

## Extratos Vegetais de *Piper hispidum* no Controle de Fitonematoides

### Plant Extracts of *Piper hispidum* in the Control of Plant-Parasitic Nematodes

Simone Carvalho Sangi<sup>a</sup>; Tamiris Chaves Freire<sup>\*a</sup>; Aline Souza da Fonseca<sup>a</sup>; Jessica Silva Félix Bastos<sup>a</sup>; Renata Reis da Silva<sup>b</sup>; Rodrigo Barros Rocha<sup>b</sup>; Cléberon de Freitas Fernandes<sup>b</sup>; José Roberto Vieira Junior<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Rondônia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte RO, Brasil.

<sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. RO, Brasil.

\*E-mail: tamirischavesfreire@gmail.com

---

#### Resumo

O nematoide-das-galhas são mundialmente conhecidos por causar elevados prejuízos à agricultura. Uma alternativa ao uso de agroquímicos é o uso de extratos vegetais que possuem baixo custo e são menos agressivo ao meio ambiente. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade nematicida de extratos aquosos e alcóolicos de *P. hispidum*, no controle do nematoide-das-galhas. Foram coletadas folhas, inflorescências e talos de *Piper hispidum*. O delineamento foi inteiramente casualizado com seis repetições, utilizando Microtubo “Eppendorf” de 250 µL usando placas acrílicas do tipo Elisa como suporte, contendo extrato nas concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 mg/mL e a suspensão de ovos de nematoide. No décimo sexto dia após terem sido levados para a (incubadora tipo B.O.D a 25 °C), o efeito dos tratamentos sobre as variáveis foram: número de ovos, juvenis (J2) eclodidos móveis e imóveis para o cálculo da inibição e eclosão. Houve diferença significativa entre os tratamentos. O extrato bruto de folhas de *Piper hispidum* foi capaz de inibir 99.50% o qual apresentou atividade ovicida e larvicida. Extratos alcóolicos de *P. hispidum* provenientes da inflorescência possuem atividade nematicida. Os resultados obtidos indicam a importância de estudos com produtos naturais como uma fonte de controle de fitonematóides.

**Palavras-chave:** Extratos. Frações. Metabólitos.

#### Abstract

The root-knot nematode is known worldwide for causing high damage to agriculture. An alternative to the use of agrochemicals is the use of plant extracts that are low cost and less aggressive to the environment. The objective of the study was to evaluate the nematicidal activity of aqueous and alcoholic extracts of *P. hispidum*, in the control of root-knot nematode. Leaves, inflorescences and stems of *Piper hispidum* were collected. The design was completely randomized with six replications, using a 250 µL “Eppendorf” microtube using Elisa-type acrylic plates as a support, containing extract at concentrations 50; 25; 12.5; 6.25; 3.12 and 1.56 mg/mL and the suspension of nematode eggs. On the sixteenth day after being taken to the (B.O.D type incubator at 25 °C), the effect of the treatments on the variables were: number of eggs, mobile and immobile hatched juveniles (J2) for the calculation of inhibition and hatching. There was a significant difference between treatments. The crude extract of *Piper hispidum* leaves was able to inhibit 99.50% which showed ovicidal and larvicidal activity. Alcoholic extracts of *P. hispidum* from the inflorescence have nematicidal activity. The results obtained indicate the importance of studies with natural products as a source of nematode control.

**Keywords:** Extracts. Fractions. Metabolites.

---

## 1 Introdução

O Brasil é o maior produtor e o segundo consumidor mundial de café, responsável por um terço da produção mundial, o que o deixa como maior produtor mundial. O Brasil é o maior exportador mundial de café arábica e o segundo maior exportador de café canéfora (Conab, 2022). O *Coffea canephora* é responsável por cerca de 35% da produção mundial de café, sendo conhecido pelo seu alto vigor vegetativo e produtividade (Brainer, 2019).

Infelizmente, a cultura do cafeeiro é acometida por doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus. Dentre as espécies que atingem o cafeeiro o *M. incognita* é apontado como uma das mais prejudiciais, devido sua ampla disseminação, alta capacidade de lesionar o sistema radicular, persistência no solo e à suscetibilidade da maioria das cultivares

ao nematoide. Esses fatores dificultam a implantação de novas áreas cultivadas com café e a manutenção de áreas já infestadas (Castro *et al.*, 2008; Mendonça; Lopes; Ludke, 2018).

O uso de nematicidas é um dos métodos mais utilizados no controle desses patógenos de solo. Com uma ampla área de plantio no Brasil o país assume a posição de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. O uso desses produtos em algumas áreas de cultivo não são permitidos, isto porque estes produtos são tóxicos ao meio ambiente e aos seres humanos, além de aumentar os custos de produção (Carneiro *et al.*, 2015; Pignati *et al.*, 2017). Assim, torna-se necessária à busca por novas alternativas de controle, a fim de conservar o meio ambiente, reduzindo impactos, e ao mesmo tempo promover o controle do patógeno no solo, melhorando a relação custo/benefício (Batista *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2010; Pignati *et al.*, 2017).

Visto que existe um crescente interesse no uso de produtos naturais, como extratos de plantas que acumulam metabólitos secundários (alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenos entre outros), por apresentarem potencial de aplicação como antimicrobiano, anti-inflamatório, inseticidas, acaricida e anestésico, esses materiais se apresentam como fontes importantes de moléculas sintetizadas naturalmente e biodegradáveis na natureza. Destaca-se o gênero *Piper* pertencente à família piperácea, composto por mais de 260 espécies distribuída nas regiões tropicais e subtropicais no Brasil, o qual tem sido estudado com frequência em função do seu emprego e das suas potencialidades (Braga *et al.*, 2018; Mgbeahuruike *et al.*, 2017; Scopel *et al.*, 2018; Singh; Ebenso; Quraishi, 2012). É importante ressaltar que este trabalho teve como objetivo verificar a ação nematocida do extrato de *Piper hispidum* como controle alternativo do *Meloidogyne incognita*.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Obtenção e identificação do material vegetal

O estudo foi conduzido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia, em Porto Velho, RO, nas dependências do laboratório de Fitopatologia. A espécie utilizada no presente trabalho foi *P. hispidum*. A coleta do material vegetal foi realizada no período de junho a agosto de 2019, em área localizada no campo experimental da Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO, com coordenadas (8° 53' 20" de latitude Sul e 63° 06' 40" de longitude Oeste de Grw), com temperatura média diária de 25 °C e 32 mm de pluviosidade (SisGen código: A088959).

Também foram coletadas amostras para registro em herbário. As amostras foram coletadas seguindo metodologia de campo de Fidalgo *et al.* (1989). A exsiccata encontra-se depositada no Herbário Dr. Ary Tupinambá Penna Pinheiro, localizado no Centro Universitário São Lucas, Porto Velho, RO, sob o número de registro 7767.

### 2.2 Material vegetal

Ramos de *Piper hispidum* contendo folhas, inflorescências e talos foram levados para laboratório e submetidos a um processo de separação entre os materiais vegetais. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa de ventilação forçada (72h, 65 °C). Posteriormente os materiais vegetais foram triturados individualmente em liquidificador industrial de alta rotação, até a obtenção de um pó fino e armazenado em temperatura ambiente em sacos plásticos, com adaptações. conforme descrito por Araújo *et al.* (2014).

### 2.3 Preparo dos extratos brutos para o fracionamento

Para preparo da extração foram usados dois solventes, água mineral estéril e o álcool etílico 96%. Foram pesadas 100 gramas de cada parte da planta e colocadas em Erlenmeyer, sendo então adicionados 200 mL de cada solvente. Em seguida foram submetidos à agitação em Incubadora Shaker refrigerada

(4 °C, 100 rpm, 24h). Logo após, os extratos foram filtrados em tecido de trama fina. Os extratos obtidos foram evaporados e concentrados em rota evaporador à 70 °C, e armazenadas em microtubos tipo Eppendorf (1,5 mL), mantidos a -20 °C, conforme metodologia adaptada de Parekh, Jadeja e Chanda (2005).

Os extratos foram pesados e diluídos em água e álcool etílico 96% obtendo-se as concentrações finais de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL e 1,56 mg/mL.

### 2.4 Condições de fracionamento dos extratos

Para a padronização do fracionamento, utilizou-se quatro solventes: hidróxido de amônio, clorofórmio, metanol e ácido sulfúrico. Aos extratos brutos secos, etanólico e aquoso, foram adicionados 16 mL de álcool metílico e 4 mL de água destilada, ou da mistura e solubilizado no ultra-som por 20 min. Posteriormente foi adicionado 20 mL de metanol e água (4:1; v:v) e a solução foi novamente homogeneizada no ultra-som por 10 min. Esta solução foi deixada em repouso por 30 min, filtrada em papel de filtro comum e funil de büchner, sendo então obtidas duas frações (Parekh; Jadeja; Chanda, 2005; Souza *et al.*, 2009).

O filtrado foi concentrado a um décimo do volume em rotaevaporador a temperatura de 70 °C. Em seguida, a solução foi acidificada com ácido sulfúrico concentrado até obter pH 4, transferida para um funil de separação onde foram adicionados 10 mL de clorofórmio e agitada manualmente. O processo foi repetido por três vezes, separando a fase orgânica da fração básica e polar terpenóides e compostos fenólicos (Parekh; Jadeja; Chanda, 2005; Souza *et al.*, 2009).

A segunda fase recolhida foi a fração básica, adicionando hidróxido de amônio concentrado a solução até obter pH 10. Posteriormente, foram adicionados 20 mL de clorofórmio e metanol (3:1; v:v) agitada manualmente e acrescentado 20 mL clorofórmio. A última fase a ser coletada foi a fração aquosa apresentando alcaloides quaternários, N-óxidos.

As três fases obtidas, correspondendo a fração orgânica, básica e aquosa, foram evaporadas e concentradas em rotaevaporador à 70 °C, armazenadas em frascos âmbar e mantidas a temperatura ambiente até a realização dos ensaios. Para a realização dos testes, as frações obtidas foram diluídas à concentração de 50 mg/mL.

### 2.5 Multiplicação e preparo do inóculo do nematoide

Os nematoides foram obtidos por meio de populações identificadas de acordo com a metodologia de Carneiro *et al.* (2001). Utilizando a técnica de eletroforese e mantidas em raízes de tomateiro 'Santa Cruz Kada'. Para o presente estudo, essas populações foram multiplicadas em chicória (*Cichorium endívia*) variedade 'Valença', mantidas em casa-de-vegetação. As raízes foram fragmentadas em pedaços de três cm e os ovos de *M. incognita* foram extraídos conforme a metodologia de

Hussey e Barker e adaptada por Bonetti e Ferraz (1981).

## 2.6 Preparo das diluições seriada

Os extratos alcoólicos e aquosos foram diluídos, para realizar os testes com ovos e J2 de *M. incognita*. A preparação das concentrações foi conduzida a partir do extrato bruto e fração (50 mg/mL), com diluição seriada inicial de 1:2 obtendo-se concentrações finais de 25 mg/mL; 12,5 mg/mL; 6 mg/mL; 3 mg/mL e 1,56 mg/mL. As quais foram utilizadas nos bioensaios em testes contra o patógeno.

## 2.7 Ensaios *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados em Microtubo Tipo “Eppendorf” de 250 µL usando placas acrílicas do tipo Elisa como suporte. Para o ensaio, 100 µL da suspensão de nematoide contendo 50 ovos e extratos nas concentrações de 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL

e 1,56 mg/mL das amostras a ser testadas foram utilizados. A suspensão de nematoide usada seguiu a metodologia descrita por Hussey e Barker e adaptada por Bonetti e Ferraz (1981). Como testemunhas foram usados água, álcool e nematicida (Carbofurano). As placas foram envoltas em papel alumínio e colocadas em incubada tipo B.O.D (25 °C, 15 dias). No 16º dia após a incubação, as contagens do número de indivíduos vivos, mortos e ovos foram realizados, com auxílio de microscópio. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado empregando nove tratamentos e seis repetições (9x6).

## 3 Resultados e Discussão

Houve diferenças entre os percentuais de inibição da eclosão dos ovos e total de *M. incognita*, para os extratos testados (bruto e frações), concentrações e para interação (Extratos x concentrações) (Quadros 1 a 6).

**Quadro 1** - Resumo da análise de variância dos efeitos de extratos e das frações de diferentes partes de *Piper hispidum* (talo, folha e inflorescência) e concentrações

F.V.	Extratos Aquosos (IEClos%)				Extratos Aquosos (INB%)			
	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Extratos (E)	5	50292.54	10058.51	13.70**	5	84068.92	16813.78	33.48**
Concent.(C)	5	28506.62	5701.32	7.77**	5	15452.43	3090.49	6.15**
E x C	25	18352.62	734.10	6.99**	25	12555.42	502.22	7.33**
Resíduo	180	18881.37	104.90		180	12325.5	68.48	
Total	215	116033.15			215			
Média	68.31				73.02			
CV(%)	14.99				11.33			

FV: Fonte de variação, GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados, QM: quadrado médio, F: teste F, CV(%): coeficiente de variação.

Fonte: dados da pesquisa.

Esses resultados indicam ação dos extratos e das frações em seis diferentes concentrações que inibiram a eclosão dos ovos e inibição total de *M. incognita* quando submetido a bioensaio *in vitro*. O extrato bruto (EB-PhFO) de folha

de *P. hispidum* foi um dos mais eficientes na inativação de juvenis J2 de *M. incognita*, dentre esses a fração básica (PhFO2) apresentou efeito nematicida afetando a eclosão de nematoides (Quadro 2).

**Quadro 2** - Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade da inibição de eclosão dos ovos e da inibição total observada com a utilização de seis extratos aquosos provenientes de diferentes partes de *Piper hispidum*, avaliados em seis diferentes concentrações

Inibição de Eclosão dos ovos (%)												
Concent	PhFO		PhTa		PhIn		PhFO1		PhFO2		PhFO3	
1	65.62	Ad	38.18	Bc	53.97	Ac	43.25	Bb	61.75	Ab	33.07	Bd
3	81.18	Ac	42.80	Cc	52.33	Cc	51.17	Cb	62.78	Bb	41.27	Cd
6	99.50	Aa	39.83	Cc	49.08	Cc	49.28	Cb	70.80	Bb	50.50	Cc
12	87.80	Ab	74.22	Bb	67.83	Cb	58.75	Ca	74.22	Bb	57.65	Cc
25	89.33	Ab	93.83	Aa	99.50	Aa	53.17	Cb	96.48	Aa	67.78	Bb
50	99.50	Aa	97.13	Aa	94.12	Aa	62.63	Ba	99.50	Aa	99.50	Aa
Inibição total (%)												
Concent	PhFO		PhTa		PhIn		PhFO1		PhFO2		PhFO3	
1	65.62	Ac	38.18	Cc	53.97	Bc	43.25	Cc	61.75	Ac	41.65	Cc
3	81.18	Ab	42.80	Cc	52.33	Cc	51.17	Cc	62.78	Bc	50.97	Cb
6	99.50	Aa	39.83	Cc	49.08	Cc	49.28	Cc	70.80	Bb	50.50	Cb
12	92.23	Aa	74.22	Bb	67.83	Bb	64.42	Cb	74.05	Bb	57.65	Cb
25	99.50	Aa	99.50	Aa	99.50	Aa	99.50	Aa	99.67	Aa	99.50	Aa
50	99.50	Aa	99.33	Aa	99.50	Aa	99.50	Aa	99.50	Aa	99.50	Aa

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL e pela mesma letra minúscula na VERTICAL não diferem entre si de acordo com o teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade. Legenda: PhFO: Extrato bruto *P. hispidum* aquoso de folha; PhTa: Extrato bruto aquoso *P. hispidum* de talo; PhIn: Extrato bruto aquoso *P. hispidum* de inflorescência; PhFO1: fração orgânica *P. hispidum*; PhFO2: fração básica de *P. hispidum*; PhFO3: fração aquosa *P. hispidum*.

Fonte: dados da pesquisa.

Já os extratos bruto de talo e inflorescências (PhTa, PhIn,) confirmaram seu controle de inibição nas maiores concentrações (12; 25; 50 mg mL<sup>-1</sup>), enquanto a fração aquosa (PhFO3) obtida da folha também se sobressaiu com as maiores concentrações.

Em outro estudo, extrato de folhas de *P. hispidum* apresentou eficiência no controle de *Hypothenemus hampei*, broca-do-cafeeiro, indicando atividade biológica do extrato dessa espécie, com ação inseticida (Santos *et al.*, 2010). Estudos conduzidos com extratos e óleos essenciais de outra espécie do gênero, *Piper aduncum*, mostraram a presença de diferentes tipos de metabólitos secundários de grande importância, com diversas atividades biológicas, como por exemplo antibacteriana, antifúngica e inseticida, dentre outras (Pohlit; Pinto; Mause, 2006).

Atividade inseticida também foi relatada para extratos de folhas e sementes de *Annona muricata L.* contra o pulgão preto *Aphis craccivora*, com mortalidade de 18,88% e 92,21%, respectivamente, na concentração de 1% (Rodrigues *et al.*, 2014). Em adição, Bandeira *et al.* (2017), relataram a potencialidade inseticida dos extratos de folhas e de sementes de *A. montana* no controle de ninfas de *A. craccivora*. Na concentração de 15%, o extrato hidroetanólico de folhas causou 78% de mortalidade e CL50 = 7,69%, enquanto o extrato obtido de sementes foi eficiente na concentração de 2%, proporcionando 96% de mortalidade das ninfas, com CL50 = 0,55%.

**Quadro 3** - Concentrações (g.mL<sup>-1</sup>) associadas a probabilidades de inibição de ovos e formas adulta de *M. incognita* de diferentes extratos aquosos estimadas utilizando curvas de concentração x mortalidade. A concentração letal de 50% da população (CL<sub>50</sub>) encontra-se destacada no quadro

CL <sub>x</sub>	Extratos (g.mL <sup>-1</sup> )					
	PhFO	PhTa	PhIn	PhFO1	PhFO2	PhFO3
0.01	0.01	0.08	0.02	0.04	0.00	0.03
0.02	0.02	0.12	0.03	0.06	0.01	0.06
0.03	0.02	0.14	0.03	0.07	0.01	0.07
0.05	0.03	0.23	0.07	0.13	0.02	0.13
0.10	0.06	0.42	0.14	0.25	0.05	0.25
0.20	0.13	0.85	0.35	0.57	0.14	0.58
0.25	0.17	1.11	0.50	0.78	0.21	0.79
<b>0.50</b>	<b>0.53</b>	<b>3.32</b>	<b>2.05</b>	<b>2.72</b>	<b>0.99</b>	<b>2.83</b>
0.75	1.61	9.92	8.40	9.44	4.65	10.10
0.80	2.13	13.00	11.91	12.85	6.81	13.84
0.90	4.40	26.55	29.88	28.95	18.63	31.77
0.95	8.01	47.86	63.86	56.63	42.78	63.08
0.98	13.48	79.80	123.38	101.34	87.96	114.36
0.98	15.74	92.91	150.10	120.50	109.02	136.51
0.99	24.69	144.58	265.35	199.35	203.40	228.39
R <sup>2</sup>	0.28	0.35	0.24	0.29	0.19	0.28

CL<sub>x</sub>: Concentração letal a diferentes concentrações variando de 1 a 99. Legenda: PhFO: Extrato bruto *P. hispidum* aquoso de folha; PhTa: Extrato bruto aquoso *P. hispidum* de talo; PhIn: Extrato bruto aquoso *P. hispidum* de inflorescência; PhFO1; fração orgânica *P. hispidum* PhFO2: fração básica de *P. hispidum* PhFO3: fração aquosa *P. hispidum*.

Fonte: dados da pesquisa.

O tratamento com o extrato bruto (EB) de folhas de *P. hispidum* mostrou-se mais eficiente em comparação aos demais, apresentando uma CL50 de inibição de ovos e formas adulta de *M. incognita* na concentração de 0,53 g.mL<sup>-1</sup> (Quadro 3).

Extrato aquoso de cúrcuma mostrou uma atividade nematicida sobre *Meloidogyne incognita* tendo obtido uma redução máxima de J2 móveis de 67,27% (Mioranza *et al.*, 2016).

O extrato bruto da folha de *P. hispidum* na concentração de 13,48 (g.mL<sup>-1</sup>) proporcionou inibição de ovos e formas adulta de *M. incognita* de 98%.

Extratos aquosos de folhas e raízes de *Palicourea marcgravii*, mais conhecida como cafezinho, apresentaram efeito tóxico sobre adultos de *Aetelion* sp. O extrato das raízes apresenta maior toxicidade (CL50 = 12,4 mg/mL) do que o extrato de folhas (CL50 = 39,9 mg/mL) (Silva *et al.*, 2009).

Extratos de folhas, frutos e talos de *P. tuberculatum* foram avaliados quanto ao potencial inseticida para o controle da mosca-do chifre. Os extratos etanólico de folhas e talos apresentaram CL50 de 61,14 mg/mL e 6,00 mg/mL, respectivamente. Para os extratos hexânico de frutos e acetate de etila de talos as CL50 foram de 136,88 mg/mL e 1,03 mg/mL, respectivamente, demonstrando a atividade inseticida promissora dessa espécie (Braga *et al.*, 2017).

**Quadro 4** - Resumo da análise de variância dos efeitos de extratos e das frações de diferentes partes de *Piper hispidum* (talo, folha e inflorescência) e concentrações (1, 3, 6, 12, 25 e 50 mg/mL) na inibição de eclosão dos ovos de *M. incognita* (IEClos%) e inibição total (INB%)

Extratos Alcólico (IEClos%)				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Extratos (E)	5	5736.07	1147.214	1.68 <sup>NS</sup>
Concent.(C)	4	2355.7	588.925	0.86 <sup>NS</sup>
E x C	20	13667.68	683.384	5.48 <sup>NS</sup>
Resíduo	150	18717.58	124.7839	
Total	179	40477.03		
Média	79.96			
CV(%)	13.97			

Extratos Alcólico (INB%)				
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Extratos (E)	5	12936.74	2587.348	5.47**
Concent.(C)	4	2733.95	683.4875	1.44 <sup>NS</sup>
E x C	20	9467.31	473.3655	5.04**
Resíduo	150	14085.25	93.90167	
Total	179			
Média	83.86			
CV(%)	11.55			

FV: Fonte de variação, GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados, QM: quadrado médio, F: teste F, CV(%): coeficiente de variação.

Fonte: dados da pesquisa.

**Quadro 5** - Teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade da inibição de eclosão dos ovos e da inibição total observada com a utilização de cinco extratos alcóolicos provenientes de diferentes partes de *Piper hispidum*, avaliados em seis diferentes concentrações

Inibição de Eclosão dos ovos (%)										
Concent	PhFO		PhTa		PhIn		PhFO1		PhFO2	
1	68.92	Bb	81.48	Ab	74.83	Aa	64.58	Bb	61.98	Bc
3	81.25	Ab	73.92	Ab	72.27	Aa	69.32	Ab	80.60	Ab
6	71.73	Bb	85.78	Ab	82.40	Aa	69.77	Bb	89.25	Ab
12	78.12	Bb	83.55	Bb	71.45	Ba	78.03	Bb	99.50	Aa
25	78.10	Bb	99.50	Aa	76.32	Ba	73.55	Bb	99.50	Aa
50	99.50	Aa	88.60	Bb	82.05	Ba	99.50	Aa	63.55	Cc
Inibição total (%)										
Concent	PhFO		PhTa		PhIn		PhFO1		PhFO2	
1	68.92	Bc	81.48	Ab	74.83	Ab	64.58	Bc	61.98	Bc
3	81.25	Ab	73.92	Ab	72.27	Ab	69.32	Ac	80.60	Ab
6	71.73	Cc	85.78	Bb	99.50	Aa	69.77	Cc	89.25	Ba
12	83.07	Bb	83.55	Bb	94.60	Aa	85.88	Bb	99.50	Aa
25	78.10	Bb	99.50	Aa	99.50	Aa	81.02	Bb	99.50	Aa
50	99.50	Aa	99.50	Aa	89.98	Aa	99.50	Aa	78.15	Bb

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL e pela mesma letra minúsculas na VERTICAL não diferem entre si de acordo com o teste de agrupamento de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade. Legenda: PhFO: Extrato bruto alcoólico de *P. hispidum* de folha; PhTa: Extrato bruto alcoólico *P. hispidum* de talo; PhIn: Extrato bruto alcoólico *P. hispidum* de inflorescência; PhFO1; fração orgânica *P. hispidum* PhFO2: fração básica de *P. hispidum*.

**Fonte:** dados da pesquisa.

Todos os extratos inibiram a eclosão *in vitro* de *M. incognita*, obtendo uma porcentagem significativa de inibição sobre a eclosão dos ovos com média variando de 99,50% a 61,98%. Essa diferença de atividade pode ser em razão das concentrações dos princípios ativos presentes nas diferentes partes da planta.

O extrato da folha fração básica alcoólico PhFO2 nas concentrações de 12 e 25 mg/mL apresentaram percentuais de inibição de 99,50%. A eficiência de inibição da eclosão de ovos em torno de 99,50%, proporcionada tanto pelo extrato aquoso bruto das folhas (PhFO), quanto pelo extrato alcoólico bruto da inflorescência (PhIn) indica o potencial nematicida *P. hispidum* para controle de *M. incognita*. Esses compostos podem apresentar algumas vantagens em relação aos químicos, tais como: baixo custo/benefício.

Em relação aos princípios bioativos já descritos para *Piper hispidum* encontram-se amidas, benzenos, ácidos benzoicos, flavonoides e óleos essenciais, dos quais 17 têm significativa atividade antifúngica, antimicrobiana, antiplasmodial, leishmanicida e inseticida (Silva *et al.*, 2014).

Estudos fitoquímicos observaram que espécie de *P. hispidum* possui alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, compostos fenólicos, cumarinas e triterpenos (Freire *et al.*, 2022).

Estudos relataram que o extrato aquoso de folhas de *Piper hispidum*, teve uma eficiência de 75% em relação a redução da eclosão de J2 de *M. incognita* (Sangi *et al.*, 2018).

Outros estudos mostraram que extratos, frações e substâncias isoladas de *P. umbellatum* apresentaram um amplo espectro de atividades farmacológicas, como por exemplo leishmanicida, frente à forma promastigota de *L. amazonensis* (Braga *et al.*, 2007).

Analisando o óleo essencial extraído dos frutos, talos e raízes de *Piper tuberculatum* Jacq. e *P. hispidum*, autores identificaram como constituintes majoritários o dilapiol, com 57,5%, a elemicina com 24,5% e o apiol 10,2%. Por outro lado, os resultados corroboram com o encontrado que o extrato metanólico dessa espécie também mostrou resultado positivo, tendo ação inseticida contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Facundo *et al.*, 2008).

Algumas pesquisas descreveram compostos fenólicos encontrados na folha de *P. tuberculatum* e folha e inflorescência de *P. hispidum*. Nesses trabalhos, foram observados flavonoides em cinco das seis partes avaliadas de *P. tuberculatum* e *P. hispidum*. A presença destes compostos também foi observada em folhas, talos e inflorescência de *Piper mollicomum* Aubl, e destacam-se por suas potenciais atividades biológicas e terapêuticas, e podem variar de acordo com o tipo do solvente utilizado (Almeida *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020).

As concentrações CL<sub>50</sub> dos extratos brutos (EB) e frações (PhFO1 e PhFO2) alcoólicos das folhas, talos e inflorescências de *P. hispidum* contra *M. incognita*, estão apresentadas no Quadro 6.

**Quadro 6** - Concentrações (g.mL<sup>-1</sup>) associadas às probabilidades de inibição de ovos e formas adulta de *M. incognita* de diferentes extratos alcoólicos estimadas utilizando curvas de concentração x mortalidade. A concentração letal de 50% da população (CL<sub>50</sub>) encontra-se destacada no quadro

CL <sub>x</sub>	Extratos (g.mL <sup>-1</sup> )				
	PhFO	PhTa	PhIn	PhFO1	PhFO2
1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
3	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
5	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
10	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
20	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01
25	0.01	0.02	0.01	0.05	0.01
<b>50</b>	<b>0.15</b>	<b>0.16</b>	<b>0.10</b>	<b>0.51</b>	<b>0.10</b>
75	3.21	1.45	1.07	4.85	1.65
80	6.86	2.50	1.93	8.47	3.30
90	50.44	10.47	9.15	36.69	20.53
95	262.12	34.18	33.12	123.14	92.90
98	1094.66	95.41	101.04	351.97	344.01
98	1675.10	129.51	140.82	481.12	507.92
99	5768.62	314.76	369.61	1193.54	1576.36
R <sup>2</sup>	0.05	0.15	0.03	0.13	0.05

CLX: Concentração letal a diferentes concentrações variando de 1 a 99. Legenda: PhFO: Extrato bruto alcoólico de *P. hispidum* de folha; PhTa: Extrato bruto alcoólico *P. hispidum* de talo; PhIn: Extrato bruto alcoólico *P. hispidum* de inflorescência; PhFO1: fração orgânica *P. hispidum*; PhFO2: fração básica de *P. hispidum*.

Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados desse experimento mostraram que os extratos alcoólicos brutos e as duas frações de *P. hispidum* apresentaram atividade nematocida promissora para o controle *M. incognita*. A CL50 (concentração letal na inibição de ovos e formas adulta) foi observada em concentrações que variaram de 0,10 à 0,16 g.mL<sup>-1</sup> dos respectivos extratos alcoólicos exceto a fração orgânica da folha (PhFO1) cuja CL50 foi obtida com a concentração de 0,51 g.mL<sup>-1</sup>.

O efeito acaricida de extratos etanólicos das folhas, caules e frutos de *P. tuberculatum* contra larvas e adultos de *Rhizoglyphus microplus* foi avaliado, tendo sido observado que as concentrações letais para 50% dos indivíduos (CL50), após 24 horas, foram 3,62, 3,99 e 5,30 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Este estudo evidencia o potencial da espécie em fornecer ingrediente ativo em formulações de pesticidas para o controle de *R. microplus* (Braga *et al.*, 2018).

Outro estudo cita o efeito inseticida de óleos essenciais de folhas de *Piper hispidinervum* C. DC. e *Piper aduncum* sobre *Sitophilus zeamais* Motsch, utilizando sete concentrações desses óleos, com a máxima concentração em 300 mg mL<sup>-1</sup> e a mínima de 10 mg mL<sup>-1</sup>. Foi observada 78 e 63% de mortalidade com as concentrações entre 300 - 200 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente (Estrela *et al.*, 2006).

Outras pesquisas apontaram que a aplicação de manipueira na concentração de 0,5 g.mL<sup>-1</sup> proporcionou um PRO de 56,04% de *M. incognita* em tomateiros em condições de campo. Também foi observado no trabalho de Guimarães *et al.* (2021), em estudo com extrato de manipueira na concentração

de 0,3 g.mL<sup>-1</sup>, uma redução de 49,12% na reprodução de *M. javanica* em jiloeiro (Guimarães *et al.*, 2021; Nasu *et al.*, 2010).

Alguns compostos são extraídos mais facilmente em álcool como os flavonoides, enquanto os ácidos e os açúcares pelos extratos aquosos (Edwards *et al.*, 2012). Por isso, há diferenças na eficiência no controle de *M. incognita* entre as diferentes partes da planta de *Piper hispidum* e os respectivos extratos utilizados no presente estudo.

Vale ressaltar que a utilização destes produtos naturais representa uma estratégia de controle mais econômico, pois, o uso de extratos de plantas com propriedades ativas pode ser cultivadas pelo próprio agricultor em sua propriedade (Santos; Silva, 2015).

#### 4 Conclusão

As diferentes partes da planta *Piper hispidum* (folhas, talos e inflorescências) tiveram efeito nematocida sobre o patógeno *M. incognita*.

Extratos aquosos e suas frações apresentaram efeito inibitório frente ao *M. incognita*, excetuando-se a fração de folha (PhFO1) que na concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup>, apresentou baixa toxicidade.

O extrato bruto de folhas de *Piper hispidum* foi capaz de inibir 99,50% , tendo demonstrado atividades ovicidas, larvicidas.

Extratos alcoólicos (EB) de *P. hispidum* inflorescência possuem atividade nematocida sobre *M. incognita*. A fração alcoólica obtida da folha (PhFO2), apresentou efeito com as concentrações 12 e 25 mg mL<sup>-1</sup>, causando 99,50% % na inibição e mortalidade.

O uso de extratos possui vantagens, como o fato de não necessitar de grandes quantidades de solvente, tendo uma extração relativamente rápida e eficiente com a adição de solventes de baixo custo/benefício que possibilita extração de compostos secundários e potencial nematocida.

Estudos como estes ilustram a importância dos produtos naturais como uma fonte de controle de fitonematóides de importância agrícola.

#### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, à Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia – FAPERON, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.

#### Referências

- ALMEIDA, K.P.C. *et al.* Prospecção fitoquímica do extrato vegetal de *Piper mollicomum* Kunth 56 (Piperaceae) e seu potencial antimicrobiano. *Rev Gestão Sustentabil. Amb.*, v.8, n.3, p.550-565, 2019. doi: 10.19177/rgsa.v8e32019550-565.
- ARAÚJO, K.M. *et al.* Identification of phenolic compounds

- and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *euphorbia tirucalli* l. antioxidants. *Basel, J. List*, v.3, n.1, p.159-175, 2014. doi: 10.3390/antiox3010159.
- BANDEIRA, H.F.S. *et al.* Bioactivity of *Annona montana* Macfad extracts on the black cowpea aphid (*Aphis craccivora* Koch). *Rev Bras. Ciênc. Agrár.*, v.12 n.1, p.41-46, 2017. doi: 10.5039/agraria.v12i1a5419.
- BATISTA, L.C.S.O. *et al.* Bioprospecção de extratos de Jaborandi contra Ctenocephalides felis felis, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus microplus*. *Revista Bras. Med. Vet.*, v.35 n.2, p.113-118. 2013.
- BONETTI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatol. Bras.*, v.6, n.3, p.553, 1981.
- BRAGA, A.G.S. *et al.* Atividade pesticida de extratos de *piper tuberculatum* jacq sobre *haematobia irritans*. *Biota Amaz.*, v.7 n.1, p.54-57, 2017. doi: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v7n1p54-57.
- BRAGA, A.G.S. *et al.* Acaricidal activity of extracts from different structures of *Piper tuberculatum* against larvae and adults of *Rhipicephalus microplus*. *Acta Amaz.*, v.48, n.1, p.57-62, 2018. doi: 10.1590/1809-4392201700053.
- BRAGA, F.G. *et al.* Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.*, v.111, n.2, p.396-402, 2007. doi: 10.1016/j.jep.2006.12.006.
- BRAINER, M.S.C.P. Análise de aspectos da produção e mercado do café. *Cad. Setorial ETENE*, v.4, n.106, 2019.
- CARNEIRO, F.F. *et al.* Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Dossiê abrasco. Rio de Janeiro: *Abrasco*, 2015.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematol. Bras.*, v.25, n.1, p. 35-44, 2001.
- CASTRO, J.M.C. *et al.* Levantamento de fitonematóides em cafezais do sul de Minas Gerais. *Nematol. Bras.*, v.32, n.1, p.56-6, 2008.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra brasileira de café, v.01 - SAFRA 2022, n.01 – Primeiro Levantamento.
- COSTA, L.V. *et al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Rev Virtual Quím.*, v.2, n.1, p.47-58, 2010. doi: 10.5935/1984-6835.20100006.
- EDWARDS, J.E. *et al.* Review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, v.79, p.5-26, 2012. doi: 10.1016/j.phytochem.04.006.
- ESTRELA, J.L.V. *et al.* Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. *Pesquisa Agropec. Bras.* v.41, n.2, p.217-222, 2006.
- FACUNDO, V.A. *et al.* Constituintes químicos fixos e voláteis de talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. *Acta Amaz.*, v.38, n.4, p.733- 742, 2008.
- FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. Técnica de coleta, preservação e herborização de material botânico. 1989. Disponível em: [https://www.academia.edu/38593254/Fidalgo\\_e\\_Bononi\\_1989\\_T%C3%A9cnicas\\_de\\_coleta\\_preserva%C3%A7%C3%A3o\\_e\\_herboriza%C3%A7%C3%A3o\\_de\\_material\\_bot%C3%A2nico](https://www.academia.edu/38593254/Fidalgo_e_Bononi_1989_T%C3%A9cnicas_de_coleta_preserva%C3%A7%C3%A3o_e_herboriza%C3%A7%C3%A3o_de_material_bot%C3%A2nico).
- FREIRE, T.C. *et al.* Avaliação fitoquímica de folhas, talos e inflorescência de *Piper tuberculatum* e *Piper hispidum*. *Res Soc. Develop.*, v.11, n.7, p.1-6, 2022. doi: 0.33448/rsd-v11i7.3017441111730174.
- GUIMARÃES, N.N. *et al.* Potencial de extratos de plantas e manipueira no controle de *meloidogyne javanica* em jiloeiro. *Holos*, v.37, n.8, p.1-15, 2021. doi: 10.15628/holos10311.
- MENDONÇA, J.L.; LOPES, C.A.; LUDKE, I. Exnerxia de tomateiro em baquicha (*Solanum stramonifolium* var inerme (Dunal) Whalen) para controle de doenças de solo. *Circular Técnica* 163. Brasília: EMBRAPA, 2018.
- MGBEAHURUIKE, E.E. *et al.* Bioactive compounds from medicinal plants: Focus on *Piper* species. *South Afri. J. Bot.*, v.112, p.54-69, 2017. doi: 10.1016/j.sajb.05.007.
- MIORANZA, T.M. *et al.* Potencial nematicida e nematostático do extrato de *Curcuma longa* sobre *Meloidogyne incognita*. *Rev. Ciênc. Agroamb.*, v.14, n.1, p.104-109, 2016. doi: 10.5327/rcaa.v14i1.1417.
- NASCIMENTO, J.C.D. *et al.* Occurrence, biological activities and 13C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). *Quím. Nova*, v.35, n.11, p.2288-2311, 2012. doi: 10.1590/S0100-40422012001100037.
- NASU, E. *et al.* Manipueira Effect on *Meloidogyne incognita* in vitro assays and in tomato plants under greenhouse conditions. *Trop. Plants Pathol.*, v.35, n.1, p.32-26, 2010. doi:10.1590/S1982-56762010000100005.
- PAREKH, J.; JADEJA, D.; CHANDA, S. Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity. *Turk. J. Biol.*, v.29, n.4, p.203-210, 2005.
- PIGNATI, W.A. *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciênc. Saúde Coletiva*, v.22, n.10, p.3281-3293, 2017. doi: 10.1590/1413-812320172210.17742017.
- POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.S.; MAUSE, R. *Piper aduncum* L. Planta Pluripotente e Fonte de Substâncias Fitoquímicas Importantes. *Revista fito*, v. 2, n. 1, p. 7-18, 2006.
- RODRIGUES, V.M. *et al.* Avaliação de extratos de *Annona muricata* L. sobre *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Hemiptera: Aphididae). *Rev. Bras. Agroecol.*, v.9, n.3, p.75-83, 2014.
- SANGI, S.C. *et al.* Extratos de *Piper* no controle alternativo de fitonematoides do gênero *Meloidogyne* em *Coffea canefora*. *Rev. Ibero-Am. Ciênc. Amb.*, v.9, n.8, p.212-223, 2018. doi: 10.6008/CBPC2179-6858.2018.008.0019.
- SANTOS, C.A.B.; SILVA, A.P.M. Extratos vegetais de plantas daninhas contra o pulgão *Aphis craccivora* koch 1854, no feijão *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Rev Ibero – Am. Ciênc. Amb.*, v.6, n.2, p.69-75, 2015. doi: 10.6008/SPC2179-6858.2015.002.0005.
- SANTOS, R.A. *et al.* Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). *Braz. J. Bot. Sci.*, v.33, n.2, p.319-324, 2010. doi: 10.1590/S0100-84042010000200012.
- SCOPEL, W. *et al.* Bioatividade de macerados de *Anthemis* SP., *Coriandrum sativum* e *Piper nigrum* contra *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Evidência*, v.18, n.1, p.95-109, 2018. doi: 10.18593/eba.v18i1.16872.
- SILVA, F.C.O. *et al.* Bioatividades de Triterpenos isolados de plantas: Uma breve revisão. *Rev Virtual Quím.*, v.12, n.1, p.234-247, 2020. doi: 10.21577/1984-6835.20200018.
- SILVA, F.R.P.; ALMEIDA, S.S.M.S. Análise fitoquímica e microbiológica da atividade do extrato bruto etanólico da Andiroba, Carapa guianensis Aubl. *Biota Amaz. Macapá*, v.4,

n.4, p.10-14, 2014. doi: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n4p10-14.

SILVA, L.V. Efeito de *Piper hispidum* (Piperaceae) Sobre Lagartas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith., 1797) (Lep.: Noctuidae) em Dieta Artificial. *Cad. Agroecol.*, v.13, n.2, p.8-8, 2018.

SILVA, W.C. *et al.* Avaliação do efeito tóxico de extratos de *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae) em laboratório. *Rev Bras. Biociênc.*, v.7, n.2, p.129-133, 2009.

SINGH, A.; EBENSO, E.E.; QURAIISHI, M.A. Corrosion

inhibition of carbon steel in hcl solution by some plant extracts. *Review article. Int. J. Corrosion*, v.2012, p.20, 2012. doi: 10.1155/2012/897430.

SOARES, P.K.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO I.S. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *J. Separation Sci.*, v. 32, n. 4, p. 644-652, 2009. doi: 10.1002/jssc.200800534.

SOUZA, E.B.R. *et al.* Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. *J. Separation Sci.*, v.32, n.23/24, p.4176-4185, 2009. doi: 10.1002/jssc.200900375.