (murine fibroblast), OEPA inhibited 83.76%, OEPC inhibited 60.81% and OEPM inhibited 88.14%. In the strain Vero CCL-81 (kidney epithelium of Cercopithecus aethiops), OEPA provoked 64.28% inhibition, OEPC, 22.43% inhibition, and OEPM, 18.77%. The mean inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of the oils that caused inhibition greater than 70% was also established. The  $\text{IC}_{50}$  of the samples varied between 12.48 and 30.86  $\mu\text{g/mL}$ . Furthermore, the calculation of the selectivity index showed greater selectivity of OEPA, OEPC and OEPM for cancerous cell lines in relation to L929 and Vero CCL-81. Therefore, *Piper's* essential oils led to promising results for cytotoxicity assays and may contribute to the search for new cancer treatments. For this, further research is needed to investigate the mechanisms of action of its components.

**Keywords:** *Piper*; chemical characterization; antioxidant; citotoxicity; cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                   |                                                                                |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1 -</b> | Partes aéreas de <i>P. arboreum</i>                                            | 17 |
| <b>Figura 2 -</b> | Partes aéreas de <i>P. corcovadensis</i>                                       | 18 |
| <b>Figura 3 -</b> | Partes aéreas de <i>P. marginatum</i>                                          | 20 |
| <b>Figura 4 -</b> | Marcadores do câncer                                                           | 22 |
| <b>Figura 5 -</b> | Reação de redução do radical DPPH                                              | 30 |
| <b>Figura 6 -</b> | Reação da estabilização do radical ABTS <sup>+</sup> por composto antioxidante | 31 |
| <b>Figura 7 -</b> | Redução do MTT a formazan                                                      | 33 |
| <b>Figura 8 -</b> | Etapas do método do MTT                                                        | 34 |
| <b>Figura 9 -</b> | Diluição seriada para construção da curva dose-resposta                        | 34 |

## LISTA DE TABELAS

|                    |                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1 -</b>  | Rendimento dos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> extraídos por hidrodestilação das folhas frescas                                                                                  | 36 |
| <b>Tabela 2 -</b>  | Compostos químicos do óleo essencial de <i>P. arboreum</i> (OEPA), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total                                            | 36 |
| <b>Tabela 3 -</b>  | Compostos químicos do óleo essencial de <i>P. corcovadensis</i> (OEPC), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total                                       | 38 |
| <b>Tabela 4 -</b>  | Compostos químicos do óleo essencial de <i>P. marginatum</i> (OEPM), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total                                          | 39 |
| <b>Tabela 5 -</b>  | Percentuais de sequestro do radical DPPH provocados pelos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> e pelo ácido ascórbico com seus respectivos desvios padrões                            | 41 |
| <b>Tabela 6 -</b>  | Percentuais de sequestro do radical ABTS+ provocados pelos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> e pelo Trolox com seus respectivos desvios padrões                                    | 42 |
| <b>Tabela 7 -</b>  | Concentrações efetivas médias (CE <sub>50</sub> ) dos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> e Trolox e capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) das amostras               | 42 |
| <b>Tabela 8 -</b>  | Percentuais de inibição e EPM de linhagens celulares <i>in vitro</i> após exposição de 72h aos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> (50 µg/mL) e ao Paclitaxel (10 µg/mL)             | 43 |
| <b>Tabela 9 -</b>  | Concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) com intervalo de confiança dos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> e do Paclitaxel em linhagens celulares <i>in vitro</i> após 72h | 44 |
| <b>Tabela 10 -</b> | Índices de seletividade dos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> e do Paclitaxel para linhagens tumorais em relação à linhagem L929                                                   | 45 |
| <b>Tabela 11 -</b> | Índices de seletividade dos óleos essenciais de <i>Piper spp.</i> e do Paclitaxel para linhagens tumorais em relação à linhagem Vero CCL-81                                            | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                    |                                                              |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|
| ABTS               | 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)     |
| AI                 | Índice de retenção                                           |
| ATO                | Trióxido de arsênio                                          |
| ATRA               | <i>All-trans retinoic acid</i>                               |
| CAT                | Catalase                                                     |
| CG-EM              | Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa      |
| CI <sub>50</sub>   | Concentração inibitória média                                |
| CIM                | Concentração inibitória mínima                               |
| CTH                | Célula tronco hematopoética                                  |
| Da                 | Daltons                                                      |
| DL <sub>50</sub>   | Dose letal média                                             |
| DMEM               | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                      |
| DMSO               | Dimetilsulfóxido                                             |
| DPPH               | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil                                |
| eV                 | Elétron-volt                                                 |
| GPx                | Glutathione peroxidase                                       |
| IS                 | Índice de seletividade                                       |
| LPA                | Leucemia Promielocítica Aguda                                |
| MTT                | Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio |
| OEPA               | Óleo essencial de <i>Piper arboreum</i>                      |
| OEPC               | Óleo essencial de <i>Piper corcovadensis</i>                 |
| OEPm               | Óleo essencial de <i>Piper marginatum</i>                    |
| PML                | <i>Promyelocytic Leukemia gene</i>                           |
| ppm                | Partes por milhão                                            |
| RAR $\alpha$       | Receptor $\alpha$ do ácido retinóico                         |
| rpm                | Rotação por minuto                                           |
| RPMI 1640          | <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>                  |
| SC-CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono supercrítico                              |
| SOD                | Superóxido dismutase                                         |
| TEAC               | Capacidade antioxidante equivalente a Trolox                 |
| UV                 | Ultravioleta                                                 |

## SUMÁRIO

|          |                                                   |           |
|----------|---------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                 | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                  | <b>15</b> |
| 2.1      | Objetivo geral                                    | 15        |
| 2.1      | Objetivos específicos                             | 15        |
| <b>3</b> | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>                      | <b>16</b> |
| 3.1      | Gênero <i>Piper</i>                               | 16        |
| 3.1.1    | <i>Aspectos gerais de Piper spp.</i>              | 16        |
| 3.1.2    | <i>Piper arboreum</i>                             | 16        |
| 3.1.3    | <i>Piper corcovadensis</i>                        | 18        |
| 3.1.4    | <i>Piper marginatum</i>                           | 19        |
| 3.2      | Câncer                                            | 20        |
| 3.2.1    | <i>Aspectos gerais do câncer</i>                  | 20        |
| 3.2.2    | <i>Câncer de mama</i>                             | 22        |
| 3.2.3    | <i>Câncer colorretal</i>                          | 23        |
| 3.2.4    | <i>Leucemia Promielocítica Aguda</i>              | 24        |
| 3.3      | Estresse oxidativo                                | 26        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b>                                | <b>28</b> |
| 4.1      | Material botânico                                 | 28        |
| 4.2      | Extração dos óleos essenciais                     | 28        |
| 4.3      | Análise por CG-EM e identificação dos componentes | 28        |
| 4.4      | Atividade antioxidante                            | 29        |
| 4.4.1    | <i>Método do DPPH</i>                             | 29        |
| 4.4.2    | <i>Método do ABTS+</i>                            | 30        |
| 4.5      | Atividade citotóxica <i>in vitro</i>              | 32        |
| 4.5.1    | <i>Cultura de células</i>                         | 32        |
| 4.5.2    | <i>Método do MTT</i>                              | 33        |
| 4.5.3    | <i>Índice de seletividade</i>                     | 35        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>                                 | <b>36</b> |
| 5.1      | Rendimento dos óleos                              | 36        |
| 5.2      | Caracterização química                            | 36        |
| 5.3      | Atividade antioxidante                            | 40        |

|          |                                           |           |
|----------|-------------------------------------------|-----------|
| 5.3.1    | <i>Sequestro do DPPH</i>                  | 40        |
| 5.3.2    | <i>Sequestro do ABTS+</i>                 | 41        |
| 5.4      | Atividade citotóxica                      | 42        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÃO</b>                          | <b>46</b> |
| 6.1      | Rendimento dos óleos                      | 46        |
| 6.2      | Componentes químicos dos óleos essenciais | 46        |
| 6.3      | Avaliação do sequestro do radical DPPH    | 47        |
| 6.4      | Avaliação do sequestro do radical ABTS+   | 48        |
| 6.5      | Classificação da citotoxicidade           | 48        |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO</b>                          | <b>50</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>                        | <b>51</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o início de sua história, o ser humano sempre buscou na natureza recursos que pudesse usar contra enfermidades. O reino vegetal, então, passou a ser uma fonte para a medicina popular (Petrovska, 2012). Exemplo disso é o registro mais antigo que se tem de uso de plantas medicinais, o qual é datado de aproximadamente 5000 anos e atribuído aos povos sumérios (Kelly, 2019). Na atualidade, sabe-se que muitos fármacos foram desenvolvidos a partir de compostos de origem vegetal, incluindo os fármacos antineoplásicos.

Dentre os antineoplásicos mais conhecidos que foram primariamente descobertos em plantas, pode-se citar a vincristina, a vinblastina, os irinotecanos e os taxanos (Moraes *et al.*, 2011). A vincristina e a vinblastina são alcalóides isolados de *Catharanthus roseus* e era pesquisada inicialmente como hipoglicemiante oral, mas passou a ser testada contra leucemias por causar depressão na medula óssea dos camundongos utilizados nos ensaios (Cragg; Newman, 2005). Os irinotecanos, por sua vez, são alcalóides semi-sintetizados pela primeira vez na década de 1980 a partir da planta *Camptotheca acuminata*, e hoje são utilizados no tratamento de carcinomas, linfomas e leucemias (Grivicich *et al.*, 2001). Já os taxanos são derivados da casca de *Taxus brevifolia* e incluem o paclitaxel e o docetaxel, empregados principalmente contra os cânceres de mama e de ovário (Bertino; Salmon, 2001).

Dentro do uso de plantas, ainda, estão os óleos essenciais, que são compostos naturais e voláteis produzidos como metabólitos secundários por diversos órgãos vegetais, como folhas, caule, flores, frutos e raízes, e armazenados por células secretoras, canais, células epidérmicas e tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008). Além disso, os óleos essenciais e seus componentes são importantes para os diversos setores da indústria no mundo contemporâneo e são empregados baseados nas atividades biológicas que desempenham na natureza, tais como bactericida, antifúngica e inseticida. Mais especificamente, são utilizados na indústria farmacêutica e agrícola, e na fabricação de cosméticos e de produtos de limpeza (Silva *et al.*, 2003; Hajhashemi *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2003).

Considerando-se tais informações, o presente estudo buscou agregar mais conhecimentos acerca da composição e das propriedades dos óleos essenciais de *Piper*, um gênero numeroso e diverso mas ainda com muitas espécies a serem estudadas quanto às atividades biológicas. Portanto, foram escolhidos ensaios que tornassem possíveis a identificação dos constituintes químicos desses óleos e a observação de possíveis ações antioxidante e citotóxica *in vitro*. Por fim, espera-se que este trabalho forneça base científica para maior aprofundamento dessa temática no futuro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Caracterizar os componentes químicos dos óleos essenciais de *Piper spp.* e avaliar suas atividades antioxidante e citotóxica.

### 2.2 Objetivos específicos

- ❖ Obter óleos essenciais das folhas de *Piper arboreum*, *Piper corcovadensis* e *Piper marginatum*;
- ❖ Identificar os compostos que constituem os óleos essenciais;
- ❖ Observar ação antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS+;
- ❖ Analisar citotoxicidade *in vitro* dos óleos essenciais nas linhagens celulares MCF-7, HL-60, HT-29, L929 e Vero CCL-81.



### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Gênero *Piper*

##### 3.1.1 Aspectos gerais de *Piper* spp.

O gênero *Piper*, que pertence à família Piperaceae, possui mais de 700 espécies descritas, representando um dos grupos mais diversos dentre as angiospermas basais. Esse gênero está distribuído nos mais diversos ecossistemas tropicais e subtropicais ao redor do globo terrestre (Quijano-Abril *et al.*, 2006). No Brasil, *Piper* é distribuído por todas as regiões, totalizando a ocorrência de 299 espécies, sendo 194 delas endêmicas do país (Flora e Funga do Brasil, 2023). Embora numerosas, as espécies de *Piper* compartilham semelhanças morfológicas, tais como folhas simples e alternadas e caules articulados. No entanto, as inflorescências sofrem variações de acordo com a espécie, podendo ser apresentadas em espádices ou espigas, as quais agrupam diminutas flores dioicas ou hermafroditas (Greig, 2004).

Além da diversidade de espécies, *Piper* abriga uma grande variedade de compostos fitoquímicos como alcaloides, amidos, lignanas, terpenos e compostos fenólicos, produzidos em todas as partes das plantas e relacionados com as várias relações ecológicas que as espécies mantêm com outros seres vivos, como herbívoros e parasitas (Goméz-Calvario; Rios, 2019; Philbin *et al.*, 2022). Outrossim, grande parte do gênero é aromática, sendo seus óleos essenciais itens de interesse e submetidos a testes de atividades antimicrobiana e inseticida. Tais atividades vêm revelando, portanto, grande potencial da aplicação do gênero na inovação terapêutica e no desenvolvimento biotecnológico (Santos *et al.*, 2012). Ademais, *Piper* é utilizado na culinária e na ornamentação, bem como na medicina popular em muitos lugares, por exemplo Indonésia, Índia, Brasil e China. O uso medicinal dá-se, principalmente, por meio de decocções e macerações, empregadas contra sintomas de doenças inflamatórias, tais como asma, bronquite, reumatismo, inflamações de garganta e gastrite (Lima *et al.*, 2020).

##### 3.1.2 *Piper arboreum*

*P. arboreum* é popularmente conhecida como alecrim-de-angola, jaborandi e pimenta do mato. Trata-se de um arbusto com altura variando entre 1 e 4 m, com ramos cilíndrico-sulcados de 4-8 mm de diâmetro. Suas folhas são papiráceas, pecioladas e apresentam

comprimento de 2-4 cm, sendo seus ápices agudo-acuminados e suas bases, inequilátero-agudas. As inflorescências estão organizadas em espigas eretas de  $7-12 \times 0,3-0,5$  cm, com flores de quatro estames, estilete curto e três estigmas. Já os frutos possuem comprimento de 0,8-1 m e são oblongos, lateralmente achatados e de estigmas persistentes. A distribuição geográfica dessa espécie se dá em florestas ombrófilas densas, matas de encosta, restingas e matas alagadiças, ocorrendo desde a América Central até o Sul do Brasil (Guimarães; Monteiro, 2006).

Na literatura, já existem relatos de algumas atividades biológicas de *P. arboreum*, tais como tripanocida, larvicida e moduladora antimicrobiana. Segundo Regasini *et al.* (2009), extratos etanólicos e suas frações hexânica e de acetato de etila das frutas, das folhas e do caule demonstraram atividade tóxica *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*, com  $CI_{50}$  inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$ . Do mesmo modo, segundo Filho *et al.* (2021), o óleo essencial de *P. arboreum* provocou mortalidade superior a 90% das larvas L3 e L4 resistentes de *Aedes aegypti* após 24h de exposição. Por fim, a atividade moduladora antimicrobiana, segundo Matias *et al.* (2022), foi descrita a partir da redução em 50% da CIM (concentração inibitória mínima) da ampicilina, quando combinado com o óleo essencial da planta, sob cepas de *Staphylococcus aureus* SA10, *Staphylococcus mutans* ATCC00446, *Escherichia coli* ATCC25922 e *Escherichia coli* EC 06.

**Figura 1.** Partes aéreas de *P. arboreum*



Fonte: Eloisa Helena de A. Andrade (2014).

### 3.1.3 *Piper corcovadensis*

*P. corcovadensis*, chamada popularmente de falso-jaborandi, é uma planta medicinal tradicionalmente usada para aliviar dores de dente por sua ação analgésica sobre a mucosa bucal (Facundo *et al.*, 2004). Tal espécie é endêmica do Brasil, ocorrendo nos domínios da Amazônia e da Mata Atlântica e crescendo em florestas ombrófilas e pluviais (Flora do Brasil, 2023). Apresenta-se como um arbusto de aproximadamente 2 m de altura, com ramos cilíndricos estriados medindo 2-3 mm de diâmetro. As folhas são pecioladas, papiráceas, de morfologia lanceolada, oblonga e elíptica, e suas lâminas medem 12-16 × 4-6 cm. As inflorescências são em racemos eretos com dimensões de 3,0 × 0,6 cm, as quais organizam flores pediceladas, com quatro estames, quatro estigmas e estiletes curtos. Seus frutos são oblongos, tetragonais e sulcados, medindo 1,5 × 1,5 mm (Queiroz *et al.*, 2020).

Ademais, os ensaios já publicados com a utilização dessa espécie indicam atividades larvicidas, antimicrobianas e inseticidas. De acordo com Silva *et al.* (2016), o óleo essencial das folhas de *P. corcovadensis* demonstrou-se muito tóxico para larvas L4 de *A. aegypti*, com CL<sub>50</sub> estabelecida em 30,52 ppm. Outrossim, segundo Fernandez *et al.* (2019), compostos que foram isolados da raiz da planta, bem como seu extrato cru, inibiram o crescimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* suscetíveis e resistentes às drogas isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida, etionamida, estreptomicina e penicilina. Além disso, o óleo essencial das folhas também manifestou-se tóxico para *Sitophilus zeamais*, responsável por grande perda da agricultura do milho ao redor do mundo, demonstrando ser, portanto, um caminho para o desenvolvimento de novas alternativas para o controle de pragas (Pimentel *et al.*, 2022).

**Figura 2.** Partes aéreas de *P. corcovadensis*



Fonte: Carlos Henrique Russi (2021).

### 3.1.4 *Piper marginatum*

*P. marginatum* não é uma espécie endêmica do Brasil, embora seja nativa da região Amazônica. No país, é popularmente conhecida como pimenta do mato e caapeba-cheirosa, mas também é chamada de “nhambuí” pelos povos indígenas tenharins. Seu uso na medicina tradicional indígena se dá pela aplicação tópica da raiz para alívio de dores e coceiras de feridas e picadas de animais (Di Stasi; Hiruma-Lima, 2002). No solo brasileiro, *P. marginatum* está presente nos domínios da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, preferencialmente em florestas de terra firme e ombrófilas (Flora e Funga do Brasil, 2023). Além de ocorrer em todas as cinco regiões brasileiras, há registros dessa espécie em outros países das Américas (Global Biodiversity Information Facility, 2022).

Essa planta apresenta-se como um arbusto, o qual pode atingir até 5 m de altura. A lâmina de suas folhas possui dimensões de 10-20 × 7-15 cm, base cordada, ápice acuminado, textura membranácea, tricomas nas margens das faces abaxial e adaxial e nervação palmatinérvea. As inflorescências tratam-se de espigas de crescimento curvo, com comprimento de até 15 cm, reunindo bractéolas triangular-peltadas franjadas em toda margem, bem como três estigmas sésseis e 4-5 estames. Ademais, os frutos são obopiramidais e glabros (Guimarães; Giordano, 2004).

A literatura já aponta atividades biológicas atreladas ao táxon, tais como larvicida, inseticida, leishmanicida, acaricida e antimicrobiana. De acordo com Autran *et al.* (2009), os óleos essenciais das folhas, do caule e das inflorescências foram capazes de repelir a oviposição e de matar larvas L4 de *Aedes aegypti*, com valores de CL50 estabelecidos abaixo de 25 ppm. Do mesmo modo, segundo Ayres *et al.* (2021), o óleo essencial das partes aéreas foi eficaz contra *Zabrotes subfasciatus*, com DL50 de 24 h definida em 1,17 µL/L. Macêdo *et al.* (2020), por sua vez, afirmou que o óleo essencial das folhas e o extrato etanólico e suas frações são tóxicos para *Leishmania amazonensis* nas formas de promastigota e amastigota.

Igualmente, a atividade acaricida foi observada por Ribeiro *et al.* (2016), cuja pesquisa mostrou que os óleos essenciais das folhas, do caule e das inflorescências mataram 50% dos indivíduos testados das espécies *Tetranychus urticae* Koch e *Neoseiulus californicus* McGregor a concentrações inferiores a 4 µL/L. Já a atividade antimicrobiana foi observada contra *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Xanthomonas albilineans*, *Colletotrichum scovillei*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*,

microrganismos estes que possuem importância médica e econômica (Duarte *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2012; Araújo *et al.* 2014; Gamboa *et al.*, 2018).

**Figura 3.** Partes aéreas de *P. marginatum*



Fonte: Robin Heymans (2023).

## 3.2 Câncer

### 3.2.1 Aspectos gerais do câncer

O câncer é definido pelo Instituto Nacional de Câncer (2022) como um conjunto de doenças caracterizadas pela divisão desordenada de células, as quais possuem capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes ou distantes. Isto é, as células cancerígenas tornam-se não responsivas aos mecanismos que regulam as taxas de proliferação e o processo de diferenciação celular adequado. Contudo, a oncogênese é um evento relativamente raro, visto que o ciclo celular normal é dotado de barreiras que protegem a integridade celular (Ward, 2002). Pensando-se nisso, é possível traçar as etapas pelas quais o câncer se desenvolve: 1) alterações genéticas; 2) anormalidades proteicas, enzimáticas ou hormonais; 3) formação do tumor primário no tecido de origem; 4) deslocamento do tumor para outros tecidos (metástase) (Naoum, 2016).

Assim como todas as células normais do corpo humano, a célula cancerígena tem suas características definidas a partir da expressão do DNA que carrega. No entanto, para que uma célula venha a ser cancerígena, é necessário que tal expressão seja alterada por mutações sucessivas em classes específicas de genes, como os proto-oncogenes, os supressores

tumorais, os genes envolvidos no reparo do DNA e os genes controladores do tempo de vida celular. Mutações essas que podem ser herdadas pelas gerações celulares seguintes. Então, durante um ciclo celular típico, são esperados pontos de checagem que identifiquem e corrijam os erros ou que induzam a destruição dessa célula anormal (NIH, 2021).

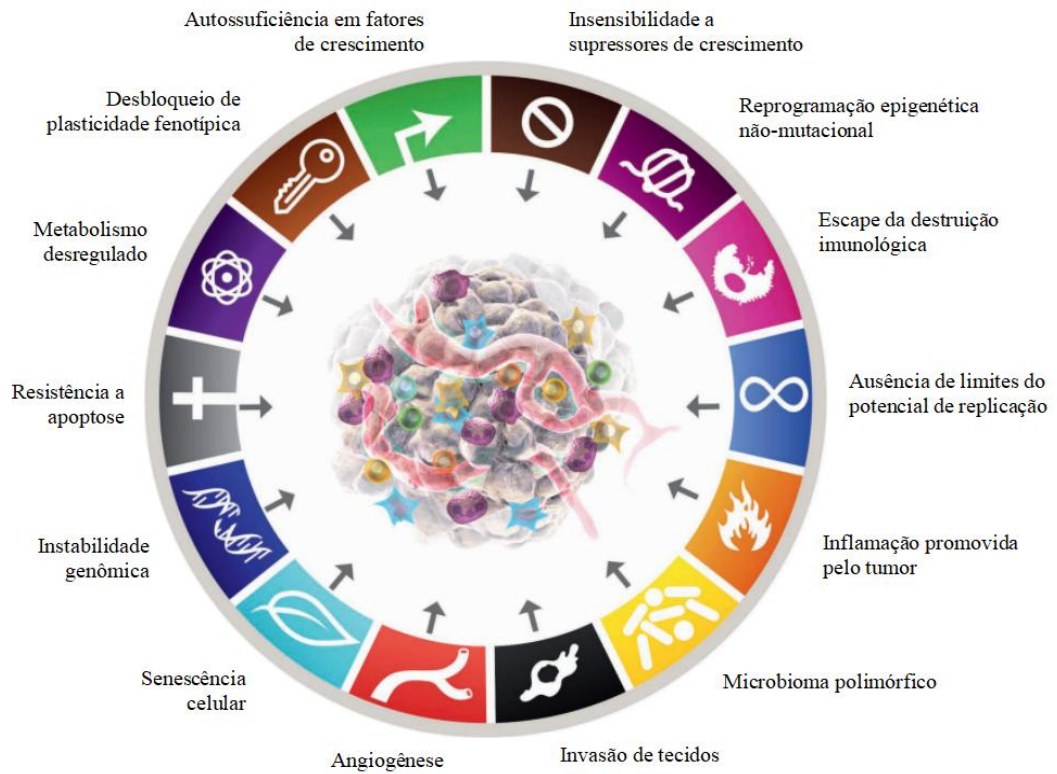
Vale salientar que, por ser um conjunto de doenças, o câncer pode se apresentar de variadas formas. Os tipos mais comuns são os carcinomas, formados por células epiteliais, tais como os cânceres de mama e de cólon. Esses se subdividem ainda em adenocarcinomas (caracterizados pela produção de fluidos e muco), basocelulares (iniciado na camada basal da epiderme) e de células escamosas (formados na camada de células escamosas) (Siegel *et al.*, 2017). Existem também os sarcomas, que se desenvolvem em ossos e tecidos moles, músculos, gorduras, endotélis e tecido fibroso (AI *et al.*, 2017). Outro tipo são as leucemias, que não formam tumores sólidos, mas que resultam na alta proliferação de glóbulos brancos na medula óssea, os quais acumulam-se no sangue periférico e provocam a eliminação de células normais (Rodrigues *et al.*, 2016). Ademais, existem os linfomas, caracterizados pelo acúmulo de linfócitos anormais nos linfonodos e vasos linfáticos (Kolstad *et al.*, 2017) e os melanomas, que se iniciam em melanócitos, podendo ocorrer tanto na pele, quanto em outros tecidos pigmentados (Lubbe *et al.*, 2016).

A partir de tudo isso, é possível definir os marcadores do câncer, que são características biológicas adquiridas por células cancerígenas, as quais seriam observáveis em quase todo tipo de câncer. Esse conceito foi estabelecido, então, para que fosse possível estudar os variados fenótipos que as doenças poderiam apresentar. Inicialmente, foram definidos seis: autossuficiência em fatores de crescimento, insensibilidade a supressores de crescimento, escape da apoptose, ausência de limites do potencial de replicação, sustento da angiogênese e invasão de tecidos (Hanahan e Weinberg, 2000). Contudo, com o avanço do conhecimento acerca da oncogênese, Hanahan e Weinberg (2011) estabeleceram outros pontos que passaram a integrar os marcadores: metabolismo celular desregulado, escape da destruição imunológica, inflamação promovida pelo tumor e instabilidade genômica. Onze anos depois, foram estabelecidas novas características adquiridas que são somadas às observações anteriores, consideradas até então como marcadores emergentes: desbloqueio da plasticidade fenotípica, reprogramação epigenética não-mutacional, microbioma polimórfico, e senescência celular (Hanahan, 2022).

Ao total, são evidentes catorze marcadores (Figura 4) e, dada toda essa complexidade que permeia o câncer, são necessários cada vez mais estudos que enriqueçam a compreensão

da comunidade científica sobre o seu desenvolvimento para que os métodos de tratamento sejam sempre melhorados.

**Figura 4.** Marcadores do câncer



Fonte: Adaptado de Hanahan (2022).

### 3.2.2 Câncer de mama

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais incidentes no mundo e também a segunda maior causa das mortes por câncer entre as mulheres, perdendo apenas para o câncer de pulmão (Mendonça *et al.*, 2004). No Brasil, é a primeira causa de morte feminina por câncer nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Os dados de incidência no país são preocupantes, uma vez que, para o ano de 2023, foram estimados mais de 70 mil novos casos (Instituto Nacional de Câncer, 2022), representando, um grave problema de saúde pública. Apesar de ser uma doença genética, o câncer de mama nem sempre é hereditário, estando muito atrelado a condições variadas dos indivíduos. A idade, porém, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento desse câncer, isto é, em pessoas mais novas o câncer de mama é considerado raro (Ministério da Saúde, 2002).



Quando o paciente encontra-se ainda com o tumor primário, o tratamento torna-se menos complexo, sendo a cirurgia e a radioterapia as alternativas mais adotadas. A cirurgia consegue remover grande parte do tecido lesionado, mas quase sempre requer um tratamento adjuvante para garantir a retirada do máximo de células cancerosas possível. Tal processo pode se dar através da retirada total ou parcial da mama, visando sempre reduzir alterações estéticas significativas (Franceschini *et al.*, 2015). Já a radioterapia é empregada para impedir ou destruir as células anormais por meio da aplicação de radiações ionizantes. Para o câncer de mama, os principais tipos de radioterapia são a teleterapia, cuja radiação é emitida por um aparelho externo ao corpo, e a braquiterapia, cuja fonte de radiação é colocada dentro do corpo do paciente por um período curto de tempo (American Cancer Society, 2021a).

Apesar disso, o tratamento sistêmico faz-se necessário quando esse câncer entra em metástase. Nesses casos, também devem ser consideradas outras formas como a quimioterapia e a hormonioterapia (Cantinelli *et al.*, 2006). Na quimioterapia antineoplásica são utilizados agentes químicos, por via intravenosa ou via oral, para destruir as células cancerígenas. Porém, esses agentes, em sua maioria, também destroem células saudáveis, resultando em efeitos adversos significativos para o paciente. Dentre os quimioterápicos mais utilizados contra o câncer de mama estão: as antracinas, como a doxorrubicina e a epirrubicina; os taxanos, como o paclitaxel e o docetaxel; o 5-fluorouracil; a capecitabina; a ciclofosfamida; e a carboplatina (American Cancer Society, 2021b). Além disso, a quimioterapia, em casos mais graves, pode ser estrategicamente usada como tratamento adjuvante, a fim de se reduzir previamente o tamanho do tumor antes da cirurgia de retirada (Al-Hilli e Boughey, 2016). A hormonioterapia, por sua vez, trata-se da aplicação de medicamentos que visam inibir a atividade dos hormônios relacionados ao crescimento do tumor (Reinbolt *et al.*, 2015).

### 3.2.3 Câncer colorretal

O câncer de cólon e reto é o terceiro mais incidente no Brasil, perdendo apenas para os cânceres de mama e de próstata. É estimado que, entre os anos de 2023 e 2025, surjam mais de 45 mil casos novos, o que representará cerca de 9,4% dos casos totais de todos os tipos de câncer. Além disso, as regiões brasileiras que mais concentram esses casos são Sudeste (20,32/100 mil homens; 16,60/100 mil mulheres), Sul (19,44/100 mil homens; 14,99/100 mil mulheres) e Centro-Oeste (17,63/100 mil homens; 13,94/100 mil mulheres). Outrossim, a região que concentra mais casos é uma das mais urbanizadas do país, possuindo perfil epidemiológico de câncer colorretal parecido com países desenvolvidos (Santos *et al.*, 2023).



Acredita-se, portanto, que são mais evidentes nessa localidade as mudanças no estilo de vida da população, como o aumento do consumo de ultraprocessados, do sedentarismo e do sobrepeso (Conde *et al.*, 2022).

Na maioria dos casos, esse câncer se desenvolve a partir de pólipos na mucosa do revestimento interno do cólon e do reto, mas nem sempre a presença de pólipos indica o câncer propriamente dito. Quando os pólipos são hiperplásicos ou inflamatórios, raramente tornam-se câncer, porém, quando trata-se de pólipos adenomatosos, a chance de desenvolvimento do câncer é consideravelmente maior. Então, a medida que o adenoma cresce, as células cancerígenas espalham-se para as outras camadas da parede intestinal e podem atingir vasos sanguíneos e linfáticos, facilitando a metástase para outros tecidos e órgãos do corpo (American Cancer Society, 2020a). A classificação do estágio dessa doença vai de acordo com o tamanho da lesão, bem como os tipos de tecidos que o câncer invadiu, e segue o sistema TNM do Comitê Conjunto Americano sobre Câncer (AJCC), o qual está efetivo desde 2018 na clínica médica. A sigla representa três parâmetros para análise do estágio: extensão do tumor (T); se o câncer atingiu os nódulos linfáticos próximos (N); e se há metástase (M).

O tratamento, por sua vez, é selecionado de acordo com o estágio, podendo ser local ou sistêmico. A cirurgia é um dos métodos para a retirada da lesão nos estágios iniciais, existindo três principais tipos: excisão local, ressecção do cólon com anastomose e ressecção do cólon com colostomia. Outros possíveis tratamentos locais são a radioterapia, a remoção por radiofrequência e a criocirurgia. Já de métodos sistêmicos os principais são a quimioterapia e a imunoterapia (National Cancer Institute, 2022). Dentre os principais fármacos utilizados estão o 5-fluorouracil, a capecitabina, o irinotecano, a oxaliplatina e a associação de trifluridina e tipiracil. Todos esses, no entanto, trazem muitos efeitos indesejados aos pacientes em tratamento, tanto estéticos como fisiológicos (American Cancer Society, 2020b).

### 3.2.4 *Leucemia Promielocítica Aguda*

A leucemia é um tipo de proliferação neoplásica que acomete as células-tronco hematopoéticas (CTHs) da medula óssea. Dentro do processo hematopoiético normal, as CTHs dão origem às diversas linhagens celulares que compõem o sangue e a linfa, como as eritróides, mielóides e linfóides (Paiva e Rego, 2013). O desenvolvimento de neoplasias hematológicas está relacionado a muitos fatores, principalmente genéticos e ambientais,

embora esteja sempre associado a sucessivas mutações genéticas nas células progenitoras (Hoffbrand; Moss, 2013). De modo particular, a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) é um subtipo de leucemia mielóide e é atrelada a alterações estruturais no gene do receptor  $\alpha$  do ácido retinóico (RAR $\alpha$ ), localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21). Esse gene sofre translocação recíproca entre o gene PML (*Promyelocytic Leukemia*), supressor de tumor localizado no braço longo do cromossomo 15 (15q22), resultando nos oncogenes PML-RAR $\alpha$  e RAR $\alpha$ -PML, encontrados em quase todos os pacientes com LPA (Leal *et al.*, 2009).

Esse tipo de leucemia foi descrito pela primeira vez na literatura em 1957 por meio de quadros clínicos onde os pacientes apresentavam grave tendência hemorrágica e a recorrente presença de promielócitos anômalos no sangue periférico (Hillestad, 1957). Atualmente, sabe-se que a LPA desencadeia uma série de alterações hematológicas, como pancitopenia e a presença de 20% de blastos no sangue, mas o seu diagnóstico ocorre a partir do mielograma e da biópsia da medula óssea (Stein; Tallman, 2012). Ademais, a imunofenotipagem por citometria de fluxo auxilia na distinção da LPA de outros tipos de leucemia (Pagnano *et al.*, 2014). Outrossim, dois subtipos morfológicos podem ocorrer na LPA: o hipergranular ou clássico, e o microgranular ou hipogranular. No padrão hipergranular, os promielócitos apresentam-se com granulação azurófila abundante, núcleo irregular e bastonetes de Auer, os quais conferem a essas células o nome de “*Faggot cells*”. Já no padrão microgranular, estão presentes blastos com núcleos bilobulados e granulação menos evidente (Brunner *et al.*, 2001 *apud* Jácomo *et al.*, 2008).

No período de 2009 a 2019, foram diagnosticados mais de 10 mil casos de leucemia mielóide aguda, representando cerca de 10% das leucemias diagnosticadas (Salvaro *et al.*, 2021). Desse valor, no entanto, a LPA corresponde a 10-15% dos casos, atingindo, em sua maioria, pessoas entre 20 e 50 anos de idade dos sexos masculino e feminino (Baba *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento inicial indicado na clínica médica a partir do reconhecimento dessa leucemia se dá com o ATRA (do inglês *all-trans retinoic acid*), agente que atua no balanço da coagulopatia, e promove regulação do ciclo celular e proteólise da oncoproteína produzida a partir do oncogene PML-RAR $\alpha$  (Seftel *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2022). Outros tratamentos podem ser combinados com o ácido trans-retinóico: o trióxido de arsênio (ATO); quimioterápicos, como a citarabina; e as antraciclina daunorrubicina e idarrubicina (Appelbaum, 2014).

### 3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é bioquimicamente caracterizado pela grande presença de espécies tóxicas reativas ou radicais livres, sendo as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio dois exemplos (Thannickal; Fanburg, 2000). Essas moléculas são quimicamente instáveis por possuírem elétrons livres e, por isso, têm a capacidade de reagir facilmente com outras moléculas do meio. Naturalmente, são formadas durante processos de oxirredução nos organismos vivos e são, dentro de um sistema equilibrado, importantes para a sinalização de funções metabólicas, como a transdução de sinal celular (Carmody; Cotter, 2001; Aslan; Ozben, 2003). A geração desses radicais dentro das células geralmente ocorre nas membranas celulares, no citoplasma e, principalmente, nas mitocôndrias devido à cadeia transportadora de elétrons (Green; Brand; Murphy, 2004).

Os efeitos prejudiciais do excesso de radicais livres versam a oxidação de biomoléculas e, conseqüentemente, a perda ou alteração de funções biológicas (Halliwell; Whiteman, 2004). Então, o estresse oxidativo de forma crônica causa danos celulares e teciduais, implicando no desenvolvimento de diversas doenças crônicas não transmissíveis, por exemplo doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas e câncer (Ferrari, 2006). Partindo disso, foi desenvolvido pelos seres vivos mecanismos de defesa contra a instalação do estresse oxidativo, equilibrando os níveis desses radicais (Shami; Moreira, 2004). Esses mecanismos de defesa antioxidante são compostos por agentes com capacidade de diminuir os efeitos do excesso de radicais livres. Além disso, podem agir impedindo a formação de radicais, impedindo a ação dos radicais ou promovendo condições para o reparo dos danos (Clarkson; Thompson, 2000; Koury; Donangelo, 2003).

Uma das defesas antioxidantes é o sistema enzimático, constituído pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx). A SOD catalisa a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), A CAT, por sua vez, converte o peróxido de hidrogênio em  $O_2$  e  $H_2O$ . Já a GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a  $H_2O$ . Essas enzimas, portanto, controlam a formação de radicais impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio (Ferreira; Matsubara, 1997). A atividade enzimática geralmente está associada à presença de cofatores, adquiridos fundamentalmente da dieta. Por exemplo, a SOD depende dos cofatores cobre e zinco no citoplasma e do manganês na mitocôndria. Ademais, a GPx pode depender de selênio no citoplasma ou na mitocôndria (Green; Brand; Murphy, 2004).

Outro mecanismo de defesa engloba os compostos antioxidantes advindos da alimentação, como vitaminas, sais minerais e compostos fenólicos. Pode-se citar o ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (precursor da vitamina E) e os carotenoides. Esses carotenoides podem ser o  $\beta$ -caroteno (precursor da vitamina E), o licopeno e a luteína. Já dentre os minerais, destacam-se o cobre, o zinco, o selênio e o magnésio (Bianchi; Antunes, 1999). Existe fundamentação bastante sólida na literatura comprovando a ação antioxidante dessas moléculas, por isso é sempre recomendado por órgãos de saúde o consumo de alimentos ricos desses compostos (Ministério da Saúde, 2022).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Material botânico

As folhas de *P. arboreum* e *P. marginatum* foram coletadas na Mata de Dois Irmãos, Recife -PE, durante a estação seca, em abril de 2023. A identificação das espécies foram feitas pela Dra. Ângela Maria de Miranda Freitas (UFRPE). As exsiccatas foram depositadas no Herbário Sérgio Tavares da UFRPE sob as numerações HST 18179 (*P. arboreum*) e HST 18178 (*P. marginatum*). Já as folhas de *P. corcovadensis* foram coletadas no Jardim Botânico do Recife - PE e uma exsicata do material foi identificada sob a numeração JR MACIEL 1655 e depositada no herbário da instituição.

### 4.2 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos por meio de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado. Para isso, 100 g de folhas frescas de cada espécie foram trituradas e colocadas em um balão de fundo redondo juntamente com água destilada. Então, o material foi aquecido por 2 h. Posteriormente, o líquido da coluna foi coletado e o resíduo apolar presente foi removido utilizando-se hexano. Para separar a água da fase apolar, um funil de separação foi empregado. Após isso, os materiais foram tratados com sulfato de sódio anidro para remoção de resíduos polares. A seguir, as amostras foram filtradas e rotaevaporadas a 68 °C e 30 rpm para separação do hexano. A partir disso, os óleos foram armazenados em recipientes de vidro hermeticamente fechados, identificados e mantidos sob refrigeração à temperatura de -5 °C.

### 4.3 Análise por CG-EM e identificação dos componentes

Os óleos essenciais de *P. arboreum* (OEPA), *P. marginatum* (OEPM) e *P. corcovadensis* (OEPC) foram submetidos a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) para caracterização química qualitativa de seus compostos. Para isso, foi utilizado o sistema cromatógrafo CG-EM QP2010 SE Plus Shimadzu, equipado com detector seletivo de massa e uma coluna capilar sílica fundida DB-5 apolar com espessura de película de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Além disso, o equipamento opera com um impacto de elétrons de 70 eV, com intervalo de varredura de 0,5 s e fragmentos de 40 a 550 Da. O aparelho estava

programado dentro dos seguintes parâmetros: temperatura do forno de 60 a 240 °C (3 °C/min), temperatura do injetor e do detector de 210 °C, gás hélio como gás de arraste, fluxo de 1 mL/min, modo Split (1:30), e volume de injeção de 1 µL de solução (1/100) do óleo em n-hexano.

A identificação dos compostos, por sua vez, foi realizada a partir dos índices de retenção que foram calculados baseados em uma série homóloga de C8-C40 de n-alcenos, utilizando a equação 1 proposta por Van Den Dool e Kratz (1963), os espectros de massa disponíveis na literatura (Adams, 2007) e a comparação computadorizada com a biblioteca de espectro de massas do sistema de dados CG-EM WILLEY 11.

$$I = 100 \times n + 100 \times \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \quad (1)$$

Onde:

I = índice de retenção

n = número de carbonos do padrão adjacente menos retido

$t_{R(i)}$  = tempo de retenção da amostra

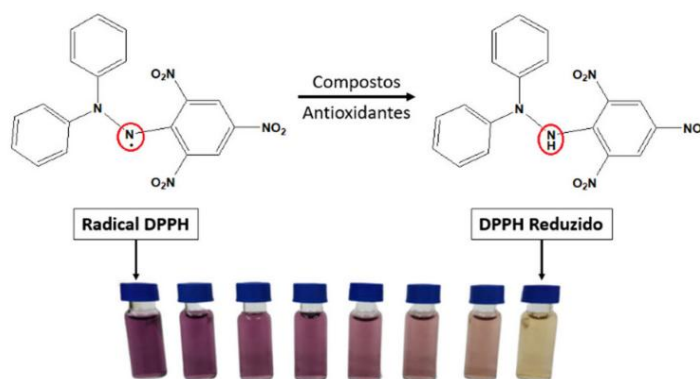
$t_{R(n)}$  = tempo de retenção do padrão adjacente menos retido

$t_{R(n+1)}$  = tempo de retenção do padrão adjacente mais retido

#### 4.4 Atividade antioxidante

##### 4.4.1 Método do DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada a partir da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), segundo metodologia descrita por Blois (1958). Esta técnica trata-se da capacidade de sequestro desse radical por meio da doação de um átomo de hidrogênio. Essa reação permite, portanto, a análise colorimétrica para quantificar o percentual de sequestro que a amostra foi capaz de realizar (Figura 5).

**Figura 5.** Reação de redução do radical DPPH.

Fonte: Oliveira *et al.* (2021).

Para isso, foi utilizada uma solução de DPPH em metanol. Ademais, foram realizadas diluições dos óleos em metanol para realizar o ensaio nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL. Como padrão, foi utilizado o ácido ascórbico nas mesmas concentrações.

Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato foi colocado 40 µL de cada amostra, em triplicata. Também foram adicionados o controle de cor de cada amostra em suas respectivas concentrações e o controle do solvente. Em ambiente escuro, foi adicionado 250 µL da solução de DPPH em todos os poços, exceto no controle de cor, e foi aguardado por um período de 25 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura das absorbâncias dos poços no espectrofotômetro a 517 nm e a análise se deu a partir da seguinte equação (2):

$$SRL (\%) = \frac{Abs_0 - (Abs_{am} - Abs_{cor})}{Abs_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

SRL (%) = percentual de sequestro do radical livre

Abs<sub>0</sub> = absorbância do controle com o solvente e o radical

Abs<sub>am</sub> = absorbância da amostra com o radical

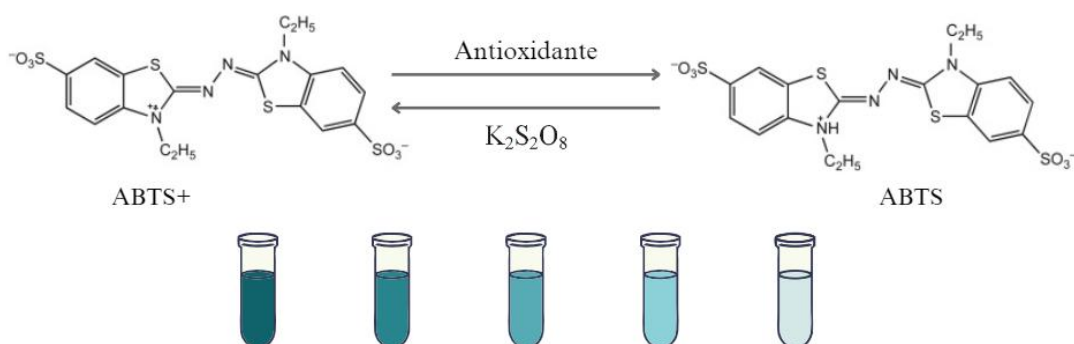
Abs<sub>cor</sub> = absorbância do controle de cor da amostra

#### 4.4.2 Método do ABTS+

Para avaliação da atividade antioxidante também foi realizado o ensaio com o uso do 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Tal método baseia-se na geração de um radical cromóforo catiônico após a oxidação do ABTS por persulfato de

potássio (Re *et al.*, 1999). Portanto, a observação dessa atividade antioxidante trata-se de um método colorimétrico, pois a estabilização desse radical resulta em mudança na coloração das soluções (Figura 6).

**Figura 6.** Reação da estabilização do radical ABTS<sup>+</sup> por composto antioxidante.



Fonte: A autora (2023).

Foi utilizada, então uma microplaca de 96 poços de fundo chato, onde foram colocados 2 µL de cada amostra. Essas amostras foram diluídas nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL em etanol e todas foram testadas em triplicata. Além disso, foram feitos os controles de cor de todas as concentrações e do solvente. Como padrão, foi utilizado um análogo da vitamina E, o Trolox (Sigma - Aldrich, Alemanha). Em ambiente escuro, foram adicionados 200 µL da solução de ABTS em etanol já calibrada em  $0,700 \pm 2$  nm. Após um período de 6 minutos, as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 734 nm. A análise foi feita baseada na porcentagem de sequestro do radical, a qual foi calculada de acordo com a equação 3.

Com os valores de sequestro de cada amostra, foi construído um gráfico e obtida equações das retas referentes à atividade de cada óleo ( $y = ax + b$ ). Então, utilizando a equação 3, foi calculada a concentração em que o radical é sequestrado em 50% (CE<sub>50</sub>).

$$CE_{50}(\mu g/mL) = \frac{50-b}{a} \quad (3)$$

Onde:

CE<sub>50</sub> = concentração efetiva média da amostra em µg/mL

a = coeficiente angular da reta

b = coeficiente linear da reta



Outrossim, foi calculada a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), a fim de relacionar a CE<sub>50</sub> do Trolox com a CE<sub>50</sub> das amostras. O cálculo, então, se deu de acordo com a equação 4 (DE VERAS *et al.*, 2019).

$$\text{TEAC } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{CE}_{50} \text{ Trolox}}{\text{CE}_{50} \text{ Am}} \quad (4)$$

Onde:

TEAC = capacidade antioxidante equivalente ao Trolox em  $\mu\text{g/mL}$

CE<sub>50</sub> Trolox = concentração efetiva média do Trolox

CE<sub>50</sub> Am = concentração efetiva média da amostra

#### 4.5 Atividade citotóxica *in vitro*

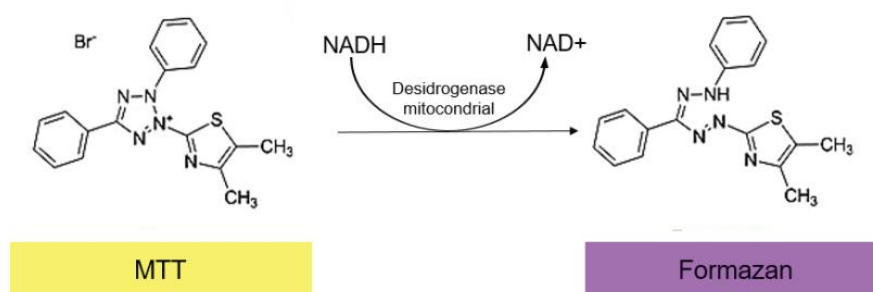
##### 4.5.1 Cultura de células

A avaliação da atividade citotóxica *in vitro* foi empregada contra células cancerígenas e não cancerígenas, cujo cultivo ocorreu no Laboratório de Experimentação *In Vitro e In Vivo* do Departamento de Antibióticos/Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. As linhagens HT-29 (câncer colorretal humano), L929 (fibroblasto do tecido conjuntivo subcutâneo de *Mus musculus*) e Vero CCL-81 (epitélio de rim de *Cercopithecus aethiops*) são mantidas no meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). As linhagens MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (pró-mieloblasto de LPA) é mantida no meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado, 1% de L-glutamina e 1% de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Além disso, todas as linhagens estavam incubadas em estufa à temperatura de 37 °C e com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Outrossim, antes dos experimentos, todas as linhagens foram confirmadas com ausência de microplasma.

#### 4.5.2 Método do MTT

O método utilizado para avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais foi o do brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) segundo Mosmann (1983). Esse ensaio trata-se de um teste colorimétrico de viabilidade celular. Para isso, o MTT, que é um sal de coloração amarelada, é reduzido a formazan por desidrogenases mitocondriais (figura 7), que resulta na formação de cristais de cor violeta e revela a presença de atividade metabólica.

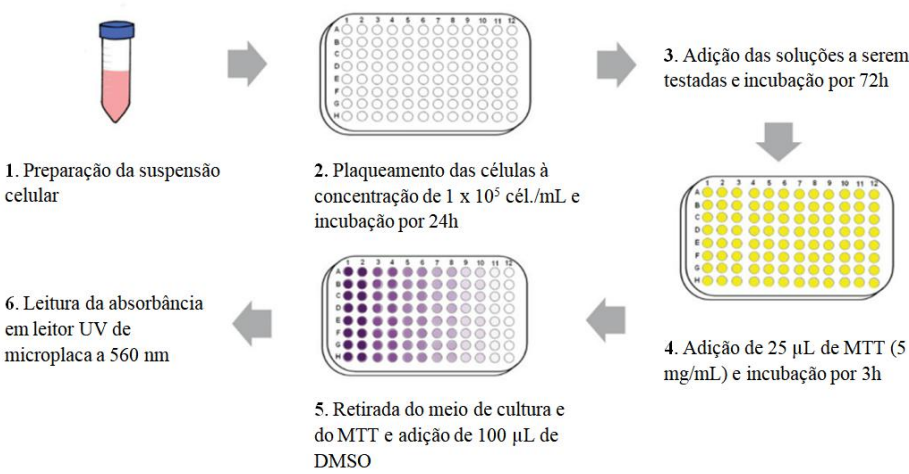
**Figura 7.** Redução do MTT a formazan



Fonte: Magalhães *et al.* (2018).

Primeiramente, foram utilizadas microplacas de 96 poços preparadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL. As microplacas foram incubadas por 24 h. Depois, 10  $\mu$ L das soluções dos óleos em dimetilsulfóxido (DMSO) (1%) foram adicionados aos poços a uma concentração final de 50  $\mu$ g/mL. Como controle positivo foi utilizado 10  $\mu$ L de uma solução do fármaco Paclitaxel (10  $\mu$ g/mL). Após isso, as microplacas foram incubadas novamente sob as mesmas condições por um período de 72 h. Então, 25  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e as microplacas foram reincubadas por 3 h. A partir disso, todo o líquido foi aspirado dos poços, restando apenas os cristais de formazan, os quais foram dissolvidos com 100  $\mu$ L de DMSO por poço (figura 8). A absorbância de cada poço foi obtida utilizando um leitor UV de microplaca a um comprimento de onda de 560 nm e o percentual de inibição foi calculado no *software GraphPad Prism 9.0 demo*.

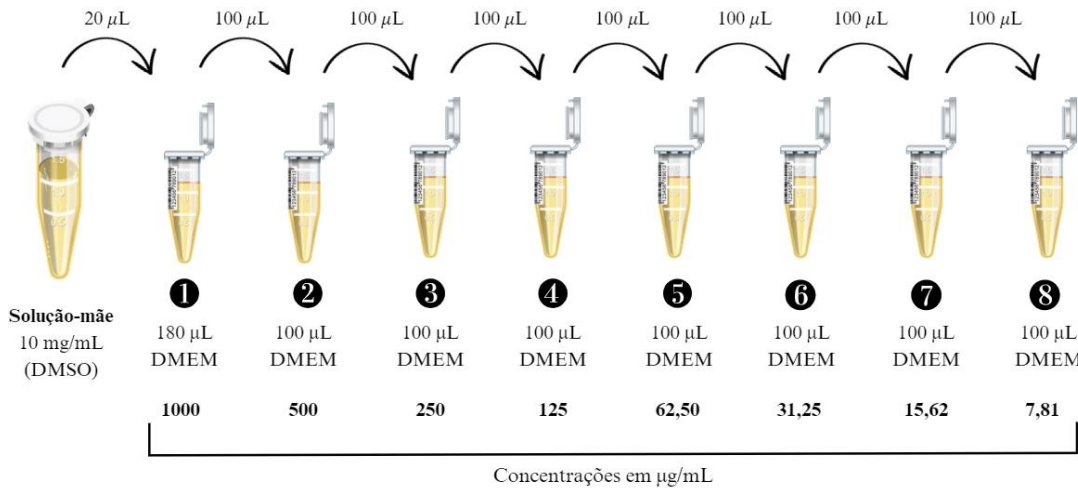
Figura 8. Etapas do método do MTT



Fonte: Adaptado de Magalhães *et al.* (2018).

As amostras que apresentaram inibição superior a 70% foram testadas em diluições seriadas, conforme mostra a figura 9, para determinação da concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ), a qual provoca inibição de 50% do crescimento em relação ao controle negativo. Após a adição das soluções, os processos se sucederam da mesma forma que o teste de inibição anterior. Vale ressaltar que as soluções são diluídas 20 vezes após a adição, uma vez que já se encontra no poço 190 µL de meio com células. Logo, as concentrações finais nos poços foram de 0,39 a 50 µg/mL. Além disso, a  $CI_{50}$  das amostras e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no *software GraphPad Prism 9.0 demo*.

Figura 9. Diluição seriada para construção da curva dose-resposta



Fonte: A autora (2023).

#### 4.5.3 Índice de seletividade

O índice de seletividade expressa uma relação entre a ação da amostra sobre uma linhagem não tumoral e a ação da amostra sobre uma linhagem tumoral, e serve para comparar a toxicidade das amostras mais ativas. Neste ensaio foram considerados os resultados das linhagens não tumorais L929 e Vero CCL-81. Para as amostras que não inibiram mais de 70% das linhagens não tumorais e, portanto, não foram estabelecidas as  $CI_{50}$ , foi considerado para o cálculo desse índice o valor da concentração máxima testada (50  $\mu\text{g/mL}$ ). O cálculo foi realizado de acordo com a seguinte equação (5):

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ não tumoral}}{CI_{50} \text{ tumoral}} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

IS = índice de seletividade

$CI_{50}$  não tumoral =  $CI_{50}$  da amostra em uma linhagem não tumoral

$CI_{50}$  tumoral =  $CI_{50}$  da amostra em uma linhagem tumoral

De acordo com Popiołkiewicz *et al.* (2005), quando o IS é maior que 100, a ação citotóxica da amostra é superior em células tumorais, ao passo que, quando IS é igual ou menor que 100, o efeito terapêutico é obtido por meio de uma concentração equivalente ou inferior à concentração que desencadeia efeitos tóxicos. Portanto, é preferível que as amostras apresentem índice de seletividade superior a 100.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Rendimento dos óleos

Os rendimentos dos óleos essenciais obtidos por meio da hidrodestilação das folhas de *P. arboreum*, *P. corcovadensis* e *P. marginatum* foram calculados e dispostos na tabela 1.

**Tabela 1.** Rendimento dos óleos essenciais de *Piper spp.* extraídos por hidrodestilação das folhas frescas.

| Espécies                | Rendimento dos óleos (%) |
|-------------------------|--------------------------|
| <i>P. arboreum</i>      | 0,23                     |
| <i>P. corcovadensis</i> | 0,25                     |
| <i>P. marginatum</i>    | 0,39                     |

### 5.2 Caracterização química

Os compostos identificados na cromatografia foram dispostos em tabelas, juntamente com seus respectivos índices de retenção e a porcentagem desses compostos na composição total dos óleos. Os compostos de *P. arboreum* estão organizados na tabela 2, os compostos de *P. corcovadensis*, na tabela 3 e os compostos de *P. marginatum*, na tabela 4.

**Tabela 2.** Compostos químicos do óleo essencial de *P. arboreum* (OEPA), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total.

(continua)

| Composto          | AI (calculado) | AI (literatura) | %    |
|-------------------|----------------|-----------------|------|
| $\alpha$ -Copaeno | 1378           | 1374            | 4,99 |
| $\beta$ -Cubebeno | 1392           | 1387            | 1,80 |
| $\beta$ -Elemeno  | 1394           | 1389            | 1,02 |
| Cipereno          | 1403           | 1398            | 1,30 |

**Tabela 2.** Compostos químicos do óleo essencial de *P. arboreum* (OEPA), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total.

(conclusão)

| Composto                   | AI (calculado) | AI (literatura) | %          |
|----------------------------|----------------|-----------------|------------|
| $\alpha$ -Gurjuneno        | 1413           | 1409            | 0,72       |
| $\beta$ -Cariofileno       | 1424           | 1419            | 16,96      |
| $\alpha$ -Humuleno         | 1458           | 1452            | 2,82       |
| (E)- $\beta$ -Farneseno    | 1460           | 1454            | 1,95       |
| Rotundeno                  | 1464           | 1457            | 1,43       |
| allo-Aromadendreno         | 1466           | 1458            | 1,19       |
| $\gamma$ -Gurjuneno        | 1479           | 1475            | 1,01       |
| $\gamma$ -Muuroleno        | 1487           | 1478            | 10,66      |
| $\alpha$ -Zingibereno      | 1501           | 1493            | 22,69      |
| Biciclogermacreno          | 1503           | 1500            | 6,32       |
| $\alpha$ -Muuroleno        | 1507           | 1500            | 2,21       |
| (E,E)- $\alpha$ -Farneseno | 1514           | 1505            | 3,07       |
| $\delta$ -Cadineno         | 1530           | 1522            | 9,32       |
| (E)- $\gamma$ -Bisaboleno  | 1538           | 1529            | 0,76       |
| (E)-Nerolidol              | 1570           | 1561            | 3,09       |
| $\alpha$ -Muurolol         | 1653           | 1644            | 1,05       |
| $\alpha$ -Cadinol          | 1666           | 1652            | 1,73       |
| NI                         | -              | -               | 3,91       |
| <b>Total</b>               |                |                 | <b>100</b> |

AI (calculado): índice de retenção calculado com a equação de Van Den Dool e Kratz; AI (literatura): índice de retenção presente na literatura consultada; NI: não identificado.

**Tabela 3.** Compostos químicos do óleo essencial de *P. corcovadensis* (OEPC), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total.

(continua)

| Composto                         | AI (calculado) | AI (literatura) | %     |
|----------------------------------|----------------|-----------------|-------|
| Limoneno                         | 1017           | 1024            | 0,31  |
| Terpinoleno                      | 1079           | 1086            | 5,09  |
| $\alpha$ -Copaeno                | 1374           | 1374            | 0,73  |
| 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno | 1400           | -               | 53,40 |
| $\alpha$ -Gurjunene              | 1409           | 1409            | 0,39  |
| $\beta$ -Cariofileno             | 1419           | 1417            | 5,46  |
| $\alpha$ -Humuleno               | 1453           | 1452            | 0,53  |
| $\gamma$ -Muuroleno              | 1477           | 1478            | 0,58  |
| D-germacreno                     | 1482           | 1484            | 3,74  |
| $\gamma$ -Amorfeno               | 1496           | 1495            | 0,72  |
| Biciclogermacreno                | 1498           | 1500            | 0,97  |
| $\alpha$ -Muuroleno              | 1501           | 1500            | 1,15  |
| $\gamma$ -Cadinene               | 1516           | 1513            | 2,79  |
| $\delta$ -Cadineno               | 1526           | 1522            | 7,74  |
| $\alpha$ -Cadineno               | 1540           | 1537            | 0,44  |
| 1-epi-Cubenol                    | 1634           | 1627            | 0,37  |
| epi- $\alpha$ -Cadinol           | 1647           | 1638            | 4,86  |
| epi- $\alpha$ -Muurolol          | 1661           | 1640            | 5,90  |
| NI                               | -              | -               | 4,83  |

**Tabela 3.** Compostos químicos do óleo essencial de *P. corcovadensis* (OEPC), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total.

(conclusão)

|              |            |
|--------------|------------|
| <b>Total</b> | <b>100</b> |
|--------------|------------|

AI (calculado): índice de retenção calculado com a equação de Van Den Dool e Kratz; AI (literatura): índice de retenção presente na literatura consultada; NI: não identificado.

**Tabela 4.** Compostos químicos do óleo essencial de *P. marginatum* (OEPM), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total.

(continua)

| <b>Composto</b>       | <b>AI (calculado)</b> | <b>AI (literatura)</b> | <b>%</b> |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| $\alpha$ -Felandreno  | 992                   | 1002                   | 1,54     |
| (Z)- $\beta$ -Ocimeno | 1028                  | 1037                   | 0,35     |
| (E)- $\beta$ -Ocimeno | 1039                  | 1044                   | 0,64     |
| $\delta$ -Elemeno     | 1338                  | 1335                   | 2,02     |
| $\alpha$ -Copaeno     | 1378                  | 1374                   | 1,58     |
| $\beta$ -Elemeno      | 1394                  | 1389                   | 0,99     |
| $\beta$ -Cariofileno  | 1423                  | 1417                   | 9,56     |
| $\alpha$ -Humuleno    | 1458                  | 1452                   | 0,76     |
| Ishwarano             | 1468                  | 1465                   | 2,96     |
| $\beta$ -Selineno     | 1492                  | 1489                   | 1,00     |
| Valenceno             | 1499                  | 1496                   | 0,68     |
| Biciclogermacreno     | 1503                  | 1500                   | 7,03     |
| Elemol                | 1557                  | 1548                   | 1,09     |
| Elemicina             | 1565                  | 1555                   | 0,67     |
| (E)-Nerolidol         | 1570                  | 1561                   | 2,53     |



**Tabela 4.** Compostos químicos do óleo essencial de *P. marginatum* (OEPM), seus respectivos índices de retenção e a porcentagem na composição total.

(conclusão)

| Composto          | AI (calculado) | AI (literatura) | %     |
|-------------------|----------------|-----------------|-------|
| Espatulenol       | 1586           | 1577            | 0,79  |
| (Z)-Asarona       | 1634           | 1616            | 2,22  |
| (E)-Isoeleticina  | 1639           | -               | 21,28 |
| $\beta$ -Eudesmol | 1662           | 1649            | 4,64  |
| Exaltacina        | 1671           | 1655            | 18,35 |
| (E)-Asarona       | 1693           | 1675            | 2,33  |
| (Z)-Isoeleticina  | 1731           | -               | 13,68 |
| NI                | -              | -               | 3,31  |
| <b>Total</b>      |                |                 | 100   |

AI (calculado): índice de retenção calculado com a equação de Van Den Dool e Kratz; AI (literatura): índice de retenção presente na literatura consultada; NI: não identificado.

### 5.3 Atividade antioxidante

#### 5.3.1 Sequestro do DPPH

Após a leitura da absorbância das amostras, foi possível quantificar o percentual de sequestro do DPPH. Como é mostrado na tabela 5, o OEPA atingiu percentuais de 13,39, 8,18 e 7,93 para as concentrações de 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O OEPC, por sua vez, nessas mesmas concentrações, foi capaz de realizar sequestro de 13,18, 9,26, e 9,10% do radical. Já o OEPM obteve percentuais de 11,55, 9,15 e 8,64, também nas mesmas concentrações. Além disso, o ácido ascórbico, o qual foi empregado como padrão, sequestrou 85,25, 76,06 e 66,45% do DPPH, igualmente nas concentrações de 500, 250 e 125  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

**Tabela 5.** Percentuais de sequestro do radical DPPH provocados pelos óleos essenciais de *Piper spp.* e pelo ácido ascórbico com seus respectivos desvios padrões.

| Amostras        | 500 µg/mL    | 250 µg/mL    | 125 µg/mL    |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| OEPA            | 13,39 ± 1,15 | 8,18 ± 0,18  | 7,93 ± 0,26  |
| OEPC            | 13,18 ± 1,02 | 9,26 ± 0,84  | 9,10 ± 0,44  |
| OEPM            | 11,55 ± 0,39 | 9,15 ± 0,85  | 8,64 ± 0,47  |
| Ácido ascórbico | 85,25 ± 0,13 | 76,06 ± 1,69 | 66,45 ± 0,13 |

OEPA: óleo essencial de *P. arboreum*; OEPC: óleo essencial de *P. corcovadensis*; OEPM: óleo essencial de *P. marginatum*.

### 5.3.2 Sequestro do ABTS<sup>+</sup>

Conforme mostrado na tabela 6, OEPA sequestrou 21,56, 19,11 e 18,65% do ABTS nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL, respectivamente. Nessas mesmas concentrações, o OEPC foi capaz de sequestrar 28,71, 21,36 e 19,67% do radical. Enquanto o OEPM realizou sequestro de 25,19, 23,20 e 20,18% nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL, respectivamente. Já o padrão de Trolox sequestrou 97,62% (500 µg/mL), 79,27% (250 µg/mL) e 60,65% (125 µg/mL).

**Tabela 6.** Percentuais de sequestro do radical ABTS<sup>+</sup> provocados pelos óleos essenciais de *Piper spp.* e pelo Trolox com seus respectivos desvios padrões.

| Amostras | 500 µg/mL    | 250 µg/mL    | 125 µg/mL    |
|----------|--------------|--------------|--------------|
| OEPA     | 21,56 ± 0,15 | 19,11 ± 0,53 | 18,65 ± 0,53 |
| OEPC     | 28,71 ± 0,88 | 21,36 ± 0,17 | 19,67 ± 0,17 |
| OEPM     | 25,19 ± 0,44 | 23,20 ± 0,08 | 20,18 ± 0,15 |
| Trolox   | 97,62 ± 0,10 | 79,27 ± 0,01 | 60,65 ± 0,19 |

OEPA: óleo essencial de *P. arboreum*; OEPC: óleo essencial de *P. corcovadensis*; OEPM: óleo essencial de *P. marginatum*.

Na tabela 7, foram reunidos os valores da concentração efetiva média (CE<sub>50</sub>) de cada óleo, bem como do padrão Trolox, e o resultado do cálculo da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox.

**Tabela 7.** Concentrações efetivas médias (CE<sub>50</sub>) dos óleos essenciais de *Piper spp.* e Trolox e capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) das amostras.

| Amostras | CE <sub>50</sub> (µg/mL) | TEAC (µg/mL) |
|----------|--------------------------|--------------|
| OEPA     | 4021,48                  | 0,0047       |
| OEPC     | 1441,64                  | 0,0132       |
| OEPM     | 2445,39                  | 0,0078       |
| Trolox   | 18,99                    | -            |

OEPA: óleo essencial de *P. arboreum*; OEPC: óleo essencial de *P. corcovadensis*; OEPM: óleo essencial de *P. marginatum*.

#### 5.4 Atividade citotóxica

No ensaio de citotoxicidade, o método do MTT revelou que, na linhagem MCF-7, o óleo essencial de *P. arboreum* (OEPA) causou inibição de 76,44% do crescimento celular, o óleo essencial de *P. corcovadensis* (OEPC), 94,72% e o óleo essencial de *P. marginatum* (OEPM), 23,31%. Já na linhagem HL-60, os percentuais de inibição foram de 90,63, 65,13 e 61,34%, respectivamente. Do mesmo modo, na linhagem HT-29, o OEPA provocou inibição de 81,52%, o OEPC, 81,74% e o OEPM, 85,06%. Ademais, na linhagem L929, o OEPA inibiu 83,76%, o OEPC, 60,81% e o OEPM, 88,14%. Por fim, na linhagem Vero CCL-81, os óleos OEPA, OEPC e OEPM foram capazes de inibir 64,28, 22,43 e 18,77% do crescimento. Os dados referentes ao controle positivo (Paclitaxel) sobre as mesmas linhagens podem ser igualmente observados na tabela 8.

**Tabela 8.** Percentuais de inibição e EPM de linhagens celulares *in vitro* após exposição de 72h aos óleos essenciais de *Piper spp.* (50 µg/mL) e ao Paclitaxel (10 µg/mL).

| Linhagem    | OEPA         | OEPC         | OEPM         | Paclitaxel   |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| MCF-7       | 76,44 ± 4,63 | 94,72 ± 0,31 | 23,31 ± 1,85 | 94,75 ± 1,10 |
| HL-60       | 90,63 ± 4,92 | 65,13 ± 2,28 | 61,34 ± 2,34 | 75,48 ± 4,07 |
| HT-29       | 81,52 ± 2,38 | 81,74 ± 3,24 | 85,06 ± 2,81 | 98,32 ± 0,19 |
| L929        | 83,76 ± 1,60 | 60,81 ± 0,49 | 88,14 ± 0,90 | 95,53 ± 1,77 |
| Vero CCL-81 | 64,28 ± 3,26 | 22,43 ± 1,59 | 18,77 ± 1,46 | 75,33 ± 4,02 |

EPM: erro padrão médio. OEPA: óleo essencial de *P. arboreum*; OEPC: óleo essencial de *P. corcovadensis*; OEPM: óleo essencial de *P. marginatum*. Linhagens: MCF-7: câncer de mama humano; HL-60: pró-mieloblasto de Leucemia Promielocítica Aguda; HT-29: câncer de cólon e reto humano; L929: fibroblasto do tecido conjuntivo subcutâneo de *Mus musculus*; Vero CCL-81: célula epitelial de rim de *Cercopithecus aethiops*.

Com base nisso, a elaboração das curvas de inibição tornou possível o estabelecimento da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de cada amostra que causou inibição superior a 70%. Conforme os dados dispostos na tabela 9, a CI<sub>50</sub> do OEPA foi de 27,58 µg/mL e do OEPC,

28,78 µg/mL na MCF-7. Na HL-60, o único óleo que apresentou inibição > 70% foi o OEPA, com  $CI_{50}$  de 15,40 µg/mL. Além disso, na HT-29, os óleos essenciais OEPA, OEPC e OEPM obtiveram concentração inibitória média de 12,48, 29,75 e 20,32 µg/mL, respectivamente. Já na linhagem L929, a  $CI_{50}$  do OEPA foi de 14,65 µg/mL e a do OEPM foi de 30,86 µg/mL. No entanto, na linhagem Vero CCL-81 para nenhum dos óleos foi possível estabelecer a  $CI_{50}$ . Na tabela 9 é possível observar, ainda, os dados referentes ao controle com paclitaxel.

**Tabela 9.** Concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) com intervalo de confiança dos óleos essenciais de *Piper spp.* e do Paclitaxel em linhagens celulares *in vitro* após 72h.

| Linhagem    | OEPA                     | OEPC                     | OEPM                     | Paclitaxel            |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| MCF-7       | 27,58<br>(20,31 - 37,46) | 28,78<br>(26,42 - 31,37) | -                        | 6,95<br>(6,56 - 7,37) |
| HL-60       | 15,40<br>(14,36 - 16,52) | -                        | -                        | 0,46<br>(0,39 - 0,55) |
| HT-29       | 12,48<br>(9,73 - 16,02)  | 29,75<br>(27,56 - 32,13) | 20,32<br>(18,27 - 22,59) | 0,49<br>(0,40 - 0,59) |
| L929        | 14,65<br>(11,62 - 18,48) | -                        | 30,86<br>(26,75 - 35,59) | 0,42<br>(0,34 - 0,52) |
| Vero CCL-81 | -                        | -                        | -                        | 1,15<br>(0,90 - 1,48) |

Valores expressos em µg/mL. OEPA: óleo essencial de *P. arboreum*; OEPC: óleo essencial de *P. corcovadensis*; OEPM: óleo essencial de *P. marginatum*. Linhagens: MCF-7: câncer de mama humano; HL-60: pró-mieloblasto de Leucemia Promielocítica Aguda; HT-29: câncer de cólon e reto humano; L929: fibroblasto do tecido conjuntivo subcutâneo de *Mus musculus*; Vero CCL-81: célula epitelial de rim de *Cercopithecus aethiops*.

A partir desses valores de concentração inibitória média, foi calculado o índice de seletividade (IS) para linhagens tumorais cujos dados estão dispostos nas tabelas 10 e 11. Em relação a L929, o OEPA apresentou IS de 53,12 para MCF-7, 95,13 para HL-60 e 117,39 para HT-29. Já o OEPC, 173,73 e 168,07 para MCF-7 e HT-29, respectivamente. O OEPM apresentou IS de 151,87 para HT-29. Em relação a Vero CCL-81, o OEPA possui IS de 181,29 para MCF-7, 324,67 para HL-60 e 400,64 para HT-29. Além disso, os IS do OEPC em relação a Vero foram semelhantes a linhagem anterior. Por fim, o OEPM possui índice de 246,06 para HT-29.

**Tabela 10.** Índices de seletividade dos óleos essenciais de *Piper spp.* e do Paclitaxel para linhagens tumorais em relação à linhagem não tumoral L929.

| Linhagens celulares | OEPA   | OEPC   | OEPM   | Paclitaxel |
|---------------------|--------|--------|--------|------------|
| MCF-7               | 53,12  | 173,73 | -      | 6,04       |
| HL-60               | 95,13  | -      | -      | 91,30      |
| HT-29               | 117,39 | 168,07 | 151,87 | 85,71      |

OEPA: óleo essencial de *P. arboreum*; OEPM: óleo essencial de *P. marginatum*. Linhagens: MCF-7: câncer de mama humano; HL-60: pró-mieloblasto de Leucemia Promielocítica Aguda; HT-29: câncer de cólon e reto humano; L929: fibroblasto do tecido conjuntivo subcutâneo de *Mus musculus*.

**Tabela 11.** Índices de seletividade dos óleos essenciais de *Piper spp.* e do Paclitaxel para linhagens tumorais em relação à linhagem não tumoral Vero CCL-81.

| Linhagens celulares | OEPA   | OEPC   | OEPM   | Paclitaxel |
|---------------------|--------|--------|--------|------------|
| MCF-7               | 181,29 | 173,73 | -      | 16,55      |
| HL-60               | 324,67 | -      | -      | 250        |
| HT-29               | 400,64 | 168,07 | 246,06 | 234,69     |

OEPA: óleo essencial de *P. arboreum*; OEPM: óleo essencial de *P. marginatum*. Linhagens: MCF-7: câncer de mama humano; HL-60: pró-mieloblasto de Leucemia Promielocítica Aguda; HT-29: câncer de cólon e reto humano; Vero CCL-81: célula epitelial de rim de *Cercopithecus aethiops*.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Rendimento dos óleos

Como é fundamentado na literatura, o rendimento dos óleos essenciais pode variar de acordo com a parte da planta utilizada, a estação do ano, com os ciclos fisiológicos naturais da espécie e com as condições ambientais (Scheffer, 1998). O método de extração do óleo essencial também pode influenciar no rendimento. Com a destilação, por exemplo, é observado que o rendimento é maior em frutos e menor em ramos e folhas (Vitti; Brito, 2003). Os rendimentos de OEPA (0,23%), OEPC (0,25%) e OEPM (0,39%) foram próximos ao rendimento descrito do óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* (0,35%), cuja extração se deu a partir do mesmo método (Schindler; Silva; Heinzmann, 2018). Por meio da observação de tais valores, pode-se inferir que os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas frescas é semelhante para as espécies desse gênero.

### 6.2 Componentes químicos dos óleos essenciais

O composto majoritário encontrado no óleo essencial de *P. arboreum* (OEPA), dos vinte e um identificados, foi o  $\alpha$ -Zingibereno, que representou 22,69% da área no cromatograma. Em seguida, foram observados o  $\beta$ -Cariofileno (16,96%), o  $\gamma$ -Muuroleno (10,66%), o  $\delta$ -Cadineno (9,32%) e o Bicyclgermacreno (6,32%). O óleo essencial de *P. corcovadensis* (OEPC), por sua vez, foi caracterizado em dezoito compostos, apresentando como composto majoritário o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, o qual representou 53,40% no cromatograma. Além desse, foram significativamente identificados no OEPC o  $\delta$ -Cadineno (7,74%), o epi- $\alpha$ -Muurolol (5,90%), o  $\beta$ -Cariofileno (5,46%) e o Terpinoleno (5,09%). Já dentre os vinte e dois compostos identificados no óleo essencial de *P. marginatum* (OEPM), o majoritário foi a (E)-Isoelemicina (21,28%), e em seguida observa-se a Exalatacina (18,35%), (Z)-Isoelemicina (13,68%),  $\beta$ -Cariofileno (9,56%) e Bicyclgermacreno (7,03%).

Apesar de apresentarem composições químicas distintas, os óleos essenciais de *Piper spp.* apresentaram alguns compostos em comum. Pode-se citar, por exemplo, o  $\beta$ -Cariofileno, o qual foi identificado nos três óleos, embora em proporções diferentes. Ademais, o Bicyclgermacreno também foi presente nos três, em proporções parecidas nos OEPA e OEPM e em baixa quantidade no OEPC. Outrossim, o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno foi identificado como composto majoritário no óleo essencial das folhas de outra espécie desse

gênero, a *P. klotzschianum* (Pereira, 2015). Outro estudo, realizado por Lima *et al.* (2019), mostrou que essa mesma espécie, *P. klotzschianum*, também apresentou na cromatografia gasosa alguns sesquiterpenos não oxigenados em comum com OEPA, OEPC e OEPM, como o  $\alpha$ -copaeno, o  $\alpha$ -humuleno e o biciclogermacreno. Já segundo Bagheri *et al.* (2014), a espécie *P. nigrum* apresentou na cromatografia gasosa o  $\beta$ -cubebeno e o  $\gamma$ -gurjuneno (encontrados no OEPA), o terpinoleno e o D-germacreno (encontrados no OEPC), o  $\delta$ -elemeno (encontrado no OEPM), o  $\gamma$ -muuroleno (encontrado nos óleos OEPA e OEPC) e o  $\beta$ -cariofileno (encontrado nos óleos OEPA, OEPC e OEPM).

Vale salientar, ainda, que as atividades biológicas atribuídas aos óleos essenciais de *Piper*, tais como antimicrobiana, larvicida e inseticida, podem ser resultado da ação de um composto isolado ou da combinação de grande parte deles. O nerolidol, por exemplo, foi encontrado como composto majoritário no óleo essencial de *P. clausenianum*, cujas atividades leishmanicida e citotóxica *in vitro* para a linhagem celular HepG2 (carcinoma hepatocelular) foram observadas também utilizando-se esse composto isolado (Marques *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2012). No caso do OEPC, mais da metade da composição do óleo é referente ao 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, de forma a sugerir que esse composto possa ser responsável pelas atividades avaliadas neste estudo.

### 6.3 Avaliação do sequestro do radical DPPH

O princípio do uso do DPPH na avaliação da atividade antioxidante é a capacidade de doar átomos de hidrogênio a esta espécie radicalar, ou seja, quanto maior o percentual de sequestro, maior a capacidade antioxidante da amostra. Portanto, concentrações elevadas para reduzir o DPPH em, pelo menos, 50% evidenciam que a amostra possui baixa atividade antioxidante (Alam *et al.*, 2014). Considerando-se isso, foi observado que os óleos apresentaram baixa atividade antioxidante frente ao DPPH, uma vez que o sequestro estimado foi de 13,39% para OEPA, 13,18% para OEPC e 11,55% para OEPM, todos esses a uma concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Diferente desses, o óleo essencial de *P. nigrum* extraído utilizando dióxido de carbono supercrítico (SC- $\text{CO}_2$ ) apresentou atividade antioxidante sob o mesmo radical DPPH (Bagheri; Manap; Solati, 2014). Nesse mesmo estudo, os autores também avaliaram o sequestro desse radical realizado pelo óleo essencial extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado e foi observado que o percentual foi significativamente inferior, isto é, apresentou baixa atividade antioxidante. Por isso, acredita-



se que o método de extração do óleo também seja capaz de alterar as atividades biológicas, uma vez que a composição química pode variar de acordo com essa metodologia adotada.

#### 6.4 Avaliação do sequestro do radical ABTS+

Semelhante ao ensaio anterior, o percentual de sequestro do radical define a capacidade antioxidante das amostras. Observou-se que a taxa de sequestro também foi inferior a 50% na concentração mais alta (500 µg/mL), e também que as CE<sub>50</sub> de OEPA, OEPC e OEPM foram consideravelmente mais altas que a do padrão. Quanto a TEAC, foi visto que seria necessária uma concentração muito baixa do Trolox para que se obtenha essa mesma atividade antioxidante. Na literatura, a espécie *P. attenuatum* apresentou atividade antioxidante com o uso do ABTS com CE<sub>50</sub> de 13,17 µg/mL para o extrato metanólico, de 20,35 µg/mL para o extrato etanólico e de 68,06 µg/mL para extrato com acetato de etila (Ohlyan *et al.*, 2013). Outro estudo, no entanto, mostrou que o extrato etanólico das folhas de *P. sarmentosum* teve CE<sub>50</sub> estabelecida em 176,4 µg/mL e o extrato aquoso das folhas, em 793,57 µg/mL. Devido a tais elevadas concentrações, essa outra espécie não foi classificada como antioxidante (Nguyen *et al.*, 2020). Assim também considera-se que os óleos OEPA, OEPC e OEPM possuem baixo potencial antioxidante frente ao radical ABTS.

#### 6.5 Classificação da citotoxicidade

Segundo a classificação utilizada por Rodrigues *et al.* (2014), um composto é considerado muito ativo quando a inibição do crescimento celular é maior que 95%. Do mesmo modo, caso a amostra provoque inibição entre 70 e 90%, é classificado como moderadamente ativo. Entre 50 e 69%, é tido como pouco ativo, e se a inibição for inferior a 50%, inativo. A partir disso, é possível classificar a atividade citotóxica dos óleos essenciais testados neste ensaio, considerando-se, também, o valor do desvio padrão de cada amostra.

O óleo essencial de *P. arboreum* (OEPA) demonstrou-se moderadamente ativo em todas as linhagens. No entanto, o OEPA atingiu maiores valores sobre HL-60, L929 e HT-29, uma vez que a inibição foi observada acima de 80% nessas linhagens. Além disso, o óleo essencial de *P. corcovadensis* (OEPC) foi ativo na MCF-7 e moderadamente ativo na HL-60, HT-29 e L929. Na linhagem Vero CCL-81, o OEPC foi inativo, dada a inibição de 22,43%. O óleo essencial de *P. marginatum* (OEPM), por sua vez, foi moderadamente ativo na HL-60, na HT-29 e na L929. Nas linhagens MCF-7 e Vero CCL-81, OEPM foi inativo. Apesar dos

resultados apresentados, não se pode afirmar, porém, qual composto ou quais compostos identificados na cromatografia são os responsáveis por essa atividade citotóxica. No entanto, pode-se sugerir que o composto majoritário do OEPC (1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno) tenha relação com essa atividade já que representa cerca de 53% da composição desse óleo. Para isso, são necessários ensaios utilizando esse composto isolado.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US NCI), é ideal que produtos e extratos naturais tenham  $CI_{50}$  inferior a 20  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto compostos purificados, inferior a 4  $\mu\text{g/mL}$  (Geran *et al.*, 1972). No que se refere às concentrações inibitórias médias estabelecidas, o OEPA obteve os menores valores nas linhagens tumorais, sendo inferiores a 20  $\mu\text{g/mL}$  para HL-60 e HT-29. Além disso, não foi estabelecida  $CI_{50}$  de nenhum óleo para a linhagem Vero CCL-81, mostrando um padrão quanto a menor citotoxicidade para esta linhagem. Nesse quesito, destaca-se o OEPC, que não possuiu  $CI_{50}$  em nenhuma das duas linhagens não tumorais utilizadas no experimento.

Outrossim, os índices de seletividade mostraram que tanto o OEPA quanto o OEPC e OEPM foram mais seletivos para linhagem tumoral HT-29 em relação à linhagem não tumoral L929. O OEPC também demonstrou-se mais seletivo para a linhagem MCF-7. Já em relação a Vero CCL-81, o OEPA foi mais seletivo para todas as linhagens tumorais, o OEPC para MCF-7 e HT-29, e OEPM para HT-29. Logo, os óleos essenciais de *Piper*, apesar de serem citotóxicos de maneira geral, foram mais seletivos para as células cancerígenas. Com isso, observa-se um resultado promissor para a área da cancerologia experimental, sendo esses óleos essenciais bons candidatos a outros estudos que aprofundem o conhecimento acerca de seus mecanismos de ação.

## 7. CONCLUSÃO

Os compostos majoritários dos óleos essenciais de *P. arboreum* (OEPA), de *P. corcovadensis* (OEPC) e de *P. marginatum* (OEPM) são o  $\alpha$ -Zingibereno, o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno e a (E)-Isoeleticina, respectivamente. Além disso, OEPA, OEPC e OEPM apresentaram baixa atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS.

Ademais, os óleos inibiram linhagens cancerígenas e não-cancerígenas e possuíram  $CI_{50}$  promissoras para as linhagens cancerígenas. Já os índices de seletividade mostraram que OEPA, OEPC e OEPM foram mais seletivos para MCF-7 (câncer de mama humano), HL-60 (pró-mieloblasto de Leucemia Promielocítica Aguda) HT-29 (câncer colorretal humano) que para a L929 (fibroblasto do tecido conjuntivo subcutâneo de *Mus musculus*) e Vero CCL-81 (célula epitelial de rim de *Cercopithecus aethiops*).

Diante do exposto, acredita-se que este estudo será importante para a construção de outros trabalhos que investiguem mais a respeito da fitoquímica e de outras atividades biológicas das espécies de *Piper*, bem como contribuirá para a busca de inovações terapêuticas para a saúde humana e animal.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4<sup>a</sup> ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AI, J.; LIU, B.; LIU, W. Folic acid-tagged titanium dioxide nanoparticles for enhanced anticancer effect in osteosarcoma cells. **Materials Science And Engineering: C**, v. 76, n. 1, p. 1181-1187, 2017.
- ALAM, M. A.; JURAIMI, A. S.; RAFII, M. Y.; HAMID, A. A.; ASLANI, F.; HASAN, M. M.; ZAINUDIN, M. A. M.; UDDIN, M. K. Evaluation of antioxidant compounds, antioxidant activities, and mineral composition of 13 collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions. **BioMed Research International**, v. 2014, ID: 296063, 2014.
- AL-HILLI, Z.; BOUGHEY, J. C. The timing of breast and axillary surgery after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Chinese Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. What is Colorectal Cancer? **American Cancer Society**, 2020a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html>>. Acesso em: 28 Jul. 2023.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Chemotherapy for Colorectal Cancer. **American Cancer Society**, 2020b. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/colon-rectal-cancer/treating/chemotherapy.html>>. Acesso em: 28 Jul. 2023.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Radiation for Breast Cancer. **American Cancer Society**, 2021a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/radiation-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 27 Jul. 2023.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Chemotherapy for Breast Cancer. **American Cancer Society**, 2021b. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>>. Acesso em: 27 Jul. 2023.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Capítulo 14: Colon and Rectum. *In*: **AJCC Cancer Staging Manual**. Nova Iorque: 7ª ed., Springer, 2015. p. 143-164.

ANDRADE, E. H. A. *Piper in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB120632>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

APPELBAUM, F. R. Capítulo 98: Acute Leukemias in Adults. *In*: NIEDERHUBER, J. E.; ARMITAGE, J. O.; DOROSHOW, J. H.; KASTAN, M. B.; TEPPER, J. E. **Abeloff's Clinical Oncology**. 5ª ed. Filadélfia: Elsevier, 2014, p. 1890-1906.

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

ASLAN, M.; OZBEN, T. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 5, p. 781-788, 2003.

AUTRAN, E. S.; NEVES, I. A.; SILVA C. S. B.; CÂMARA, C. A. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2284-2288, 2009.

AYRES, V. F. S.; OLIVEIRA, M. R.; BALDIN, E. L. L.; CORRÊA, G. M.; GUIMARÃES, A. C.; TAKEARA, R. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils of *Piper marginatum*, *Piper callosum* and *Vitex agnus-castus*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 93, n. 3, 2021.

BABA, S. M.; PANDITH, A. A.; SHAH, Z. A.; BABA, R. A. Pathogenetic implication of fusion genes in acute promyelocytic leukemia and their diagnostic utility. **Clinical genetics**, v. 95, p. 41-52, 2018.

- BAGHERI, H.; MANAP, M. Y. B. A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v. 121, p. 220-228, 2014.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BERTINO, J. R.; SALMON, S. E. Princípios de terapia do câncer. In: BENNETT, G. **Tratado de medicina interna**. 21<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1178-1194.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- CANTINELLI, F. S.; CAMACHO, R. S.; SMALETZ, O.; GONSALES, B. K.; BRAGUITTONI, E.; JUNIOR, J. R. A oncopsiquiatria no câncer de mama: considerações a respeito de questões do feminino. **Arch. Clin. Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 124-133, 2006.
- CARMODY, R. J.; COTTER, T. G. Signalling apoptosis: a radical approach. **Redox Report**, v. 6, p. 77-90, 2001.
- CLARCKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637-646, 2000.
- CONDE, W. L.; SILVA, I. V.; FERRAZ, F. R. Undernutrition and obesity trends in Brazilian adults from 1975 to 2019 and its associated factors. **Cad. Saúde Pública**, v. 38, n. 1, 2022.
- DE VERA, B. O.; Algrizea Minor Sobral, Faria & Proença (Myrteae, Myrtaceae): chemical composition, antinociceptive, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil. **Natural Products Research**, v. 23, p. 1-5, 2019.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DOOL, H. V. D.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

DUARTE, M. C. T. FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 06-08, 2004.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; FILHO, R. B. Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da Floresta Amazônica - Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 79-83, 2004.

FERNANDEZ, C. M. M.; BALDIN, V. P.; IEQUE, A. L.; BERNUCI, K. Z.; ALMEIDA, R. T.; VALONE, L. M.; FONSECA, D. P.; MAKIMORI, R. Y.; ANDRADE, J. P. P.; PILAU, E. J.; ROMAGNOLO, M. B.; NAKAMURA, T. U.; CARDOSO, R. F.; CORTEZ, D. A. G.; GAZIM, Z. C.; SCODRO, R. B. L.; FILHO, B. P. D. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of dichloromethane extract of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. roots and isolated compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 341-347, 2019.

FERRARI, C. K. B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**, v. 5, n. 5, p. 275-279, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, F. M.; PALMEIRA, C. M.; OLIVEIRA, M. M.; SANTOS, D.; SIMÕES A. M.; ROCHA, S. M.; COIMBRA, M. A.; PEIXOTO, F. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 189-196, 2012.

FILHO, A. A. P.; PESSOA, G. C. D.; YAMAGUCHI, L. F.; STANTON, M. A.; SERRAVITE, A. M.; PEREIRA, R. H. M.; NEVES, W. S.; KATO M. J. Larvicidal Activity of Essential Oils From *Piper* Species Against Strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Resistant to Pyrethroids. *Front. Plant Sci. - Sec. Plant Metabolism and Chemodiversity*, v. 12, 2021.

FRANCESCHINI, G.; SANCHEZ, A. M.; DI LEONE, A.; MAGNO, S.; MOSCHELLA, F.; ACCETTA, C.; MARSETTI, R. New trends in breast cancer surgery: a therapeutic approach increasingly efficacy and respectful of the patient. **Il Giornale di chirurgia**, v. 36, n. 4, p. 145-152, 2015.

GAMBOA, F.; MUÑOZ, C.; NUMPAQUE, G.; SEQUEDA-CASTAÑEDA, L. G.; GUTIERREZ, S. J.; TELLEZ, N. Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. **International Journal of Microbiology**, 2018.

GERAN, R. I.; GREENBERG, N. H.; MCDONALD, M. M.; SCUMAKER, A. M.; ABBOT, B. J. Protocol for screening chemical agents and natural products against animal tumours and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 3, p. 1-61, 1972.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. *Piper marginatum* Jacq. in **Global Biodiversity Information Facility**, 2022. Disponível em <<https://www.gbif.org/species/3086325>> Acesso em: 23 Jul. 2023.

GOMÉZ-CALVARIO, V.; RIOS, M. Y. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, occurrence, biosynthesis, and biological activity of *Piper* amides. **Magn. Reson. Chem.**, v. 57, p. 994-1070, 2019.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 110-118, 2004.



GRIVICICH, I.; MANS, D. R. A.; PETERS, G. J.; SCHWARTSMANN, G. Irinotecan and oxaliplatin: an overview of the novel chemotherapeutic options for the treatment of advanced colorectal cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 9, p. 1087-1103, 2001.

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

GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS, E. V. S. S.; QUEIROZ, G. A. *Piper in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12735>>. Acesso em: 07 jul. 2023.

GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS, E. V. S. S.; QUEIROZ, G. A. *Piper in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12763>>. Acesso em: 21 jul. 2023.

GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS, E. V. S. S.; QUEIROZ, G. A. *Piper in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12813>>. Acesso em: 23 Jul. 2023.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, n. 3, p. 567-587, 2006.

GREIG, N. Introduction. In: DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. ***Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution***. Nova Iorque: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004, p. 1-4.

HAILLWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B.; Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 67-71, 2003.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HEYMANS, R. *Piper marginatum* in **iNaturalist**. Papaichton, Guiana Francesa. Disponível em <<https://www.inaturalist.org/photos/265278770>>. Acesso em: 23 Jul. 2023.

HILLESTAD, L K. Acute promyelocytic leukemia. **Acta medica Scandinavica**, v. 159, n. 3, p.189-194, 1957.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Fundamentos em hematologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dados e números sobre o câncer de mama: Relatório anual de 2022**. Rio de Janeiro: INCA, Nov. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE. O que é câncer? **INCA**, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 25 Jul. 2023.

JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L.; REGO, E. M. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 82-89, 2008.

KELLY, K. Capítulo 1: Paleopathology: the study of disease in prehistoric times. *In: KELLY, K. The History of Medicine - Early civilizations: prehistoric times to 500 C.E.* Nova Iorque: Facts on File, 2009. p. 1-26.

KOLSTAD, A.; PEDERSEN, L. B.; ESKELUND, C. W.; HUSBY, S.; GRØNBÆK, K.; JERKEMAN, M.; LAURELL, A.; RÄTY, R.; ELONEN E.; ANDERSEN, N. S.; BROWN, P. N.; KIMBY, E.; BENTZEN, H.; SUNDSTRÖM, C.; EHINGER, M.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M.; DELABIE, J.; RALFKIØR, E.; FAGERLI, U.; NILSSON-EHLE, H.; GEISLER, C. H. Molecular Monitoring after Autologous Stem Cell Transplantation and Preemptive Rituximab Treatment of Molecular Relapse: Results from the Nordic Mantle Cell Lymphoma Studies (MCL2 and MCL3) with Median Follow-Up of 8.5 Years. **Biology Of Blood And Marrow Transplantation**, v. 23, n. 3, p. 428-435, 2017.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

LEAL, A. M.; KUMEDA, C. A.; VELLOSO, E. D. R. P. Características genéticas da leucemia promielocítica aguda de novo. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 454-462, 2009.

LIMA, C. N. F.; LIMA, L. F.; CORREIA, D. B.; MACHADO, S. T. S.; SOUSA, J. P.; SANTOS, E. S.; DELMONDES, G. A.; MENEZES, I. R. A.; FELIPE, C. F. B.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R. Systematic review: Medicinal use and scientific elucidation of the *Piper* genus for the treatment of symptoms and inflammatory diseases. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 2, p. 62-72, 2020.

LIMA, R. N.; RIBEIRO, A. S.; CARDOZO-FILHO, L.; VEDOY, D.; ALVES, P. B. Extraction from Leaves of *Piper klotzschianum* using Supercritical Carbon Dioxide and Co-Solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 147, p. 205-212, 2019.

LUBBE, S. J.; ESCOTT-PRICE, V.; BRICE, A.; GASSER, T.; PITTMAN, A. M.; BRAS, J.; HARDY, J.; HEUTINK, P.; WOOD, N. M.; SINGLETON, A. B.; GROSSET, D. G.; CARROLL, C. B.; LAW, M. H.; DEMENAIS, F.; ILES, M. M.; BISHOP, D. T.; NEWTON-BISHOP, J.; WILLIAMS, N. M.; MORRIS, H. R. Rare variants analysis of cutaneous

malignant melanoma genes in Parkinson's disease. **Neurobiology Of Aging**, v. 48, n. 1, p. 222, 2016.

MACÊDO, C. G.; FONSECA, M. Y. N.; CALDEIRA, A. D.; CASTRO, S. P.; PACIENZA-LIMA, W.; BORSODI, M P. G.; SARTORATTO, A.; SILVA, M. N.; SALGADO C. G.; ROSSI-BERGMANN, B.; CASTRO, K. C. F. Leishmanicidal activity of *Piper marginatum* Jacq. from Santarém-PA against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 210, 2020.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Comunicado Técnico - Embrapa**, n. 427, 2018.

MARQUES, A. M.; BARRETO, A. L. S.; ROMANOS, M. T. V.; SOARES, R. M. A.; KAPLAN, M. A. C. Antileishmanial activity of nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 908-914, 2011.

MATIAS, E. F. F.; PEREIRA, A. P. D.; BRAZ, A. V. O.; RODRIGUES, M. C.; SILVA, J. L.; MAIA, P. A. A.; SANTOS, S. C.; REBELO, R. A.; BEGNINI, I. M.; SILVA, L. E.; AMARAL, W.; KOWALSKA, G.; ROWINSKI, R.; HAWLENA J.; KOWALSKI, R.; COUTINHO, H. D. M.; ALENCAR, V. R. C. T. Chemical Profile and Biological Activities of Essential Oil from *Piper arboreum* for Development and Improvement of Mouthwash. **Molecules**, v. 27, p. 6408, 2022.

MENDONÇA, G. A. S.; SILVA, A. M.; CAULA, W. M. Características tumorais e sobrevida de cinco anos em pacientes com câncer de mama admitidas no Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 20, n. 5, p. 1232-1239, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Falando sobre câncer de mama**. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Recomendações para o aumento do consumo de frutas, legumes e verduras**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Primária à Saúde, Departamento de Promoção da Saúde, 2022.

MORAES, L. G.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 77-99, 2011.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAOUM, P. C. Interfaces celular, molecular, imunológica e terapêutica do câncer humano. *In*: NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Biologia Médica do Câncer Humano**. São José do Rio Preto: Vitrine Literária Editora, 2016, p. 10-43.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Colon Cancer Treatment. **National Cancer Institute - NIH**, 2022. Disponível em: <[https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#\\_93](https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#_93)>. Acesso em: 28 Jul. 2023.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. What is Cancer? **NIH - National Cancer Institute**, 2021. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 25 Jul. 2023.

NGUYEN, N. Q.; NGUYEN, V. T.; VAN, N. T. H.; VO, T. N. M. Bioactive compounds and antioxidant activity of leaves from *Piper sarmentosum* Piperaceae. **Materials Science and Engineering**, v. 991, 012028, 2020.

OHLYAN, R.; KANDALE, A.; DEORA, G. S.; RATHORE, V.; CHAHAL, J. In vitro screening of dry fruit extracts of *Piper attenuatum* for antioxidant and anticancer activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 1365-1370, 2013.

OLIVEIRA, M. C. C.; BARBOSA, R. C. F.; FLORES, D. C. Atividade antioxidante de frutas cítricas: adaptação do Método do DPPH para experimentação em sala de aula. **Experimentação no Ensino de Química**, v. 43, n. 4, p. 401-405, 2021.

PAGNANO, K. B. B.; REGO, E. M.; ROHR, S.; CHAUFFAILLE, M. L.; JACOMO, R. H.; BITTENCOURT, R.; FIRMATO, A. B.; FAGUNDES, E. M.; MELO, R. A. M.; BERNARDO, W. Guidelines on the diagnosis and treatment for acute promyelocytic leukemia: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Guidelines Project: Associação Médica Brasileira - 2013. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, n.1, p. 71-92. 2014.

PAIVA, H. H.; REGO, E. M. Hematopoese: Regulação e Microambiente. *In*: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 11-14.

PEREIRA, D. M. N. **Estudo fitoquímico e biológico das espécies: *Piper klotzschianum* (Piperaceae) e *Achyrocline satureioides* (Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié, p.83, 2015.

PERRY, N. S.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C.; Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 651-659, 2003.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PHILBIN, C. S.; DYER, L. A.; JEFFREY, C. S.; GLASSMIRE, A. E.; RICHARDS, L. A. Structural and compositional dimensions of phytochemical diversity in the genus *Piper* reflect distinct ecological modes of action. **Journal of Ecology**, v. 110, n. 1, p. 57-67, 2022.

PIMENTEL, C. S. L.; ALBUQUERQUE, B. N. L.; ROCHA, S. K. L.; SILVA, A. S.; SILVA, A. B. V.; BELLON, R.; AGRA-NETO, A. C.; AGUIAR, J. C. R. O. F.; PAIVA, P. M. G.; PRINCIVAL, J. L.; NAPOLEÃO, T. H.; NAVARRO, D. M. A. F. Insecticidal activity of the essential oil of *Piper corcovadensis* leaves and its major compound (1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene) against the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 1008-1017, 2022.

POPIOŁKIEWICZ, J.; POLKOWSKI, K.; SKIERSKI, J. S.; MAZUREK, A. P. In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs—genistein glycosides.

**Cancer Letters**, v. 229, p. 67–75, 2005.

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

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

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

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

REINBOLT, R. E.; MANGINI, N.; HILL, J. L.; LEVINE, L. B.; DEMPSEY, J. L.; SINGARAVELU, J.; KOEHLER, K. A.; TALLEY, A.; LUTSBERG, M. B. Endocrine therapy in breast cancer: the neoadjuvant, adjuvant, and metastatic approach. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 31, n. 2, p. 146-155, 2015.

RIBEIRO, N.; CAMARA, C.; RAMOS, C. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 76, n. 1, p. 71-76, 2016.

RODRIGUES, C. A.; GONÇALVES, M. V.; IKOMA, M. R. V.; LORAND-METZE, I.; PEREIRA, A. D.; FARIAS, D. L. C.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F.; SCHAFFEL, R.; RIBEIRO, E. F. O.; ROCHA, T. S.; BUCCHERI, V.; VASCONCELOS, Y.; FIGUEIREDO,

V. L. P.; CHIATTONE, C. S.; YAMAMOTO, M. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 4, p. 346-357, 2016.

RODRIGUES, F. A. R.; BOMFIM, I. S.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; GONÇALVES, R. S. B.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M. S. V.; SOUZA, M. V. N. Mefloquine–oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 83, p. 126-131, 2014.

RUSSI, C. H. *Piper corcovadensis* in **iNaturalist**. Santa Catarina, Brasil. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/photos/163798106>>. Acesso em: 21 Jul. 2023.

SALVARO, M. M.; FRASSETTO, M. D.; JUST, M. S.; FURTADO, J.; MACARINI, V. H.; SCHUCK, F. W.; ROCHA, L. M.; FRASSETTO, M. E. G.; TOMILIN E. A.; MATTIA, M. R. Leucemia mieloide aguda: perfil clínico-epidemiológico no Brasil entre 2009 e 2019. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 43, p. S505-S506, 2021.

SANCHÉZ, Y.; CORREA, T. M.; ABREU, Y.; PINO, O. Efecto del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) Dawson. **Rev. Protección Veg.**, v. 27, n. 1, p. 39-44, 2012.

SANTOS, M. O.; LIMA, F. C. S.; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M.; CANCELA, M. C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, 2023.

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

SCHEFFER, M. C. **Influência da adubação orgânica sobre a biomassa, o rendimento e a composição do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. mil-folhas**. Dissertação (Mestrado



em Agronomia) - Ciência do Solo do Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998.

SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 263-273, 2018.

SEFTEL, M. D.; BARNETT, M. J.; COUBAN, S.; LEBER, B.; STORRING, J.; ASSAILY, W.; FUERTH, B.; CHRISTOFIDES, A.; SCHUH, A. C. A Canadian consensus on the management of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia in adults. **Current Oncology**, v. 21, n. 5, p. 234-250, 2014.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SIEGEL, J. A.; LUBER, A. J.; WEINSTOCK, M. A. Predictors of actinic keratosis count in patients with multiple keratinocyte carcinomas: A cross-sectional study. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, v. 76, n. 2, p. 346-349, 2017.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277-283, 2003.

SILVA, M. F. R.; BEZERRA-SILVA, P. C.; LIRA, C. S.; ALBUQUERQUE, B. N. L.; NETO, A. C. A.; PONTUAL, E. M.; MACIEL, J. R.; PAIVA, P. M. G.; NAVARRO, D. M. A. F. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 64-70, 2016.

STEIN, E. M.; TALLMAN, M. S. Provocative pearls in diagnosing and treating acute promyelocytic leukemia. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 26, n. 7, p. 636-641, 2012.

THANNICKAL, V. J. FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. 1005-1028, 2000.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, v. 17, n. 3, p. 1-26, 2003.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, 2002.

XIAO, M.; ZHOU, P.; SUN, K. Effect of therapeutically related drugs on coagulation-anticoagulation balance in acute promyelocytic leukemia. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 28, 2022.