



Protocolo para cultivo de *Piper aduncum* L. em sistema agroecológico para estudo do óleo essencial de suas folhas

*Protocol for cultivation of *Piper aduncum* L. in an agroecological system for the study of the essential oil from its leaves.*

ASSUNÇÃO, Jeferson Adriano e Silva^{1,2}; RAMOS, Ygor Jessé⁴; SOUZA, Ulisses Carvalho³; MOREIRA, Davyson de Lima^{1,2}

¹ Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos-Fiocruz), jefersonadriano.sa@gmail.com; ² Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, davysonmoreira@hotmail.com.; ³ Centro de Responsabilidade Socioambiental do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, usouza@jbrj.gov.br; ⁴ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, ygor.jesse@ufba.br

RESUMO EXPANDIDO

Eixo Temático: Manejo de Agroecossistemas

Resumo: A Mata Atlântica é um bioma de grande importância ecológica e está ameaçado devido à degradação e ao risco de extinção de várias espécies. A espécie *Piper aduncum* L., presente neste bioma, possui potencial biológico e farmacológico, sendo importante investigar formas adequadas de propagação e cultivo. Nesse contexto, foi desenvolvido um protocolo de cultivo por alporquia em sistema agroecológico, visando a produção sustentável de matéria-prima vegetal de qualidade. O protocolo implantado foi bem-sucedido, com raízes adventícias se desenvolvendo em 31 dias e as mudas transplantadas apresentando vigor e crescimento satisfatório. A análise dos óleos essenciais tanto da planta matriz quanto daquelas obtidas dos alporques demonstrou a presença do dilapiol como substância majoritária. Esses resultados indicam que a alporquia é uma estratégia eficaz para produzir mudas de *P. aduncum* com potencial de manter uma estabilidade química em relação ao óleo essencial.

Palavras-chave: plantas medicinais; piperaceae; agroecologia; alporquia; dilapiol.

Introdução

O bioma Mata Atlântica, segunda maior floresta tropical da América do Sul, é um complexo de ecossistemas que abriga uma rica diversidade biológica. No entanto, a fauna e a flora desse bioma enfrentam altos níveis de ameaças e inúmeros desafios para sua preservação. Devido ao seu alto endemismo e à degradação de seus habitats, muitas espécies animais e vegetais estão em risco de extinção. Com isso, a Mata Atlântica é considerada um dos *hotspots* mundiais e é reconhecida como Patrimônio Nacional na Constituição da República Federativa do Brasil (art. 225) (BRASIL, 1988; MARQUES *et al.*, 2021). A Mata Atlântica contém 266 famílias de angiospermas, abrangendo 3.475 gêneros e 35.700 espécies. A família Piperaceae, incluindo o gênero *Piper* L., contribui com 467 espécies (GUIMARÃES; MEDEIROS; QUEIROZ, 2023; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023). *Piper* L. apresenta alta plasticidade fenotípica química e possui potencial para diversas aplicações biológicas e farmacológicas. Estudos com espécies de *Piper* da Mata Atlântica podem levar à descoberta de extratos, frações enriquecidas, óleos essenciais (OEs)



e substâncias isoladas com valor terapêutico para doenças humanas e animais (NOR; SYUKRI, 2020). Por exemplo, os OEs de *Piper aduncum* L. apresentam uma variedade de atividades biológicas, como propriedades vasodilatadoras, gastrointestinais, inseticidas, antiparasitárias, anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes, sendo dilapiol a substância majoritária de um quimiotipo específico e responsável por essas atividades (DUROFIL *et al.*, 2021). A caracterização química dos OEs de *P. aduncum*, espécie amplamente distribuída em diferentes ecossistemas da Mata Atlântica, é fundamental para a identificação de suas bioatividades.

A composição química desses OEs vegetais pode variar devido a fatores bióticos, abióticos e genéticos, incluindo condições de cultivo e métodos de propagação (MONZOTE *et al.*, 2017). Portanto, é de suma importância estudar e padronizar as práticas de cultivo de plantas medicinais em sistemas agrícolas sustentáveis para preservar os recursos genéticos e obter matérias-primas vegetais de qualidade e conteúdo químico estável, sem prejudicar o meio ambiente (DASSOU *et al.*, 2020). Diante das preocupações com a exploração dos ecossistemas naturais, a busca por alternativas agroecológicas padronizadas que promovam o aumento da produtividade e o uso racional da terra tem crescido (SANTOS, CROUZEILLES, SANSEVERO, 2019). Nesse contexto, entender a plasticidade fenotípica química dos OEs de *P. aduncum* em condições de cultivo é fundamental para estabelecer protocolos padronizados para explorar seu potencial bioativo. Portanto, o objetivo desta pesquisa é desenvolver um protocolo de cultivo agroecológico sustentável para *P. aduncum* do quimiotipo dilapiol, visando a produção de matéria-prima vegetal de qualidade.

Metodologia

Pesquisa literária para busca de modelo de protocolo de cultivo

Os procedimentos de coleta de dados para elaboração das etapas do protocolo envolveram pesquisas na literatura científica e análise de documentos relacionados a propagação clonal e cultivo de plantas. Foram realizadas buscas em artigos científicos (PUROHIT *et al.*, 2016; ARIFF *et al.*, 2021), e protocolos de cultivos publicados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (PEREIRA *et al.*, 2012; RAPOSO *et al.*, 2012) para obter informações sobre as melhores práticas de cultivo, como substratos recomendados, técnicas de propagação, manejo de pragas e doenças, e cuidados específicos para o crescimento saudável da planta.

Coleta dos propágulos e identificação botânica de *Piper aduncum* L.

O espécime matriz de *P. aduncum* em cultivo foi obtido a partir da propagação de um indivíduo silvestre coletado na Reserva Biológica do Tinguá (S 22° 35' 23" / O 43° 16' 45", 26 m acima do nível do mar) em outubro de 2017. Uma matriz saudável de 3 m de altura foi selecionada, e três estacas dos ramos secundários foram retiradas a 1,40 m do solo. Apenas uma das mudas sobreviveu na quarentena do viveiro. Essa muda foi transplantada no Sistema de Cultivo Agroecológico do Centro de Responsabilidade Socioambiental do Jardim Botânico do Rio de Janeiro



(CRS/JBRJ) (S 22° 58' 00" / W 43° 13' 43", 26 m acima do nível do mar). As coletas foram realizadas com licenças concedidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (n. 57296-4 - código de autenticação 47749568) e a licença para acesso ao Patrimônio Genético para pesquisa e desenvolvimento tecnológico foi obtida do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com a id. AE20045. O espécime matriz em cultivo passou por identificação botânica realizada pela Dr.^a Elsie Franklin Guimarães e pelo Dr. George Azevedo Queiroz, ambos do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (IPJBRJ) e amostras herborizadas foram depositadas no Herbário RB/IPJBRJ, com suas respectivas descrições (RB01426180).

Desenvolvimento do protocolo de multiplicação clonal

O Sistema de Cultivo Agroecológico do CRS/JBRJ é composto por diversos elementos interligados, formando uma estrutura sistêmica que estabelece interdependência entre eles. Esses elementos englobam áreas de plantas ornamentais, medicinais e ritualísticas, cultivo orgânico de hortaliças, plantas alimentícias não convencionais (PANC), compostagem, vermicompostagem, biodigestor, estufa e uma área de produção sustentável integrada (PSI). Nesse sistema foi estabelecido um protocolo de multiplicação por alporquia para a matriz *P. aduncum*. Devido à limitação de espaço para cultivo, dois ramos saudáveis com diâmetro adequado foram selecionados para o processo de alporquia, seguindo as orientações de Ariff e col. (2021). Durante um período de 11 meses foram realizadas medições mensais para coletar dados sobre os indivíduos plantados (1ª geração), incluindo altura registrada com o uso de uma fita métrica, observação da cor das folhas, identificação de inflorescências e frutos.

Colheita, extração e análise da composição química dos óleos essenciais

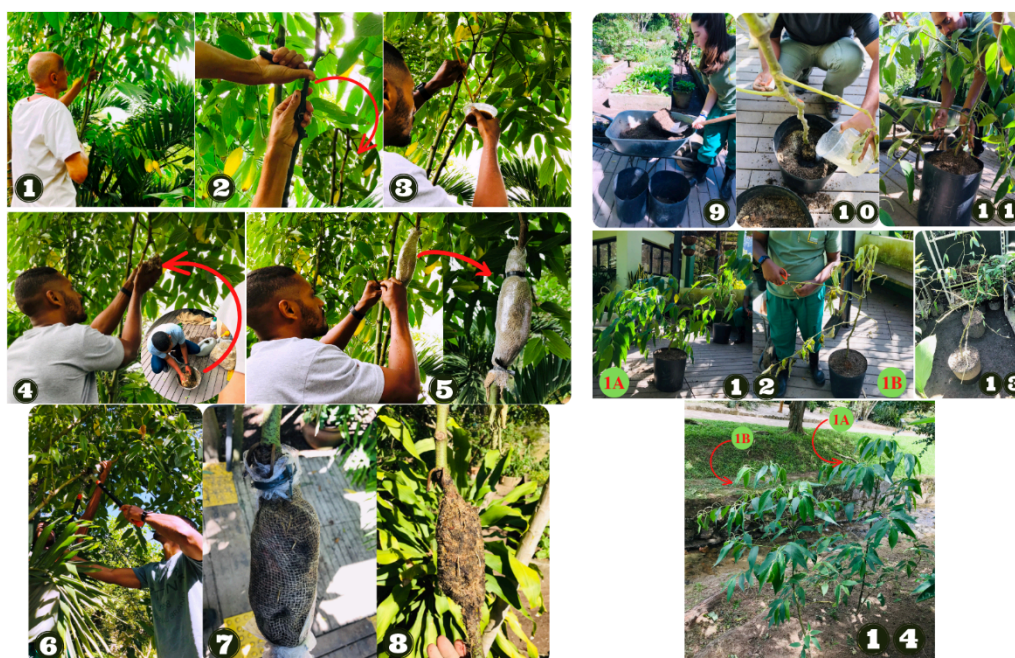
Para obter o perfil químico da matriz de *P. aduncum* e sua 1ª geração (dois indivíduos), foram colhidas 100 g de folhas frescas em novembro de 2022, às 9h. As folhas foram submetidas à extração por hidrodestilação usando um aparelho tipo Clevenger modificado, conforme descrito por Wasicky (1963), para obter os OEs. As folhas frescas foram pesadas, cortadas manualmente e imersas em 500 mL de água destilada. Após 2 h de extração, os OEs foram pesados para cálculo dos rendimentos, e armazenados, conforme descrito por Ramos e col. 2022. Os OEs foram diluídos em diclorometano (Merck, Brasil) na concentração de 1000 ppm e submetidos à cromatografia em fase gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM) para identificação e GC acoplada a detector de ionização de chama (CG-DIC) para quantificação das substâncias voláteis conforme descrito por Ramos e col. (2022). As análises de variância (ANOVA) foram realizadas com o programa Statistica, versão 12 (StartSoft Inc., Tulsa, EUA), para a comparação das médias obtidas nos resultados da análise da composição química dos OEs, conforme descrito por Pirali-Kheirabadi, Razzaghi-Abyaneh, Halajian (2009).



Resultados e Discussão

Protocolo de multiplicação clonal

Devido à preocupação com a fitossanidade e falta de espaço, realizaram-se apenas duas alporquias. Após cerca de 31 dias, as raízes adventícias começaram a se desenvolver. Em 23 de maio de 2022, as raízes visíveis na superfície dos substratos tinham entre 2 e 5 cm de comprimento e apresentavam vigor e sanidade. Os alporques foram, então, plantados em potes de 18 L com uma mistura de duas partes de argila, duas partes de matéria orgânica de origem vegetal e uma parte de areia, juntamente com 500 mL de hidrogel Forth® em cada pote para auxiliar na retenção de água. As mudas (indivíduos 1A e 1B) foram mantidas em quarentena em um viveiro por 81 dias para atingirem máximo vigor e desenvolvimento de seus órgãos vegetativos. Em 12 dias, observou-se o desenvolvimento de folhas



emergindo das gemas apicais de ambos os indivíduos, o surgimento de raízes superficiais no indivíduo 1B e o desenvolvimento de inflorescências no indivíduo 1A (Figura 1).

Figura 1: Principais etapas do protocolo de propagação pela técnica de alporquia da matriz *Piper aduncum* L.

Legenda: 1 = Seleção de caules com maior vigor; 2 = Anelamento da epiderme caulinar; 3 = Aplicação do enraizador no local lesionado; 4 e 5 = Aplicação de esfagno umedecido, rede de palha, filme de polipropileno no local lesionado e fixação das extremidades dos alporques; 6 = Desmame dos alporques da planta matriz; 7 e 8 = Avaliação das raízes dos alporques; 9 = Confecção do substrato para plantio dos alporques; 10 = Aplicação do hidrogel; 11 = Plantio dos alporques; 12 = Retira de folhas murchas das mudas; 13 = Quarentena das mudas em viveiro; 14 = Plantio das mudas em local definitivo.

Fonte: O próprio autor.



As mudas foram transplantadas em um local parcialmente sombreado, próximo da matriz, em 08 de agosto de 2022. O indivíduo 1A, que desenvolveu inflorescências, tinha 100 cm de altura, enquanto o indivíduo 1B, que não apresentava inflorescências, tinha 110 cm. Em julho de 2023, a muda 1A atingiu 200 cm de altura, enquanto a muda 1B atingiu 230 cm de altura, representando um crescimento médio de 9 cm e 10 cm por mês, respectivamente, ao longo de 11 meses. Portanto, a multiplicação por alporquia em indivíduos de *P. aduncum* foi bem-sucedida. A técnica de alporquia tem sido amplamente utilizada com sucesso em várias espécies vegetais, incluindo árvores frutíferas e medicinais como *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, *P. trunciflora* (O.Berg) Kausel, *P. jaboticaba* (Vell.) Kausel, *Moringa oleifera* Lam. (SASSO, CITADIN, DANNER, 2010; COLES, DU TOIT, 2020). Até agora, apenas um estudo abordou a alporquia em plantas do gênero *Piper* L. Os pesquisadores compararam diversos métodos de propagação para a multiplicação da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), incluindo estaquia, enxertia e mergulhia. Os resultados indicaram que a enxertia foi a mais eficaz (91,52%), enquanto as taxas dos outros métodos não foram mencionadas (SHETE *et al.*, 2022).

Perfil químico da matriz e 1ª geração de *Piper aduncum* L.

A análise química dos OEs obtidos da matriz e da primeira geração (espécimes 1A e 1B) de *P. aduncum* possibilitou a identificação de 12 substâncias, correspondendo a 92,42% (matriz), 93,49% (geração 1A) e 90,18% (geração 1B) do teor total identificado, respectivamente. Mesmo com a diversidade química qualitativa dos exemplares variando, a variedade de substâncias presentes nos OEs não diminuiu. Portanto, não houve perda de diversidade química da matriz para a 1ª geração nas duas análises realizadas. O dilapiol foi a substância química majoritária no OE de todos os indivíduos, representando 80,92% na matriz, 85,52% na 1ª geração (1A) e 81,96% na 1ª geração (1B) do teor total identificado. Além disso, observou-se que há variação significativa entre os teores dessa substância nos indivíduos da 1ª geração ($p < 0.01$). Houve uma ligeira redução nos rendimentos dos OEs para a matriz (0,78%), 1ª geração 1A (0,76%) e 1B (0,61%). Essa variação não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Conforme mencionado por Potzernheim e col. (2012), esses rendimentos se encontram dentro da faixa esperada para a produção comercial.

Conclusões

O protocolo de multiplicação por alporquia em *P. aduncum* foi bem-sucedido, resultando em mudas saudáveis e com crescimento satisfatório. As análises químicas dos OE não mostraram diversidade química nas mudas em comparação com a matriz, sendo o dilapiol a substância majoritária em todas as amostras. Esses resultados indicam pela primeira vez que a alporquia é uma estratégia eficaz para produzir mudas de *P. aduncum*.



Referências bibliográficas

Angiospermas in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB128482>>. Acesso em: 05 jul. 2023

ARIFF, F. F. M. *et al.* Genotype Screening and Propagation Techniques of Three Selected Medicinal Plant Species for Production of High-Quality Planting Material. **Horticulturae**, v. 7, n. 12, p. 570, 2021.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Planalto.gov.br. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/Constituicao.htm#art225%C2%A71viii. Acesso em: 05 jul. 2023.

COLES, Z. S.; DU TOIT, E. S. Open air-layering of *Moringa oleifera* utilizing seedling plug containers. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 225-228, 2020.

DASSOU, A. G. *et al.* Ethnoapicultural investigation to improve conservation status of threatened melliferous agroforestry species with high medicinal and food values in Benin. **Agroforestry Systems**, v. 94, p. 539-553, 2020.

DUROFIL, A. *et al.* *Piper aduncum* essential oil: a promising insecticide, acaricide and antiparasitic. A review. **Parasite**, v. 28, 2021.

GUIMARÃES, E. F. *et al.* **Piperaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB190>>. Acesso em: 05 jul. 2023.

MACEDO, AL. *et al.* An Overview of Neolignans of the Genus *Piper* L.: Isolation Methods and Biological Activities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 693-720, 2017.

MARQUES, M. *et al.* The Atlantic Forest: an introduction to the megadiverse forest of South America. In: **The Atlantic Forest**. Springer, Cham, 2021. p. 3-23.

MONZOTE, SCULL, R., COS, P., SETZER, W. N. Essential oil from *Piper aduncum*: Chemical analysis, antimicrobial assessment, and literature review. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 49, 2017.

NOR, F. M. A.; SYUKRI, Y. Medicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Properties of *Piper aduncum* L. **Sains Malaysiana**, v. 49, n. 8, p. 1829-1851, 2020.

PEREIRA, R. *et al.* Produção de pimenta-longa (*Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C. DC.) no Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, ISSN 1679-6535; Fortaleza, CE, dez. 2012.



PIRALI-KHEIRABADI, K.; RAZZAGHI-ABYANEH, M.; HALAJIAN, A. Acaricidal effect of *Pelargonium roseum* and *Eucalyptus globulus* essential oils against adult stage of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* in vitro. **Veterinary parasitology**, v. 162, n. 3-4, p. 346-349, 2009.

POTZERNHEIM, M. C. L. *et al.* Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 25-31, 2012.

PUROHIT, S. *et al.* Propagation through air layering in *Zanthoxylum armatum* DC: an endangered medicinal plant in the Himalayan region. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 86, n. 3, p. 607-610, 2016.

RAMOS, C. S. *et al.* Use of hydrodistillation to obtain and fractionate essential oils simultaneously. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 17, p. 2179-3425, 2022.

RAPOSO, A. *et al.* Protocolo de micropropagação para as espécies *Piper hispidinervum* e *P. aduncum*. **Embrapa Acre Circular Técnica (INFOTECA-E)**, ISSN 0100-9915; Rio Branco, Acre, set., 2012.

SANTOS, P. Z. F; CROUZEILLES, R; SANSEVERO, J. B. B. Can agroforestry systems enhance biodiversity and ecosystem service provision in agricultural landscapes? A meta-analysis for the Brazilian Atlantic Forest. **Forest ecology and management**, v. 433, p. 140-145, 2019.

SASSO, S. A. Z; CITADIN, I; DANNER, M A. Propagação de jabuticabeira por enxertia e alporquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 571-576, 2010.

SHETE, S. S. *et al.* Comparative performance of different methods of propagation for multiplication of bush pepper (*Piper nigrum* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 11, n. 3, p. 382-385, 2022.

WASICKY R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica** v. 1, n. 1, p. 77-81, 1963.