



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

INAIARA CASAPULA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE 7 ESPÉCIES DE *Piper* (PIPERACEAE), ISOLAMENTO DE
CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO
SAFROL E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE DOS FITOPATÓGENOS
Botrytis cinerea DO MORANGO E *Colletotrichum* sp. DO PIMENTÃO

CURITIBA - PARANÁ
JUNHO 2023

INAIARA CASAPULA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE 7 ESPÉCIES DE *Piper* (PIPERACEAE), ISOLAMENTO
DE CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL
DO SAFROL E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE DOS
FITOPATÓGENOS *Botrytis cinerea* DO MORANGO E *Colletotrichum* sp.
DO PIMENTÃO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para à
obtenção do grau de Doutora em
Química, Sub-Área de Química
Orgânica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz
Helena Lameiro de Noronha Sales
Maia.

Coorientador: Prof. Dr. Henrique da
Silva Silveira Duarte

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Casapula, Inaiara

Caracterização química dos constituintes dos óleos essenciais de 7 espécies de *Piper* (piperaceae), isolamento de constituintes majoritários e modificação estrutural do safrol e suas aplicações no controle dos fitopatógenos *Botrytis cinerea* do morango e *Colletotrichum sp.* do pimentão. / Inaiara Casapula. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia.

Coorientador: Prof. Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte

1. Óleos essenciais. 2. Antifúngicos. I. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. II. Duarte, Henrique da Silva Silveira. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001018026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **INAIARA CASAPULA** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE 7 ESPÉCIES DE *Piper* (PIPERACEAE), ISOLAMENTO DE CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS E MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO SAFROL E SUAS APLICAÇÕES NO CONTROLE DOS FITOPATÓGENOS *Botrytis cinerea* DO MORANGO E *Colletotrichum* sp. DO PIMENTÃO**, sob orientação da Profa. Dra. BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Junho de 2023.

Assinatura Eletrônica

30/06/2023 18:55:21.0

BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/07/2023 09:57:54.0

LUIZ EVERSON DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/06/2023 23:06:20.0

KAHLIL SCHWANKA SALOME

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/07/2023 11:33:56.0

BRÁS HELENO DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

03/07/2023 16:18:50.0

SIRLEI DIAS TEIXEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ - CAMPUS PATO BRANCO)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpqquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 295462

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 295462

RESUMO

A busca por novas moléculas bioativas no controle de fitopatógenos vem crescendo nos últimos anos. Isso se deve ao fato de que alguns alimentos como o pimentão e o morango apresentarem contaminação de defensivos agrícolas principalmente na pós-colheita. Isso traz um alerta quanto à preocupação com a segurança alimentar. Por isso, novas fontes de origem natural têm sido estudadas para uso como defensivos agrícolas. Espécies como morango (*Fragaria x ananassa* Duch) e pimentão (*Capsicum annuum* L.) são acometidas por diversas doenças em todos os estágios de cultivo. Algumas delas são causadas por fitopatógenos e, entre estes, tem-se o *Botrytis cinerea*, causador do mofo cinzento no morango, e o *Colletotrichum* sp., causador da antracnose no pimentão. Esses fitopatógenos causam muitas perdas no cultivo dessas espécies e principalmente nos frutos durante a pós-colheita. Estudos com os óleos essenciais de *Piper* têm demonstrado que estes possuem propriedades antifúngicas, podendo ser uma alternativa para o controle desses fitopatógenos. No presente trabalho foi analisada a composição química dos óleos essenciais de 7 espécies de *Piper*, sendo *Piper aduncum*, *Piper crassinervium*, *Piper fuliginum*, *Piper gaudichaudianum*, *Piper lhotzkianum*, *Piper malacophyllum* e *Piper tuberculatum*. Avaliou-se a sazonalidade dos OE, pela Análise de Componentes Principais (ACP, do inglês Principal Compounds Analysis- PCA); realizou-se o isolamento de majoritários como miristicina e dilapiol, além de derivatização com o safrol e a atividade de inibição frente aos fitopatógenos *B. cinerea* e *Colletotrichum* sp. foram avaliadas, sendo determinados a Concentração Mínima Inibitória (CIM), a inibição de crescimento micelial por contato e por volatilização. Como resultados foram observados que o OE de *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum*, com uma CIM de 60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente, além de se observado o método de ação dos OEs se ocorrem por volatilização ou por contato. Para os compostos isolados e produtos de reação do safrol, tem-se como resultados que a miristicina tem uma CIM de 40 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o safrol, epóxido safrol e o isosafrol apresentaram uma CIM de 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados mostram o potencial destes OEs como promissores biofungicidas no controle do *B. cinerea*. Para o *Colletotrichum* sp., o resultado obtido foi para o OE de *P. aduncum* com uma CIM de 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$, e o isosafrol com uma CIM 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o epóxido safrol com 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$, mostrando que a mudança na estrutura do composto favorece a atividade biológica.

Palavras-chave: Óleos essenciais; *Piper*; *Botrytis cinerea*; *Colletotrichum* sp.; Safrol; atividade antifúngica.

ABSTRACT

The search for new bioactive molecules in controlling phytopathogens has been increasing in recent years. This is because some foods, such as bell peppers and strawberries, exhibit contamination from agricultural pesticides, primarily post-harvest. This raises an alert about concerns for food safety. Therefore, new natural sources have been studied for use as agricultural pesticides. Species like strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) and bell pepper (*Capsicum annuum* L.) are afflicted by various diseases at all stages of cultivation. Some of these are caused by phytopathogens, among which are *Botrytis cinerea*, the cause of gray mold in strawberries, and *Colletotrichum* sp., responsible for anthracnose in bell peppers. These phytopathogens cause significant losses in the cultivation of these species, especially in the fruits during post-harvest. Studies with essential oils of Piper have shown that they possess antifungal properties and could be an alternative for controlling these phytopathogens. In the present study, the chemical composition of essential oils from 7 Piper species was analyzed, including *Piper aduncum*, *Piper crassinervium*, *Piper fuligineum*, *Piper gaudichaudianum*, *Piper lhotzkianum*, *Piper malacophyllum*, and *Piper tuberculatum*. The seasonality of the essential oils was evaluated through Principal Compounds Analysis (PCA); isolation of major components such as myristicin and dillapiol was carried out, as well as derivatization with safrole, and the inhibitory activity against the phytopathogens *B. cinerea* and *Colletotrichum* sp. were assessed, determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), mycelial growth inhibition by contact, and volatilization. The results observed that the essential oil of *P. aduncum* and *P. gaudichaudianum*, with an MIC of 60 μ L mL⁻¹ and 20 μ L mL⁻¹, respectively, as well as the method of action of the essential oils occurring through volatilization or contact. For the isolated compounds and reaction products of safrole, it was found that myristicin has an MIC of 40 μ L mL⁻¹, safrole, safrole epoxide, and isosafrole showed an MIC of 200 μ L mL⁻¹, 100 μ L mL⁻¹, and 200 μ L mL⁻¹, respectively. These results demonstrate the potential of these essential oils as promising biofungicides in controlling *B. cinerea*. For *Colletotrichum* sp., the result obtained was for the essential oil of *P. aduncum* with an MIC of 200 μ L mL⁻¹, and isosafrole with an MIC of 200 μ L mL⁻¹, safrole epoxide with 250 μ L mL⁻¹, showing that changes in the structure of the compound favor biological activity.

Keywords: Essential oils; *Piper*; *Botrytis cinerea*; *Colletotrichum* sp.; Safrole, Antifungal effect.

Dedico este trabalho à minha família, em especial a minha Mãe e meu Pai, que
sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

- A Jeová Deus pela vida e por me dar coragem e força para completar essa jornada.

- Aos meus pais: Cleuma de Carvalho Casapula e Paulo Roberto Casapula, pelo amor e apoio incondicional, incentivo, compreensão e auxílio na busca da realização deste sonho.

- Aos meus irmãos e cunhadas: André Luiz Casapula, Daiglis R. O. L. Casapula, Lucas Carvalho Casapula e Rayanne T. S. Casapaula; e aos meus sobrinhos e amores da minha vida André Augusto Leite Casapula, Luiz Henrique Leite Casapula e Hadassa Tromel Casapula.

A professora Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos, pelas oportunidades, paciência, amizade e por toda confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

- Ao Professor Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte, pela coorientação e discussão dos testes biológicos, assim como todo suporte e estrutura para a realização dos testes no LEMID.

- Ao professor Dr. Diones Krinski da UNEMAT, pela coleta do material vegetal.

- Ao Professor Dr. Cícero Deschamps, por ceder a estrutura do Laboratório de Ecofisiologia da UFPR, para extração dos óleos.

- Aos Técnico de Laboratório Dr. Roger Raupp Cipriano pelas ajudas com as extrações dos óleos essenciais.

- A Professora Dra. Louise Larrisa May De Mio, pela ajuda inicial nos testes biológicos, assim como todo suporte e estrutura para a realização dos testes no LEMID.

- A McS Juliana Maia, Bsc Mayara C. C. Silva e Msc Eliseu J. da Silva do LEMID, pelas ajudas com o fitopatógeno isolado *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp., para os testes biológicos.

- Aos professores: Dr. Francisco de Assis Marques e Dr. Brás Heleno de Oliveira, pela disponibilidade e por todas as contribuições neste trabalho, realizadas através da banca de qualificação, visando à melhoria dele.

- Aos professores membros da banca Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira, Prof. Dr. Luiz Everson da Silva, Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira e Prof. Dr. Kahlil S. Salomé pela disponibilidade em contribuir e avaliar este trabalho.
- Ao Pós doutorando Dr. Georgi Dal Pont do Grupo Integrado de Aquicultura da Universidade Federal do Paraná (GIA- UFPR), pela ajuda com as leituras de placa.
- Aos Técnicos que me ajudam muito com o manuseio de equipamentos, análises e com procedimentos em relação ao PPGQ em especial ao Thiago José dos Santos, Marcelino Câmara e Fernanda G. Dias, e do LEMID Izabel e Simone.
- Aos meus amigos, que fiz durante a graduação, o mestrado e da vida que sempre me deram apoio em especial a Andressa Vaz, Bruna Garcia, Caroline M. Monaro, Gisa Ap. Dacoregio, Luciane J. Palmiei, Jefferson M. da Silva, João Pedro, Kátia, Lucas Diovani, Luiz Fernando A. Batista, Mara C. Dalmolin, Meira Balestros, Rafael Dolato, Renan Reisdörfer Schorr, Thatiane Kuczera, Vinicius Annies.
- Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química e do Departamento de Química, da época de IC, mestrado e doutorado, em especial a Elaine Fernanda dos Santos, Rafael Sari, Aurea P. Ferriani, Sara S. L. Graf, Carmem Jost, Allan Rodrigues, Ana Paula Palaro Klein, Ana Paula Preidum, Carlos Eduardo M. Piomonte, Adson Soares da Silva, Edione F. Canzi, Emmanuele Meneguetti, Rebeca Gabriel de Camargo, Maria Helena Verdan, Regiane L. B. Strapasson, Juliana Mari Jo, Anderson R. dos Santos, Angelita Nepel, Kahlil S. Salomé, Cassiano Pires e Nelissa P. Vaz.
- Aos colegas do LEMID em especial a Juliana N. Maia, Mayara C. C. Silva, Eliseu J. da Silva Débora Petermann, Thiago A. Carraro, Rubens C. Zimmermann, Gabriel Koch, Elizeu J. da Silva e Camila L. Zela.
- Aos meus amigos e colegas de trabalho do ILAMIR, Franciele Oliveira Czervinski, Diego Portela dos Fernandes, Guilherme Fedalto, Flavia Afonso, Joicy Micheletto, Ana Maria Guerreiro Antunes, Shirley Santos Cezar, Bianca Luciano, Leandro Keiji Maurer Ozahata, Estela, Rosemari, Ivan Bino, Flavio Perraro, Daniel Paredes, Leonardo Cury, Anelize Baniuk Rupepleger, Tatiana Stepanenko, Guido Alonso, Carolina Henríquez, Larissa Rocha dos Santos, Adelita Carolina Rodrigues, Luiz Henrique Manchini, Paulo Quezada, Jéssica Thais de Lima.

- A todos os professores que auxiliaram no aumento do meu conhecimento e que me fizeram crescer como pessoa e pesquisadora.
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado- Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, pela infraestrutura e oportunidade para a realização desta pesquisa.
- A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADO!

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas.

Pessoas transformam o mundo.”.

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 BIOSÍNTESE DE TERPENOS	4
FIGURA 2 EXEMPLOS DE MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS	5
FIGURA 3 PRINCIPAIS CLASSES DOS SESQUITERPENOS	5
FIGURA 4 ROTA BIOSINTÉTICA DOS ARILPROPANOIDES	6
FIGURA 5 EXEMPLOS DE MORANGOS COM MOFO CINZENTO	13
FIGURA 6 EXEMPLOS DE PIMENTÕES COM ANTRACNOSE	14
FIGURA 7 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO SAFROL	23
FIGURA 8 - REAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO DO SAFROL	24
FIGURA 9 - REAÇÃO DE EPÓXIDAÇÃO DO SAFROL	25
FIGURA 10. ESTRUTURAS DOS FUNGICIDAS IPRODIONA E PROPINEB. 30	
FIGURA 11 CROMATOGRAMA DE <i>P. aduncum</i> NA ESTAÇÃO do VERÃO. .	32
FIGURA 12 CROMATOGRAMA DE <i>P. aduncum</i> NA ESTAÇÃO do VERÃO ÁREA DOS PICOS AMPLIADA.....	32
FIGURA 13 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM OEs DE FOLHAS DE <i>Piper aduncum</i>	32
FIGURA 14 GRÁFICO DOS OEs DE <i>P. aduncum</i> – CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.	35
FIGURA 15 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE <i>P. aduncum</i> . (VERÃO=1, OUTONO=2 E INVERNO=3).....	36
FIGURA 16 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE <i>P. aduncum</i>	37
FIGURA 17 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>P. aduncum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.....	37
FIGURA 18 CROMATOGRAMA DE <i>P. crassinervium</i> NA ESTAÇÃO do INVERNO.....	38
FIGURA 19 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NOS OEs DAS FOLHAS DE <i>P. crassinervium</i>	38
FIGURA 20 GRÁFICO DOS OEs DE <i>P. crassinervium</i> – CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO	40
FIGURA 21 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE <i>P.</i> <i>crassinervium</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4).....	41

FIGURA 22 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE <i>P. crassinervium</i>	41
FIGURA 23 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>P. crassinervium</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL	42
FIGURA 24 CROMATOGRAMA DE <i>P. fuligineum</i> NA ESTAÇÃO do INVERNO.	43
FIGURA 25 ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO MAJORITÁRIO IDENTIFICADO NOS OEs DE <i>P. fuligineum</i>	46
FIGURA 26 GRÁFICO DOS OEs DE <i>P. fuligineum</i> – CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.	46
FIGURA 27 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE <i>P. fuligineum</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4).....	47
FIGURA 28 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE <i>P. fuligineum</i>	48
FIGURA 29 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>P. fuligineum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL	49
FIGURA 30 CROMATOGRAMA DO OE DE <i>P. gaudichaudianum</i> NA ESTAÇÃO do INVERNO.	49
FIGURA 31 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>Piper gaudichaudianum</i>	50
FIGURA 32 GRÁFICO DOS OEs DE <i>P. gaudichaudianum</i> – CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.	52
FIGURA 33 . GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE <i>P.</i> <i>gaudichaudianum</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)	53
FIGURA 34 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE <i>P. gaudichaudianum</i>	53
FIGURA 35 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>P. gaudichaudianum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL	54
FIGURA 36 CROMATOGRAMA DO OE DE <i>P. lhotzkyanum</i> NA ESTAÇÃO do INVERNO.....	55
FIGURA 37 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Piper lhotzkyanum</i>	55

FIGURA 38 GRÁFICO DOS OEs DE <i>P. lhotzkyanum</i> - CLASSE DE COMPOSTOS PORESTAÇÃO POR ESTAÇÃO.	57
FIGURA 39 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE <i>P. lhotzkyanum</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4).....	58
FIGURA 40 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE <i>P. lhotzkyanumum</i>	58
FIGURA 41 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>P. lhotzkyanum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL	59
FIGURA 42 CROMATOGRAMA DE <i>P. malacophyllum</i> NA ESTAÇÃO do INVERNO.....	60
FIGURA 43 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Piper malacophyllum</i>	62
FIGURA 44 GRÁFICO DOS OEs DE <i>P. malacophyllum</i> - CLASSE DE COMPOSTOS PORESTAÇÃO POR ESTAÇÃO.	63
FIGURA 45 GRÁFICO DE SCORES DOS OES EXTRAÍDOS DE <i>P. malacophyllum</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4) ...	64
FIGURA 46 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE <i>P. malacophyllum</i>	64
FIGURA 47 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>P. malacophyllum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.....	65
FIGURA 48 CROMATOGRAMA DE <i>P. tuberculatum</i> NA ESTAÇÃO VERÃO.	66
FIGURA 49 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Piper tuberculatum</i>	67
FIGURA 50 GRÁFICO DOS OEs DE <i>P. tuberculatum</i> - CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO POR ESTAÇÃO	67
FIGURA 51 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE <i>P. tuberculatum</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)	69
FIGURA 52 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE <i>P. tuberculatum</i>	70
FIGURA 53 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE <i>P. tuberculatum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.....	71
FIGURA 54 CROMATOGRAMA DA PAV-FR3	72

FIGURA 55 ESPECTRO DE MASSAS DA PGV-FR3	72
FIGURA 56 CROMATOGRAMA DA PGP-FR2	73
FIGURA 57 ESPECTRO DE MASSAS DA PCV-FR2	73
FIGURA 58 ESTRUTURA DO DIIDROSAFROL	74
FIGURA 59 CROMATOGRAMA DO DIIDROSAFROL	74
FIGURA 60 ESPECTRO DE MASSAS DO DIIDROSAFROL	75
FIGURA 61 PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS DO DIIDROSAFROL COM A PERDA DE M/Z 29 DALTONS.....	75
FIGURA 62 CROMATOGRAMA DO ISOSAF	76
FIGURA 63 ESPECTRO DE MASSAS DO SAFROL	77
FIGURA 64 ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 1	77
FIGURA 65 ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 2	77
FIGURA 66 ESPECTRO DE RMN ¹ H EM 200MHz DO ISOSAFROL	78
FIGURA 67 ESPECTRO DE ¹ H AMPLIADO EM 5,70 ppm.....	79
FIGURA 68 ESTRUTURAS DO ISOSAFROL E DO SAFROL	80
FIGURA 69 CROMATOGRAMA DO EPSAF	81
FIGURA 70 ESPECTRO DE MASSAS DO EPSAF	81
FIGURA 71 ESPECTRO DE RMN DE ¹ H EM 400 MHz.....	82
FIGURA 72 ESPECTRO DE RMN DE ¹ H EM 400 MHZ DOS H1a, H1b E H3b.	83
FIGURA 73 ESPECTRO DE RMN DE ¹ H EM 400 MHZ DO H ₂	84
FIGURA 74 ESPECTRO EM RNM ¹³ C EM 200MHz	85
FIGURA 75 MAPA DE CORRELAÇÃO COSY ¹ H - ¹³ C.....	86
FIGURA 76 MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹ H AMPLIADO NA REGIÃO DE 2,88 A 2,70 ppm	86
FIGURA 77 MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹ H AMPLIADO NA REGIÃO DE 6,80 A 6,50 ppm	87
FIGURA 78 MAPA DE CORRELAÇÃO DO HSQC-ED (¹ H- ¹³ C) DO EPÓXIDO.	88
FIGURA 79 MAPA DE CORRELAÇÃO DO HSQC-ED (¹ H- ¹³ C) DO EPÓXIDO AMPLIADA.	88
FIGURA 80 MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC DE ¹ H- ¹³ C EM 400 MHz AMPLIADO.....	89
FIGURA 81 ESTRUTURA DO EPÓXIDO SAFROL	89

FIGURA 82 – ESTRUTURA DOS MAJORITÁRIOS DO OE DE <i>P. gaudichaudianum</i> E <i>P. aduncum</i> DA ESTAÇÃO DO VERÃO.....	91
FIGURA 83 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR CONTATO DOS OEs DE <i>Piper</i> NA CONCENTRAÇÃO DE 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$	127
FIGURA 84 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR CONTATO DOS OEs DE <i>Piper</i> NA CONCENTRAÇÃO DE 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$	127
FIGURA 85 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR CONTATO DOS OEs DE <i>Piper</i> NA CONCENTRAÇÃO DE 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$	128
FIGURA 86 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR CONTATO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> E DO ISOSAFROL E EPÓXIDO SAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$.	128
FIGURA 87 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR CONTATO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> E DO ISOSAFROL E EPÓXIDO SAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$.	129
FIGURA 88 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR CONTATO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> E DO ISOSAFROL E EPÓXIDO SAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$	129
FIGURA 89 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR VOLATILIZAÇÃO DOS OEs DE <i>Piper</i> NA CONCENTRAÇÃO DE 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$	130
FIGURA 90 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR VOLATILIZAÇÃO DOS OEs DE <i>Piper</i> NA CONCENTRAÇÃO DE 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$	130
FIGURA 91 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> POR VOLATILIZAÇÃO DOS OEs DE <i>Piper</i> NA CONCENTRAÇÃO DE 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$	131
FIGURA 92 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> . POR VOLATILIZAÇÃO DOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> , EPÓXIDO SAFROL E ISOSAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$	131
FIGURA 93 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> . POR VOLATILIZAÇÃO DOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> , EPÓXIDO SAFROL E ISOSAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$	132

FIGURA 94 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> . POR VOLATILIZAÇÃO DOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> , EPÓXIDO SAFROL E ISOSAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$	132
---	-----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 QUANTIDADES EM μL POR POÇO DA PLACA DE MICRODILUIÇÃO	28
TABELA 2 DIAGRAMA DAS DISTRIBUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES NAS PLACAS DE MICRODILUIÇÃO (CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{L mL}^{-1}$)	28
TABELA 3 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OEs DE <i>Piper aduncum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	33
TABELA 4 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OEs DE FOLHAS DE <i>Piper crassinervium</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	39
TABELA 5 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OEs DE <i>Piper fuligineum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	44
TABELA 6 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO OE DE <i>Piper gaudichaudianum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	51
TABELA 7 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO OE DE <i>Piper lhotzkyanum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	56
TABELA 8 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OEs DE <i>Piper malacophyllum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	61
TABELA 9 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OEs DE <i>Piper tuberculatum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	68
TABELA 10 RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO DO OE DE <i>P. gaudichaudianum</i>	71
TABELA 11 RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO DO OE DE <i>P. gaudichaudianum</i>	73
TABELA 12 DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^1H EM 200MHz DO ISOSAFROL	78

TABELA 13 DADOS DO RMN ^{13}C EM 50MHz DO ISOSAFROL OBTIDO NA REAÇÃO E DO SAFROL COM DADOS OBTIDOS DA LITERATURA EM 75 MHz.....	80
TABELA 14 DADOS DO RMN ^1H EM 400 MHz DO EPSAF COM DADOS OBTIDOS DA LITERATURA EM 400 MHz	82
TABELA 15 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO NA PRIMEIRA HORA E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>B. cinerea</i>); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)].	94
TABELA 16 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DOS COMPOSTOS ISOLADOS E DE ASSOCIAÇÃO DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>B. cinerea</i>); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)	94
TABELA 17 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DO SAFROL E SEUS PRODUTOS DE REAÇÃO DOS ISOLADOS E DE ASSOCIAÇÃO DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>B. cinerea</i>); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)]	95
TABELA 18 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO COM CONTROLE DE FUNGICIDAS (CONTROLE POSITIVO) DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>B. cinerea</i>); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)].	95
TABELA 19 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DOS OEs DE <i>Piper</i> DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Colletotrichum</i> sp); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)]	96
TABELA 20 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DO SAFROL E SEUS PRODUTOS DE REAÇÃO DOS ISOLADOS E DE ASSOCIAÇÃO, DE MISTURA DE ARIL PROPANOIDES, DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Colletotrichum</i> sp); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)].....	96

TABELA 21 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO COM CONTROLE DE FUNGICIDAS (CONTROLE POSITIVO) DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE <i>Colletotrichum sp</i>); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)].	97
TABELA 22 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - <i>B. cinerea</i> (MOFO CINZENTO) NOS OEs DE <i>Piper</i> .	101
TABELA 23 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - <i>B. cinerea</i> (MOFO CINZENTO) NOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> E DO SAFROL E PRODUTOS DE REAÇÃO	101
TABELA 24 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR VOLATILIZAÇÃO - <i>B. cinerea</i> (MOFO CINZENTO) NOS OEs DE <i>Piper</i>	102
TABELA 25 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR VOLATILIZAÇÃO - <i>B. cinerea</i> (MOFO CINZENTO) NOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> E DO SAFROL E PRODUTOS DE REAÇÃO.	102
TABELA 26 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - <i>Colletotrichum sp.</i> (ANTRACNOSE) NOS OEs DE <i>Piper</i> .	103
TABELA 27 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - <i>Colletotrichum sp.</i> (ANTRACNOSE) NOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OEs DE <i>Piper</i> E DO SAFROL E PRODUTOS DE REAÇÃO	103
TABELA 28 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL VOLATILIZAÇÃO - <i>Colletotrichum sp.</i> (ANTRACNOSE) NOS OEs DE <i>Piper</i> .	104
TABELA 29 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL VOLATILIZAÇÃO - <i>Colletotrichum sp.</i> (ANTRACNOSE) DO SAFROL E ISOSAFROL	104
TABELA 30 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE <i>P. aduncum</i>	120
TABELA 31 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE <i>P. crassinervium</i>	121
TABELA 32 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE <i>P. fuligineum</i>	121
TABELA 33 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE <i>P. gaudichaudianum</i>	123
TABELA 34 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE <i>P. lhotzknianum</i>	123

TABELA 35 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE <i>P. malacophyllum</i>	124
TABELA 36 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE <i>P. tuberculatum</i>	125

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 ESTUDOS RECENTES DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS OEs DAS 7 ESPÉCIES DE <i>PIPER</i> ESTUDADAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	9
QUADRO 2 LISTA DE ESPÉCIES DE <i>Piper</i> E SUA LOCALIZAÇÃO DE COLETA.....	19
QUADRO 3 MATRIZES GERADAS PARA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS OEs DE <i>Piper</i>	22
QUADRO 4 RENDIMENTO DOS OEs DE <i>Piper</i> EXPRESSOS EM (% m/m) ..	31

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

IA	-	Índice Aritmético
<i>B. cinerea</i>	-	<i>Botrytis cinerea</i>
BD	-	Batata dextrose em caldo
BDA	-	Batata dextrose em ágar
CCDA	-	Cromatografia Camada Delgada Analítica
CCDP	-	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl_3	-	Clorofórmio deuterado
CG-EM	-	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
COSY	-	Correlação espectroscópica entre hidrogênios
d	-	Dupleto
dd	-	Duplo-dupleto
dddd	-	Duplo-duplo-duplo-dupleto
dq	-	Duplo-quarteto
DCM	-	Diclorometano
DMSO	-	Sulfóxido de dimetila
DO	-	Densidade óptica
DP	-	Desvio padrão
H	-	Hora
HEX	-	Hexano
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlação heteronuclear à múltiplas ligações)
HSQC -ED	-	Heteronuclear single quantum coherence -edit (Correlação heteronuclear a uma ligação- editado)
Hz	-	Hertz
<i>J</i>	-	Constante de acoplamento
<i>m</i>	-	multipleto
NIST	-	National Institute of Advance Science and Tecnology
OE	-	Óleo essencial
OE_s	-	Óleos Essenciais

PCA	-	Método estatístico de Análises de Componentes Principais
PC1	-	Primeira Componente Principal
PC2	-	Segunda Componente Principal
PC3	-	Terceira Componente Principal
PC's	-	Componentes principais
mL	-	Mililitro
μL	-	Microlitro
min.	-	Minuto
<i>P.</i>	-	<i>Piper</i>
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	-	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	-	Simpleto
TMS	-	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs).....	2
1.2	TERPENOS	3
1.3	ARILPROPANOIDES.....	5
1.4	FAMÍLIA PIPERACEAE	6
1.4.1	O GÊNERO <i>Piper</i>	7
1.5	ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Piper</i>	8
1.6	O CULTIVO DO MORANGO	12
1.7	FITOPATÓGENO <i>Botrytis cinerea</i>	13
1.8	O CULTIVO DO PIMENTÃO	13
1.9	O <i>Colletotrichum</i> sp. NO CULTIVO DO PIMENTÃO.....	14
1.10	CONTROLE DE FITOPATÓGENOS	15
1.11	OEs COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS	15
2.	JUSTIFICATIVA	17
3.	OBJETIVOS	17
3.1	GERAL.....	17
3.2	ESPECÍFICOS.....	18
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	18
4.2	SOLVENTES E REAGENTES.....	19
4.3	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	19
4.4	SECAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO	20
4.5	EXTRAÇÃO DO OE.....	20
4.6	ANÁLISE EM CG-EM	20
4.7	ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS.....	22
4.8	ISOLAMENTO DO DILAPIOL.....	22
4.9	ISOLAMENTO DA MIRISTICINA.....	23
4.10	REAÇÃO DE REDUÇÃO DO SAFROL	23
4.11	REAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO DO SAFROL.....	24
4.12	REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO DO SAFROL	24

4.13 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	25
4.14 TESTES in vitro DO FITOPATÓGENO <i>Botrytis cinerea</i> E <i>Colletotrichum</i> sp.....	26
4.14.1 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS	26
4.14.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	27
4.15 ANÁLISE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR CONTATO (CMC)..	29
4.16 ANÁLISE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR VOLATILIDADE (CMV)	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 RENDIMENTO DOS OEs.....	31
5.2 ANÁLISE DOS OEs DE <i>P. aduncum</i>	31
5.2.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE <i>P. aduncum</i>	35
5.3 ANÁLISE DOS OEs DE <i>P. crassinervium</i>	38
5.3.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE <i>P. crassinervium</i>	40
5.4 ANÁLISE DOS OEs DE <i>P. fuligineum</i>	43
5.4.1 ANÁLISE SAZONAL DOS OEs DE <i>P. fuligineum</i>	47
5.5 ANÁLISE DOS OEs DE <i>P. gaudichaudianum</i>	49
5.5.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE <i>P. gaudichaudianum</i>	52
5.6 ANÁLISE DOS OEs DE <i>P. lhotzkyanum</i>	54
4.6.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE <i>P. lhotzkyanum</i>	57
5.7 ANÁLISE DOS OEs DE <i>P. malacophyllum</i>	59
5.7.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE <i>P. malacophyllum</i>	63
5.8 ANÁLISE DOS OEs DE <i>P. tuberculatum</i>	65
5.8.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE <i>P. tuberculatum</i>	69
5.9 ISOLAMENTOS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS	71
5.9.1 ISOLAMENTO DO DILAPIOL	71
4.9.2 ISOLAMENTO DA MIRISTICINA	72
5.10 DERIVATIZAÇÕES DO SAFROL	74
5.10.1 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DO DIIDROSAFROL	74
5.10.2 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DO ISOSAFROL.....	76
5.10.3 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DO EPÓXIDO SAFROL	80
5.11 TESTES BIOLÓGICOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA PARA <i>B. cinerea</i>	90

5.12 TESTES BIOLÓGICOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA <i>Colletotrichum</i> sp.....	92
5.13 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE <i>Piper</i> FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR CONTATO PARA O FITOPATÓGENO <i>B. cinerea</i>	98
5.14 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE <i>Piper</i> FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR VOLATILIZAÇÃO PARA O FITOPATÓGENO <i>B.</i> <i>cinerea</i>	99
5.15 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE <i>Piper</i> FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR CONTATO PARA O FITOPATÓGENO <i>Colletotrichum</i> sp.	100
5.16 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE <i>Piper</i> , ISOLADOS E PRODUTOS DE REAÇÃO, FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR VOLATILIZAÇÃO PARA O FITOPATÓGENO <i>Colletotrichum</i> sp..	105
6. CONCLUSÕES	105
7. PERSPECTIVAS.....	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXO I – TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS DE APOIO.....	120

1. INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade, o homem se utiliza de plantas para a cura de doenças, no uso como inseticida e conservação de corpos, descobertas que ocorreram por acaso e que, ao longo do tempo estão sendo comprovadas pela ciência (FERNANDES JUNIOR; MACHADO, 2011).

Os produtos naturais podem fornecer uma gama de compostos ou modelos de moléculas que agem na proteção dos seres vivos. Estes compostos são biossintetizados pelos organismos vivos podendo ser obtidos de diferentes matrizes, como plantas, fungos, bactérias, animais e organismos de ambientes extremos (ABDELMOHSEN et al., 2017; LOPES et al., 2016; MOUSSAOIU & ALAOUI, 2016).

A pesquisa fitoquímica tem por finalidade a extração, purificação, isolamento e a elucidação estrutural das substâncias presentes nas plantas. A análise fitoquímica pode indicar o grupo de metabólitos secundários relevantes de determinada espécie, como também a classe específica de constituintes e as substâncias responsáveis por certa atividade biológica (FOGLIO et al, 2006).

No mercado mundial estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo a maior parte provenientes de plantas (CALIXTO, 2003). Newman e Cragg (2020), pesquisaram as novas drogas para tratamento anticâncer registradas, abrangendo um período de 40 anos, e concluíram que cerca de 17% são oriundas de produtos naturais e 22% são derivados de produtos naturais.

O Brasil possui um grande potencial a ser explorado na área de produtos naturais, principalmente no que se diz respeito aos organismos vegetais, devido aos seus 6 biomas distintos e sua grande biodiversidade. Para o grupo dos Angiospermas, no Brasil existem cerca de 6 mil espécies catalogadas, sendo que, 70% são espécies endêmicas (ZAPPI et al, 2015; BERLINCK et al. 2017).

Do mesmo modo, estudos fitoquímicos devem ser realizados a fim de conhecer a sua composição e os compostos responsáveis pelas propriedades biológicas evidenciadas em estudos, além de aprimorar técnicas de cultivo, seleção e melhoramento de plantas para a manutenção da qualidade, boa reprodutibilidade e constância de princípios ativos. Estas atitudes levariam ao

crescimento da produção e do uso das plantas medicinais e dos óleos essenciais (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; MORAIS, 2009).

1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS (OEs)

A International Standard Organization (ISO), conforme a norma ISO 9235:2013, define os óleos essenciais (OEs) como compostos aromáticos voláteis. Estes são produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água ou por prensagem dos pericarpos cítricos. Os OEs são substâncias voláteis lipofílicas, geralmente líquidas, de composição complexa. Eles possuem propriedades organolépticas e biológicas que correspondem à sua composição química. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Apresentam solubilidade limitada em água, suficiente para aromatizar soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos.

A química dos OEs geralmente é composta por monoterpenos, sesquiterpenos, arilpropanoides e compostos fenólicos. A literatura mostra que muitos destes compostos possuem atividades biológicas, muitas delas associadas a efeito repelente e antimicrobiano, podendo agir de forma isolada, com associação de compostos pelo efeito sinérgico (BORGES & AMORIM, 2020).

Os OEs estão muito presentes em fitoterápicos, perfumarias, cosméticos e nas indústrias agro alimentícias. São usados para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos e alimentos (ALI et al., 2015; BAGHERI; MAPNAP; SOLATI, 2014). Estima-se que cerca de 3000 OEs sejam conhecidos, dos quais aproximadamente trezentos são comercialmente importantes, destinados principalmente, para o mercado de fragrâncias (HENRIQUES, SIMÕES-PIRES e APEL, 2007; FRANZ, 2010).

Os OEs também podem ser utilizados como larvicidas, fungicidas, carrapaticidas, no controle de artrópodes, como antibacterianos tendo uma gama de aplicações biológicas conhecidas, principalmente para uso na etnofarmacologia (ERLAND et al. 2015; FILOMENO et al., 2020; PLANTA-RUEDA et al., 2018; RENKEMA et al. 2016; YAZGAN, 2020).

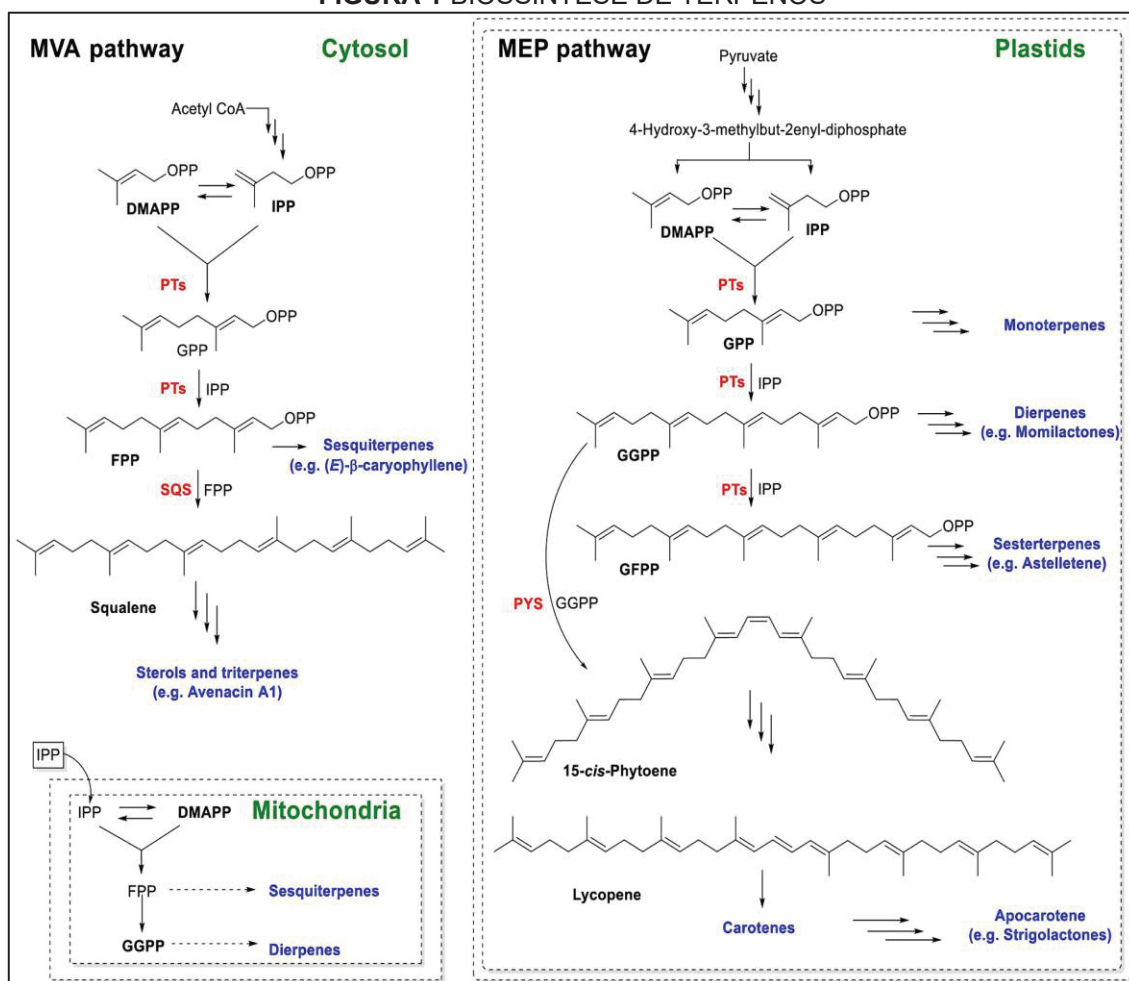
Karpiński (2020) em seu artigo de revisão sobre os OEs da família Lamiaceae, mostrou que, os OEs dessa família têm apresentado boa atividade antifúngica, como o OE de *Ocimum gratissimum* L. que apresentou uma Concentração inibitória mínima (CIM) de 62,5 µl/mL frente ao fungo *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* (MOHR et al., 2017). Isso mostra que OEs têm um potencial para estudos sobre sua ação fungicida.

1.2 TERPENOS

Terpenos formam o maior grupo de produtos naturais de origem vegetal, e contém a maior variedade de tipos estruturais. Apresentam diversas funções, dentre elas a proteção contra herbívoros, fungos, bactéria e plantas competidoras, além da atração de polinizadores. São formados pela fusão de unidades de cinco átomos de carbono e classificados de acordo com o número de unidades que possuem (BORGES & AMORIM, 2020; EVERT; EICHHORN, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2017).

A biossíntese dos terpenos acontece por dois caminhos: O caminho do mevalonato (MVA) no citoplasma das células e o caminho do metil eritritol (MEP) nos plastídios das células (NAGEGOWDA & GUPTA, 2020) (figura 1). Os precursores formados nestes caminhos são dois isômeros, o difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) que por sucessivas condensações formam os terpenos (figura 2) (DEWICK, 2009).

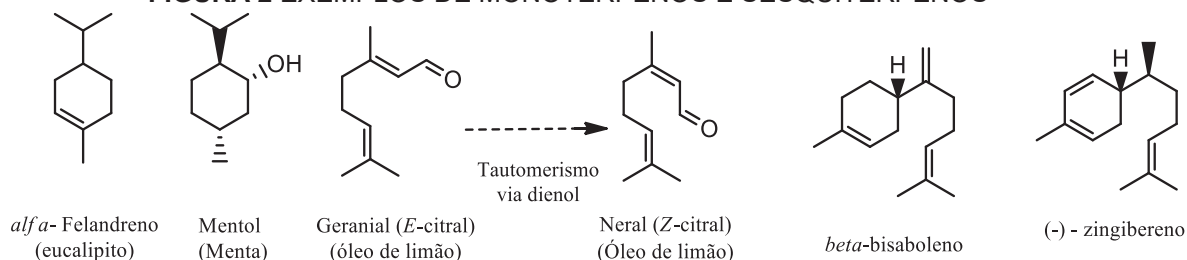
FIGURA 1 BIOCÍNTese DE TERPENOS



*Legenda: DMAPP – difosfato de dimetilalila; IPP – difosfato de isopentenila; GPP- difosfato de geranila; FPP – difosfato de farnesila; difosfato de geranilgeranila; GFPP- difosfato de geranil farnesil; PTs- prenil transferase; PYS- fitoeno sintase.

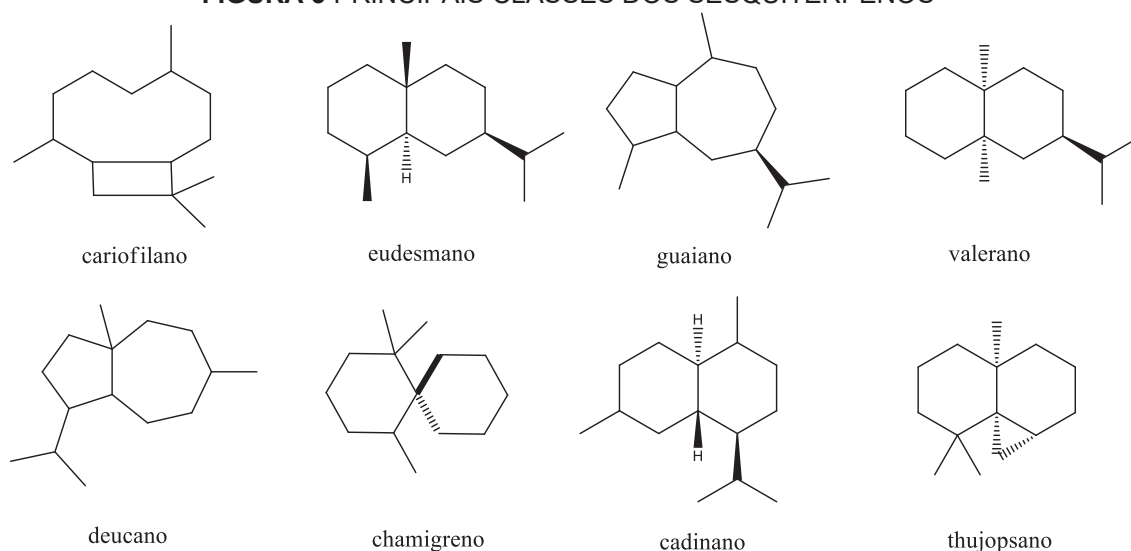
Fonte: HUANG & OSBOURN, 2019

Os monoterpenos são formados pela condensação do tipo “cabeça-cauda” de uma unidade de difosfato de dimetilalila (DMAPP) com uma unidade de difosfato de isopentenila (IPP) e os sesquiterpenos, uma condensação adicional com outra unidade de IPP. Como exemplo de monoterpenos encontrados em OEs têm-se o α-felandreno no eucalipto, o mentol na menta e o citral no limão, e sesquiterpenos como o (-) -β-bisaboleno e o (-) -zingibereno (Figura 2).

FIGURA 2 EXEMPLOS DE MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS

Fonte: DEWICK, 2009.

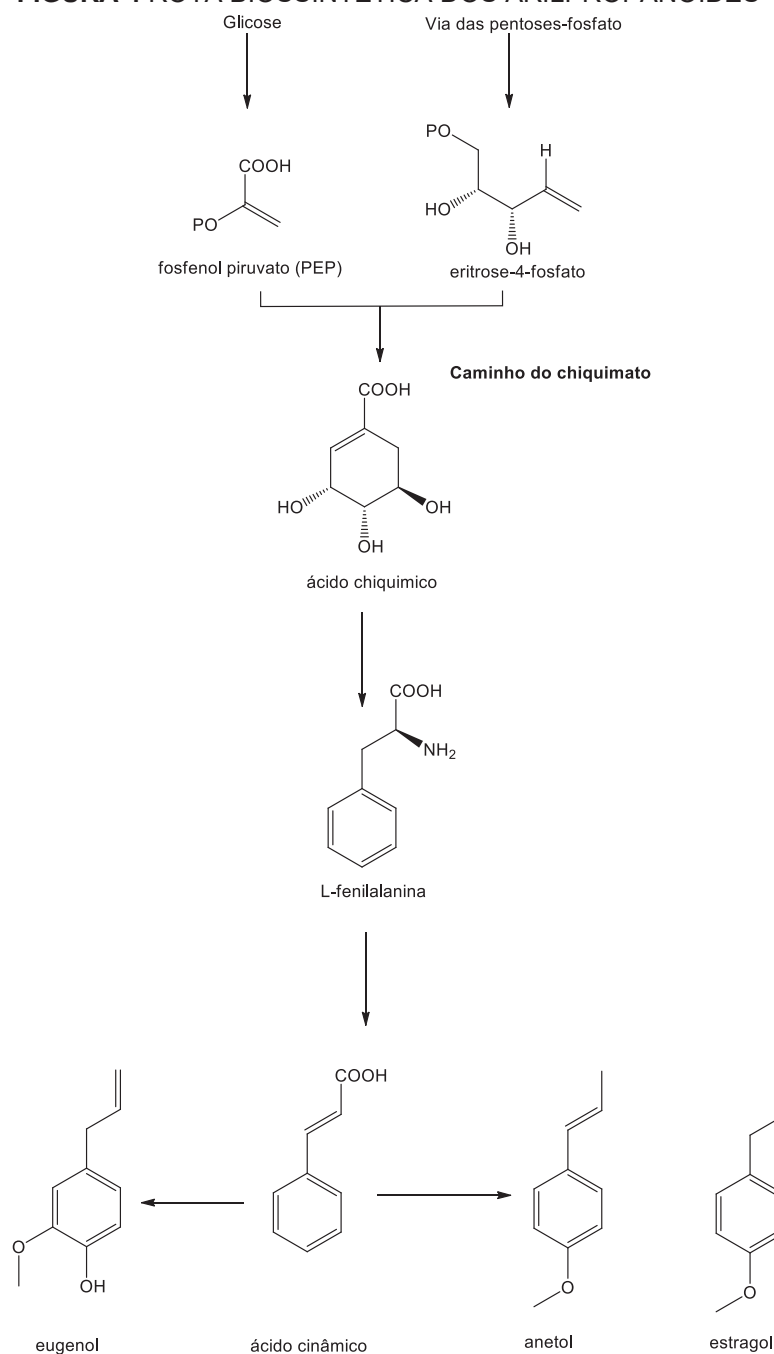
O estudo dos sesquiterpenos é muito mais complexo quando comparado aos monoterpenos, em função da maior variabilidade de núcleos básicos dessa classe (Figura 3).

FIGURA 3 PRINCIPAIS CLASSES DOS SESQUITERPENOS

Fonte: DEWICK, 2009.

1.3 ARILPROPANOIDES

Os arilpropanoides são uma grande classe de metabólitos secundários encontrados em plantas, são produzidos principalmente pela rota biossintética via ácido chiquímico, o qual é formado pela combinação do ácido fosfoenol pirúvico (PEP) e um açúcar derivado da via pentose-fosfato, a eritrose-4-fosfato, com posteriores modificações estruturais. Estes compostos desempenham um papel importante na defesa das plantas contra herbívoros e fitopatógenos nas plantas (DEWICK, 2009; MITHOFER & MAFFEI, 2017). A FIGURA 4 mostra a rota biossintética do arilpropanoides.

FIGURA 4 ROTA BIOSSINTÉTICA DOS ARILPROPANOIDES

Adaptado de SANGWAN et al. (2001).

1.4 FAMÍLIA PIPERACEAE

As espécies de Piperaceae são notáveis pela sua diversidade química. Os principais componentes incluem alcaloides piperidínicos, amidas, lignanas, terpenos e flavonoides. Cada um desses grupos de compostos apresenta uma variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais (Parmar et al., 1997; Gupta et al., 2002).

A família Piperaceae Giseke é conhecida pela sua importância econômica e medicinal, é predominantemente tropical, com uma distribuição geográfica abrangente que inclui regiões da Ásia, especialmente o Sudeste Asiático (com a Índia como centro de diversidade para a *Piper nigrum*), a América Central e do Sul, a África Ocidental e Madagascar, além de áreas nas Ilhas do Pacífico e na Austrália (JARAMILLO & MANOS, 2001; WANKE et al., 2007). Esta distribuição destaca-se pelas condições ideais de umidade e temperatura dos trópicos, favorecendo habitats de florestas úmidas e áreas sombreadas, o que é refletido na adaptabilidade ecológica e diversidade das espécies da família, tornando-as um recurso valioso para a pesquisa em produtos naturais e medicamentos (GUERRINI et al., 2008; DUARTE et al., 2007).

O Brasil, apresenta alta diversidade de Piperaceae, encontrando cerca de 467 espécies, divididas em três gêneros, sendo 297 pertencentes ao gênero *Piper* e 164 do gênero *Peperomia* e um do gênero *Manekia* (MEDEIROS, 2006; SOUZA, et al., 2009, ZAPPI et al, 2015, Guimarães et al., 2023).

Dentre as espécies da família Piperaceae pode-se destacar o gênero *Piper*, com maior número de espécies da família e que apresenta diversas atividades biológicas relevantes, entre elas a atividade antimicrobiana, antifúngica, inseticida e repelência (RUIZ-VÁSQUEZ et al., 2022; SANTOS et al., 2012)

1.4.1 O GÊNERO *Piper*

O gênero *Piper* apresenta uma gama grande de possibilidades de utilização de suas espécies. Algumas são utilizadas como alimentos e temperos, outras como inseticidas, alucinógenos e medicinais, além de apresentar atividade antifúngica e antibacteriana (LOPEZ et al., 2002; PARMAR, 1997). Isso ocorre devido à grande diversidade de classes de compostos isolados de espécies de *Piper* como: alcaloides/amidas, lignanas, neolignanas, flavonoides, terpenos, propenilfenóis, cavalactonas, butenolidas, piperolidas e OEs. Os metabólitos secundários têm sido encontrados em todas as partes da planta, incluindo folhas, caules, raízes e inflorescência (DYER et al., 2004; PARMAR et al., 1997; SENGUPTA e RAY, 1987).

As espécies do gênero *Piper* podem ocupar ambientes abertos ou perturbados de floresta. Há espécies capazes de tolerar a sazonalidade de

florestas tropicais secas decíduas ou subdecíduas. Uma grande parte das espécies de *Piper* são pioneiras, colonizando áreas de clareiras, estradas e pastos, mas há também as que crescem em locais úmidos ou florestas fechadas (MEDEIROS, 2006). O gênero *Piper* é o mais conhecido por seu valor econômico dentro da família Piperaceae. O mais importante representante deste é a pimenta preta (*Piper nigrum* L.), o produto agrícola mais conhecido no gênero (DYER et al, 2004).

1.5 ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper*

Os óleos essenciais de espécies de *Piper* também são amplamente estudados, em função da sua variabilidade química e suas atividades biológicas. Andrade e colaboradores (2011) relataram a identificação de 141 componentes do óleo essencial (OE) de *P. dilatatum*, sendo que 52 componentes são mono ou sesquiterpenos. Matasyoh e colaboradores, por sua vez, estudaram a atividade larvicida do OE de *P. capense* contra o vetor da malária, sendo o óleo composto principalmente por mono e sesquiterpenos, e relataram que o OE desta planta pode ser estudado como larvicida que não prejudica a natureza, podendo inclusive ser utilizado pelos moradores que cultivam a planta para a prevenção da doença (MATASYOH, 2011).

Em 2012, Lima e colaboradores extraíram o OE de *P. aleyreanum*, composto principalmente de mono e sesquiterpenos, e verificaram que o óleo possui atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e propriedades gastroprotetoras (LIMA, 2012). Sauter e colaboradores extraíram o OE de *P. hispidinervum*, composto também principalmente por mono e sesquiterpenos, e relataram que o óleo possui atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyphaga* (SAUTER, 2012).

Em 2013, Sperotto e colaboradores extraíram OE de *P. gaudichaudianum*, que é utilizada popularmente como anti-inflamatória, e relataram que o OE não é mutagênico, mas apresentou um efeito citotóxico contra o fungo *Saccharomyces cerevisiae* (SPEROTTO, 2013).

Macedo e colaboradores (2020) mostraram em seu estudo que o OE, o extrato etanólico e as frações de *P. marginatum*, apresentaram atividade anti - anti-promastigota e anti-amastigota contra *Leishmania amazonensis* com baixa

QUADRO 1 ESTUDOS RECENTES DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS OEs DAS 7 ESPÉCIES DE *PIPER* ESTUDADAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

n.	Espécie	Composição (majoritários) OE folhas	Atividade biológica	Local de coleta	Referência
1	<i>Piper aduncum</i>	miristicina (12,4%); piperitona (11,8%); germacreno-D (6,9%); terpine-4-ol (6,3%); Dilapiol (6,3%)	Antifúngica para <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Rio Verde, GO, Brazil	VALADARES et al., 2018
2	<i>Piper aduncum</i>	OE-B: canfeno (7,41%); canfora (13,87%); piperitona (20,07%); viridiflorol (12,97%). EO-C: canfeno (5,39%); canfora (9,41%); piperitona (19,01%); viridiflorol (18,80%).	Citotóxica, Antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>) e antifúngica (<i>Candida albicans</i>)	Bauta (OE-B), e Ceiba (OE-C), Provincia de Artemisa, Cuba.	GUTIÉRREZ et al; 2016
3	<i>Pioer aduncum</i>	dilapiol (81,01%)	Larvicida contra <i>Aedes aegypti</i>	São Paulo, SP, Brasil	PERREIRA FILHO et al; 2021
4	<i>Piper crassinervium</i>	7- <i>epi</i> - α -eudesmol (11,12%); β -selineno (10,40%)	Inseticida contra <i>Drosophila suzukii</i>	Botucatu, SP, Brasil	DE SOUZA et al., 2020
5	<i>Piper crassinervium</i>	α -pineno (13,95%); β - pineno (12,09%).	Larvicida para <i>Aedes aegypti</i>	São Paulo, SP, Brasil	PERREIRA FILHO et al; 2021
6	<i>Piper fuliginum</i>	asaricina (10,82%); biciclogermagreno (5,64%), <i>d</i> -cadineno	Efeito ovicida para o controle de <i>Anticarsia gemmatilis</i>	Botucatu, SP, Brasil	KRINSKI & FOERSTER., 2018

n.	Espécie	Composição (majoritários) OE folhas	Atividade biológica	Local de coleta	Referência
7	<i>Piper gaudichaudianum</i>	1-epi-cubanol (25,0%), eudesm-7(11)-en-4-ol (28,40%); miristicina (15,19%).	Inseticida contra <i>Drosophila suzukii</i>	Piraquara – PR- Brasil	DE SOUZA et al., 2020
8	<i>Piper gaudichaudianum</i>	alfa-humuleno (15,50%); biciclogermacreno (13,53%)	Larvicida para <i>Aedes aegypti</i>	São Paulo, SP, Brasil	PERREIRA FILHO et al; 2021
9	<i>Piper gaudichaudianum</i>	β -selineno (14,0%); viridifloreno (10,5%); (<i>E</i>) -nerolidol (9,0%); óxido de cariofileno (9,3%)	Anti-inflamatório: efeito antiquimiotático	Três Cachoeiras, RS, Brasil	SOARES et al; 2022
10	<i>Piper lhozkyanum</i>	β -elemeno (~21,50%); α -zingibereno (~13,50%)	Não descrito	Teresópolis, RJ, Brasil	DA COSTA et al; 2021
11	<i>Piper lhozkyanum</i>	biciclogermagreno (21,71%); óxido de cariofileno (13,97%).	Ovicida para o controle de <i>Anticarsia gemmatilis</i>	Botucatu, SP, Brasil	KRINSKI et al., 2018
12	<i>Piper malacophyllum</i>	canfeno (20,8%); cânfora (32,8%).	Antimicrobiana para <i>Cryptococcus neoformans</i> e o filamentoso <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Florianópolis, SC, Brasil	SANTOS et al; 2012
13	<i>Piper tuberculatum</i>			Barbalha, CE, Brasil	

	α -pineno (26,54%); β -pineno (27,74%); β -ocimeno (12,45%), β -cariofileno (4,38%).	DOS SANTOS et al; 2022
14	<i>Piper tuberculatum</i> β -Bisaboleno (40,2%); cariofileno (9,7%).	Amazonia Peruana, Peru RUIZ-VÁSQUEZ et al; 2022 Atividade antifúngica com um IC ₅₀ : <i>Botrytis cinerea</i> : 800 µg/mL 57+- 9%; <i>Aspergillus niger</i> 77 ± 3; <i>Alternaria alternata</i> 87 ± 5
15	<i>Piper tuberculatum</i> β -cariofileno (10,6%); γ -muuroleno (9,0%).	Recife, PE, Brasil ARAÚJO et al; 2020 Efeito repelente contra <i>Tetranychus urticae</i>

toxicidade para macrófagos. O extrato etanoico apresentou melhor índice de seletividade em comparação ao medicamento de referência Pentamidina.

O QUADRO 1 mostra os estudos recentes da literatura dos OEs das 7 espécies de *Piper* selecionadas para este trabalho e suas atividades biológicas (quando descritas).

Os estudos mostram que os OEs de *Piper* podem ser úteis no controle de fungos, entre eles os fitopatógenos de frutas e vegetais no pós-colheita. Devido a fragilidade de sua estrutura algumas frutas não podem ser submetidas ao molhamento com fungicidas, podendo assim os OEs serem uma alternativa devido ao seu caráter volátil.

1.6 O CULTIVO DO MORANGO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é a 17ª fruta na ordem de importância mundial. A produção mundial de morangos vem crescendo em números absolutos nos últimos anos, chegando a 8.114.373 toneladas para uma área total plantada de 373.435 hectares (ANTUNES, 2017). Essa fruta é muito perecível e vulnerável à infecção de fungos, resultando em podridões que ocasionam perdas econômicas.

Vários patógenos podem afetar o morangueiro, causando danos em maior ou menor intensidade em função das condições climáticas, do manejo adotado, das cultivares utilizadas e da agressividade do patógeno. O morango, em especial, é um produto altamente perecível, tendo uma vida útil pós-colheita reduzida, devido, dentre outros fatores, a alta taxa respiratória e a incidência de podridões que afetam os frutos (KADER, 1991).

Uma das grandes perdas pós-colheita se dá pelo desenvolvimento de fungos, sendo o *B. cinerea* Pers, agente causal do mofo cinzento, o que normalmente se encontra maiores incidências. *Botrytis cinerea* causa perdas de importância econômica, não apenas no pré-colheita, mas também durante o transporte e armazenamento, portanto, por mais eficiente que seja o tratamento fitossanitário efetuado no campo, ele não é suficiente para dispensá-lo na pós-colheita (CAMILI et al, 2007).

1.7 FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea*

As espécies de *Botrytis* apresentam um estilo de vida necrotrófico; ou seja, alimentam-se de tecidos mortos ou em processo de morte. Elas secretam enzimas que auxiliam na decomposição da matéria orgânica, facilitando assim a sua absorção. Sendo patógenos de amplo espectro, infectam muitas plantas hospedeiras. Após a infecção e morte dos tecidos, o fungo pode sobreviver e esporular no tecido necrótico, ou produzir estruturas de sobrevivência de longo prazo, como escleródios. Essas estruturas de sobrevivência podem ser associadas a plantas vivas ou com detritos vegetais enterrados, ou no solo (HOLTZ; COERTZE; WILLIAMSON, 2007). A FIGURA 5 mostra frutos contaminados com *B. cinerea*.

FIGURA 5 EXEMPLOS DE MORANGOS COM MOFO CINZENTO



Autor: Gerald Holmes



Autor: Edward Sikora

1.8 O CULTIVO DO PIMENTÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma hortaliça originária do continente americano, sendo cultivado há cerca de 7000 anos. É uma planta de clima tropical, que se desenvolve melhor em temperaturas elevadas ou amenas. Além disso, o pimentão é uma das cinco espécies cultivadas do gênero *Capsicum*, pertencente à família Solanaceae. Presente na dieta de muitas populações no mundo devido ao seu sabor picante e adocicado, o pimentão possui grande importância econômica, com produção mundial de aproximadamente 32 milhões de toneladas e é cultivado em grande número em todo o mundo, atingindo uma área cultivada que ultrapassa 1,5 milhão de hectares (BIANCHETTI, 1996; DE WITT; BOSLAND, 1993;

FILGUEIRA, 2005; FAOSTAT, 2017, FRATIANNI et al. 2020; FRIZZONE et al., 2001; HENZ et al., 2007; LOPES et al., 2018).

A doença mais comum no Brasil em espécies de *C. annuum* é a antracnose, que pode ser causada por várias espécies de fungos do gênero pelo fitopatógeno *Colletotrichum* sp. limitando a vida útil dos frutos tanto durante o armazenamento, quanto durante o transporte e a comercialização. Para que sua vida útil seja prolongada, fungicidas são utilizados durante o seu cultivo. De acordo com Lopes e colaboradores (2018), o pimentão encontra-se entre os líderes no ranking de alimentos com maior resíduo de agrotóxicos.

1.9 O *Colletotrichum* sp. NO CULTIVO DO PIMENTÃO

O *Colletotrichum* sp., é o fungo causador da doença antracnose, este fungo causa grandes perdas em diversas culturas, como a macieira, pimentão, morango, citrus entre outras. As espécies mais conhecidas são *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. fructula*. Seu controle se dá através do controle químico e da retirada de frutos mumificados de frutos saudáveis e podas de áreas afetadas (MENEZES, 2006). A FIGURA 6 mostra frutos de *C. annuum* com antracnose.

De acordo com os dados publicados pela ANVISA no relatório do Programa de Análise de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (PARA) publicado em 2020, nos quais foram analisadas 326 amostras, mostrou que 80% das amostras de pimentão apresentaram irregularidades relacionadas a ingredientes ativos não autorizados e/ou acima do limite permitido no Brasil, e com concentrações acima do limite como fungicidas da classe dos ditiocarbamatos, que foram detectados em 170 amostras e ficaram acima do limite permitido de 0,08 mg/Kg com 0,12 mg/Kg.

FIGURA 6 EXEMPLOS DE PIMENTÕES COM ANTRACNOSE



1.10 CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Em 2016, 13,8% dos alimentos produzidos foram perdidos. Frutas e vegetais incorrem em altos níveis de perda, dada a sua natureza altamente perecível. Algumas das variáveis para essa grande perda são as condições de armazenamento que podem levar a menor prazo de validade, condições climáticas que favorecem a deterioração biológica (por exemplo, ataques de bactérias, fungos ou insetos), além da contaminação de alimentos por patógenos. Por exemplo, o governo queniano destruiu quase 14 000 toneladas de milho em 2014 devido à contaminação com aflatoxinas, um tipo de micotoxinas produzidas por uma infestação por fungos, que são altamente tóxicas e podem causar danos extensos à saúde humana e animal (FAO, 2019).

O controle de doenças de pós-colheita é baseado, tradicionalmente, na aplicação de fungicidas sintéticos, antes do armazenamento, por meio de banhos, aspersão ou por incorporação em ceras. Atualmente, é reduzido o número de princípios ativos autorizados para uso nessa etapa, devido, principalmente, às considerações toxicológicas. Por esse motivo, há um considerável interesse por métodos alternativos de controle de doenças, que possuam mecanismos capazes de controlar patógenos nos tecidos vegetais a patógenos ou que possam complementar ou substituir o uso de fungicidas e prolongar o período de armazenamento dos frutos (HALFELD-VIEIRA et al, 2016).

1.11 OEs COMO ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DE FITOPATÓGENOS

Estudos com compostos isolados de OEs de plantas têm comprovado suas ações como fungicidas naturais inibindo a ação dos fungos e, um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (CARNEIRO et al., 2019; VALADARES et al., 2018). Silva e colaboradores em 2014, demonstraram a atividade antifúngica contra *Marasmius perniciosa* utilizando OE de *Piper divaricatum*.

Devido a tendência dos fitopatógenos desenvolverem resistência aos fungicidas químicos comerciais, quando esses são utilizados com dosagens erradas, o estudo de novos produtos e estratégias de controle de doenças faz-se

necessário. O uso de OEs como uma alternativa no controle de doenças tem se mostrado promissor, pois estudos vem considerando sua potencialidade de aplicação em função das atividades biológicas e menor dano ambiental (ALI et al., 2015; GONÇALVES & PASA, 2015; LA TORRE et al., 2016; PEREIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2017; SANTOS., 2020; TOMAZONI et al., 2017).

Para algumas espécies de *Piper* já há estudos do potencial antifúngico como o de *P. aduncum* relatado por Bastos & Albuquerque (2004) cuja concentração mínima inibitória (CIM) para *Colletotricum musae* foi de 150 µg mL⁻¹. Almeida et al. relataram em 2009 que, o dilapiol presente em *P. aduncum*, apresentou ação fungicida contra o fungo *Moniliophthora perniciosa* (vassoura de bruxa).

Estudos indicam a potencialidade do uso de OEs e dos seus compostos para fins de biocontrole, especialmente sua ação no controle de fungos fitopatogênicos (JING et al., 2018). Avanço e colaboradores (2016) investigaram a composição e ação antifúngica do OE de *Curcuma longa* L. Ele demonstrou atividade contra o fungo *Fusarium verticillioides*, diminuindo seu desenvolvimento. Isto indica um possível uso como conservante de alimentos.

Zhao e colaboradores (2021) em seu estudo com atividade antifúngica do OE de *Origanum vulgare* frente a *B. cinerea*, apresentou como compostos majoritários o metil eugenol (16,5%), miristicina (15,6%), carvacrol (15,0%) e timol (9,8%). Na atividade antifúngica, o OE exibiu uma forte atividade assim como seus dois principais componentes, o timol e carvacrol.

Valadares e colaboradores em 2018 estudaram o OE das folhas coletadas no município de Rio Verde, Goiás de *Piper aduncum*, contendo como compostos majoritários a miristicina e piperitona e, avaliaram o potencial inibitório a um isolado de *Sclerotinia sclerotiorum*, um patógeno fúngico que causa muitas perdas econômicas em várias culturas, como por exemplo a de soja, provocando a doença do mofo branco. O estudo mostrou que houve um grande potencial antifúngico com inibição de 96,31% utilizando 10µL de OE.

Chen e colaboradores (2019) estudaram os OEs de cinco espécies da família da Rutaceae, sendo o OE de *Citrus medica* mais eficiente em testes *in vitro* no controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, do que o fungicida utilizado flutriafol. Esse estudo mostrou que a atividade biológica está associada ao sinergismo dos

constituintes presentes no OE. Nos testes *in vivo* o OE mostrou uma diminuição na incidência e gravidade da doença.

Souza e colaboradores (2020) investigaram os mecanismos de ação dos OEs de *Aniba canellia* e *A. parviflora* e analisaram suas atividades de inibição e ação fungicida superior ao do fitossanitário mancozebe utilizado em campo para os dois fitopatógenos *Aspergillus flavus* e *Colletotrichum guaranicola*. Estes fitopatógenos causam grandes perdas tanto no campo como no pós-colheita, ocorrendo a incidência de doenças entre elas o apodrecimento do milho e da antracnose nas folhas do Guaraná, respectivamente. Em sua conclusão os autores mostraram que há permeabilidade dos OEs nas membranas dos fungos, o que reforça o seu potencial fungicida.

2. JUSTIFICATIVA

A preocupação com a segurança alimentar em relação aos resíduos de agrotóxicos faz com que estudos para a busca de alternativas de origem natural sejam necessários. Com isso, estudos com OEs têm se mostrado promissores devido à sua composição química complexa e à sua capacidade de ação multissítio. Muitos têm mostrado seu potencial como biodefensivos agrícolas. Os óleos essenciais de *Piper* têm mostrado possuir várias atividades biológicas, entre elas a fungicida. Por isso, há uma necessidade de um entendimento maior sobre a composição dos OEs de *Piper*, assim como a avaliação de sua atividade biológica e de seus majoritários contra aos fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar os óleos essenciais de plantas selecionadas do gênero *Piper* e avaliar suas atividades no controle dos fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar quimicamente dos óleos essenciais por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliar a sazonalidade dos óleos essenciais extraídos, considerando alterações em relação à quantidade e a composição química dos óleos obtidos.
- Realizar as análises quimiométricas (ACP e AAH) dos óleos essenciais extraídos para verificar estatisticamente a existência de similaridade entre eles;
- Isolar os constituintes majoritários dos óleos essenciais quando houver e, caracterização dos constituintes isolados por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN de ^1H e de ^{13}C);
- Realizar modificações estruturais no safrol para avaliação do seu potencial como fungicida e caracterização dos produtos de reação por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), ressonância magnética nuclear unidimensional (RMN de ^1H e de ^{13}C) e bidimensional pelos experimentos de COSY (^1H - ^1H), HSQC (^1H - ^{13}C) e HMBC;
- Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais totais e dos constituintes isolados contra o fitopatógeno do morango e do pimentão, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp., respectivamente, por meio da determinação da concentração mínima inibitória (CIM) pelo método de diluição em caldo e pela inibição do crescimento micelial radial, por contato e por volatilização *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

As análises dos óleos essenciais foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) da marca Shimadzu modelo GC-2010 Plus, acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus para

análises de amostras líquidas, gasosa (headspace) e microextração em fase sólida (SPME), do laboratório de multiusuários do Departamento de Química da UFPR.

As placas de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas espalhando uma suspensão de sílica gel 60 (Vetec, Brasil e Machery-Nagel, Germany) com indicador de fluorescência F254 em água destilada sobre placas de vidro (20 x 20 cm), usando um espalhador do tipo Quickft, com espessura de 1,0 mm.

Para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizou-se cromatofolhas de alumínio recobertas por sílica gel 60, com indicador de fluorescência F254 e 0,2 mm de espessura (Merck). As placas foram reveladas por irradiação de luz ultravioleta (254 e 366 nm) e revelador anisaldeído (revelador universal).

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes utilizados neste estudo foram, água destilada, hexano pureza 99,5% (Supelco) para as análises no CG-EM. Padrão de *n*-alcanos C8-C30 (Supelco- 1000 µg mL⁻¹), hexano P.A. (HEX) (Alphatec), diclorometano P.A. (DCM) (Dipa), 1-butanol P.A. (Alphatec), hidróxido de potássio P.A. (KOH) (Neon), metanol (MeOH) (Dipa), éter de petróleo 30-60 (EP) (Reatec), sulfato de sódio anidro (Vetec) como secante, ácido clorídrico P.A. (Reatec), cloreto de sódio sem iodo P.A. (Synth) e clorofórmio deuterado (CCl₃D) com 0,05% de tetrametilsilano (TMS) (merck).

4.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As coletas das 7 espécies de *Piper* foram realizadas em várias regiões do Brasil e realizadas pelo Drº Diones Krinski (UNEMAT - MS). No QUADRO 2 são descritas as espécies de *Piper* coletadas e respectivas localidades de coleta.

QUADRO 2 LISTA DE ESPÉCIES DE *Piper* E SUA LOCALIZAÇÃO DE COLETA

Espécie	Município/UF	Coordenadas geográficas
<i>Piper aduncum</i>	Tangará da Serra/MT	14°37'29.0"S 57°29'09.1"W
<i>Piper crassinervium</i>	Botucatu/SP	22°51'37.19"S 48°26'14.32"W
<i>Piper fuligineum</i>	Botucatu/SP	22°50'42.03"S 48°25'34.04"W

<i>Piper gaudichaudianum</i>	São José dos Pinhais/PR	25°33'01.8"S 49°14'10.8"W
<i>Piper lhotzkyanum</i>	Botucatu/SP	22°53'32.57"S 48°28'57.45"W
<i>Piper malacophyllum</i>	Novo Progresso/PA	7°06'59.0"S 55°24'22.1"W
<i>Piper tuberculatum</i>	Tangará da Serra/MT	14°37'29.0"S 57°29'09.1"W

As coletas foram efetuadas por estação do ano, realizadas nos meses de março de 2015 a fevereiro/2016, para abranger o estudo de sazonalidade dos OEs.

4.4 SECAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico foi selecionado retirando os galhos e as folhas foram limpas e secas em estufa de ar circulante a 40°C até que a massa do material fosse constante. As folhas secas foram submetidas à hidrodestilação.

4.5 EXTRAÇÃO DO OE

O material vegetal seco foi grosseiramente triturado, 50 g do material em 1000 litro de água destilada foram submetidos à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 4h. As extrações foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal- UFPR, campus Agrárias, devido à infraestrutura disponível, que permitiu realizar as triplicatas simultaneamente. Depois de realizada a extração, o OE foi coletado ou extraído do hidrolato (3 x 10 mL) com hexano, posteriormente, este foi secado com sulfato de sódio anidro e filtrado.

4.6 ANÁLISE EM CG-EM

Para a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) a amostra foi diluída a 1% (v/v) em hexano e analisada utilizando as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás de arraste empregado foi o hélio com vazão de 1,02 mL min⁻¹, em modo split 1:90, estando o injetor à 250 °C e o sistema de ionização 70 eV. Foi injetado 1 µL de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 °C (0') até 250°C, com aquecimento de 3 °C min⁻¹.

Para o cálculo do índice de retenção foi empregada uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados, C8 a C30.

O índice de retenção experimental foi calculado utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (1963) (demonstrada abaixo):

$$\text{Índice aritmético} = 100 \times (C_n - C_{n-1}) \times \left(\frac{T_x - T_{n-1}}{T_n - T_{n-1}} \right) + 100 \times C_{n-1}$$

Os quais:

- C_n é o número de átomos de carbono do n -alcano cujo tempo de retenção é imediatamente superior ao tempo de retenção do analito;
- C_{n-1} é o número de átomos de carbono do n -alcano cujo tempo de retenção é imediatamente inferior ao tempo de retenção do analito;
- T_x é o tempo de retenção do analito;
- T_n é o tempo de retenção do alcano C_n ;
- T_{n-1} é o tempo de retenção do alcano C_{n-1} .

Os componentes dos OEs foram identificados através da comparação dos índices de retenção e espectros de massas com a literatura Adams (2017) e os espectros de massas também foram comparados com a biblioteca de massas NIST 14 (NIST, Gaithersburg, USA).

A quantificação relativa foi determinada a partir da normalização da área dos picos com a área total do cromatograma, sem o uso de fator de correção.

As concentrações médias relativas (\bar{x}) foram calculadas pela soma dos valores das triplicatas, dividido pelo número de amostras (no caso= 3). Conforme a fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Sendo, x_i o valor obtido e n o número de amostras.

Para se conhecer a medida da dispersão dos valores em torno da média realizou-se o cálculo do desvio padrão (S ou DP) dado pela seguinte fórmula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Sendo x_i o valor obtido, \bar{x} o valor da média e n o número de amostras.

Todas as análises foram feitas em triplicata para os OEs expressos como média \pm erro padrão.

4.7 ANÁLISE MULTIVARIADA DE DADOS

A partir dos dados obtidos foi realizada a Análise dos Componentes Principais (ACP do inglês- *Principal Component Analysis*- PCA), e o tratamento dos resultados com o pacote PLS_toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) opera no software Matlab® v.7.0.1 (Math Work Inc.)®.

Após a identificação dos OEs, a matriz de dados gerada a partir das tabelas de identificação foi submetida aos procedimentos estatísticos multivariados com valores centrados na média. Nessas matrizes foram levadas em consideração as concentrações relativas calculadas para cada composto a partir da normalização de área do cromatograma. No QUADRO 3 mostra a disposição das matrizes geradas.

QUADRO 3 MATRIZES GERADAS PARA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS OEs DE *Piper*

Espécie	Linhas*	Colunas*
<i>Piper aduncum</i>	4	35
<i>Piper crassinervium</i>	4	26
<i>Piper fuligineum</i>	4	40
<i>Piper gaudichaudianum</i>	4	22
<i>Piper lhotzkyanum</i>	4	25
<i>Piper malacophyllum</i>	4	37
<i>Piper tuberculatum</i>	4	22

*Linhas correspondem as amostras de OEs extraídas nas diferentes estações do ano e as colunas os compostos identificados (atribuindo sua respectiva concentração em cada amostra) consideradas as concentrações médias das triplicatas.

A Análise de Componentes Principais (ACP) foi usada para reduzir a dimensão dos dados e obter representação simultânea das amostras (*scores*), considerando a composição química dos OEs (*loadings*), a fim de gerar agrupamentos ou separações entre as amostras, como tratamento dos dados, para facilitar a interpretação dos dados foi utilizado o pré-tratamento de centralização na média, no qual retira o efeito da média e destaca as variações em torno da média (FERREIRA, 2015).

4.8 ISOLAMENTO DO DILAPIOL

Do OE de *P. aduncum* da estação do verão foi realizado o isolamento do dilapiol, por meio de CCDP, fase móvel hexano:DCM 50:50, que resultou em 5

faixas. As faixas foram marcadas e raspadas da placa de vidro, e filtradas em funil de büchner de vidro com placa sinterizada, eluidas em DCM e MeOH. As frações foram secas a temperatura ambiente.

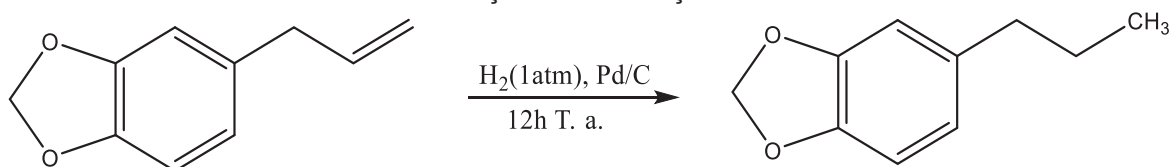
4.9 ISOLAMENTO DA MIRISTICINA

Do OE de *P. gaudichaudianum* da estação da primavera, que tem em sua composição cerca de 30% de miristicina, foi utilizada CCDP, fase móvel Hexano:DCM 50:50, que resultou em 3 faixas. As faixas foram marcadas e raspadas da placa de vidro, e filtradas em funil de büchner de vidro com placa sinterizada, eluidas em DCM e MeOH. As frações foram secas a temperatura ambiente.

4.10 REAÇÃO DE REDUÇÃO DO SAFROL

O procedimento foi adaptado da metodologia de Zheng e colaboradores (1992). Em um balão de 25mL solubilizou-se 50 mg de safrol (0,31 mol) em 1 mL de hexano (99,5%). A esta solução foi adicionado 10% de catalizador Pd/C. A reação foi mantida com adição constante de gás hidrogênio (H_2) à solução e sob agitação por 12 horas. Ao término, a solução foi filtrada em papel filtro, seca com sulfato de sódio anidro, e filtrou-se novamente, então a solução foi seca em temperatura ambiente até a evaporação total do solvente. O produto de reação foi purificado em coluna em fase líquida sob pressão reduzida (coluna à vácuo, termo usual), utilizando sílica gel 60 (230 - 400 mesh) (Merck, Germany) e funil de büchner em vidro, e o produto de reação foi eluído em hexano, então a fração foi evaporada em evaporador rotativo para retirada do solvente. O produto seco foi transferido para um frasco tarado e o produto de reação foi caracterizado através de CG-EM considerando seu IA e fragmentação de massas, obtendo-se então o diidrodafrol, com rendimento desta reação foi de 72% m/m.

FIGURA 7 - REAÇÃO DE REDUÇÃO DO SAFROL

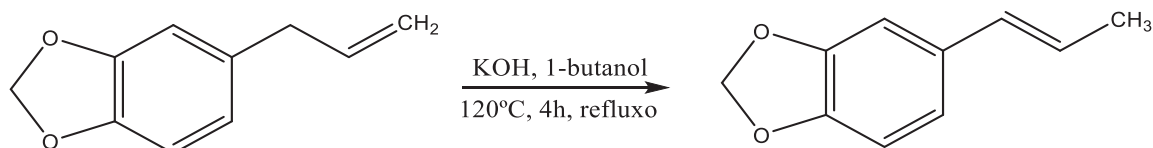


4.11 REAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO DO SAFROL

O procedimento foi adaptado da metodologia de Luís e colaboradores (2020). Em um balão de 25mL foram adicionados 10 mL de uma solução 3 mol L⁻¹ de KOH em butan-1-ol, e 100 mg de safrol (0,06 mol), e mantida a reação em refluxo a 120 °C em banho de óleo por 4 h sob agitação magnética. Após este tempo, a mistura foi neutralizada com HCl 10% e a fase orgânica foi lavada sucessivamente com água destilada e solução aquosa de NaCl.

A fase orgânica foi extraída com hexano (3 x 30 mL), então a fase hexânica foi rotaevaporada para redução do volume de solvente. A purificação foi realizada através de coluna em fase líquida sob pressão reduzida utilizando sílica gel 60 (230 - 400 mesh) (Merck, Germany) e funil de büchner em vidro, e o produto de reação foi eluído em hexano, então a fração foi evaporada em evaporador rotativo para retirada do solvente. O produto seco foi transferido para frasco tarado e o produto de reação foi caracterizado através de métodos espectroscópicos e espectrométricos, obtendo-se então o isosafrol, o rendimento desta reação foi de 78% m/m. A FIGURA 3 mostra a reação de isomerização do safrol.

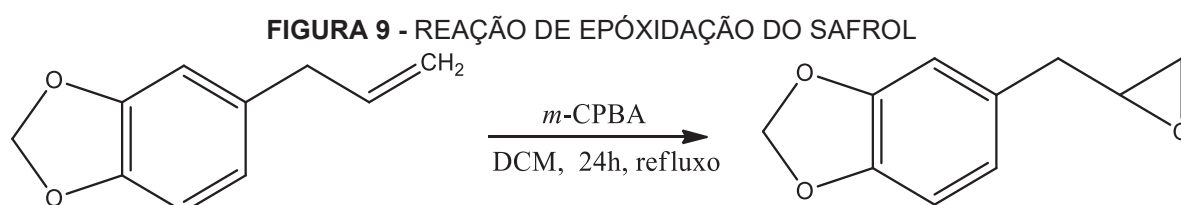
FIGURA 8 - REAÇÃO DE ISOMERIZAÇÃO DO SAFROL



4.12 REAÇÃO DE EPOXIDAÇÃO DO SAFROL

A síntese do epóxido safrol foi realizada seguindo a metodologia de Xu e colaboradores (2017). Em um balão de fundo redondo foi adicionado o ácido *m*-cloroperbenzóico (m-CPBA) (0,9815 g, 0,15 mol) dissolvido em 6,20 mL de diclorometano (DCM), seguido pela adição de safrol (0,500 g, 0,1 mol) à temperatura ambiente. Após agitação durante 24 horas, a mistura foi filtrada e o precipitado foi rejeitado. O sobrenadante foi lavado três vezes com solução de NaOH 5% e, subsequentemente, três vezes com água deionizada. A camada orgânica obtida foi seca sobre sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). A purificação foi realizada por meio de cromatografia em coluna líquida (CCL) utilizando sílica gel

60 (230 - 400 mesh) (Merck, Germany), e o produto de reação foi eluído em hexano, então a fração foi evaporada em evaporador rotativo para retirada do solvente. O produto seco foi transferido para frasco tarado e o produto de reação foi caracterizado por meio de métodos espectroscópicos e espectrométricos, obtendo-se então o epóxido safrol, com rendimento de 82% m/m. A FIGURA 3 mostra a reação de epoxidação do safrol.



4.13 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As substâncias isoladas e produtos de reação foram identificados principalmente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os experimentos foram conduzidos em dois equipamentos, em diferentes frequências. Os espectros foram obtidos em espectrômetros Bruker DPX 200 com campo magnético de 4,7 Tesla (200 MHz para o núcleo de ^1H), e/ou Bruker AVANCE III de 9,4 Tesla (400 MHz para o núcleo de ^1H). Foram realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais. Nos unidimensionais foram obtidos os espectros de RMN de hidrogênio (RMN de ^1H ; 200, 400 MHz) e de carbono totalmente desacoplado ($^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$; 50, 100 MHz). Os experimentos bidimensionais realizados foram os mapas de correlação direta ^1H - ^1H (COSY) e ^1H - ^{13}C (HSQC) e a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC). Para os experimentos foram utilizados aproximadamente 0,5 mL de solvente deuterado (clorofórmio- d), com tetrametilsilano (TMS, 0,05 % v/v) como referência interna, e ajuste da homogeneidade do campo magnético. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (G) em relação ao TMS (G = 0 ppm). As constantes de acoplamentos (J) foram expressas em Hertz (Hz). Os espectros foram processados com o software Top Spin (versão 4.0.8, Bruker Biospin). As análises no equipamento de RMN em 200 MHz foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN, DQUI-UFPR). E os experimentos bidimensionais em 400 MHz, foram realizados no Centro de

Ressonância Magnética Nuclear localizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

4.14 TESTES *in vitro* DO FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea* E *Colletotrichum* sp.

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças (LEMID), localizado no Setor de Ciências Agrárias, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade. O isolado de *B. cinerea* foi obtido de uma propriedade de cultivo de morangos da variedade San Andreas, no município de São José dos Pinhais. A coleta foi realizada no dia 07 de abril de 2017 e o seu isolamento em 10 de abril de 2017. Foi feita a identificação molecular do isolado para caracterização da espécie.

O *Colletotrichum* sp., foi isolado de pimentão comercial, a coleta foi realizada no dia 2 de março de 2022 e seu isolamento foi realizado no dia 07 março de 2022 pelo método indireto. Ainda será realizada a detecção molecular para confirmação da espécie. O repique das culturas foram realizados periodicamente, e o cultivo foi realizado a 25 °C por oito dias em câmara de incubação, tanto para *Colletotrichum* sp., como para o *B. cinerea*.

4.14.1 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

O repique das culturas foi realizado periodicamente para as espécies trabalhadas, *B. cinerea* e *Colletotrichum* sp. O cultivo foi realizado a 25 °C por 7 dias em câmara de incubação. Na placa de Petri contendo a cultura de 7 dias, foram vertidos 10 mL de meio de cultura de batata dextrose (BD). Em seguida, foi feita uma raspagem com alça de esfregaço para retirada dos esporos para o BD. Esta solução foi passada por uma filtragem com gaze estéril para retirada de micélio e particulados do meio de cultura de batata dextrose ágar (BDA) provenientes da placa que possam estar na solução. A solução então foi transferida para um tubo. O tubo foi agitado durante 15 segundos em vortex para posterior contagem de esporos na câmara de Neubauer. A concentração final do inóculo a ser utilizado foi de 10^5 esporos mL⁻¹ (FEHLBAUM et al., 1994).

4.14.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A atividade antifúngica foi avaliada em ensaio de inibição de crescimento em caldo BD (FEHLBAUM et al., 1994), com algumas modificações realizadas por FIEIRA et al., 2013. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em microplaca de 96 poços, as quantidades de cada poço estão descritas na TABELA 1, e o diagrama da distribuição das placas com as concentrações dos óleos na TABELA 2.

As microplacas com os inóculos foram incubadas a 25 °C por 72 h em Estufa Incubadora B.O.D. Foi observado o crescimento microbiano com o auxílio do leitor de microplacas a uma absorbância de 650 nm. O experimento foi conduzido em três repetições por tratamento e foram realizadas em triplicata. O valor da CIM foi obtido quando as medidas de absorção das amostras dos OEs são iguais ou menores que a absorção do meio de cultura ou se mantiveram com valores iguais da primeira leitura, indicando que não houve crescimento do fungo, assim indicando 100% de inibição. O antifúngico iprodiona (Rovral ®) foi utilizado como controle positivo de inibição de crescimento celular de *B. cinerea* e, o propineb foi utilizado para *Colletotrichum* sp., e para as concentrações utilizadas se seguiu o modelo de concentração utilizado pelos OEs.

As análises das leituras das placas de microdiluição foram feitas no laboratório GIA (Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais – UFPR), localizado no Setor de Ciências Agrárias, no equipamento da marca molecular devices, modelo Spectra Max M2, de 5 a 96 poços utilizando o filtro de 650 nm. As leituras foram realizadas no tempo zero e 72 horas do início dos testes.

TABELA 1 QUANTIDADES EM μL POR POÇO DA PLACA DE MICRODILUIÇÃO

Concentração em $\mu\text{L mL}^{-1}$	Quantidades por poço em μL		
	Solução estoque de $200 \mu\text{L mL}^{-1}$	Água	Inóculo
1	0,5	39,5	160
2	1	39	160
4	2	38	160
6	3	37	160
Concentração em $\mu\text{L mL}^{-1}$	Solução estoque de $2000 \mu\text{L mL}^{-1}$	Água	Inóculo
8	0,5	39,5	160
10	1	39	160
20	2	38	160
Concentração em $\mu\text{L mL}^{-1}$	Solução estoque de $20000 \mu\text{L mL}^{-1}$	Água	Inóculo
40	0,4	39,6	160
60	0,6	39,4	160
80	0,8	39,2	160
100	1	39	160
200	2	38	160
250	2,5	37,5	160
300	3	37	160
400	4	36	160
Concentração em $\mu\text{L mL}^{-1}$	Solução estoque de $40000 \mu\text{L mL}^{-1}$	Água	Inóculo
600	3	37	160
800	4	36	160
1000	5	35	160
1200	6	34	160

TABELA 2 DIAGRAMA DAS DISTRIBUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES NAS PLACAS DE MICRODILUIÇÃO (CONCENTRAÇÃO EM $\mu\text{L mL}^{-1}$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MC	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	MC
B	MC	1	1	1	20	20	20	250	250	250	1200	MC
C	MC	2	2	2	40	40	40	300	300	300	1200	MC
D	MC	4	4	4	60	60	60	400	400	400	1200	MC
E	MC	6	6	6	80	80	80	600	600	600	Inc	MC
F	MC	8	8	8	100	100	100	800	800	800	Inc	MC
G	MC	10	10	10	200	200	200	1000	1000	1000	Inc	MC
H	Água	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	Inc+ H ₂ O	MC

*Os quais: MC: meio de cultura; Inc: solução contendo os esporos (inóculos) e H₂O: água.

4.15 ANÁLISE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR CONTATO (CMC)

Os OEs, compostos isolados e derivados foram adicionados ao meio BDA para obtenção das concentrações 0; 25; 50; 100 $\mu\text{L ml}^{-1}$ e vertidos cada concentração em uma placa de petri. Discos de micélio contendo 5 mm de diâmetro de cada isolado foram transferidos para meio BDA contendo cada concentração. As placas contendo os meios de cultura foram incubados a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas durante 3 dias (72 horas) para o *B. cinerea* e 5 dias (120 horas) para o *Colletotrichum* sp.. O experimento foi conduzido em duas repetições por tratamento, cada placa correspondia uma unidade experimental. A avaliação foi realizada ao terceiro dia para *B. cinerea* e no quinto dia para o *Colletotrichum* sp., após a implantação do experimento, por meio da mensuração do tamanho da colônia do micélio a partir de duas medidas diametralmente opostas com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®), o experimento foi conduzido em quintuplicata. A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada usando a fórmula:

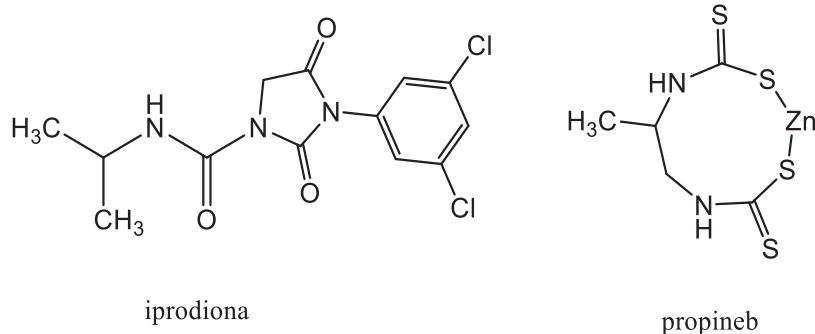
$$\%ICM = \left[\frac{C - T}{C} \right] \times 100$$

Nos quais: C = diâmetro da testemunha;

T = diâmetro médio do tratamento com os OEs, compostos isolados e derivados.

Como meio de controle positivo foi utilizado o iprodiona para *B. cinerea* e propineb (Antracol 700W ®) para o *Colletotrichum* sp.. Na FIGURA 5 estão representadas as suas estruturas químicas.

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e comparados usando uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. Para análise dos dados utilizou se o programa estatístico R® (R CORE TEAM, 2022).

FIGURA 10. ESTRUTURAS DOS FUNGICIDAS IPRODIONA E PROPINEB.

4.16 ANÁLISE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR VOLATILIDADE (CMV)

Nas placas de petri foram vertidos 10 mL de meio de cultura BDA e em sua tampa foi colado um papel filtro de 4 mm de diâmetro. Os OEs, compostos isolados e derivados foram separadamente adicionados ao papel filtro na proporção de formar uma câmara volátil nas concentrações 0; 25; 50; 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Discos de micélio contendo 5 mm de diâmetro de cada isolado foram transferidos para meio BDA contendo cada concentração. As placas contendo os meios de cultura foram incubados a 25°C sob fotoperíodo de 12 horas durante 3 dias (72 horas) para o *B. cinerea* e 5 dias (120 horas) para o *Colletotrichum* sp.. O experimento foi conduzido em duas repetições por tratamento, cada placa correspondia uma unidade experimental. A avaliação foi realizada ao terceiro dia para *B. cinerea* e ao quinto dia para o *Colletotrichum* sp., após a implantação do experimento, por meio da mensuração do tamanho da colônia do micélio a partir de duas medidas diametralmente opostas com o auxílio de paquímetro digital (Kingtools®), o experimento foi conduzido em quintuplicata. O experimento foi conduzido em duplicata, e foi utilizando a fórmula de %ICM do crescimento micelial por contato. Como meio de controle positivo foi utilizado o iprodiona para *B. cinerea* e propineb para o *Colletotrichum* sp.. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e comparados usando uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com $p < 0,05$. Para análise dos dados utilizou se o programa estatístico RStudio® (R CORE TEAM, 2022).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS OEs

Os rendimentos das extrações dos OEs estão descritos no quadro 4:

QUADRO 4 RENDIMENTO DOS OEs DE *Piper* EXPRESSOS EM (% m/m)

Espécie	Verão*	Outono*	Inverno*	Primavera*
<i>P. aduncum</i>	0,92 ± 0,04	0,90 ± 0,10	1,99 ± 0,12	0,24 ± 0,03
<i>P. crassinervium</i>	0,49 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,44 ± 0,03
<i>P. fuligineum</i>	0,62 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,38 ± 0,00	0,31 ± 0,00
<i>P. gaudichaudianum</i>	1,28 ± 0,02	0,98 ± 0,00	1,47 ± 0,11	0,94 ± 0,05
<i>P. lhotzkyanum</i>	0,42 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,20 ± 0,00
<i>P. malacophyllum</i>	0,71 ± 0,02	0,34 ± 0,00	0,76 ± 0,02	0,83 ± 0,01
<i>P. tuberculatum</i>	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,24 ± 0,01

* Dados da extração em triplicata.

Pelos dados do quadro observamos que a *P. gaudichaudianum* e a *P. aduncum* ambas na estação do inverno obtiveram o maior rendimento e a espécie com menor rendimento foi a *P. tuberculatum*. O rendimento dos OEs pode estar associado a fatores intrínsecos e extrínsecos, por isso pode ser observada a diferença nos rendimentos, como em *P. aduncum*, que embora seja a com maior rendimento no inverno (1,99% ± 0,12), mas na primavera (0,24% ± 0,03) seu rendimento é muito menor (GOBBO-NET0; LOPES, 2007).

5.2 ANÁLISE DOS OEs DE *P. aduncum*

A quantificação dos constituintes do OE de *P. aduncum* foi realizada com base na área dos picos em relação a área total do cromatograma, permitindo-se identificar 35 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 3, na qual está representada a média das análises em triplicata. O cromatograma da FIGURA 11 e 12 representam a análise do OE das folhas na estação do verão.

FIGURA 11 CROMATOGRAMA DE *P. aduncum* NA ESTAÇÃO do VERÃO.

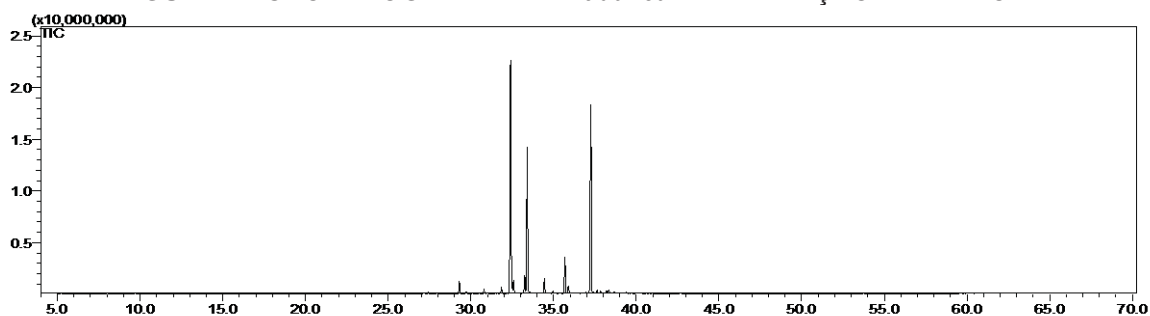
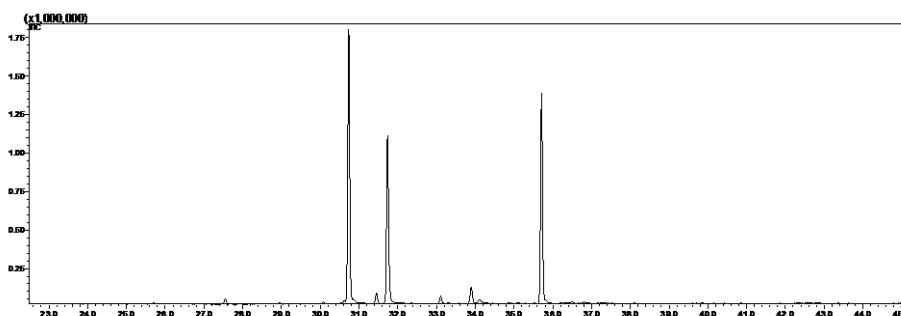
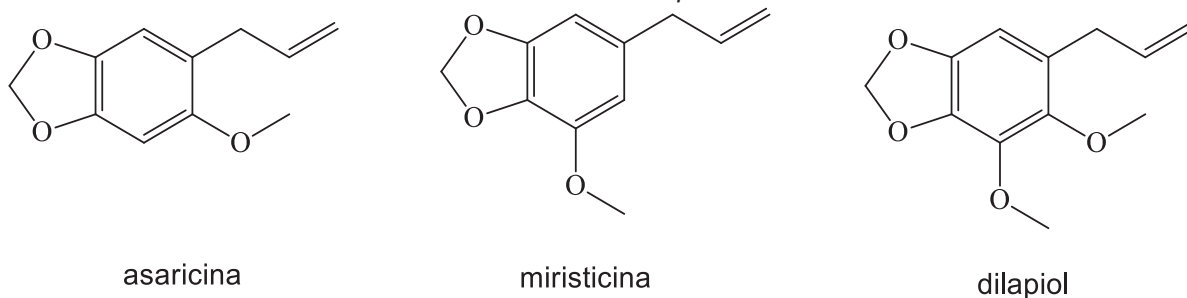


FIGURA 12 CROMATOGRAMA DE *P. aduncum* NA ESTAÇÃO do VERÃO ÁREA DOS PICOS AMPLIADA.



Foi identificada 98,18% da composição dos OEs de *P. aduncum*. A asaricina, miristicina e dilapiol foram os compostos majoritários, e quando somados totalizam cerca de 82% da composição total dos OEs. A FIGURA 13 mostra a estrutura dos compostos majoritários, o OE da estação do verão foi selecionado para avaliação dos testes com os fitopatógenos *B. cinerea* e *Colletotrichum* sp..

FIGURA 13 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM OEs DE FOLHAS DE *Piper aduncum*



Fonte: ADAMS, 2017.

TABELA 3 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OÊs DE *Piper aduncum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

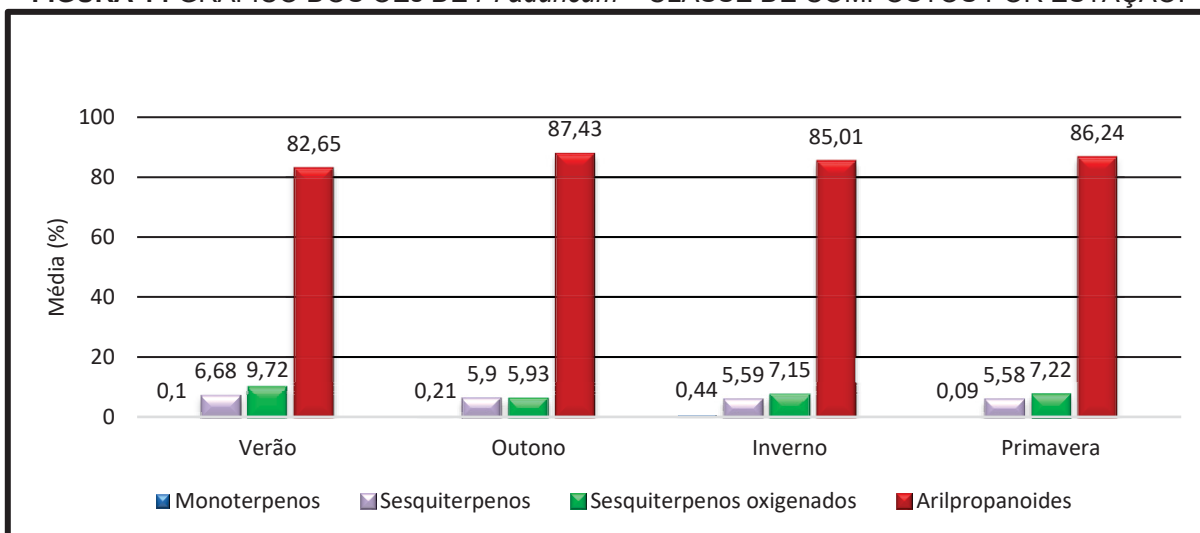
Piper aduncum (MT)				Primavera		Verão		Outono		Inverno		
Nº	T _x	IA*	IA Adams	Composto	média	DP	média	DP	média	DP	média	DP
1	8,02	933	932	α - pineno	0,03	0,01	0,04	0,01	0,06	0,04	0,16	0,03
2	9,68	978	974	β - pineno	0,05	0,03	0,06	0,03	0,15	0,08	0,28	0,04
3	26,17	1348	1348	α - cubebeno	0,04	0,01	0,06	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03
4	27,16	1371	1369	ciclosativeno	0,09	0,01	0,16	0,02	0,12	0,05	0,12	0,04
5	27,43	1377	1374	α - copaeno	0,23	0,02	0,27	0,05	0,32	0,08	0,25	0,11
6	27,78	1385	1387	β - bourboneno	0,05	0,01	0,05	0,01	0,07	0,02	0,07	0,02
7	28,00	1390	1389	β - elemeno	0,08	0,02	0,16	0,02	0,10	0,08	0,05	0,03
8	28,80	1409	1409	α - gurjuneno	0	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	29,30	1421	1417	E - cariofileno	1,41	0,12	1,51	0,20	1,66	0,40	1,42	0,51
10	29,73	1431	1430	β - copaeno	0,17	0,02	0,27	0,04	0,19	0,05	0,18	0,08
11	30,10	1440	1439	aromadendreno	0,03	0,02	0,07	0,01	0,00	0,00	0,06	0,01
12	30,52	1450	1451	trans-murola-3,5-dieno	0,02	0,02	0,08	0,00	0,01	0,01	0,05	0,02
13	30,79	1457	1452	α - humuleno	0,5	0,04	0,50	0,06	0,53	0,12	0,45	0,15
14	31,00	1462	1458	allo aromadendreno	0,08	0,00	0,21	0,02	0,05	0,04	0,09	0,04
15	31,48	1473	1475	trans-cardina-1(6),4-dieno	0,02	0,02	0,17	0,00	0,03	0,03	0,08	0,03
16	31,60	1476	1478	γ - muuroleno	0,04	0,02	0,11	0,01	0,03	0,02	0,09	0,04
17	31,85	1482	1480	germacreno D	0,43	0,07	0,84	0,14	0,33	0,09	0,91	0,32
18	32,40	1496	1495	asaricina	34,43	0,87	35,30	0,55	36,14	1,29	38,75	1,97
19	32,58	1500	1500	n-pentadecano	2,21	0,14	1,76	0,23	2,35	0,56	1,52	0,56
20	32,74	1504	1500	biciclogermacreno	0,13	0,01	0,32	0,02	0,08	0,05	0,19	0,05
21	33,25	1517	1514	cubebol	2,41	0,07	2,38	0,13	2,76	0,32	1,91	0,13
22	33,41	1521	1517	miristicina	17,44	0,30	19,75	0,27	18,14	0,51	19,73	0,83
23	33,92	1534	1533	trans- cadina-1,4-dieno	0,04	0,01	0,10	0,01	0,03	0,03	0,08	0,02
24	34,45	1547	1555	elemicina	1,68	0,06	1,68	0,10	2,60	0,21	1,57	0,03
25	34,97	1561	1531	(E) - nerolidol	0,3	0,02	0,22	0,03	0,20	0,07	0,27	0,05
26	35,68	1579	1577	espatulenol	2,19	0,01	4,83	0,07	1,42	0,13	2,74	0,13
27	35,89	1584	1582	óxido de cariofileno	1,04	0,04	0,79	0,10	1,00	0,22	0,78	0,06
28	36,78	1607	1602	ledol	0,08	0,03	0,10	0,01	0,01	0,02	0,08	0,01
29	36,95	1612	1608	epóxido de humuleno	0,22	0,01	0,14	0,01	0,17	0,02	0,13	0,01
30	37,25	1620	1620	dilapiol	32,69	1,73	25,92	1,15	30,54	2,44	24,96	0,13
31	37,65	1630	1627	1-epi-cubenol	0,16	0,01	0,26	0,01	0,08	0,03	0,42	0,04
32	37,85	1635	1632	α - acorenol	0,24	0,01	0,25	0,01	0,03	0,03	0,16	0,02
33	38,22	1646	1644	α - muurolol (=torreyol)	0,13	0,02	0,25	0,20	0,06	0,06	0,27	0,04
34	38,34	1649	1645	cubenol	0,34	0,02	0,32	0,01	0,19	0,04	0,27	0,04
35	38,67	1657	1652	α - cadinol	0,11	0,02	0,18	0,00	0,01	0,02	0,16	0,01

¹Índice aritmético calculado. ²Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. São destacados em negrito os compostos majoritários

Classe de compostos	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Monoterpenos	0,09	0,1	0,21	0,44
Sesquiterpenos	5,58	6,68	5,9	5,59
Sesquiterpenos oxigenados	7,22	9,72	5,93	7,15
Arilpropanoides	86,24	82,65	87,43	85,01
Total	99,12	99,15	99,47	98,18

Na FIGURA 14, é possível observar, por meio do gráfico, a distribuição das classes dos compostos nos OEs ao longo das estações do ano. Pelos valores quantitativos das classes de compostos, nota-se que não há diferenças significativas na composição dos OEs entre as estações do ano, o que o torna interessante para um uso comercial.

FIGURA 14 GRÁFICO DOS OEs DE *P. aduncum* – CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.



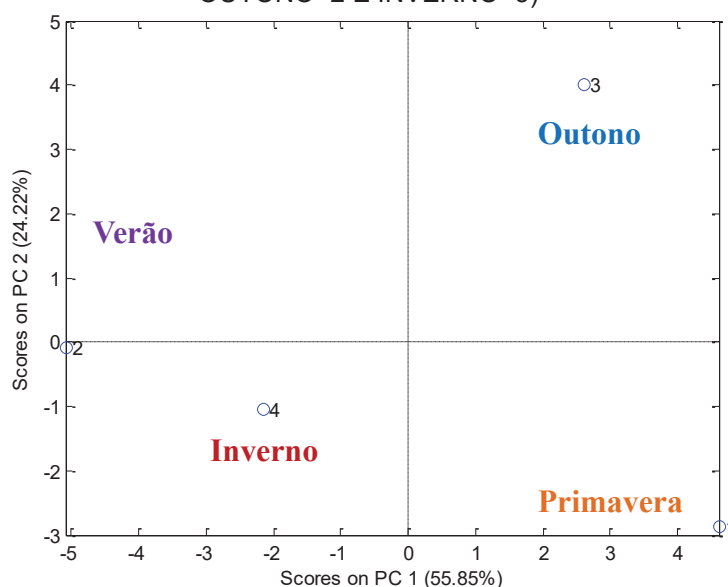
5.2.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE *P. aduncum*

Para os resultados da constituição química dos OEs obtidos de *P. aduncum*, buscando-se uma melhor visualização das semelhanças e/ou diferenças entre as amostras nas diferentes estações do ano, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Nesta análise avaliaram-se os *scores* (FIGURA 15) e os *loadings* (FIGURA 16), nos quais foram consideradas os valores das médias de cada estação, sendo possível, avaliar as diferenças nos OEs de cada uma das amostras de cada estação.

No gráfico de *scores* dos OEs de *P. aduncum*, pode-se notar que a Componente Principal 1 (PC1) explica 55,85% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 24,22% totalizando 80,07% da variância. Estes valores foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os OEs, embora estas diferenças sejam pequenas. A PC1 diferencia os OEs das estações do verão e do outono, enquanto a PC2 destaca a estação do inverno em relação ao

outono e ao verão. O gráfico de *loadings* traz a representação dos compostos responsáveis pela variância dos OEs (FIGURA 16).

FIGURA 15 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE *P. aduncum*. (VERÃO=1, OUTONO=2 E INVERNO=3)



No gráfico de *loadings* dos OEs de *P. aduncum*, observa-se que os compostos asaricina (18) e α -pineno (1), numerados conforme a tabela de elucidação do OE, são responsáveis pela diferenciação na PC2 para a estação do inverno, período em que há um aumento na produção destes compostos, destacando esta estação das demais. É possível notar uma diferenciação da estação do outono em relação à do verão pela PC1, na qual os compostos responsáveis são β -copaeno (10) e espatulenol (26) para a estação do verão, enquanto para o outono destacam-se o cubebol (21), a elemicina (24) e o óxido de cariofileno (27) (A TABELA 30 traz o nome do composto com seu respectivo número do gráfico de loadings, anexo 1, página 121). Compostos responsáveis pela variância dos dados dos OEs de *P. aduncum* estão representados na FIGURA 17.

FIGURA 16 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE *P. aduncum*

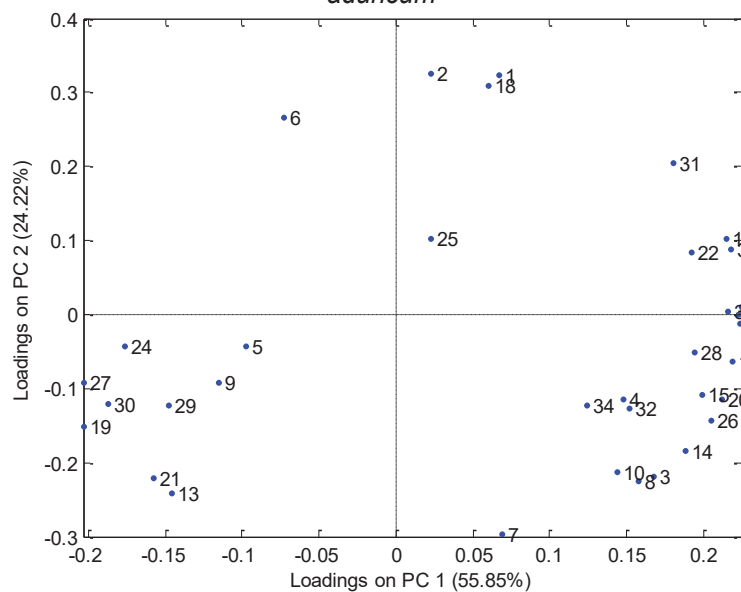
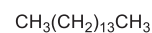
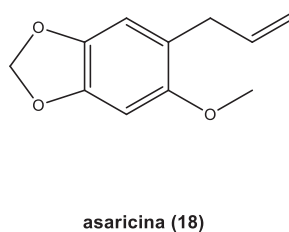
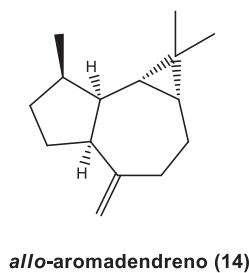
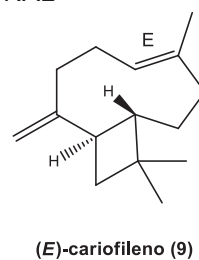
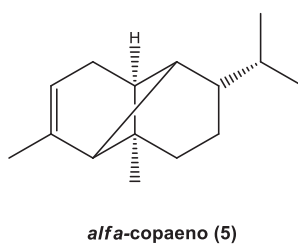
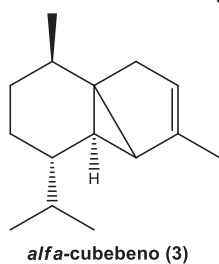
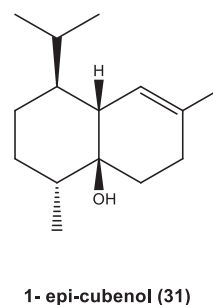
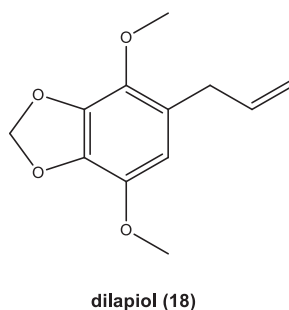
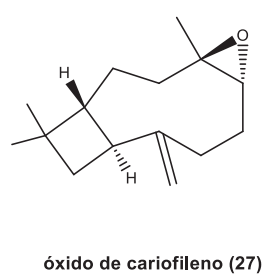


FIGURA 17 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *P. aduncum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL



n-pentadecano (19)

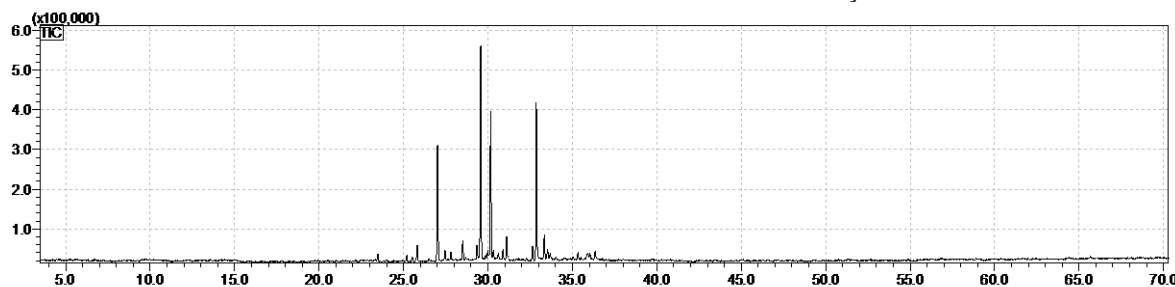


Fonte: ADAMS, 2017.

5.3 ANÁLISE DOS OEs DE *P. crassinervium*

A quantificação dos constituintes dos OEs de *P. crassinervium* foram realizadas com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo-se identificar 26 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 4, na qual está representada a média das análises em triplicata. O cromatograma da análise do OE das folhas na estação do inverno está na FIGURA 18.

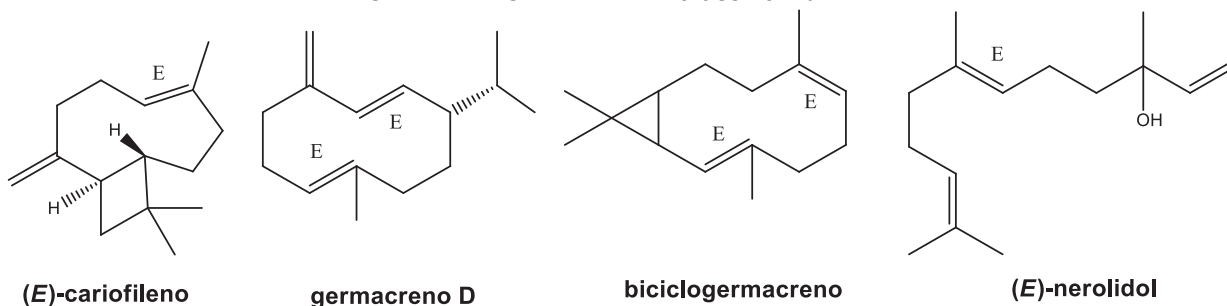
FIGURA 18 CROMATOGRAMA DE *P. crassinervium* NA ESTAÇÃO do INVERNO.



Foi identificada 92,74% da composição dos OEs de *P. crassinervium*. O germacreno D foi o composto majoritário na estação do inverno e na primavera ($24,66\% \pm 0,35$; $22,10\% \pm 0,76$ respectivamente) e com a maior concentração entre os compostos nas demais estações, em seguida o (*E*)-nerolidol teve sua maior concentração na estação do verão ($21,06\% \pm 2,34$), o (*E*)-cariofileno e biciclogermacreno com suas maiores concentrações na estação do outono ($12,20\% \pm 1,18$, e $18,35\% \pm 1,76$ respectivamente).

A FIGURA 19 mostra a estrutura dos compostos majoritários da estação do inverno, e este óleo foi selecionado para avaliação dos testes com os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp..

FIGURA 19 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NOS OEs DAS FOLHAS DE *P. crassinervium*.



Fonte: ADAMS, 2017.

TABELA 4 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OEs DE FOLHAS DE *Piper crassinervium*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

		<i>P. crassinervium</i>			Primavera			Verão			Outono			Inverno		
Nº	T _x	IA ¹	IA Adams ²	Composto	Média	DP		Média	DP		Média	DP		Média	DP	
1	25,20	1371	1374	α-copaeno	0,78	0,06		0,57	0,05		0,93	0,29		1,12	0,23	
2	25,53	1379	1387	β-bourboneno	-	-		0,47	0,03		0,48	0,42		0,89	0,61	
3	25,81	1386	1389	β-elemeno	1,40	0,27		1,55	0,23		1,93	0,22		4,39	5,65	
4	26,52	1402	1409	α-gurjuneno	0,12	0,21		0,30	0,06		0,00	0,00		0,70	0,66	
5	27,03	1414	1417	E- cariofileno	13,46	0,33		10,53	0,74		12,20	1,18		6,84	5,92	
6	27,46	1425	1430	β-copaeno	0,86	0,23		0,75	0,04		1,23	0,07		0,74	0,64	
7	27,80	1433	1439	aromadendreno	1,03	0,07		0,81	0,11		0,70	0,61		1,04	0,16	
8	28,51	1450	1452	α-humuleno	2,58	0,12		2,13	0,05		2,31	0,16		2,18	0,17	
9	28,69	1454	1458	allo-aromadendreno	0,16	0,28		0,43	0,03		0,00	0,00		0,34	0,32	
10	29,36	1470	1478	γ-muroleno	1,72	0,13		1,28	0,04		2,15	0,64		1,14	0,99	
11	29,57	1476	1480	germacreno D	22,10	0,76		19,78	1,07		21,71	0,39		24,66	0,35	
12	29,88	1483	1487	aristolocheno	0,36	0,32		0,45	0,07		0,46	0,42		0,33	0,30	
13	30,16	1490	1500	biciclogermacreno	15,50	1,20		13,07	2,92		16,03	0,81		13,39	0,75	
14	30,32	1494	1500	α-muroleno	1,26	0,15		0,53	0,46		1,44	0,23		0,16	0,28	
15	30,88	1508	1513	γ-cardineno	1,19	0,05		0,90	0,03		1,39	0,37		1,25	0,25	
16	31,11	1513	1522	α-cardineno	2,96	0,31		1,87	0,28		2,92	0,22		5,76	0,78	
17	31,22	1516	1521	trans-calameneno	0,00	0,00		0,29	0,05		0,00	0,00		0,00	0,00	
18	32,64	1552	1556	trans-douca-4(1''),7-dieno	1,51	0,06		1,05	0,14		1,76	0,09		1,67	0,24	
19	32,87	1558	1561	E-nerolidol	17,42	0,90		21,06	2,34		18,35	1,76		14,41	1,11	
20	33,34	1570	1577	espatulenol	3,88	0,98		5,90	2,06		3,91	0,72		3,64	0,30	
21	33,53	1575	1582	óxido de cariofileno	2,43	0,48		5,89	1,56		1,90	0,52		2,78	0,35	
22	33,69	1579	1590	globulol	1,02	0,38		0,98	0,13		0,65	0,62		0,82	0,71	
23	35,88	1636	1638	epi-α-cadinol	0,75	0,09		0,73	0,23		0,59	0,51		0,83	0,28	
24	35,93	1638	1640	epi-α-murolol	0,82	0,18		0,83	0,13		0,44	0,41		0,64	0,57	
25	36,04	1641	1644	α-murolol (=torreyol)	0,72	0,03		1,10	0,14		0,61	0,53		0,90	0,13	
26	36,34	1649	1652	α-cadinol	1,35	0,28		1,61	0,41		1,45	0,27		2,12	0,49	
Total identificado:					95,38	1,36		94,88	8,50		95,55	2,03		92,74	0,48	

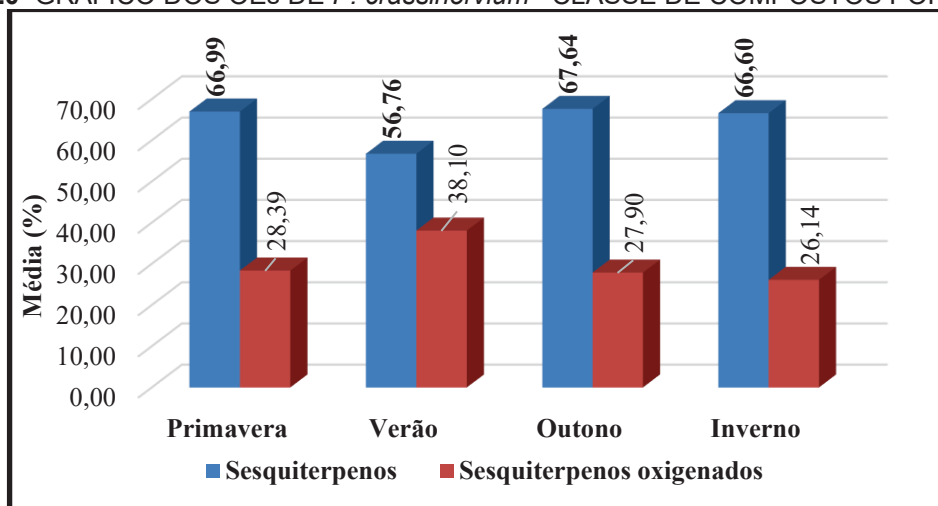
Período de coleta das Estações do ano

Classe de compostos	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sesquiterpenos	66,99	56,76	67,64	66,6
Sesquiterpenos oxigenados	28,39	38,1	27,9	26,14
Total	95,38	94,86	95,54	92,74

¹Índice aritmético calculado. ²Índice aritmético da literatura ([ADAMS, 2017](#)). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,02%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários

No gráfico (FIGURA 20) pode se observar a distribuição das classes dos compostos nos OEs de *P. crassinervium* nas estações do ano. Pelo gráfico observou-se que os sesquiterpenos são predominantes em todas as estações. No verão houve a predominância do (*E*)-nerolidol, e ocorre um aumento na produção dos sesquiterpenos oxigenados.

FIGURA 20 GRÁFICO DOS OEs DE *P. crassinervium*– CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO



5.3.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE *P. crassinervium*

Para os resultados da constituição química dos OEs obtidos de *P. crassinervium*, buscando-se uma melhor visualização das semelhanças e/ou diferenças entre as amostras nas diferentes estações do ano, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Nesta análise avaliaram-se os *scores* (FIGURA 21) e os *loadings* (FIGURA 22), nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos OEs de cada uma das amostras de cada estação.

No gráfico de *scores* dos OEs de *P. crassinervium*, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 44,56% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 40,10% totalizando 84,66% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os OEs extraídos em amostras de diferentes estações do ano, devido as suas componentes estarem cada uma em um quadrante do gráfico.

FIGURA 21 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE *P. crassinervium*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)

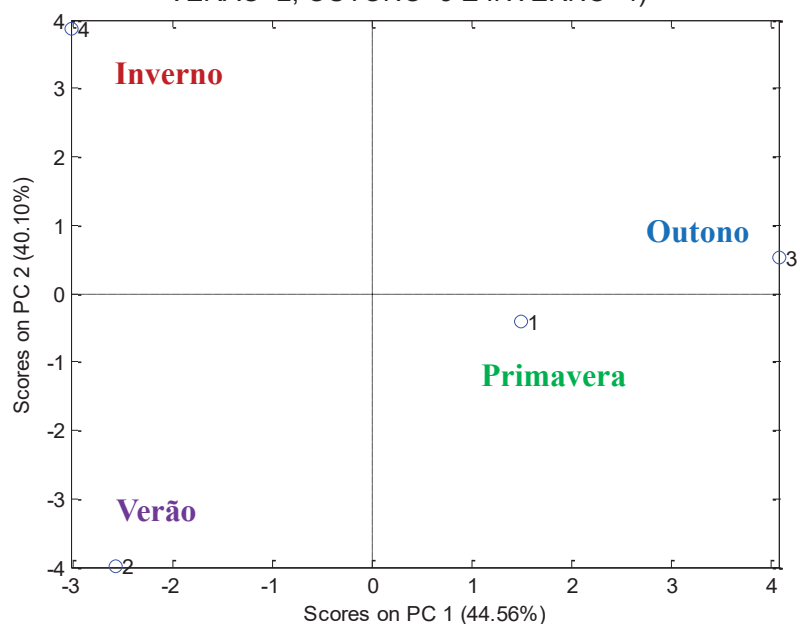
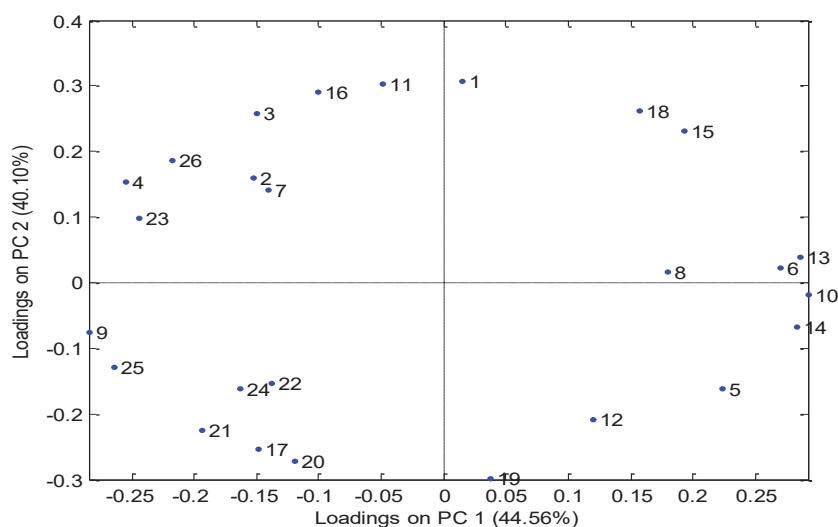


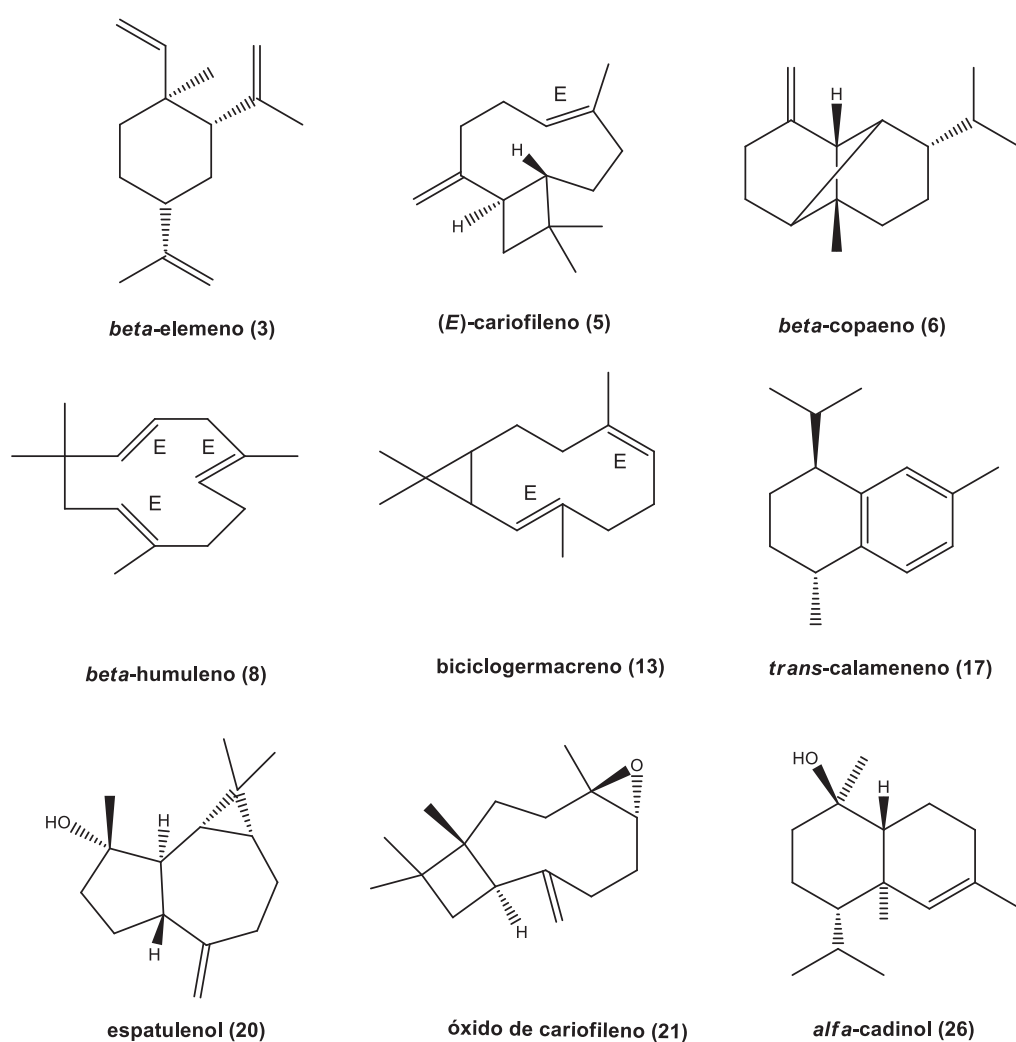
FIGURA 22 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE *P. crassinervium*



Pelo gráfico de *loadings* dos OEs de *P. crassinervium* podemos observar que os compostos (*E*)-cariofileno (5) e α -humuleno (8) são responsáveis pela diferença da composição do OE na estação da primavera, se comparado com as demais estações, devido a sua maior concentração nesta estação. E para a estação do verão, os compostos responsáveis pela variação foram o *trans*-calameneno (17), espatulenol (20) e o óxido de cariofileno (21); na estação do outono os responsáveis foram o β -

copaeno (6) e biciclogermacreno (13) e na estação do inverno β -elemeno (3) e o α -cadinol (26), nos quais se nota que a diferença entre as estações do verão e o outono está na variação da concentração dos sesquiterpenos oxigenados e sesquiterpenos respectivamente (TABELA 31 traz o nome do composto com seu respectivo número do gráfico de loadings, anexo 1, página 122). Os compostos responsáveis pela variância dos dados dos OEs de *P. crassinervium* estão representados na FIGURA 23.

FIGURA 23 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *P. crassinervium* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL

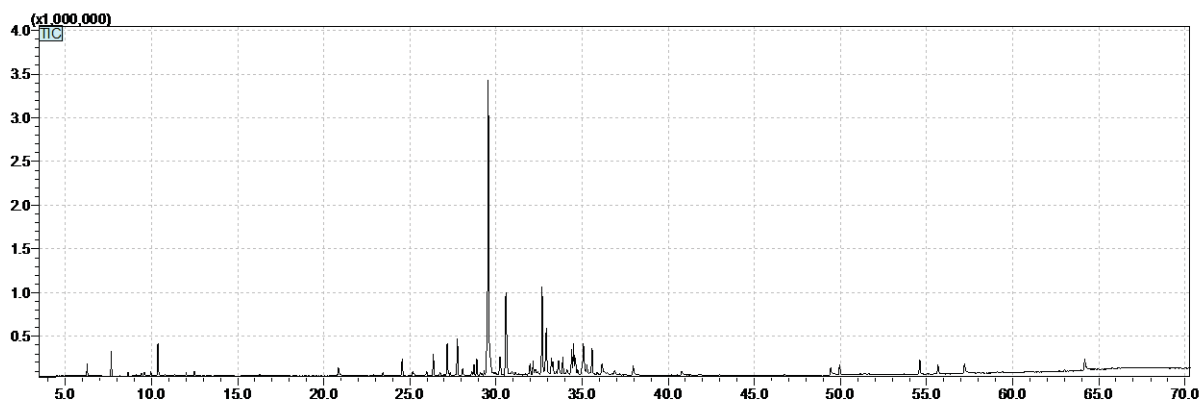


Fonte: ADAMS, 2017.

5.4 ANÁLISE DOS OEs DE *P. fuligineum*

A quantificação dos constituintes do OE de *P. fuligineum* foi realizada com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo-se identificar 40 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 5, na qual está representada a média das análises em triplicata. O cromatograma da FIGURA 24 representa a análise do OE na estação do inverno.

FIGURA 24 CROMATOGRAMA DE *P. fuligineum* NA ESTAÇÃO do INVERNO.



Foi identificada 82,13% da composição dos OEs de *P. fuligineum*. O composto majoritário na estação do verão, outono e inverno foi a asaricina ($28,48\% \pm 1,13$; $16,03\% \pm 1,43$; $9,49\% \pm 2,28$, respectivamente). Na estação da primavera o majoritário foi o globulol ($12,92\% \pm 0,23$) seguido do 10-epi- γ -eudesmol ($9,08\% \pm 0,35$).

Xiang e colaboradores (2017) mostraram o estudo de 19 espécies de *Piper*, e o isolamento de asaricina, sendo este composto o melhor resultado na inibição da enzima acetilcolinesterase que é relacionada ao mal de Alzheimer com uma dose de $IC_{50} 0,44 \pm 0,02$. Hematpoor e colaboradores (2017) mostraram a atividade repelente e anti inseticida contra *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica*, e *Plodia interpunctella*, de asaricina, isoasarona e *trans*-asarona isolados de extratos de *Piper sarmentosum* Roxb, sendo que a asaricina mostrou um bom resultado inseticida contra *Plodia interpunctella*.

A FIGURA 25 mostra a estrutura do composto majoritário da estação do verão, e este óleo foi selecionado para avaliação dos testes com os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp. devido a concentração do composto majoritário.

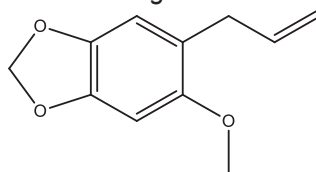
TABELA 5 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OES DE *Piper fuliginum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

<i>P. fuliginum</i>				Primavera		Verão		Outono		Inverno	
Nº	Tr	IA¹	IA²	Composto	Média (%)	DP	Média	DP	Média (%)	DP	Média (%)
1	6,265	932	932	α -pineno	0,13	0,11	0,49	0,06	0,68	0,17	0,20
2	7,667	976	974	β -pineno	0,22	0,19	1,26	0,31	1,22	0,26	0,40
3	8,650	1005	1002	α -felandreno	0,00	0,00	0,16	0,09	0,30	0,01	0,26
4	9,423	1024	1020	<i>p</i> -cimeno	0,05	0,05	0,11	0,05	0,19	0,02	0,14
5	9,593	1028	1024	limoneno	0,03	0,05	0,21	0,04	0,19	0,02	0,16
6	9,962	1038	1032	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	0,02	0,03	0,25	0,08	0,00	0,00	0,13
7	10,371	1048	1044	(<i>E</i>)- β -ocimeno	0,19	0,16	2,07	0,51	0,28	0,00	0,93
8	11,348	1072	1067	cis-óxido de linalol(furanoide)	0,00	0,00	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00
9	12,011	1088	1085	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno	0,00	0,00	0,19	0,05	0,03	0,04	0,00
10	12,497	1100	1095	linalol	0,82	0,59	0,38	0,17	0,06	0,03	1,24
11	20,846	1289	1285	safról	0,00	0,00	0,78	0,14	0,00	0,00	0,23
12	23,440	1350	1348	α -cubebeno	0,25	0,02	0,29	0,07	0,54	0,06	0,21
13	24,553	1376	1373	α -ylangeno	0,60	0,08	1,45	0,24	3,26	0,28	1,03
14	25,166	1390	1387	β -cubebeno	0,05	0,08	0,44	0,08	0,26	0,00	0,06
15	25,974	1410	1409	α -gujuneno	1,28	0,14	0,43	0,11	0,37	0,07	0,97
16	26,363	1419	1417	<i>E</i> -cariofileno	3,07	0,17	1,87	0,20	2,13	0,19	3,88
17	26,765	1429	1430	β -copaeno	0,39	0,13	0,31	0,03	0,42	0,02	0,53
18	27,167	1439	1439	aromadendreno	3,64	0,26	3,00	0,36	4,06	0,33	3,13
19	27,760	1454	1452	α -humuleno	6,29	0,23	3,15	0,27	3,16	0,22	6,44
20	28,068	1461	1458	<i>allo</i> -aromadendreno	1,35	0,12	0,68	0,09	0,74	0,08	1,02
21	28,599	1474	1471	dauca-5,8-dieno	0,10	0,18	0,41	0,04	0,36	0,13	0,32
22	28,725	1477	1475	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	0,90	0,12	0,91	0,08	1,31	0,14	1,16
23	28,888	1481	1478	γ -muuroleno	2,08	0,10	1,37	0,11	0,63	0,06	3,35
24	29,316	1492	1492	<i>cis</i> - β -guaieno	0,77	0,03	0,37	0,08	0,39	0,06	0,72
25	29,553	1498	1495	<i>asaricina</i>	6,02	0,14	28,48	1,13	16,03	1,43	9,49
26	30,223	1515	1513	γ -cardineno	1,20	0,18	2,23	0,17	2,19	0,19	1,30
27	30,576	1524	1522	δ -cadineno	3,36	0,17	10,11	0,69	9,58	0,12	5,05
28	30,929	1533	1533	<i>trans</i> -cardina-1,4-dieno	0,00	0,00	0,26	0,02	0,30	0,04	0,15
29	31,138	1539	1537	α -cardineno	0,29	0,08	0,19	0,02	0,36	0,04	0,22
30	32,152	1565	1563	(<i>E</i>)-nerolidol	1,02	0,04	0,96	0,30	0,96	0,02	1,22
31	32,276	1568	1567	palustrol	1,72	0,08	0,31	0,12	0,39	0,01	1,10
32	32,679	1578	1577	<i>espatulenol</i>	4,37	0,06	7,50	0,32	10,61	0,01	5,93
33	32,921	1585	1590	<i>globulol</i>	12,92	0,23	5,22	0,29	6,96	0,10	9,30
34	33,312	1595	1595	cubeban-11-ol	4,87	0,17	0,95	0,32	0,93	0,06	2,86
35	33,632	1603	1600	rosifolol	5,99	0,12	1,53	0,28	1,55	0,07	3,86
36	33,876	1610	1608	epóxido de humuleno II	2,84	0,18	1,48	0,16	2,87	0,03	2,17
37	34,397	1624	1622	10-epi- γ -eudesmol	9,08	0,35	2,16	0,09	1,80	0,03	5,84
38	34,505	1627	1620	dilapiol	0,00	0,00	2,21	0,63	2,15	0,10	0,71
39	35,073	1642	1644	α -muurolol (=torreyol)	3,66	0,17	3,46	0,61	4,79	0,12	3,42
40	35,577	1656	1652	α -cadinol	2,97	0,29	2,23	0,14	2,33	0,10	3,00
Total identificado:					82,55	0,13	89,94	0,76	84,30	0,34	82,13
											1,93

Classe de compostos	Período de coleta das Estações do ano			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Monoterpenos	0,64	4,74	2,87	2,22
Monoterpenos oxigenados	0,82	0,44	0,06	1,24
Sesquiterpenos	28,47	28,96	32,89	31,71
Sesquiterpenos oxigenados	46,59	24,33	30,30	36,52
Arilpropanoides	6,02	31,47	18,18	10,43
Total	82,55	89,94	84,30	82,13

¹Índice aritmético calculado.²Índice aritmético da literatura ([ADAMS, 2017](#)). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,01%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários

FIGURA 25 ESTRUTURA QUÍMICA DO COMPOSTO MAJORITÁRIO IDENTIFICADO NOS OEs DE *P. fuligineum*.



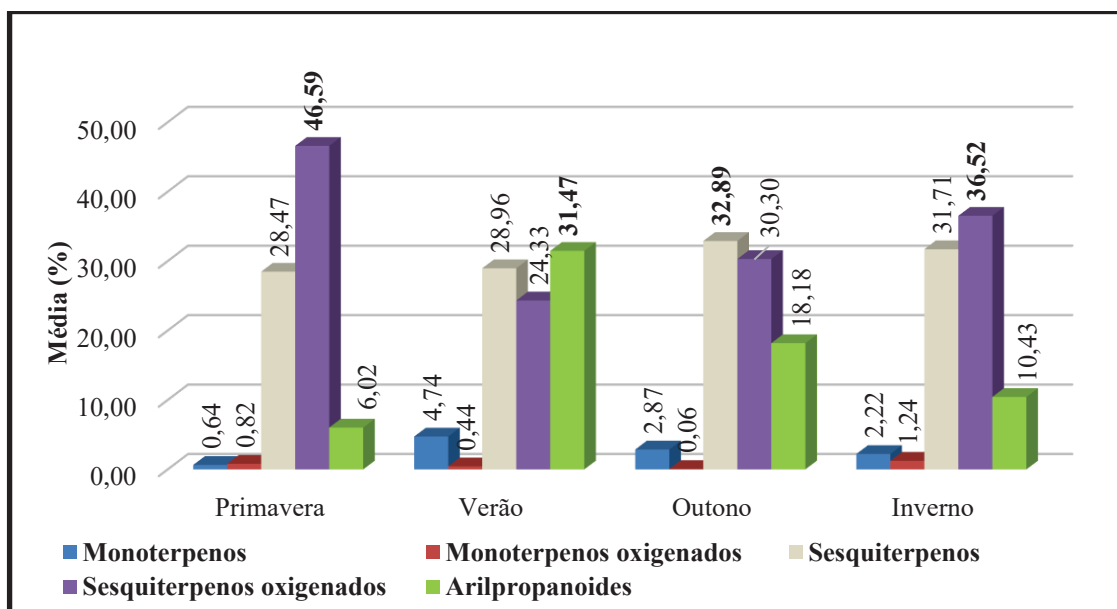
Asaricina

Fonte: ADAMS, 2017.

Na literatura encontramos poucos trabalhos com *P. fuligineum*. Até o presente momento podemos notar que a composição dos OEs desta espécie é composta majoritariamente por sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, e, isso pode ser observado na FIGURA 26.

Pelo gráfico podemos observar uma diferença entre as estações da primavera com as demais estações, sendo que no verão há uma predominância de sesquiterpenos oxigenados, e observa-se uma menor produção de sesquiterpenos e maior produção de arilpropanoides, sendo que nesta estação a asaricina é o majoritário.

FIGURA 26 GRÁFICO DOS OEs DE *P. fuligineum* – CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.



5.4.1 ANÁLISE SAZONAL DOS OEs DE *P. fuligineum*

Para os resultados da constituição química dos OEs obtidos de *P. fuligineum*, buscando-se uma melhor visualização das semelhanças e/ou diferenças entre as amostras nas diferentes estações do ano, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Nesta análise avaliaram-se os *scores* (FIGURA 27) e os *loadings* (FIGURA 28), nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos OEs de cada uma das amostras de cada estação.

No gráfico de *scores* dos OEs de *P. fuligineum*, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 63,20% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 24,76% totalizando 87,96% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os OEs extraídos em amostras de diferentes estações do ano, devido as suas componentes estarem cada uma em um quadrante do gráfico.

FIGURA 27 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE *P. fuligineum*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)

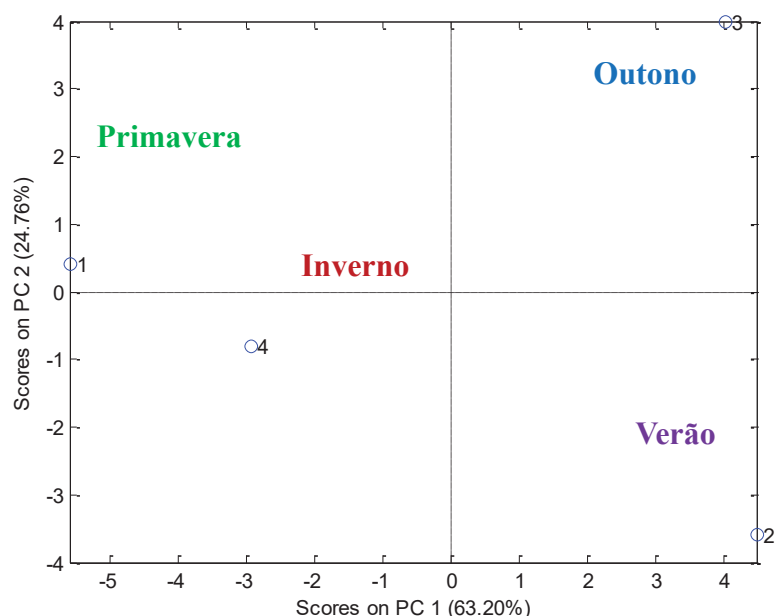
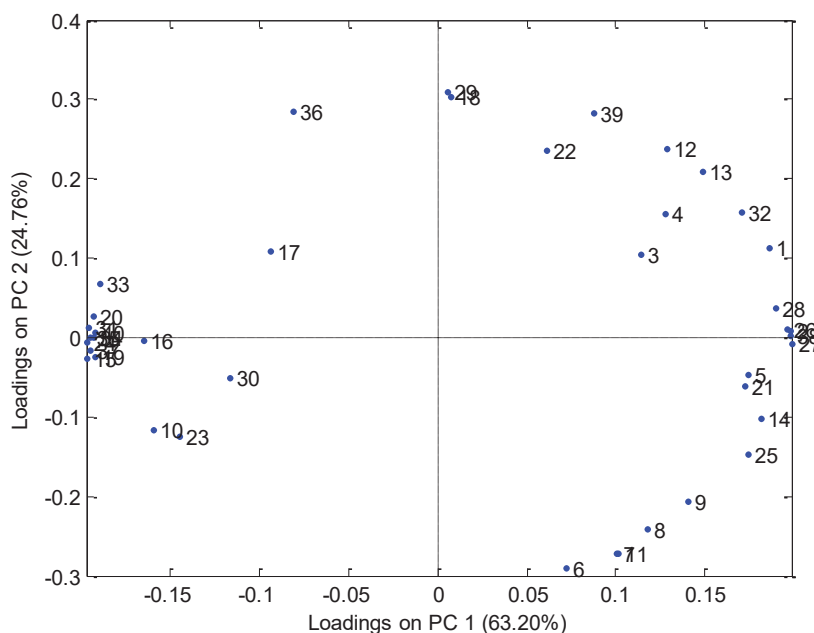
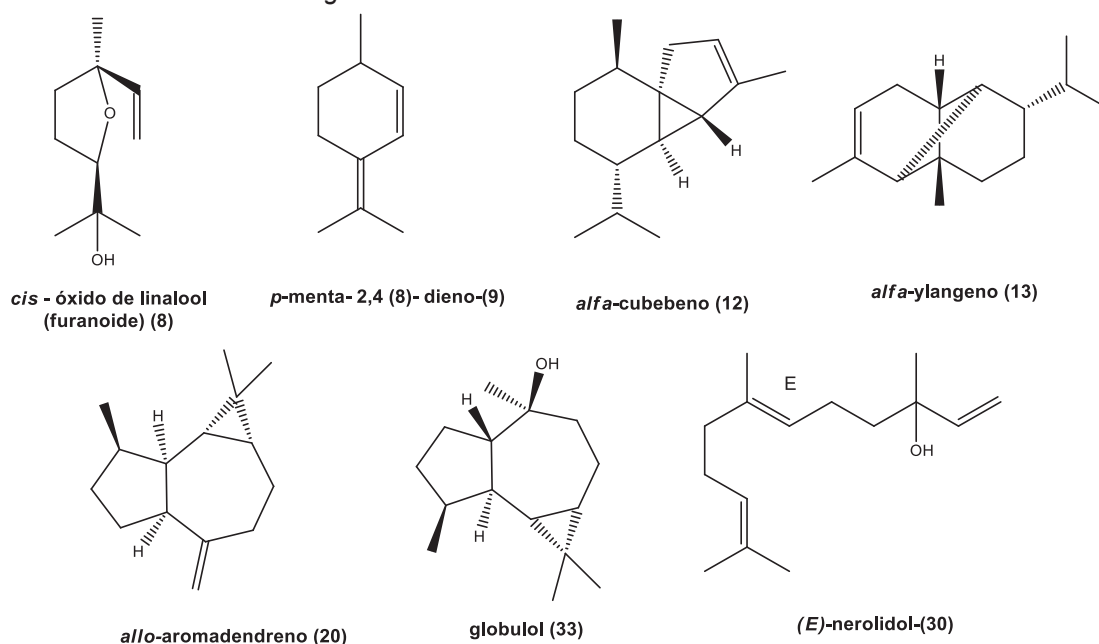


FIGURA 28 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE *P. fuligineum*



Pelo gráfico de *loadings* dos OEs de *P. fuligineum* podemos observar que os compostos *allo*-aromadendreno (20) e globulol (33) são os responsáveis pela diferença da composição do OE na estação da primavera com as estações de verão e outono pela PC1, devido a sua maior concentração nesta estação destes compostos. E para a estação do verão, os compostos responsáveis pela variação foram o *cis*-óxido de linalool (furanoide) (8), *p*-menta- 2, 4 (8) –dieno (9) e a asaricina (25); para a estação do outono os responsáveis foram o α -cubebeno (12) e α -ylangeno (13) e na estação do inverno o (*E*)-nerolidol (30) (TABELA 32 traz o nome do composto com seu respectivo número do gráfico de loadings, anexo 1, página 123). Os compostos responsáveis pela variância dos dados dos OEs de *P. fuligineum* estão representados na FIGURA 29.

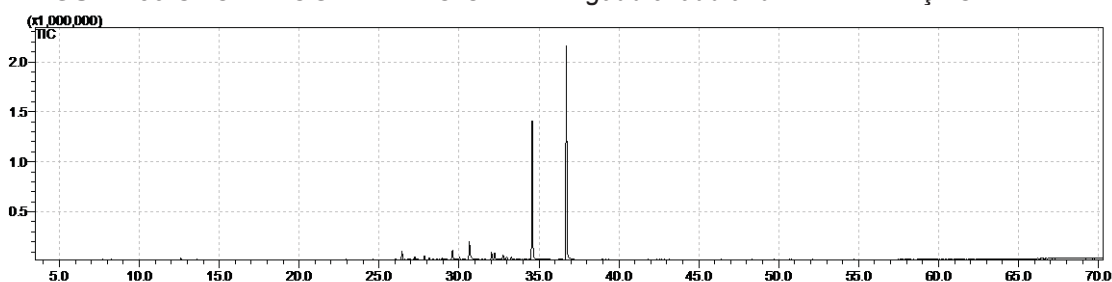
FIGURA 29 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *P. fuligineum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL



5.5 ANÁLISE DOS OEs DE *P. gaudichaudianum*

A quantificação dos constituintes do OEs de *P. gaudichaudianum* foi realizada com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo-se identificar 22 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 6, na qual está representada a média das análises em triplicata. A FIGURA 30 mostra o cromatograma da análise do OE na estação do inverno.

FIGURA 30 CROMATOGRAMA DO OE DE *P. gaudichaudianum* NA ESTAÇÃO do INVERNO.

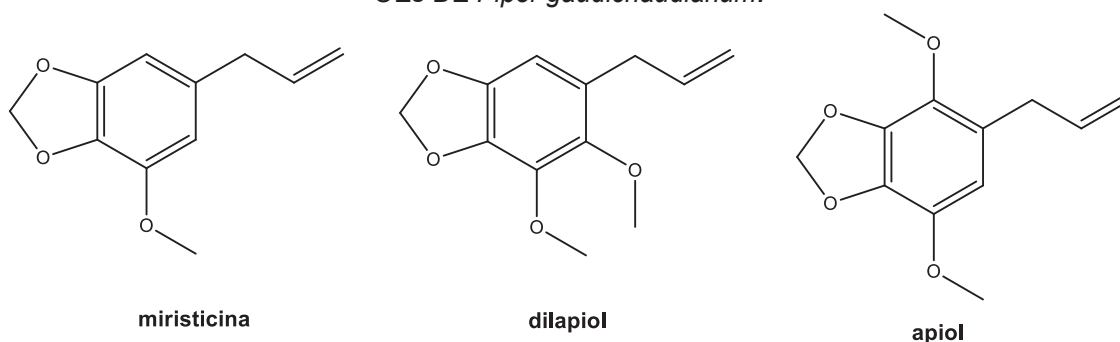


Foi identificada 88,45% da composição dos OEs de *P. gaudichaudianum*. A literatura mostra que os arilpropanoides são a classe de compostos majoritários dos OEs de *P. gaudichaudianum* sendo o dilapiol (87,8%) o composto majoritário conforme descrito no trabalho de Schindler e Heinzmann (2017), o que corrobora com

a elucidação dos OEs de *P. gaudichaudianum* deste trabalho que têm os arilpropanoides como a classe de compostos predominantes, sendo o dilapiol majoritário na estação do verão. Pela análise da composição, foi possível observar que entre as estações há diferenças na produção dos arilpropanoides, como por exemplo na estação do verão o majoritário é o dilapiol ($56,47\% \pm 2,44$), e na estação de outono a miristicina ($31,16\% \pm 1,91$) e no inverno o apiol ($44,04\% \pm 4,45$). Isso mostra que estudos de sazonalidade são importantes para se compreender a produção de compostos do metabolismo especial, mostrando que fatores abióticos influenciam sua produção (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A FIGURA 31 mostra a estrutura dos compostos majoritários da estação do outono, e este óleo foi selecionado para avaliação dos testes com os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp. devido a concentração dos compostos majoritários.

FIGURA 31 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *Piper gaudichaudianum*.



Fonte: ADAMS, 2017.

A FIGURA 32 traz um gráfico, no qual podemos observar a distribuição da classe dos compostos nos OEs nas estações do ano. Pelo gráfico observou-se a predominância dos arilpropanoides em todas as estações.

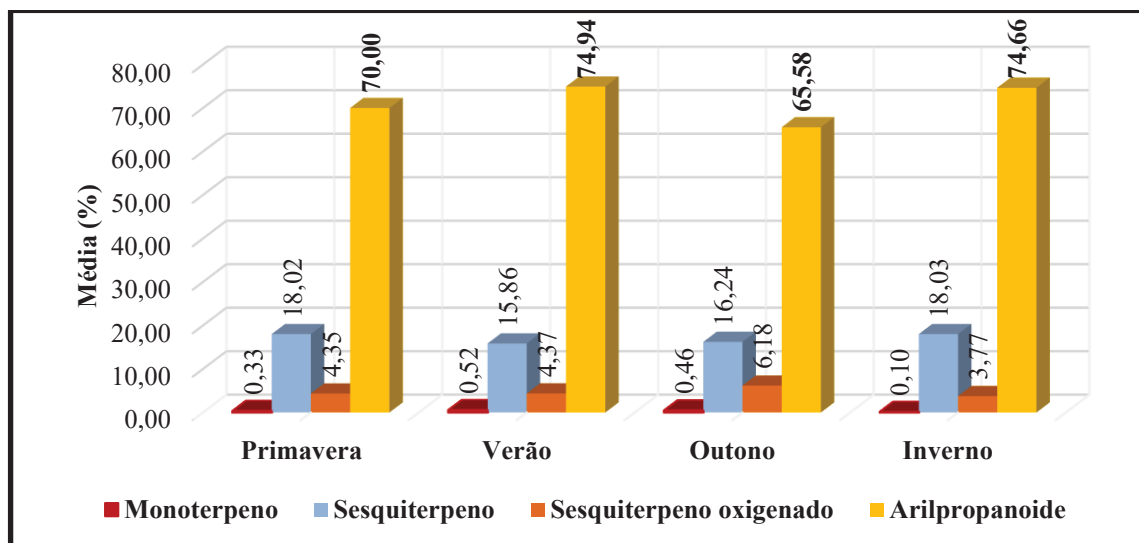
TABELA 6 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO OE DE *Piper gaudichaudianum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

<i>P. gaudichanianum</i>			Primavera		Verão		Outono		Inverno	
Nº	Tr	IA ¹	IA ²	Composto	Média %	DP	Média %	DP	Média %	DP
1	6,298	932	932	α-pineno	0,17	0,13	0,15	0,06	0,13	0,11
2	7,708	976	974	β-pineno	0,16	0,02	0,38	0,08	0,33	0,06
3	24,620	1376	1374	α-copaeno	0,48	0,19	0,15	0,10	0,39	0,12
4	26,038	1409	1409	α-gurjuneno	0,22	0,07	0,09	0,08	0,56	0,21
5	26,431	1418	1417	E- cariofileno	5,70	0,55	4,40	0,16	3,51	0,88
6	26,840	1428	1430	β-copaeno	0,39	0,12	0,23	0,06	0,31	0,08
7	27,234	1439	1439	aromadendreno	1,12	0,27	1,83	0,05	1,06	0,24
8	27,827	1454	1452	α-humuleno	1,05	0,10	1,03	0,04	1,39	0,26
9	28,132	1461	1458	allo-aromadendreno	2,36	0,25	0,76	0,13	0,74	0,22
10	28,780	1477	1478	γ-muroleno	0,15	0,04	0,11	0,09	0,25	0,06
11	28,956	1481	1480	germacreno D	1,09	0,18	0,79	0,03	1,54	0,26
12	29,595	1497	1500	biciclogermacreno	4,27	0,32	5,77	0,34	4,46	1,09
13	29,755	1501	1500	α-muroleno	0,26	0,06	0,11	0,10	0,43	0,10
14	30,029	1508	1511	δ-amorfeno	0,45	0,18	0,34	0,05	1,42	0,41
15	30,623	1523	1517	miristicina	30,20	2,59	4,56	1,34	31,16	1,91
16	31,417	1544	1544	α-colacoreno	0,48	0,10	0,24	0,07	0,18	0,12
17	32,032	1560	1555	elemicina	1,76	0,02	1,14	0,09	2,20	0,48
18	32,224	1565	1561	E-nerolidol	2,42	0,22	2,77	0,17	3,23	0,46
19	32,751	1578	1577	espatulenol	1,61	0,12	1,34	0,04	1,92	0,01
20	33,730	1604	1602	ledol	0,32	0,29	0,25	0,27	1,03	0,14
21	34,572	1627	1620	dilapiol	16,35	0,82	56,47	2,44	15,20	1,21
22	36,706	1685	1677	apiol	21,69	4,51	12,76	0,89	17,02	2,21
TOTAL					92,70	1,25	95,69	2,1	88,45	1,12
									96,52	1,60

Classe de compostos		Período de coleta das Estações do ano			
		Primavera	Verão	Outono	Inverno
Monoterpenos		0,33	0,52	0,46	0,10
Sesquiterpenos		18,02	15,86	16,24	18,03
Sesquiterpenos oxigenados		4,35	4,37	6,18	3,77
Arlpropanoídes		70,00	74,94	65,58	74,66
Total		92,70	95,69	88,45	96,56

Índice aritmético calculado.²Índice aritmético da literatura ([ADAMS, 2017](#)). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,01%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários.

FIGURA 32 GRÁFICO DOS OEs DE *P. gaudichaudianum*– CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.



5.5.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE *P. gaudichaudianum*

Para os resultados da constituição química dos OEs obtidos de *P. gaudichaudianum*, buscando-se uma melhor visualização das semelhanças e/ou diferenças entre as amostras nas diferentes estações do ano, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Nesta análise avaliaram-se os *scores* (FIGURA 33) e os *loadings* (FIGURA 34) obtidos, nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos OEs de cada uma das amostras de cada estação.

No gráfico de *scores* dos OEs, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 50,60% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 30,96% totalizando 80,56% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os OEs extraídos em amostras de diferentes estações do ano, devido as suas componentes estarem cada uma em um quadrante do gráfico (FIGURA 33). Notamos pela PC1 a diferença dos OEs da estação do inverno e do outono e a diferença da estação do verão e da primavera. Pela PC2 é evidenciado a diferença da estação do inverno e do verão e da estação do outono e da primavera. As componentes responsáveis pela distribuição das estações no gráfico de *scores* estão representadas no gráfico de *loadings*.

FIGURA 33 . GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE *P. gaudichaudianum*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)

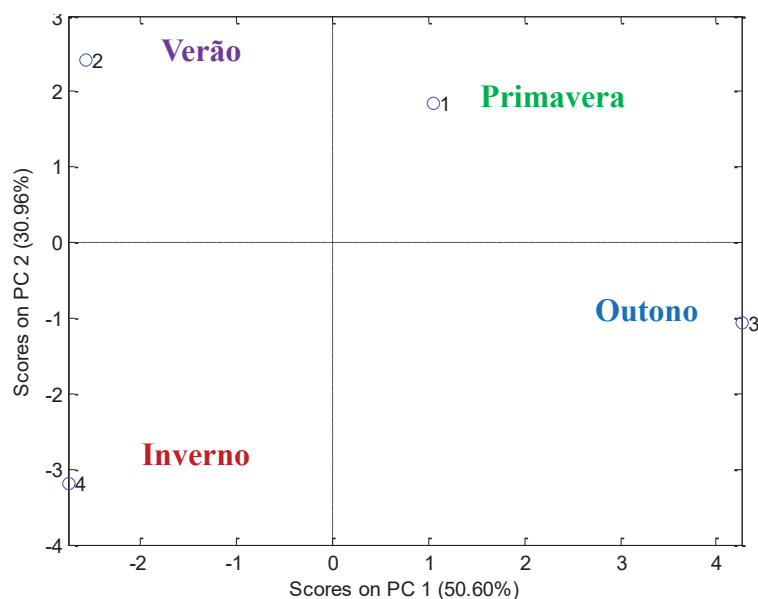
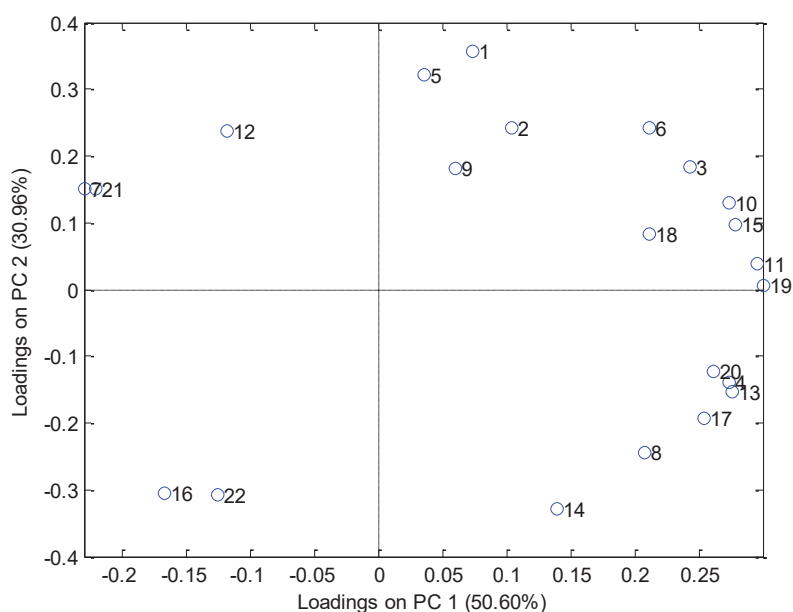


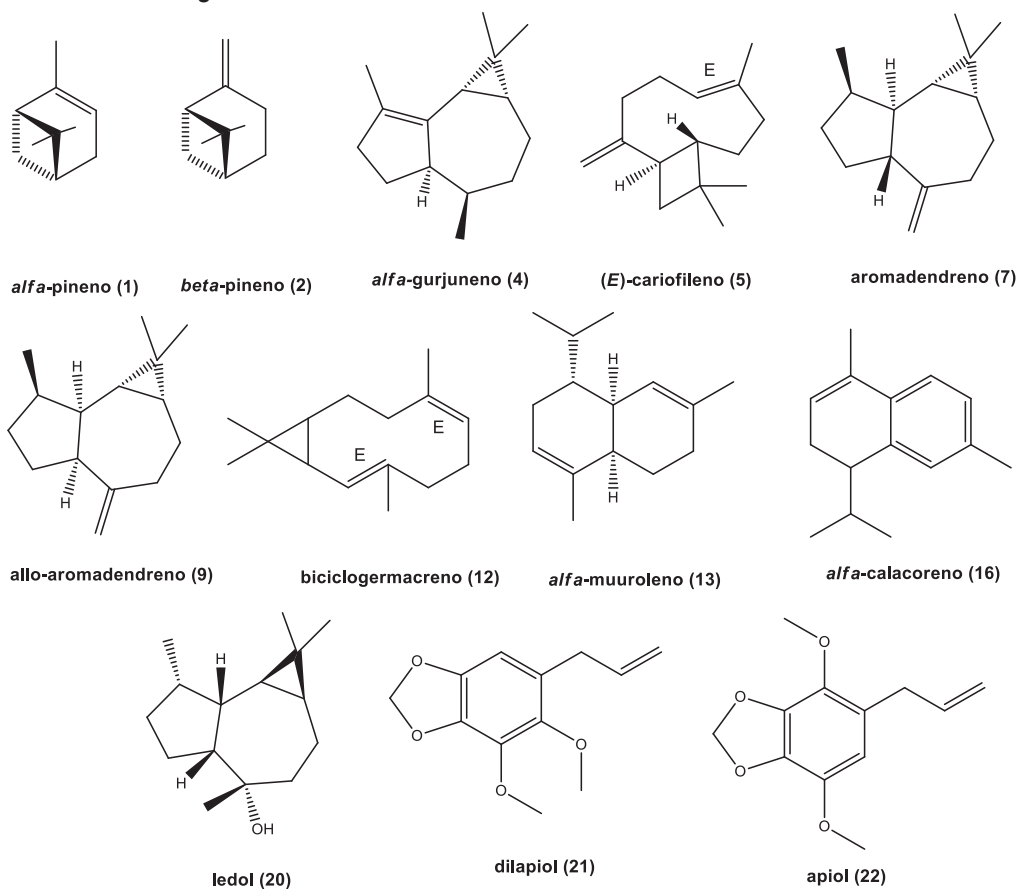
FIGURA 34 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE *P. gaudichaudianum*.



Pelo gráfico de *loadings* dos OEs *P. gaudichaudianum* podemos observar que os compostos α -pineno (1), β -pineno (2) e (*E*)-cariofileno (5) são responsáveis pela diferença da composição do OE na estação da primavera, se comparado com as demais estações, devido a sua maior concentração nesta estação. E para a estação do verão, os compostos responsáveis pela variação foram o aromadendreno (7),

biciclogermacreno (12) e o apiol (21), na estação do outono os responsáveis foram o α -gurjuneno (4), α -muuroleno (13) e ledol (20), e na estação do inverno o α -calacoreno (16) (TABELA 33 traz o nome do composto com seu respectivo número do gráfico de loadings, anexo 1, página 124). Os compostos responsáveis pela variância dos dados dos OEs de *P. gaudichaudianum* estão representados na FIGURA 35.

FIGURA 35 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *P. gaudichaudianum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL

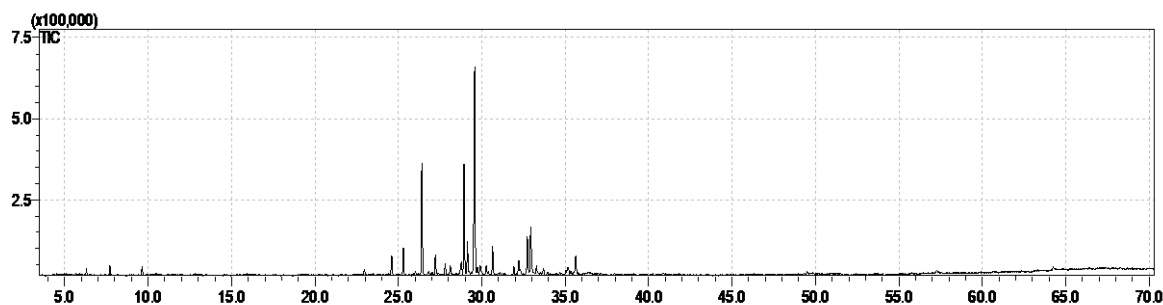


Fonte: ADAMS, 2017.

5.6 ANÁLISE DOS OEs DE *P. lhotzkyanum*

A quantificação dos constituintes do OE de *P. lhotzkyanum* foi realizada com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo-se identificar 25 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 7, na qual está representada a média das análises em triplicata. A FIGURA 36 mostra o cromatograma da análise do OE na estação do inverno.

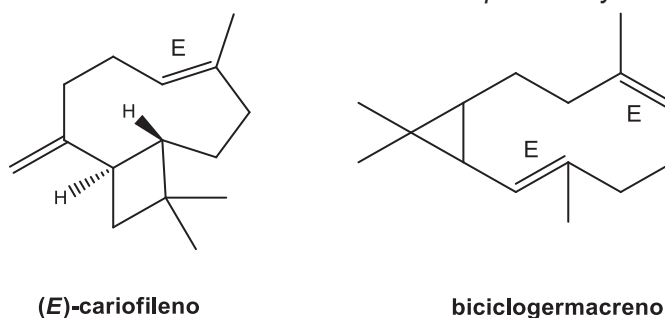
FIGURA 36 CROMATOGRAMA DO OE DE *P. Ihotzkyanum* NA ESTAÇÃO do INVERNO.



Foi identificada 85,53% da composição dos OEs de *P. Ihotzkyanum*. O biciclogermacreno foi o composto majoritário na estação do outono ($32,98\% \pm 1,80$) e com a maior concentração entre os compostos nas estações da primavera e inverno, no verão o composto majoritário foi o óxido de cariofileno ($18,35\% \pm 2,72$), seguido do biciclogermacreno ($18,02\% \pm 3,16$) e o espatulenol ($12,21\% \pm 2,52$).

A FIGURA 37 mostra a estrutura dos compostos majoritários da estação da primavera, e este óleo foi selecionado para avaliação dos testes com os fitopatógenos *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum* sp. devido a concentração dos compostos majoritários.

FIGURA 37 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Piper Ihotzkyanum*



Fonte: ADAMS, 2017.

A FIGURA 38 mostra o gráfico, no qual pode-se analisar a distribuição das classes dos compostos nos OEs nas estações do ano. É possível observar a predominância da classe dos sesquiterpenos nas suas composições nas 4 estações climáticas do ano, com uma diferença apenas na estação do verão, em que há um aumento significativo na produção de sesquiterpenos oxigenados.

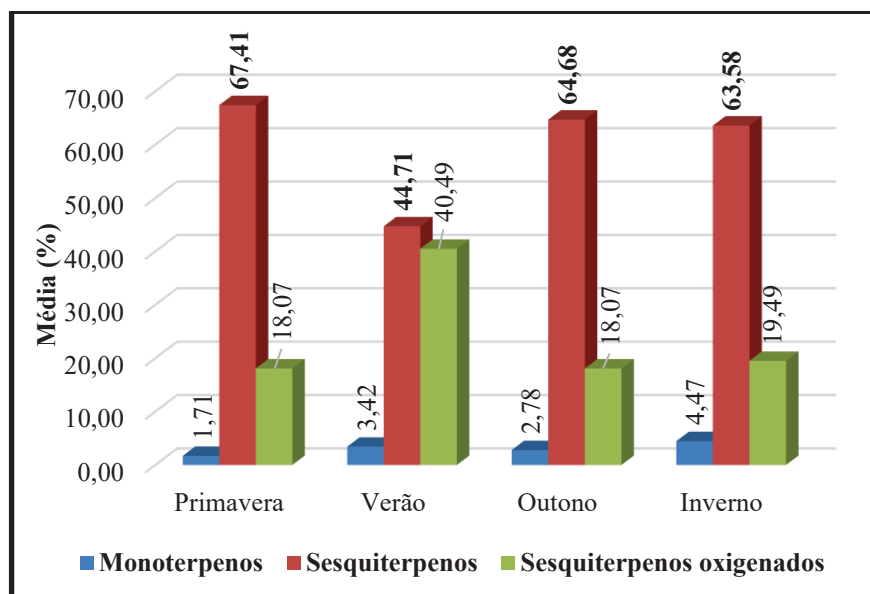
TABELA 7 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO OE DE *Piper hotzknyanum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

<i>P. hotzknyanum</i>			Primavera		Verão		Outono		Inverno	
Nº	Tx	IA ¹	IA ²	Composto	Média (%)	DP	Média (%)	DP	Média (%)	DP
1	6,290	931	932	α -pineno	0,44	0,08	0,82	0,24	0,63	0,62
2	7,693	975	974	β -pineno	0,65	0,15	1,14	0,20	1,08	1,09
3	9,623	1027	1024	limoneno	0,62	0,20	1,46	0,39	1,07	0,94
4	24,591	1397	1374	α -copaeno	2,01	0,19	1,21	0,06	1,43	0,12
5	25,288	1414	1389	β -elemeno	2,64	0,12	2,12	0,16	2,95	0,57
6	26,015	1375	1409	α -gurjuneno	0,44	0,11	0,24	0,12	0,48	0,08
7	26,400	1391	1417	E- cariofileno	11,85	0,41	8,11	0,29	9,96	0,37
8	26,805	1428	1439	aromadendreno	0,38	0,20	0,71	0,63	0,35	0,09
9	27,804	1452	1452	α -humuleno	1,18	0,05	1,02	0,03	0,97	0,03
10	28,102	1460	1458	<i>allo</i> -aromadendreno	0,99	0,14	0,94	0,15	1,20	0,06
11	28,931	1480	1480	germacreno D	11,77	0,96	5,32	1,14	6,07	0,30
12	29,132	1485	1487	aristochoeno	4,17	0,13	3,00	0,26	3,75	0,26
13	29,566	1496	1500	biciclogermacreno	26,15	0,68	18,02	3,16	32,98	1,80
14	29,739	1500	1500	α -muuroleno	0,83	0,06	0,77	0,11	0,87	0,10
15	30,279	1513	1513	γ -cardineno	1,05	0,04	1,02	0,08	0,87	0,12
16	30,637	1523	1522	α -cardineno	3,07	0,05	1,58	0,48	2,23	0,23
17	31,917	1556	1556	<i>trans</i> -douca-4(11),7-dieno	0,90	0,04	0,65	0,09	0,58	0,05
18	32,721	1577	1577	espatulenol	4,56	0,12	12,21	2,52	6,68	0,49
19	32,918	1582	1582	óxido de cariofileno	7,31	0,57	18,35	2,72	6,18	0,13
20	33,694	1602	1600	rosifoliol	0,92	0,15	1,20	0,27	0,73	0,14
21	33,917	1608	1608	epóxido de humuleno II	0,32	0,01	1,30	0,26	0,29	0,05
22	35,035	1639	1636	β -acorenil	0,61	0,03	1,65	0,27	1,15	0,80
23	35,169	1642	1645	cubenol	1,39	0,19	1,47	0,12	0,85	0,35
24	35,334	1647	1644	α -muurolol (=torreyol)	0,32	0,02	1,42	0,14	0,20	0,03
25	35,628	1655	1658	selin-11-en-4- α -ol	2,63	0,11	2,88	0,17	1,98	0,34
Total identificado:					87,19	1,54	88,61	1,00	85,53	1,17

Período de coleta das Estações do ano				
Classe de compostos	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Monoterpenos	1,71	3,42	2,78	4,47
Sesquiterpenos	67,41	44,71	64,68	63,58
Sesquiterpenos oxigenados	18,07	40,49	18,07	19,49
Total	87,19	88,61	85,53	87,54

¹Índice aritmético calculado. ²Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,01%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários

FIGURA 38 GRÁFICO DOS OEs DE *P. lhotzkyanum* - CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO POR ESTAÇÃO.

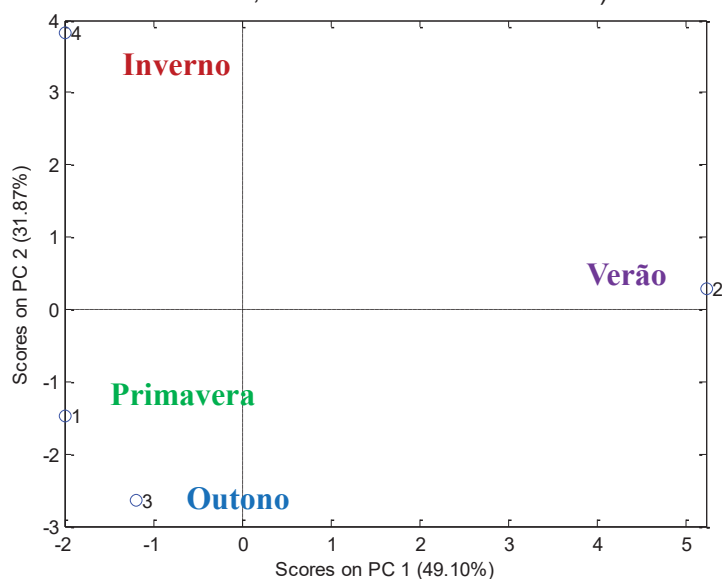


4.6.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE *P. lhotzkyanum*

Para os resultados da constituição química dos OEs obtidos de *P. lhotzkyanum*, buscando-se uma melhor visualização das semelhanças e/ou diferenças entre as amostras nas diferentes estações do ano, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Nesta análise avaliaram-se os *scores* (FIGURA 39) e os *loadings* (FIGURA 40) obtidos, nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos OEs de cada uma das amostras de cada estação.

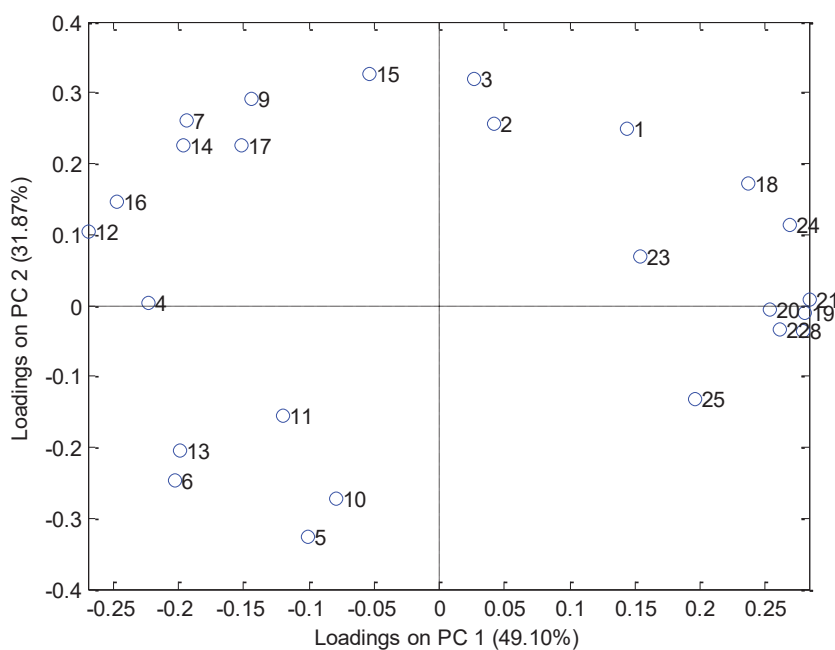
No gráfico de *scores* dos OEs de *P. lhotzkyanum*, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 49,10% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 37,87% totalizando 80,97% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os OEs extraídos em amostras de diferentes estações do ano, e observou-se algumas similaridades na composição de duas estações outono e primavera não havendo variância significativa nas mesmas, devido ao fato de estarem no mesmo quadrante, conforme observado no gráfico.

FIGURA 39 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE *P. lhotzkyanum*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)



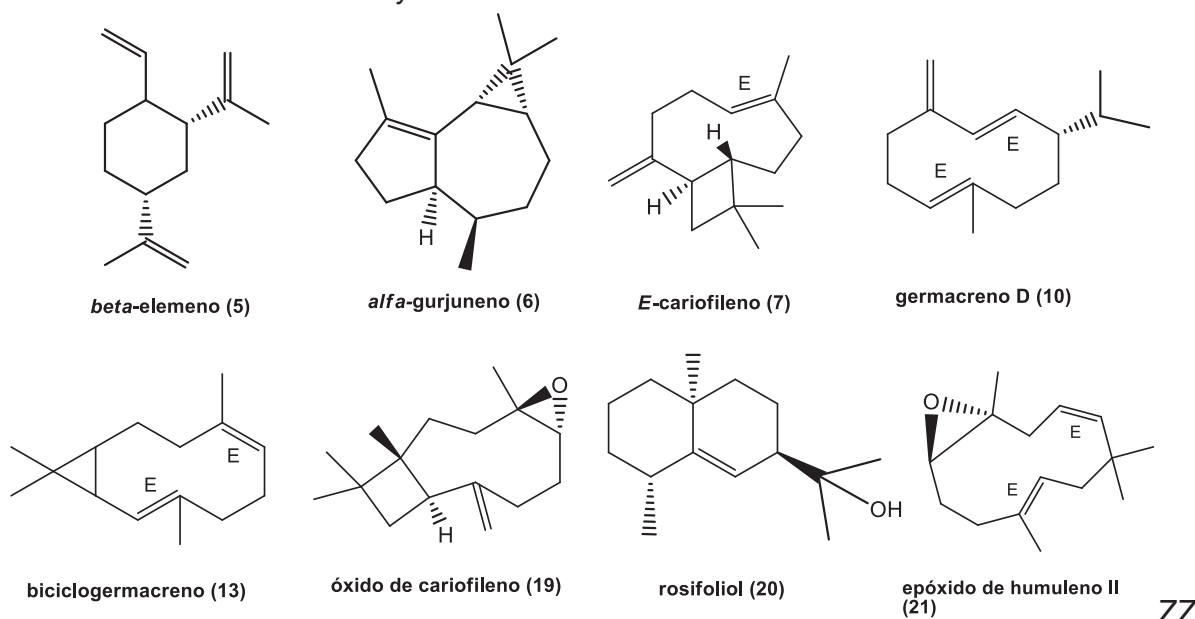
Através da PC1 observa-se a diferença da estação do verão das demais estações pela diferença na composição dos OEs que se distingue das demais. Através da PC2 nota-se a variância da estação do inverno com as demais estações. As componentes responsáveis pela distribuição e diferenciação das estações no gráfico de *scores* estão representadas no gráfico de *loadings*.

FIGURA 40 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE *P. lhotzkyanum*.



Embora as estações da primavera e do outono estejam próximas, há uma pequena variância entre elas, pelo gráfico de *loadings* do OEs o composto germacreno D (11) é o responsável pela variação na estação da primavera; os compostos α -gurjuneno (6) e biciclogermacreno (13) são responsáveis pela diferença da composição do OE na estação do outono se comparado com as demais estações, devido a sua maior concentração nesta estação. Para o inverno o *E*-cariofileno (7). E para a estação do verão, os compostos responsáveis pela variação foram o óxido de cariofileno (19), rosifoliol (20) e epóxido de humuleno II (21) (TABELA 34 traz o nome do composto com seu respectivo número do gráfico de loadings, anexo 1, página 125). Os compostos responsáveis pela variância dos dados dos OEs de *P. lhotzkyanum* estão representados na FIGURA 41.

FIGURA 41 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *P. lhotzkyanum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL



Fonte: ADAMS, 2017.

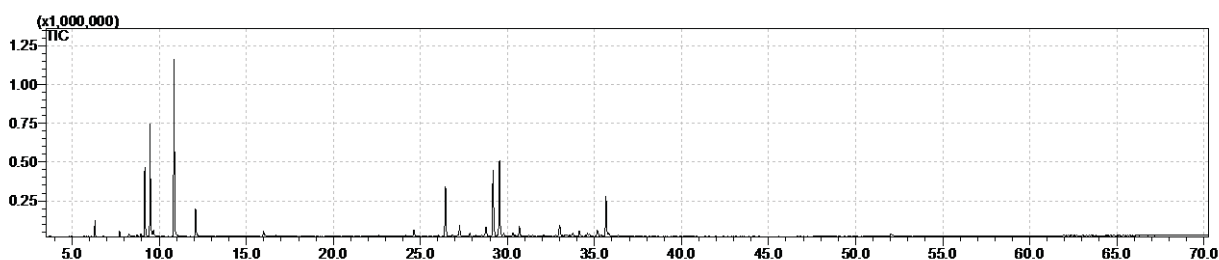
5.7 ANÁLISE DOS OEs DE *P. malacophyllum*

A quantificação dos constituintes do OE de *P. malacophyllum* foi realizada com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo-se identificar 37 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 8, na

qual está representada a média das análises em triplicata. A FIGURA 42 é referente ao cromatograma mostra a análise do OEs na estação do inverno.

Foi identificada 85,32% da composição dos OEs de *P. malacophyllum*. O γ -terpineno foi o composto majoritário na estação da primavera e verão ($25,64\% \pm 3,58$; $23,63\% \pm 1,99$ respectivamente). Nas estações do outono e inverno os compostos majoritários foram o α -selineno ($20,79\% \pm 0,56$; $11,11\% \pm 0,41$) e o β -selineno ($18,19\% \pm 0,97$; $10,03\% \pm 0,40$).

FIGURA 42 CROMATOGRAMA DE *P. malacophyllum* NA ESTAÇÃO do INVERNO.



Há poucos relatos sobre a composição dos OEs de *P. malacophyllum*. O trabalho de Santos e colaboradores (2012) elucidaram pela primeira vez a composição do OE de folhas coletadas em Florianópolis que apresentou 28 compostos com a predominância de monoterpenos e monoterpenos oxigenados. A cânfora (32,8%) e o canfeno (20,8%) são os majoritários e o OE apresentou ampla atividade antimicrobiana, destacando-se a atividade antifúngica moderada contra o fungo leveduriforme *Cryptococcus neoformans* e o filamentoso *Trichophyton mentagrophytes*.

A FIGURA 43 mostra a estrutura dos compostos majoritários da estação do outono, e este óleo foi selecionado para avaliação dos testes com os fitopatógenos *B. cinerea* e *Colletotrichum sp.* devido a concentração dos compostos majoritários.

TABELA 8 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OES DE *Piper malacophyllum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

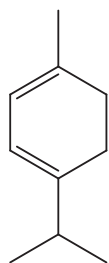
<i>P. malacophyllum</i>			Primavera		Verão		Outono		Inverno		
Nº	T _x	IA* Adams	Composto	Média (%)	DP	Média (%)	DP	Média (%)	DP	Média (%)	DP
1	6,31	932	α -pineno	1,01	0,12	0,66	0,10	0,12	0,13	1,23	0,29
2	7,73	974	β -pineno	0,70	0,15	0,34	0,05	0,04	0,02	0,59	0,07
3	9,17	1016	α -terpineno	11,41	1,88	10,61	0,67	0,00	0,00	7,34	0,22
4	9,52	1025	α -cimeno	9,17	1,03	6,70	0,94	0,17	0,29	11,55	0,72
5	10,89	1059	γ -terpineno	25,64	3,58	23,63	1,99	0,32	0,18	18,45	0,22
6	12,09	1088	terpinoleno	5,44	0,49	5,01	0,38	0,00	0,00	3,48	0,05
7	15,99	1177	terpinen-4-ol	0,38	0,35	0,50	0,10	0,00	0,00	0,87	0,07
8	24,64	1376	α -copaeno	0,62	0,09	0,55	0,28	1,16	0,11	1,00	0,09
9	26,05	1409	α -gurjuneno	0,00	0,00	0,24	0,03	0,38	0,01	0,00	0,00
10	26,44	1419	(E)-cariofileno	6,26	0,88	6,19	0,43	8,41	0,73	7,16	0,53
11	27,25	1439	aromadendreno	1,44	0,35	1,96	0,32	3,50	0,24	1,76	0,04
12	27,84	1453	α -humuleno	0,51	0,11	0,47	0,06	0,63	0,05	0,55	0,05
13	28,15	1461	<i>allo</i> -aromadendreno	0,00	0,00	0,24	0,05	0,48	0,08	0,10	0,17
14	28,51	1470		4,5-di-epi-aristocheno	0,41	0,10	0,34	0,03	0,66	0,04	0,37
15	28,76	1486	aristocheleno	1,73	0,34	2,02	0,29	0,00	0,00	1,96	0,10
16	29,17	1486	β -selineno	8,96	1,38	9,82	1,15	18,19	0,97	10,03	0,40
17	29,54	1495	α -selineno	10,05	1,56	11,20	1,37	20,79	0,56	11,11	0,41
18	29,77	1501	α -muuroleno	0,24	0,21	0,30	0,13	1,83	0,09	0,36	0,03
19	30,30	1514	γ -cardineno	0,56	0,06	0,64	0,05	1,34	0,06	0,66	0,05
20	30,43	1518	7-epi- α -selineno	0,10	0,18	0,35	0,02	0,64	0,04	0,80	0,85
21	30,68	1524	δ -cardineno	1,37	0,21	1,54	0,18	3,44	0,12	1,17	0,71
22	31,03	1533	<i>trans</i> -cardina-1,4-dieno	1,33	1,16	0,10	0,17	0,08	0,10	0,00	0,00
23	31,24	1539	α -cardineno	0,00	0,00	0,04	0,08	0,28	0,06	0,11	0,19
24	31,43	1544	α -calacoreno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,12	0,00	0,00
25	32,77	1578	espatulenol	0,00	0,00	0,15	0,13	0,56	0,05	0,26	0,23
26	33,00	1584	thujopsan-2- β -ol	0,66	1,14	1,66	0,10	4,53	0,16	2,70	0,20
27	33,15	1588	globulol	0,00	0,00	0,07	0,12	0,28	0,07	0,00	0,00
28	33,31	1592	viidiflorol	0,00	0,00	0,32	0,06	0,72	0,08	0,41	0,07
29	33,41	1595	cubeban-11-ol	0,00	0,00	0,22	0,06	0,36	0,02	0,09	0,16
30	33,57	1599	guaialol	0,00	0,00	0,13	0,11	0,27	0,07	0,00	0,00
31	33,75	1604	β -oplopenona	0,12	0,20	0,55	0,04	1,24	0,06	0,84	0,06
32	33,97	1610	epóxido de humuleno II	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,07	0,00	0,00
33	34,84	1633	<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno	0,00	0,00	0,26	0,11	0,35	0,06	0,00	0,00
34	35,16	1642	α -muurolol (=torreyol)	0,75	0,66	1,08	0,12	2,34	0,15	1,51	0,22
35	35,51	1652	α -eudesmol	1,43	2,17	0,00	0,00	0,41	0,05	0,00	0,00
36	35,66	1656	selin-11-en-4- α -ol	3,74	3,33	4,62	0,49	10,15	0,58	6,92	0,61
37	35,82	1660	<i>allo</i> -himachalol	0,25	0,43	0,41	0,08	1,02	0,14	0,55	0,17
Total				94,28	1,83	92,90	0,94	85,32	5,57	93,92	7,00

(Continuação da TABELA 8).

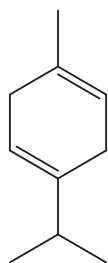
Classe de compostos	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Monoterpenos	53,37	46,96	0,65	42,63
Monoterpenos oxigenados	0,38	0,50	0,00	0,87
Sesquiterpenos	33,58	35,99	62,15	37,13
Sesquiterpenos oxigenados	6,94	9,46	22,52	13,29
Total	94,28	92,90	85,32	93,92

¹Índice aritmético calculado. ²Índice aritmético da literatura ([ADAMS, 2017](#)). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,01%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários

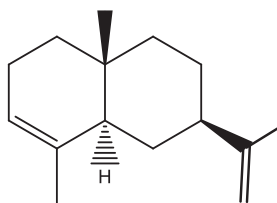
FIGURA 43 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Piper malacophyllum*.



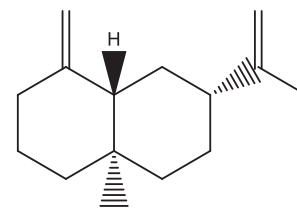
alfa-terpineno



gama-terpineno



alfa-selineno

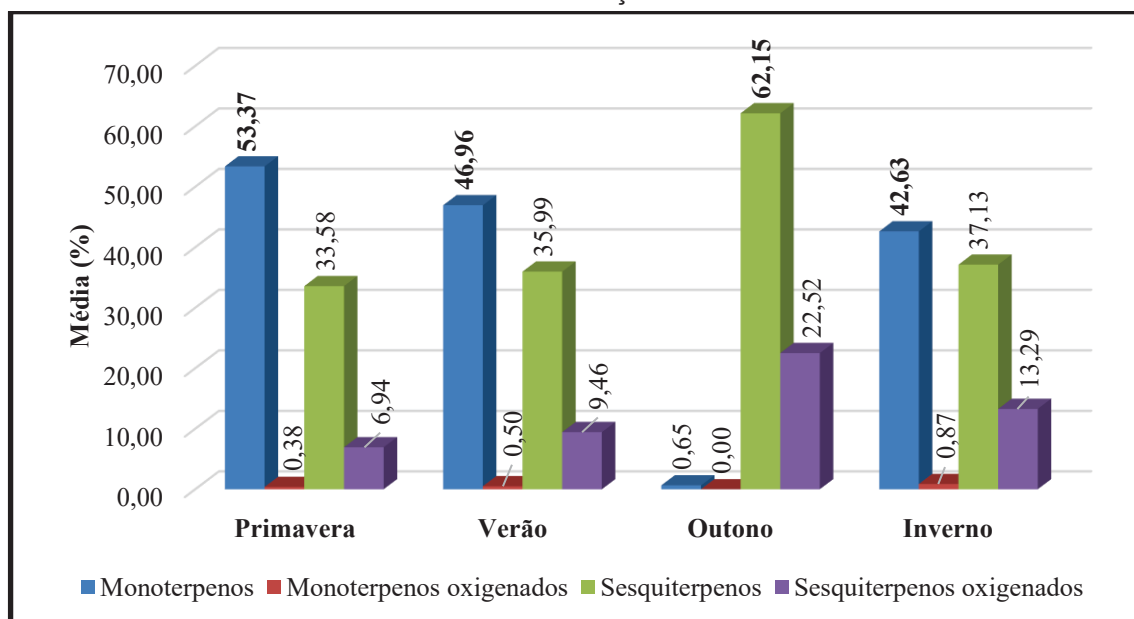


beta-selineno

Fonte: ADAMS, 2017.

Pelo gráfico (FIGURA 44) observa-se que existe entre as classes de compostos produzidos por *P. malacophyllum* nas estações uma predominância na produção de monoterpenos na primavera, no verão e no inverno, de sesquiterpenos no outono e o aumento na produção de sesquiterpenos oxigenados e quase nenhuma produção de monoterpenos nesta estação. O que mostra que fatores abióticos podem influenciar a produção dos metabolitos secundários nas plantas, como irradiação solar, umidade, temperatura, ataque de patógenos, como os principais fatores (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

FIGURA 44 GRÁFICO DOS OEs DE *P. malacophyllum* - CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO POR ESTAÇÃO.



5.7.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE *P. malacophyllum*

Para os resultados da constituição química dos OEs obtidos de *P. malacophyllum*, buscando-se uma melhor visualização das semelhanças e/ou diferenças entre as amostras nas diferentes estações do ano, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Nesta análise avaliaram-se os *scores* (FIGURA 45) e os *loadings* (FIGURA 46), nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos OEs de cada uma das amostras de cada estação.

No gráfico de *scores* dos OEs de *P. malacophyllum*, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 80,92% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 11,53% totalizando 92,45% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os OEs extraídos em amostras de diferentes estações do ano, embora a diferenciação entre primavera e verão não ficou muito evidenciado devido a pouca variância na sua composição.

FIGURA 45 GRÁFICO DE SCORES DOS OES EXTRAÍDOS DE *P. malacophyllum*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)

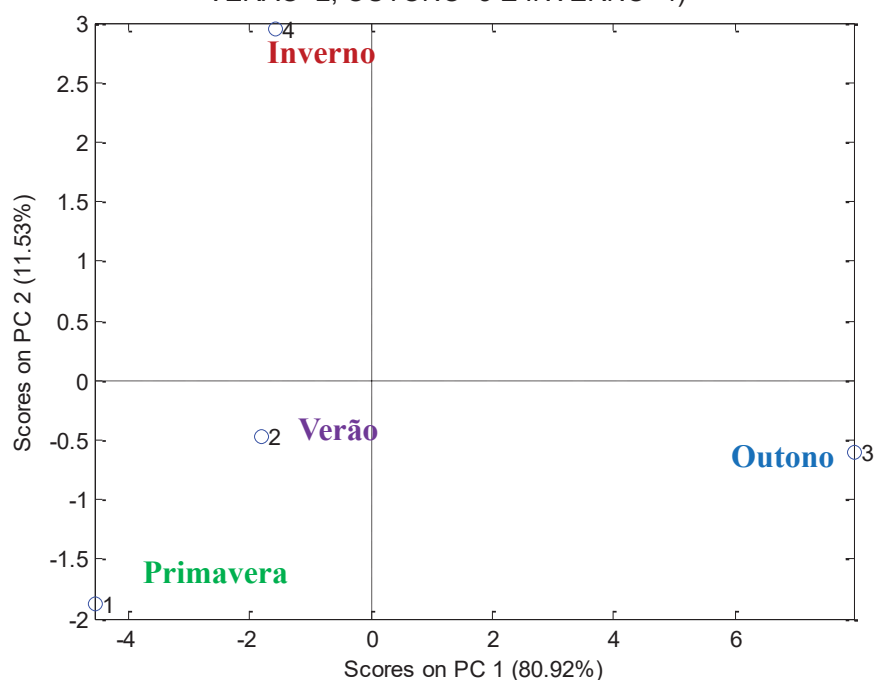
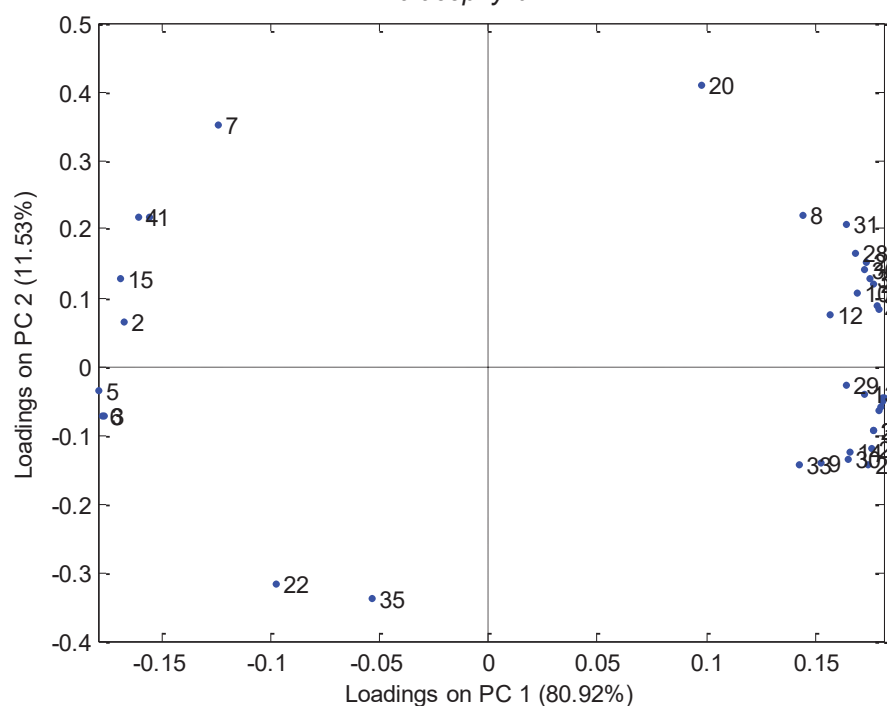


FIGURA 46 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE *P. malacophyllum*

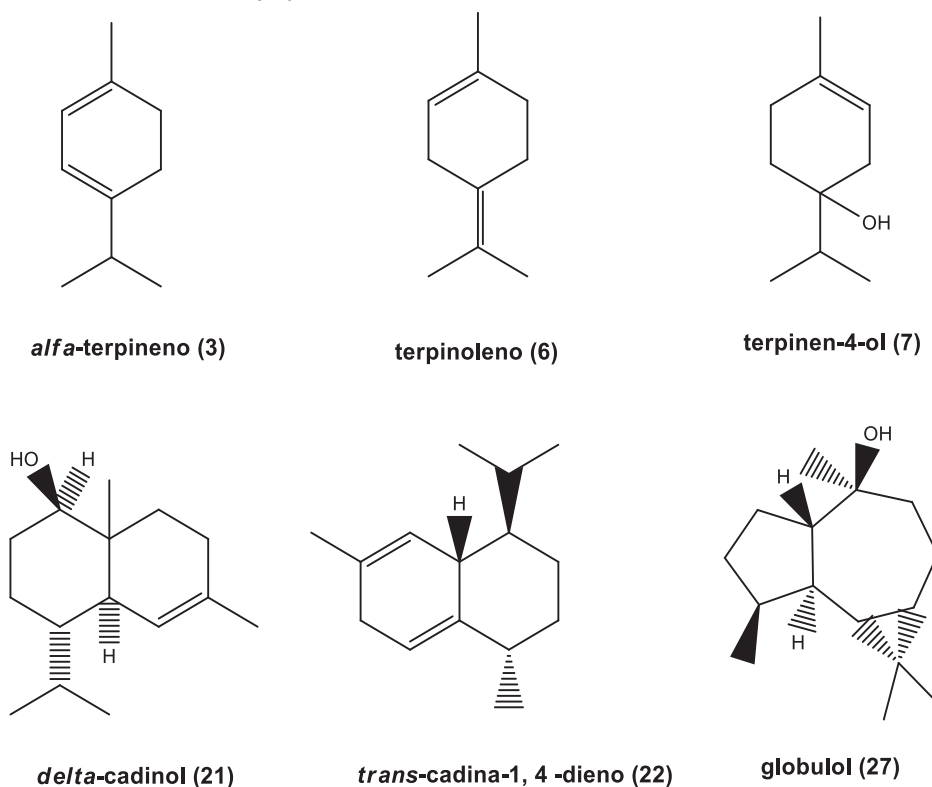


Pela PC1 é possível observa a diferença entre as estações do verão e primavera com a estação do outono, e na PC2 a distinção da estação do inverno com as demais estações. Isso evidencia a diferença na composição e/ou variação dos compostos nos OEs de *P. malacophyllum* na estação do outono. As componentes

responsáveis por essa diferença da distribuição das estações no gráfico de *scores* podem ser observadas pelo gráfico de *loadings*.

Pelo gráfico de *loadings* do OEs nota-se que para a estação da primavera o composto responsável da diferenciação das demais estações é o *trans*-cadina-1,4-dieno (22). Para o verão, os compostos responsáveis pela variação foram o α -terpineno (3) e terpinoleno (6), para a estação do outono os responsáveis foram o δ -cadineno (21), e o globulol (27), e na estação do inverno o terpinen-4-ol (7) (TABELA 35 traz o nome do composto com seu respectivo número do gráfico de loadings, anexo 1, página 126). Os compostos responsáveis pela variância dos dados dos OEs de *P. malacophyllum* estão representados na FIGURA 47.

FIGURA 47 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *P. malacophyllum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.



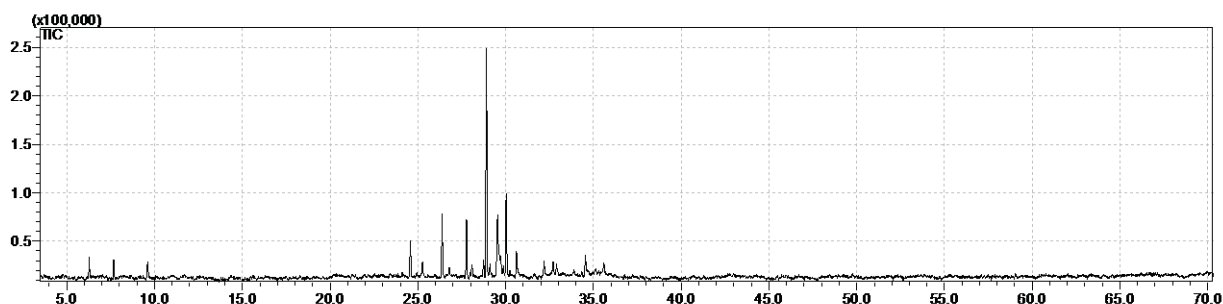
Fonte: ADAMS, 2017.

5.8 ANÁLISE DOS OEs DE *P. tuberculatum*

A quantificação dos constituintes dos OEs de *P. tuberculatum* foi realizada com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo-se

identificar 22 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 9, na qual está representada a média das análises em triplicata. O cromatograma da FIGURA 48 representa a análise do OE de *P. tuberculatum* na estação do verão.

FIGURA 48 CROMATOGRAMA DE *P. tuberculatum* NA ESTAÇÃO VERÃO.



Foi identificada 81,50% da composição dos OEs de *P. tuberculatum*. O amorf-4,7(11)-dieno foi o composto majoritário na estação do verão ($26,98\% \pm 4,24$) e com a maior concentração entre os compostos nas demais estações, em seguida o biciclogermacreno teve sua maior concentração na estação do verão ($12,04\% \pm 2,41$), o (*E*)-cariofileno e espatulenol com suas maiores concentrações na estação do outono ($10,71\% \pm 0,59$, e $9,88\% \pm 1,07$ respectivamente).

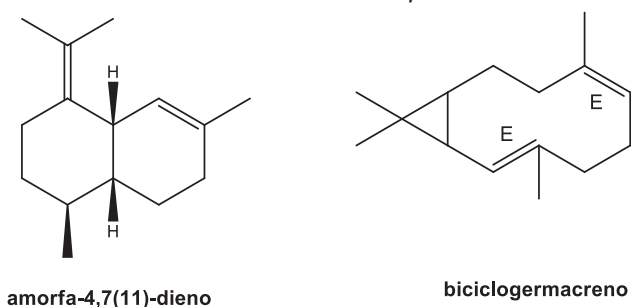
Santos e colaboradores (2015) em seu trabalho mostraram a composição de *P. tuberculatum* e a atividade da etoxicumarina O-desetilase (ECOD) em ratos, e como majoritários foram identificados o isocariofileno (13,2%) e germacreno D (36,3%). E o OE mostrou inibição dose-dependente da atividade da etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) em ratos. Quando ao se comparar os majoritários deste trabalho e o de Santos e colaboradores, observa-se que há predominância de sesquiterpenos nos OEs de *P. tuberculatum*.

Comparando a composição dos OEs de *P. tuberculatum* descritos na literatura e a composição dos OEs de *P. tuberculatum* deste trabalho, notamos uma semelhança com relação a classe predominante que no trabalho de Braga e colaboradores (2018), que mostra a classe dos sesquiterpenos como predominante com 45% da composição dos OEs de talos finos, e como majoritários o óxido de cariofileno com 32% e o (*E*)-cariofileno com 17,7 %, com material vegetal coletado em Porto Velho em abril de 2008. A diferença principalmente nos majoritários, pode estar relacionada principalmente a fatores como a localização, o clima, fatores

abióticos, idade da planta e a ataques de fitopatógenos e herbívoros. E isso evidencia como é comum encontrar diferenças nas composições de OEs de mesma espécie (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A FIGURA 49 mostra a estrutura dos compostos majoritários da estação do verão, e este óleo foi selecionado para avaliação dos testes com *B. cinerea* e *Colletotrichum* sp. devido a concentração dos compostos majoritários.

FIGURA 49 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Piper tuberculatum*.



Fonte: ADAMS, 2017.

Pela análise do gráfico (FIGURA 50), pode-se observar que há uma predominância de sesquiterpenos em todas as estações e que há um aumento na produção dos sesquiterpenos oxigenados na estação do outono. Na estação do inverno, quase não há produção de arilpropanoides.

FIGURA 50 GRÁFICO DOS OEs DE *P. tuberculatum* - CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO POR ESTAÇÃO

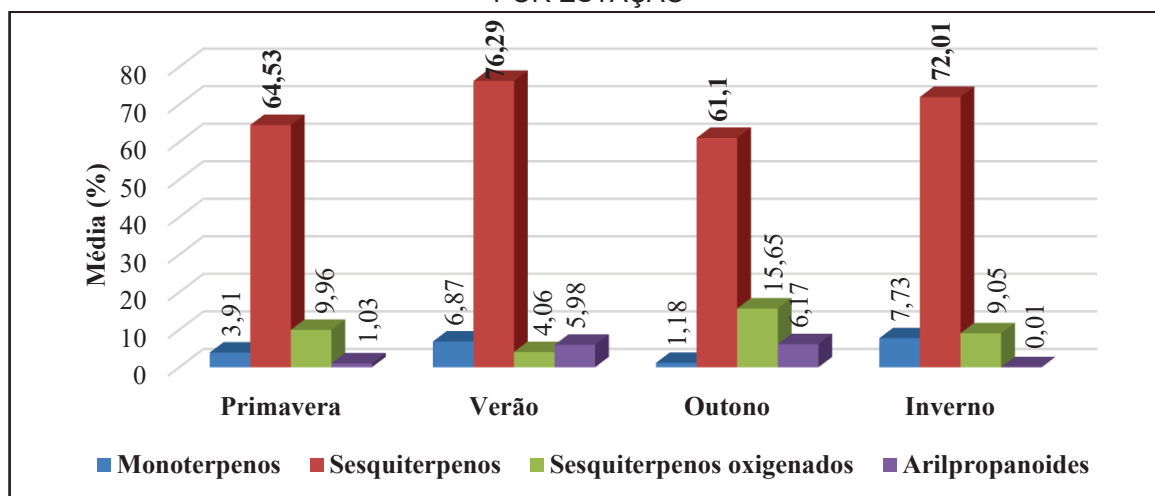


TABELA 9 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS OEs DE *Piper tuberculatum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

P. tuberculatum					Primavera		Verão		Outono		Inverno	
n°	Tr	IA¹	IA²	Composto	Média (%)	DP	Média (%)	DP	Média (%)	DP	Média (%)	DP
1	6,276	932	932	α-pineno	1,44	1,51	2,34	1,48	0,72	0,11	2,58	1,03
2	7,676	975	974	β-pineno	1,84	2,18	2,36	1,06	0,47	0,14	3,36	0,53
3	9,604	1035	1032	β-(Z)-ocimeno	0,63	0,89	2,17	0,70	0,00	0,00	1,79	0,23
4	22,930	1337	1335	δ-elemeno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,67	0,16	0,00	0,00
5	24,568	1376	1374	α-copaeno	5,91	0,01	4,03	0,85	8,83	0,42	5,23	0,85
6	24,945	1385	1387	β-bourboleno	0,34	0,31	0,00	0,00	1,09	0,38	0,41	0,19
7	25,274	1393	1389	β-elemeno	0,79	0,46	0,96	0,42	1,72	0,40	0,51	0,44
8	26,377	1419	1417	(E)-cariofileno	9,05	0,33	7,70	0,77	10,71	0,57	8,13	1,16
9	26,782	1429	1430	β-copaeno	0,89	0,19	1,05	0,23	1,21	0,28	1,51	0,44
10	27,772	1454	1452	α-humuleno	2,76	0,10	6,54	0,28	1,39	0,18	2,96	0,13
11	28,080	1461	1458	allo-aromadendreno	1,80	1,57	1,46	0,14	1,58	0,56	2,47	0,33
12	28,735	1477	1478	γ-muroleno	3,20	0,64	1,95	0,31	2,16	0,26	3,60	0,21
13	28,903	1481	1479	amorfa-4,7(11)-diene	22,79	1,73	26,98	4,24	11,70	3,18	26,87	3,93
14	29,538	1497	1500	biciclogermacreno	9,90	0,99	12,04	2,41	9,99	0,55	10,11	0,95
15	30,037	1510	1505	β-bisaboleno	3,20	0,37	9,57	1,20	4,59	0,99	5,79	0,12
16	30,239	1515	1511	δ-amorfeno	1,23	0,34	0,64	0,07	1,18	0,38	1,03	0,57
17	30,620	1525	1522	δ-cardineno	2,69	0,41	3,36	0,65	4,29	0,61	3,41	0,50
18	31,994	1560	1555	elemicina	0,00	0,00	2,78	1,10	2,78	1,10	0,00	0,00
19	32,185	1565	1561	(E)-nerolidol	1,73	0,01	2,28	0,42	2,24	0,24	1,45	0,42
20	32,695	1578	1577	espatulenol	6,09	0,31	1,78	0,64	9,88	1,07	5,72	0,27
21	34,543	1627	1619	dilapiol	1,03	0,41	3,21	1,40	3,39	0,94	0,04	0,00
22	35,591	1656	1652	δ-cardinol	2,14	0,42	0,00	0,00	3,53	0,63	1,89	0,86
Total identificado:					81,50	1,77	90,43	4,28	84,10	2,72	88,83	5,51

Classe de compostos	Período de coleta das Estações do ano			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Monoterpenos	3,91	6,87	1,18	7,73
Sesquiterpenos	64,53	76,29	61,10	72,01
Sesquiterpenos oxigenados	9,96	4,06	15,65	9,05
Arilpropanoídes	1,03	5,98	6,17	0,01
Total	81,50	93,21	84,10	88,81

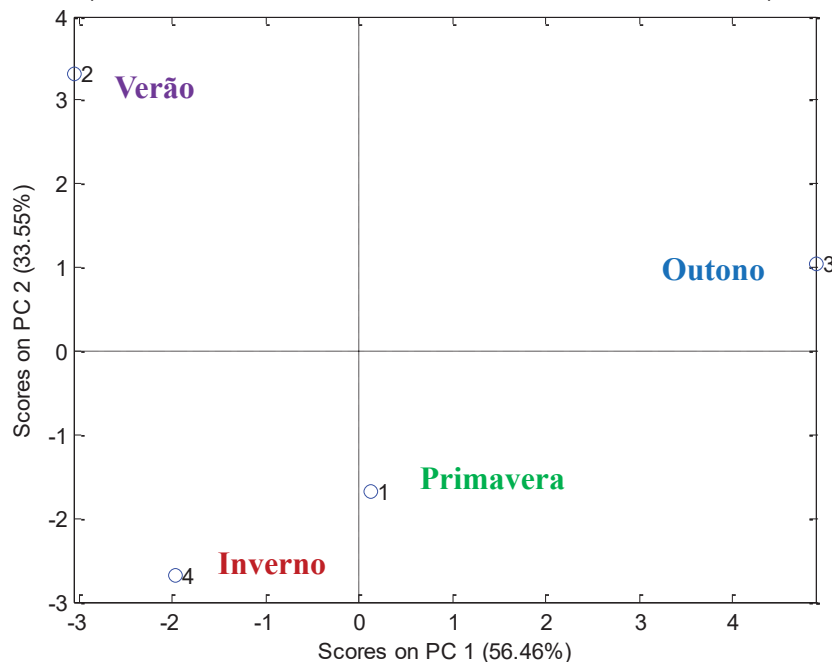
¹Índice aritmético calculado. ²Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,01%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários

5.8.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OEs DE *P. tuberculatum*

Para os resultados da constituição química dos OEs obtidos de *P. tuberculatum*, buscando-se uma melhor visualização das semelhanças e/ou diferenças entre as amostras nas diferentes estações do ano, realizou-se a Análise de Componentes Principais (ACP). Nesta análise avaliaram-se os *scores* (FIGURA 51) e os *loadings* (FIGURA 52), nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos OEs de cada uma das amostras de cada estação.

No gráfico de *scores* dos OEs de *P. tuberculatum*, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 56,46% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 35,55% totalizando 92,01% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os OEs extraídos em amostras de diferentes estações do ano, devido as estações estarem cada uma em um quadrante do gráfico de *scores*.

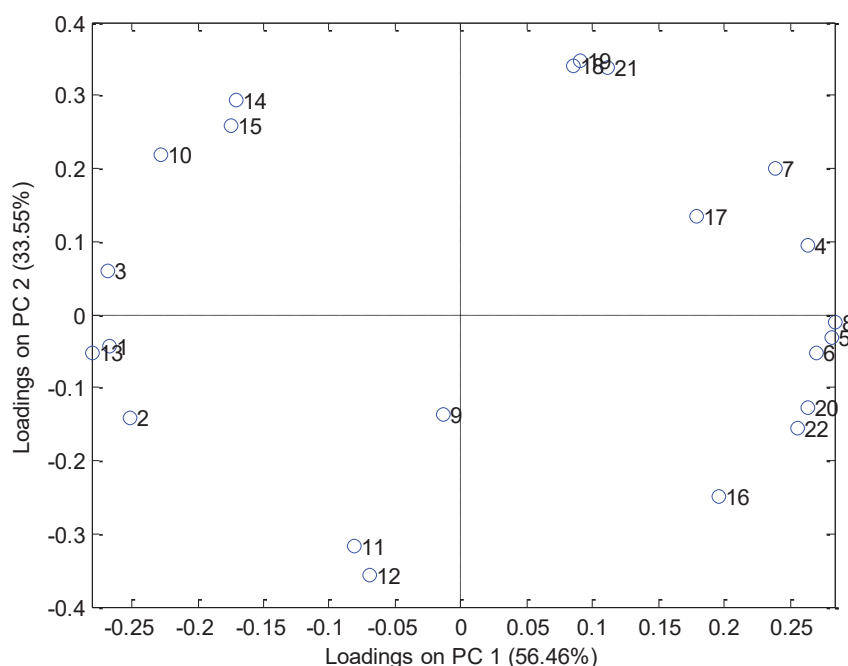
FIGURA 51 GRÁFICO DE SCORES DOS OEs EXTRAÍDOS DE *P. tuberculatum*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=2, OUTONO=3 E INVERNO=4)



Na PC1 nota-se que a diferença entre as estações do verão e inverno da estação do outono, pela PC2 a diferença da estação do inverno e do verão e a estação da primavera com a estação do outono. As componentes responsáveis

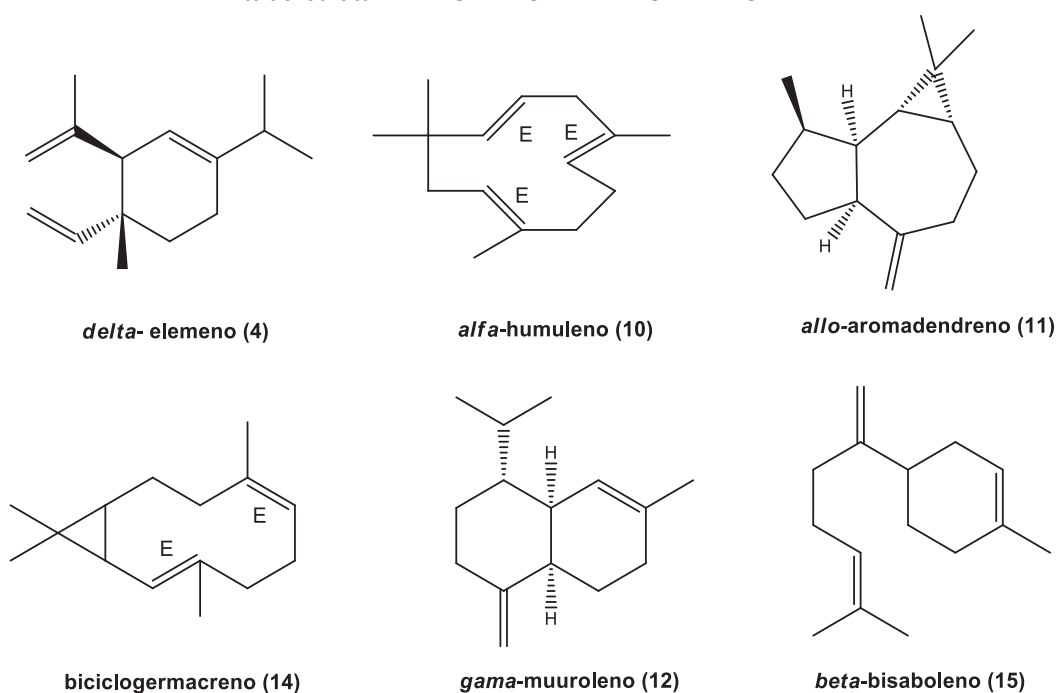
pelas variâncias e distribuição das estações no gráfico de *scores* podem ser observadas pelo gráfico de *loadings*.

FIGURA 52 GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE OEs DE *P. tuberculatum*.



Pelo gráfico de *loadings* dos OEs, podemos observar que para a estação da primavera o composto (componente) δ -amorfeno (16) foi responsável pela diferenciação desta estação entre as demais. Para a estação do verão, os compostos responsáveis pela variação foram o α -humuleno (10), biciclogermacreno (14) e β -bisaboleno (15), para a estação do outono os responsáveis foram o δ -elemeno (4) sendo que este composto só foi identificado nesta estação. Na estação do inverno os compostos foram o *allo*-aromadendreno (11) e o γ -muuroleno (12). (TABELA 36 traz o nome do composto com seu respectivo número do gráfico de loadings, anexo 1, página 127). Os compostos responsáveis pela variância dos dados dos OEs das de *P. Tuberculatum* estão representados na FIGURA 53.

FIGURA 53 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS OEs DE *P. tuberculatum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.



Fonte: ADAMS, 2017.

5.9 ISOLAMENTOS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS

5.9.1 ISOLAMENTO DO DILAPIOL

O isolamento do dilapiol do OE de *P. aduncum* da estação verão (PAV) via cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), resultou nas frações e suas respectivas massas, descritas na TABELA 10.

TABELA 10 RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO DO OE DE *P. gaudichaudianum*

Fração	Massa (mg)	%
PAV-FR1	17,8000	29,67
PAV -FR2	10,7000	17,83
PAV -FR3	20,4000	34,00
PAV -FR4	3,2000	5,33
PAD -FR5	3,1000	5,17
Massa total:	55,2000	92,00

As frações foram submetidas a técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), as frações PAV-FR2 e PAV-FR3 mostraram-se puras

e foram submetidas a análise de CG-EM na qual a fração PAV-FR3 estava pura sendo possível sua identificação, a PAV-FR2 mostrou-se impura com a mistura dos compostos asaricina e miristicina. A FIGURA 54 mostra o cromatograma da PAV-FR3 e a FIGURA 55 o espectro de massas.

FIGURA 54 CROMATOGRAMA DA PAV-FR3

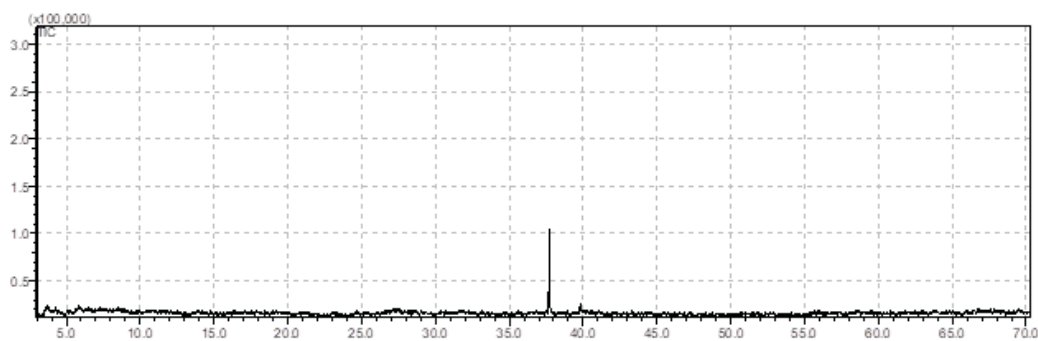
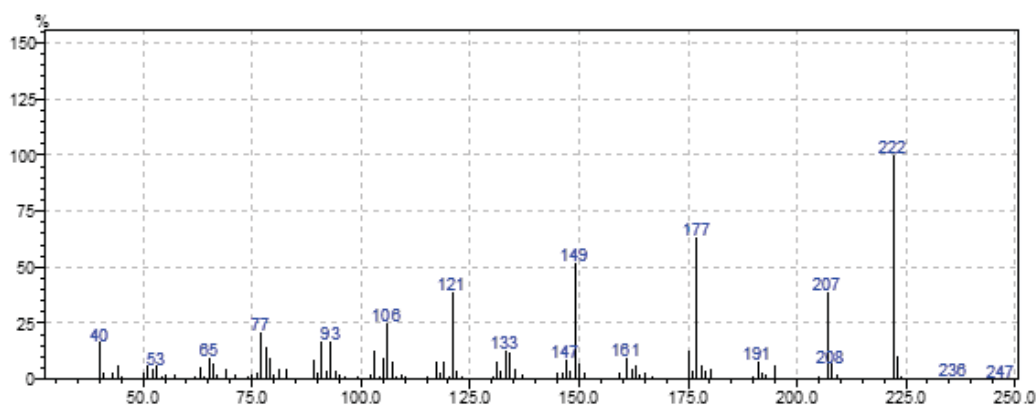


FIGURA 55 ESPECTRO DE MASSAS DA PAV-FR3



Pela análise do CG-EM foi possível obter o IA de 1621, e comparando com os dados da literatura e o espectro de massas, a fração PAV-FR3 foi identificada como dilapiol (ADAMS,2017). Um estudo piloto com um pequeno grupo de análogos de dilapiol em combinação com o larvicida botânico α -tertienil, mostrou que a modificação da molécula poderia levar a resultados mais promissores. Isso mostra o potencial desse arilpropanoide como composto bioativo (BELZILE et al., 2000; BUDZINSKI et al., 2008; CARBALLO-ARCE et al., 2019; GOMES et al., 2016; LIU et al., 2014; OMAR et al., 2003).

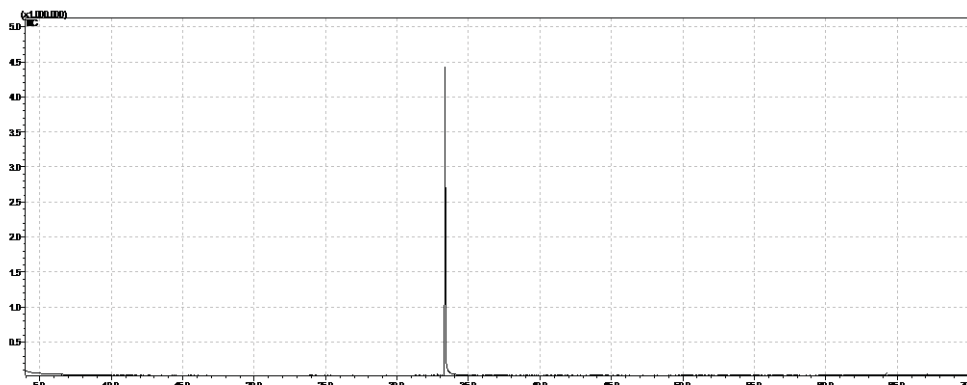
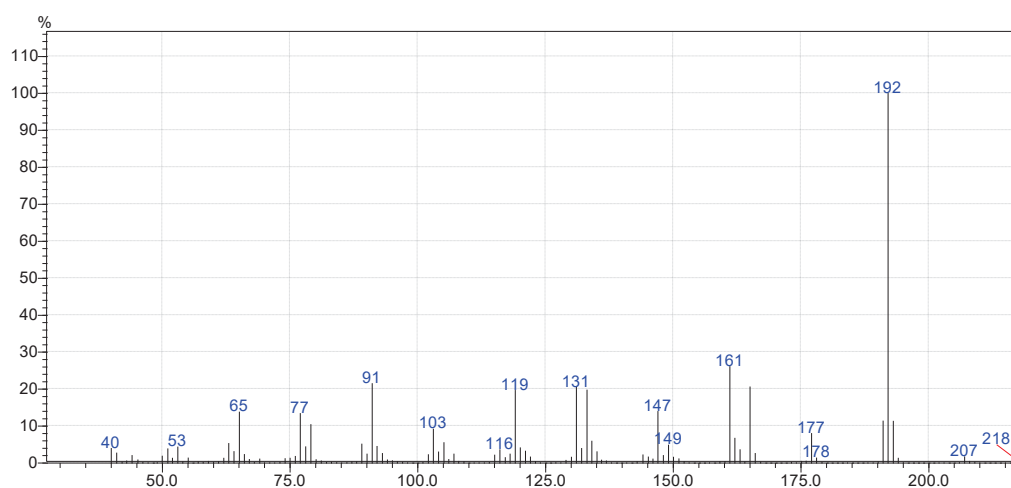
4.9.2 ISOLAMENTO DA MIRISTICINA

O isolamento da miristicina do OE de *P. gaudichaudianum* da estação primavera (PGP) via CCDP, resultou nas frações e respectivas massas descritas na TABELA 11.

TABELA 11 RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO DO OE DE *P. gaudichaudianum*

Fração	Massa (mg)	%
PGP-FR1	5,42	10,84
PGP -FR2	29,32	58,65
PGP -FR3	10,38	20,76
Massa total:	45,12	90,25

As frações foram submetidas a técnica de CG-EM à qual mostrou que a PGP -FR2 estava pura e foi possível realizar a sua identificação, as demais frações mostraram-se impuras. Na FIGURA 56 mostra o cromatograma da PGP-FR2 e a FIGURA 57 o espectro de massas.

FIGURA 56 CROMATOGRAMA DA PGP-FR2**FIGURA 57** ESPECTRO DE MASSAS DA PCV-FR2

Através dos dados obtidos da análise do CG-EM, identificou-se a miristicina com um IA de 1520. Esta fração foi separada para o teste biológico frente ao *B. cinerea*.

5.10 DERIVATIZAÇÕES DO SAFROL

A classe dos arilpropanoides demonstrou maior atividade contra os fungos estudados. Diante disso, realizou-se algumas derivatizações no esqueleto básico para avaliação da atividade fungicida. A molécula de safrol foi escolhida para esse estudo devido a sua disponibilidade no laboratório, além de ser um produto comercial de custo relativamente baixo e de fácil isolamento e purificação da espécie de *P. mikanianum* (Atalanta-SC) e óleo de sassafrás, com proporção de aproximadamente 80% na composição dos OEs dessas espécies (CARNEIRO et al., 2020).

5.10.1 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DO DIIDROSAFROL

A redução da ligação dupla do safrol forneceu o produto diidrosafrol com rendimento de 72% (FIGURA 58), este composto foi identificado pela técnica de CG-EM (FIGURA 59) pelo espectro de massas (FIGURA 60).

FIGURA 58 ESTRUTURA DO DIIDROSAFROL

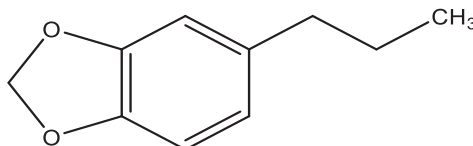
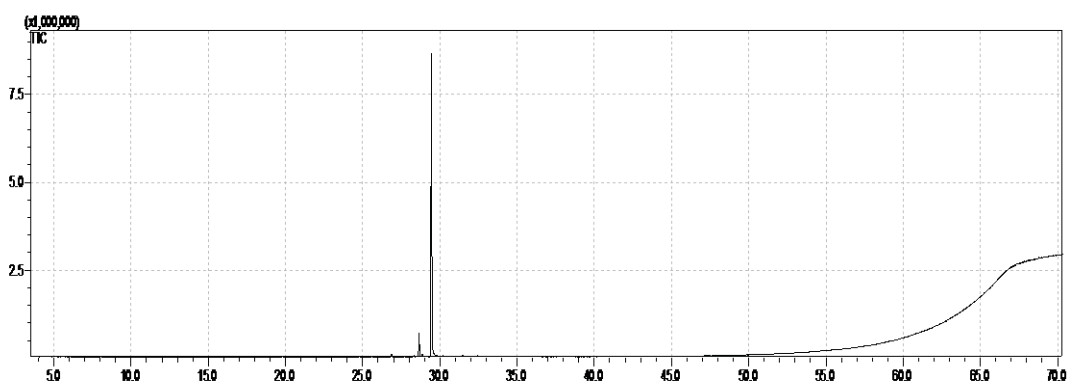


FIGURA 59 CROMATOGRAMA DO DIIDROSAFROL



Pelo espectro de massas do diidrosafrol, em comparação com o espectro de massas do safrol, pode se observar a adição em massa de duas unidades (2H). Pela fragmentação de massas do diidrosafrol, é possível observar uma

clivagem heterolítica da ligação do carbono alfa e beta ao anel aromático, havendo perda de massa de m/z 29 daltons, referentes a perda do radical etila ($\bullet\text{CH}_3\text{CH}_2$), havendo a formação de um ion tropilho dissustituído m/z 135 daltons, conforme a FIGURA 60.

FIGURA 60 ESPECTRO DE MASSAS DO DIIDROSAFROL

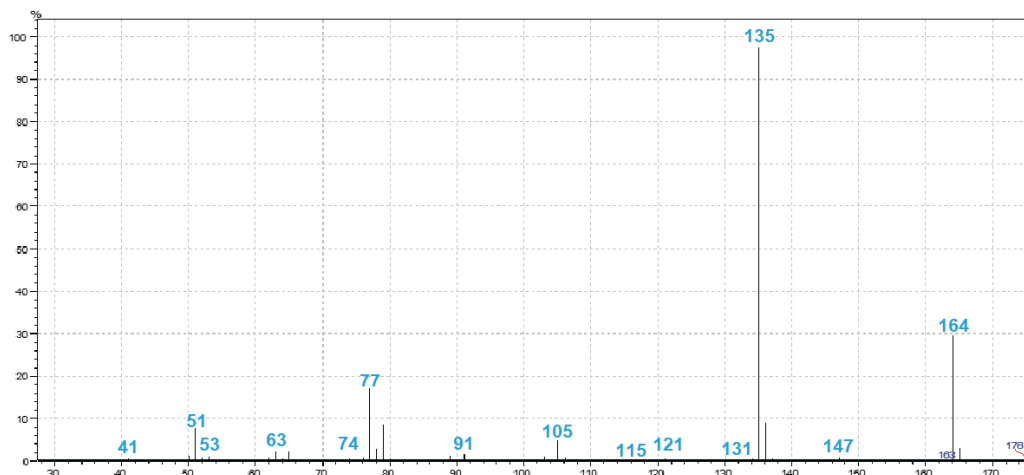
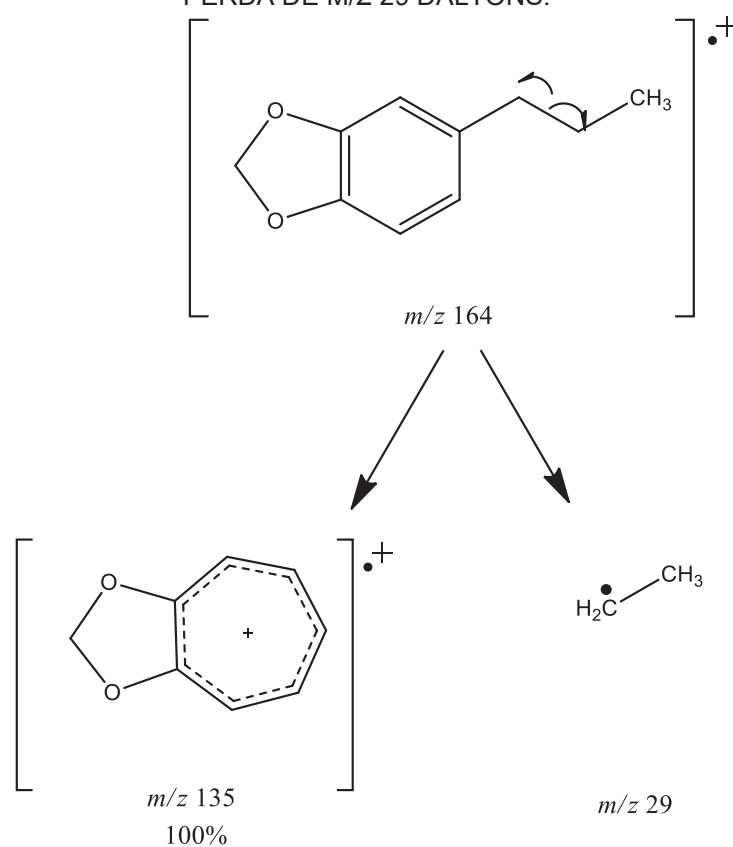


FIGURA 61 PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS DO DIIDROSAFROL COM A PERDA DE m/z 29 DALTONS.

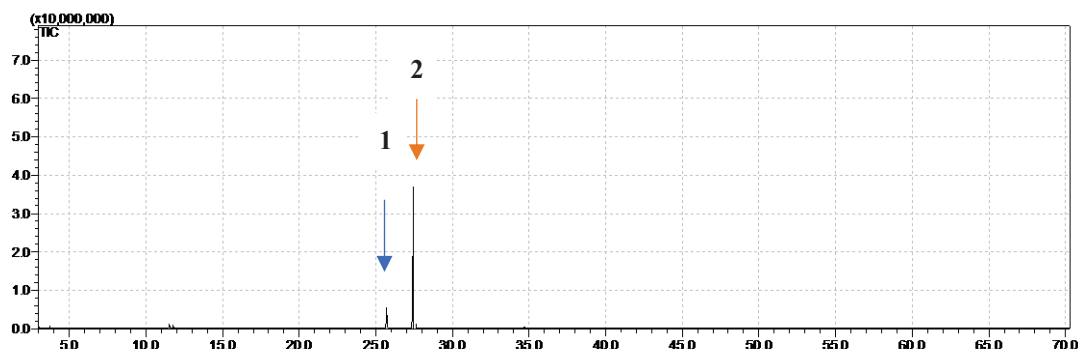


Fonte: Autora.

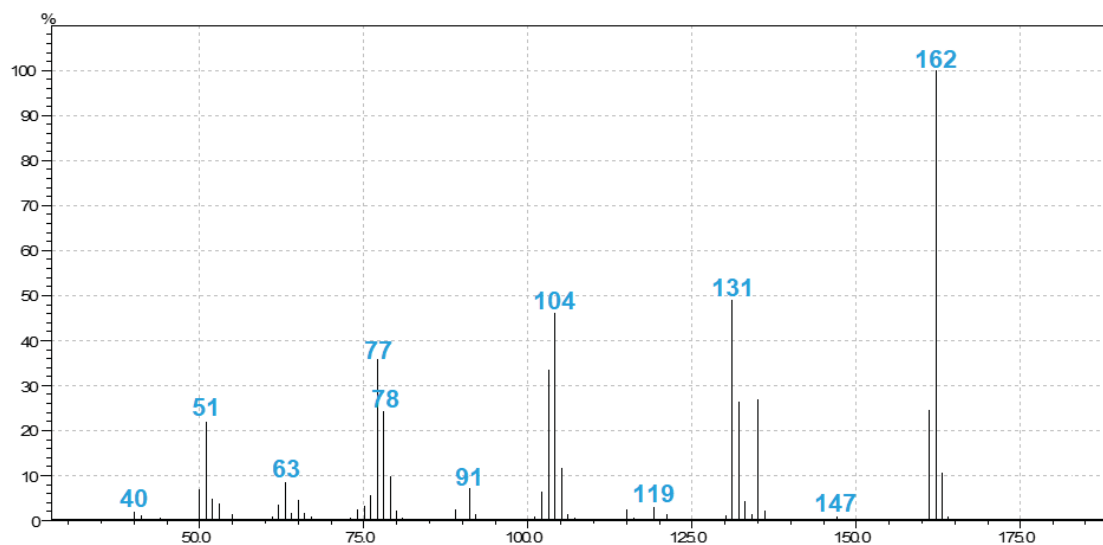
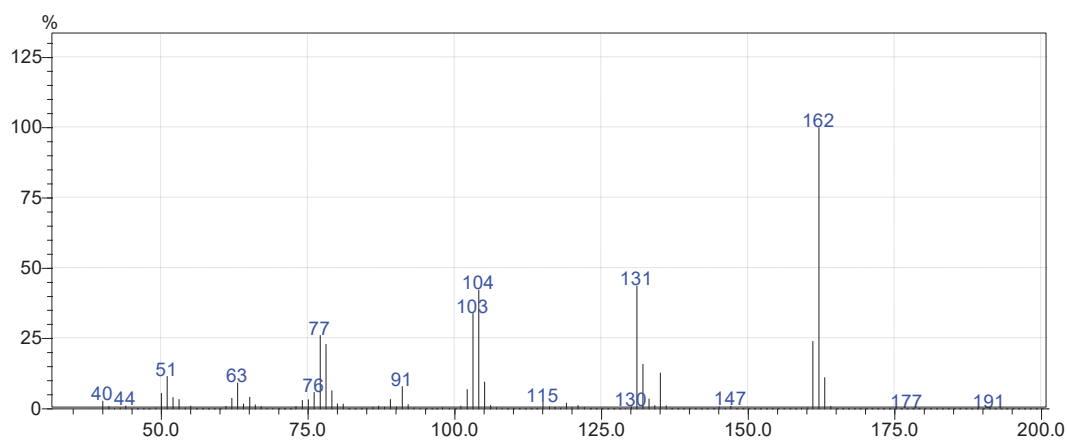
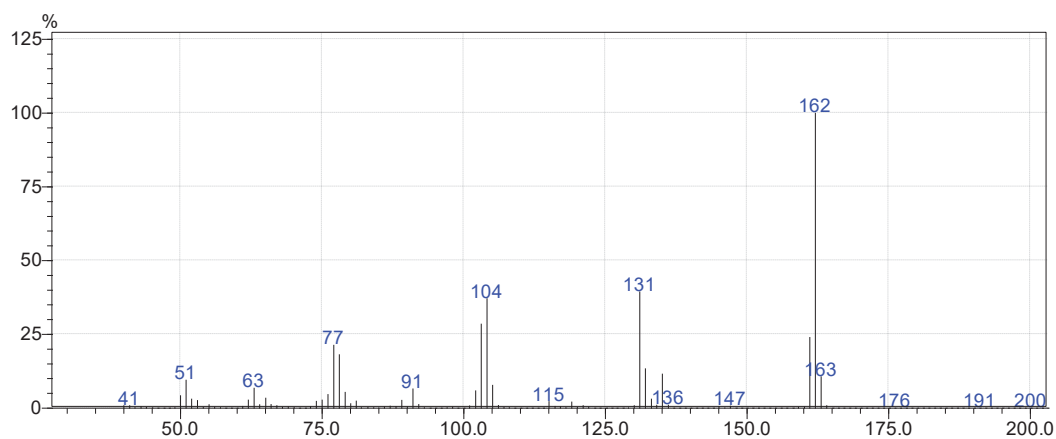
5.10.2 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DO ISOSAFROL

A reação de isomerização do safrol teve um rendimento de 78% (m/m) da mistura de *E*-isoafrol e *Z*-isoafrol e, para a identificação desta mistura denominada como ISOSAF foi utilizada a técnica de CG-EM, comparando os valores do IA e os espectros de massas do safrol e do produto de reação conforme as FIGURAS 62 a 65.

FIGURA 62 CROMATOGRAMA DO ISOSAF



No cromatograma do ISOSAF (FIGURA 62) podemos observar a presença de dois picos, o qual já era esperado a formação do isoafrol nas configurações *E* e *Z*. Não foi observada mudanças no espectro de massas (figuras 63 a 65) entre reagente e produtos, mas o IA são diferentes, tendo o safrol o IR de 1290 e o isoafrol pico 1 IA de 1340 e o pico 2 IA de 1379, ambos foram comparados com a literatura (ADAMS, 2017). Para elucidação completa dos produtos, estes foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN), sendo possível determinar a estrutura do isoafrol (*E-Z*). Nas FIGURAS 62 a podemos observar os espectros de RMN ^1H .

FIGURA 63 ESPECTRO DE MASSAS DO SAFROL**FIGURA 64** ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 1**FIGURA 65** ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 2

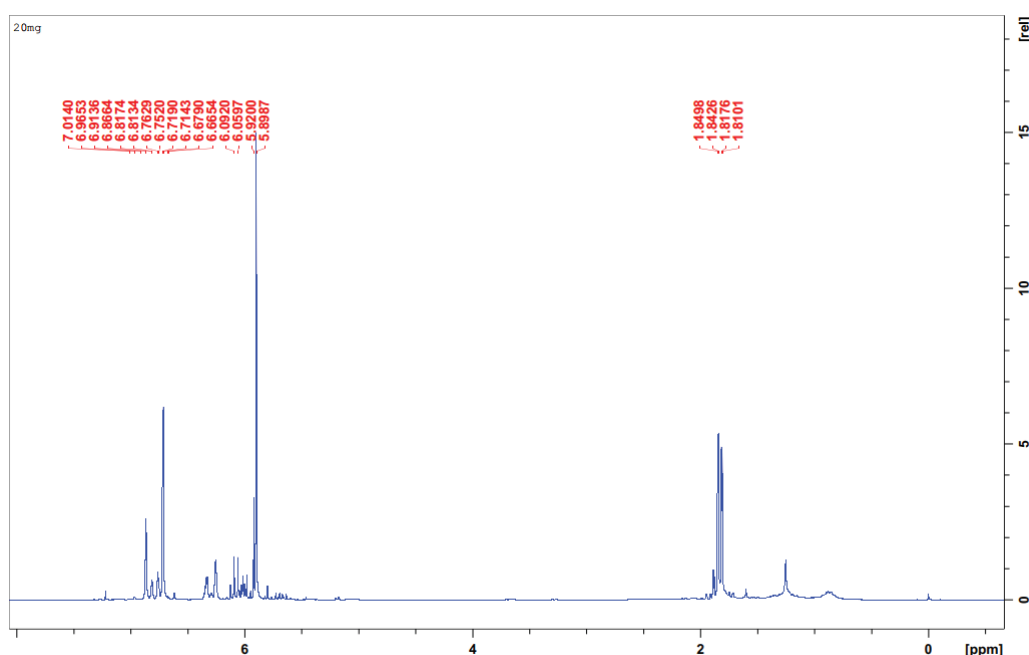
A TABELA 12 mostra os dados obtidos do espectro de RMN observando os núcleos do ^1H em 200 MHz.

TABELA 12 DADOS DO ESPECTRO DE RMN ^1H EM 200MHz DO ISOSAFROL

n	δ ppm	Multiplicidade	Integral (f)	J_z (Hz)
1 (Z)	6,25	<i>d</i>	1	11,83
1 (E)	6,33	<i>d</i>	1	14,25
2 (Z)	5,68	<i>dq</i>	1	6,47,11,62
2 (E)	6,02	<i>dq</i>	1	6,47, 14,21
3	1,83	<i>dd</i>	3	1,50; 6,47
2'	6,87	<i>s</i>	1	1,02
5'	6,78	<i>d</i>	1	-
6'	6,72	<i>d</i>	1	-
1''	5,9	<i>s</i>	2	-

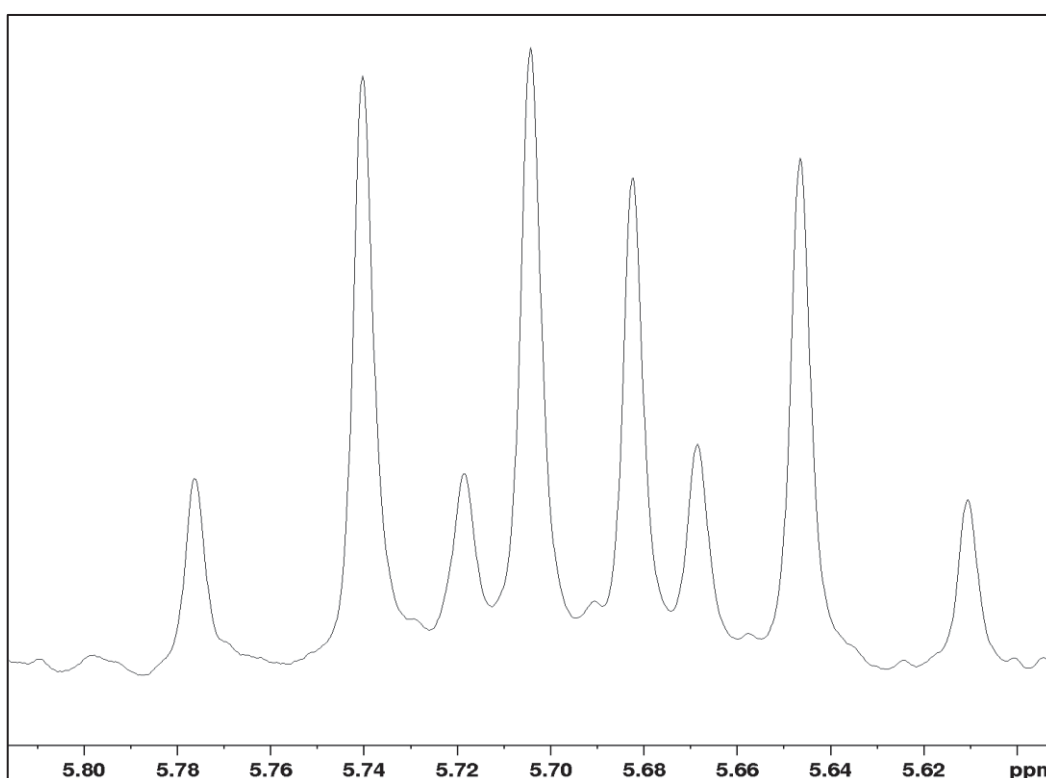
*Como solvente foi utilizado o Cloroformio deuterado (CCl_3D) e como referência interna o Tetrametilsilano (TMS).

Observando o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 66) do isosafrol foi possível identificar 3 hidrogênios aromáticos sendo 2 como dois dupletos com a mesma constante de acoplamento, em 6,78 ppm e 6,72 ppm (1H, $J = 7,81$ Hz, H-5', H-6'), o que evidencia um acoplamento na posição orto e um simpleto em 6,87 ppm (1H, H-2'), evidenciando um anel aromático trissubstituído.

FIGURA 66 ESPECTRO DE RMN ^1H EM 200MHz DO ISOSAFROL

A atribuição para os sinais de hidrogênios referentes a isomerização devido termos uma mistura obtivemos sinais para a configuração *E* e *Z*, como os sinais de dois duplos quartetos em 5,69 ppm (1H, $J=6,47$; 11,62 Hz, H-2) (FIGURA 67) e em 6,03 ppm (1H, $J=6,47$; 14,21 Hz, H-2) sendo *Z* e *E* respectivamente. O sinal em 1,83 ppm sendo um duplo duplete (3H, $J=6,47$ Hz; 1,56 Hz, H-1), sinal típico de hidrogenio ligado a carbono sp^3 , os sinais em 6,25 ppm (1H, $J=11,83$ Hz, H-3) e 6,33 ppm (1H, $J=14,25$ Hz, H-3) como dupletos referentes a configuração *Z* e *E*.

FIGURA 67 ESPECTRO DE ^1H AMPLIADO EM 5,70 ppm



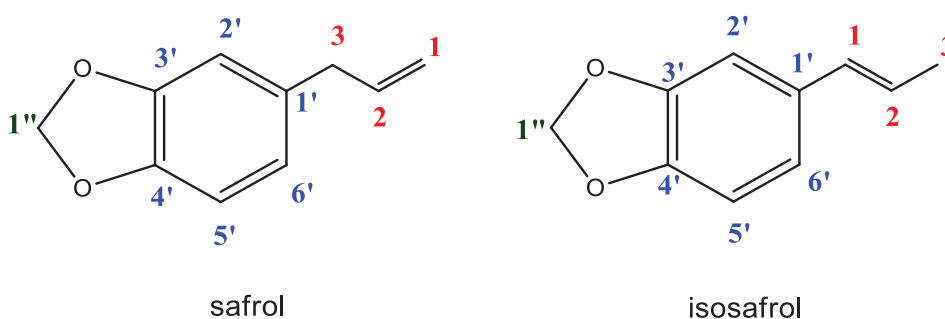
Os dados obtidos no espectro RMN de ^{13}C estão mostrados na TABELA 13. O sinal em $\delta 18,32$ ppm é atribuído ao carbono 3' do isosafrol, enquanto no safrol este sinal é em $\delta 115,6$ ppm, nos carbonos 1' e 2' os sinais ocorrem em $\delta 130,56$ ppm e $\delta 123,56$ ppm, e no safrol estes sinais são observados em 39,8 ppm e 136,5 ppm. Através dos espectros podemos confirmar a formação do isosafrol, e pela técnica de CG-EM indica que o produto majoritário é o *E*-isosafrol (SILVA et al., 2021).

TABELA 13 DADOS DO RMN ^{13}C EM 50MHz DO ISOSAFROL OBTIDO NA REAÇÃO E DO SAFROL COM DADOS OBTIDOS DA LITERATURA EM 75 MHz

n	δ ppm (isosafrol)	δ ppm (safrol literatura) *
1	130,56	39,90
2	123,56	137,60
3	18,32	115,60
1'	132,51	133,80
2'	105,34	108,10
3'	147,93	147,60
4'	146,52	145,80
5'	108,2	108,10
6'	120,07	121,30
1''	100,9	100,80

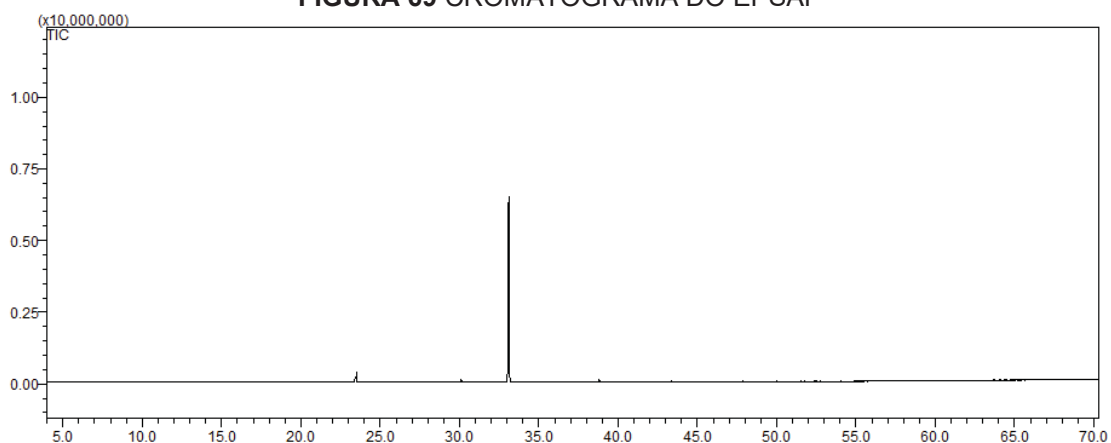
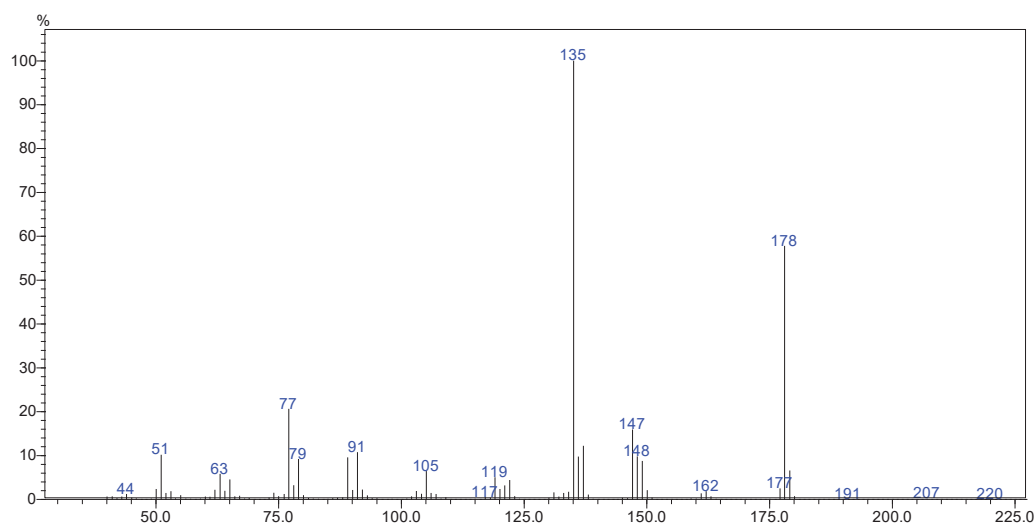
*Fonte: SILVA et al., 2021

FIGURA 68 ESTRUTURAS DO ISOSAFROL E DO SAFROL



5.10.3 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DO EPÓXIDO SAFROL

A reação de epoxidação do safrol teve um rendimento de 82% (m/m) denominado EPSAF e, para a identificação deste composto foi utilizada a técnica de CG-EM, comparando os cromatogramas e espectros de massas do safrol (FIGURA 63) e do epóxido safrol (FIGURAS 70). No cromatograma do epóxido (FIGURA 69) pode-se observar a presença do pico em 33,10 minutos com um IA de 1513. No espectro de massas é possível observar a massa de 178 m/z, com pico base de 135 m/z, tendo uma perda de 43 m/z, caracterizando a perda do radical $\text{CHCH}_2\text{O}\bullet$ formando o ion tropílio dissustituído. Os dados foram comparados com a literatura e confirmou a formação do epóxido safrol (WILLHALM et al., 1964).

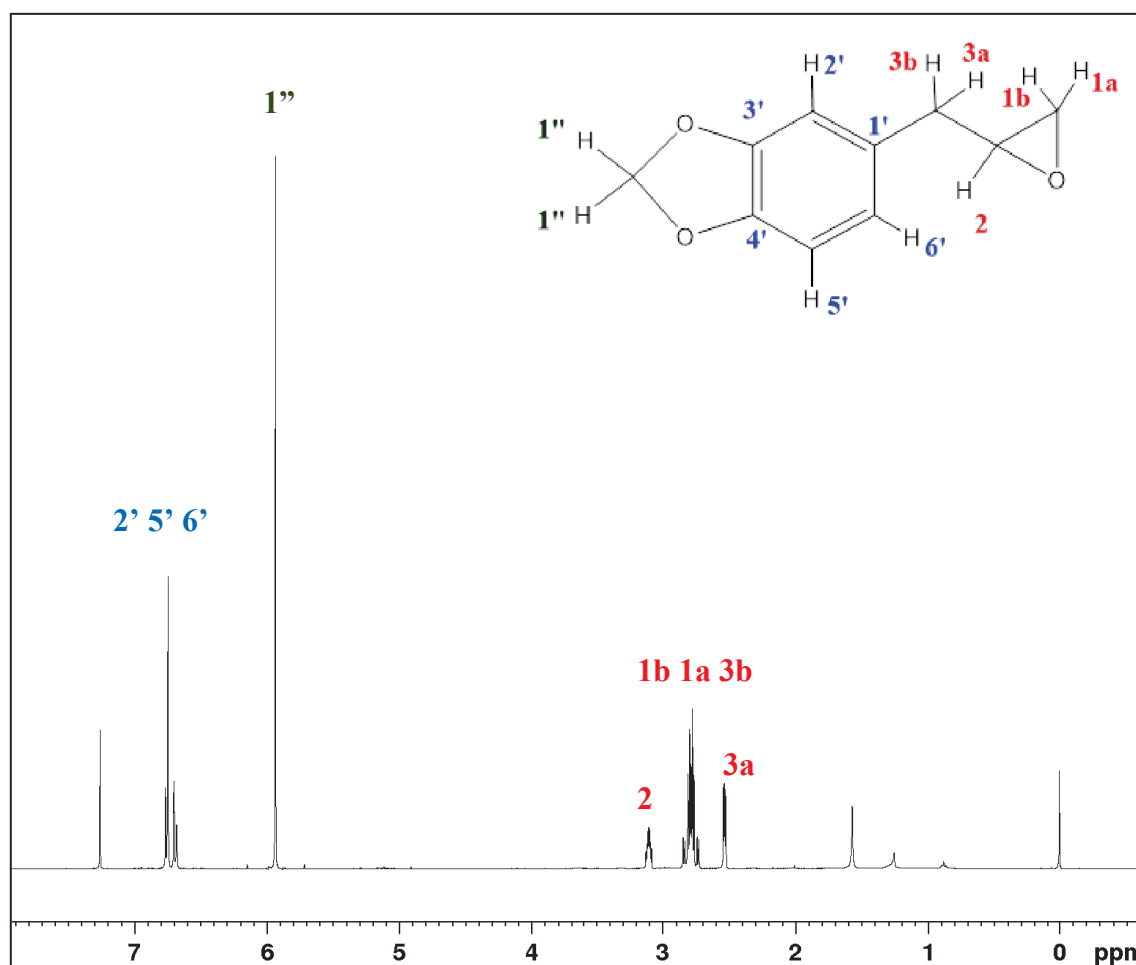
FIGURA 69 CROMATOGRAMA DO EPSAF**FIGURA 70 ESPECTRO DE MASSAS DO EPSAF**

Na análise de RMN ^1H foram observados os sinais descritos na TABELA 14 e foram comparados com dados da literatura.

TABELA 14 DADOS DO RMN ^1H EM 400 MHz DO EPSAF COM DADOS OBTIDOS DA LITERATURA EM 400 MHz

N	EPSAF ^1H δ ppm	Epóxido safrol (literatura) ^1H δ ppm
1a	2,78	2,70
1b	2,81	2,80
2	3,10	3,10
3a	2,53	2,53
3b	2,84	2,87
2'	6,73	6,70
5'	6,75	6,77
6'	6,68	6,68
1''	5,93	5,93

FIGURA 71 ESPECTRO DE RMN DE ^1H EM 400 MHz



Observando o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 71) de EPSAF foi possível identificar 3 hidrogênios aromáticos sendo 2 como dois dupletos com a mesma constante de acoplamento, em 6,75 e 6,68 ppm (1H, $J = 7,81$ Hz, H-5', H-6'), o que evidencia um acoplamento na posição *orto* e um simpleto em 6,73 ppm (1H, H-2'), evidenciando um anel aromático trissubstituído. O sinal em 6,75 ppm (H-5') apresentou estar sobreposto ao simpleto (6,73), mas isto não interferiu em sua atribuição.

Para os sinais de hidrogênios referentes a epoxidação observou-se sinais sobrepostos decorrentes de hidrogênios geminais com deslocamentos distintos devido as diferenças de ambientes químicos e pelo travamento dos hidrogênios através da ciclização do epóxido do H1a e H1b. Isso pode ser observado na FIGURA 72 na qual os sinais do hidrogênio 1a e 1b são distintos mesmo ligados a um mesmo carbono, e há uma sobreposição do H3b com deslocamento na mesma região. O sinal em 3,10 ppm (1H, *dddd*, H-2) (FIGURA 73) com uma multiplicidade de um duplo duplo duplo dubleto, indicando os desdobramentos com os 4 hidrogênios vicinais.

FIGURA 72 ESPECTRO DE RMN DE ^1H EM 400 MHZ DOS H1a, H1b E H3b.

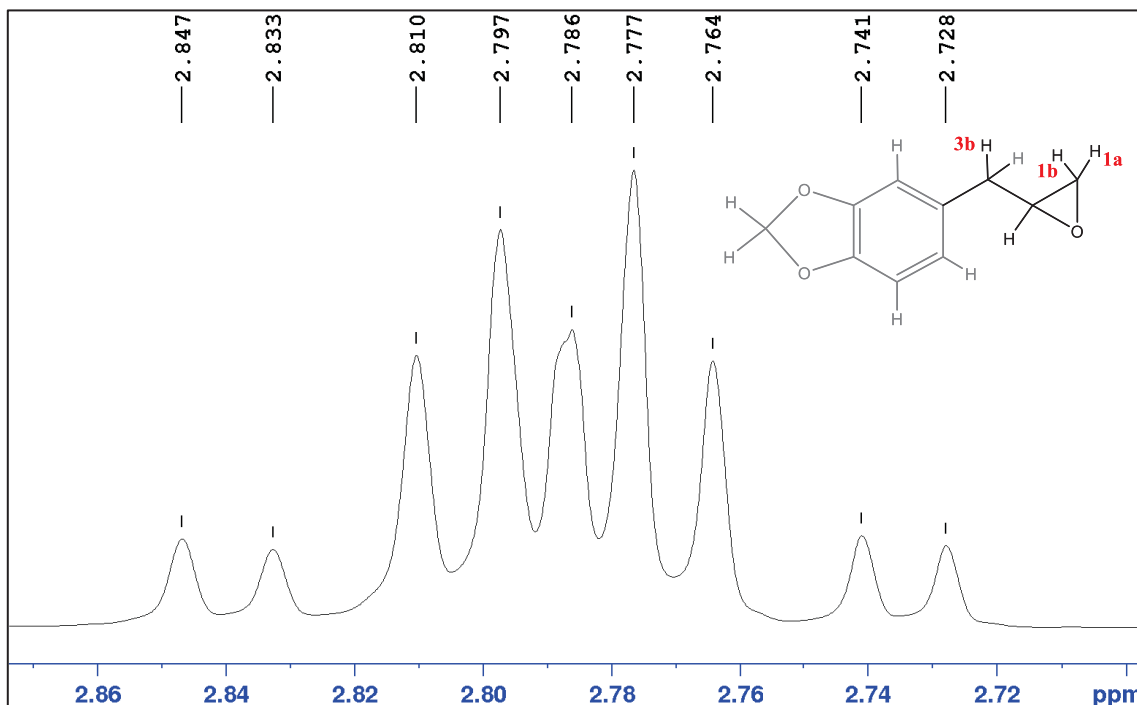
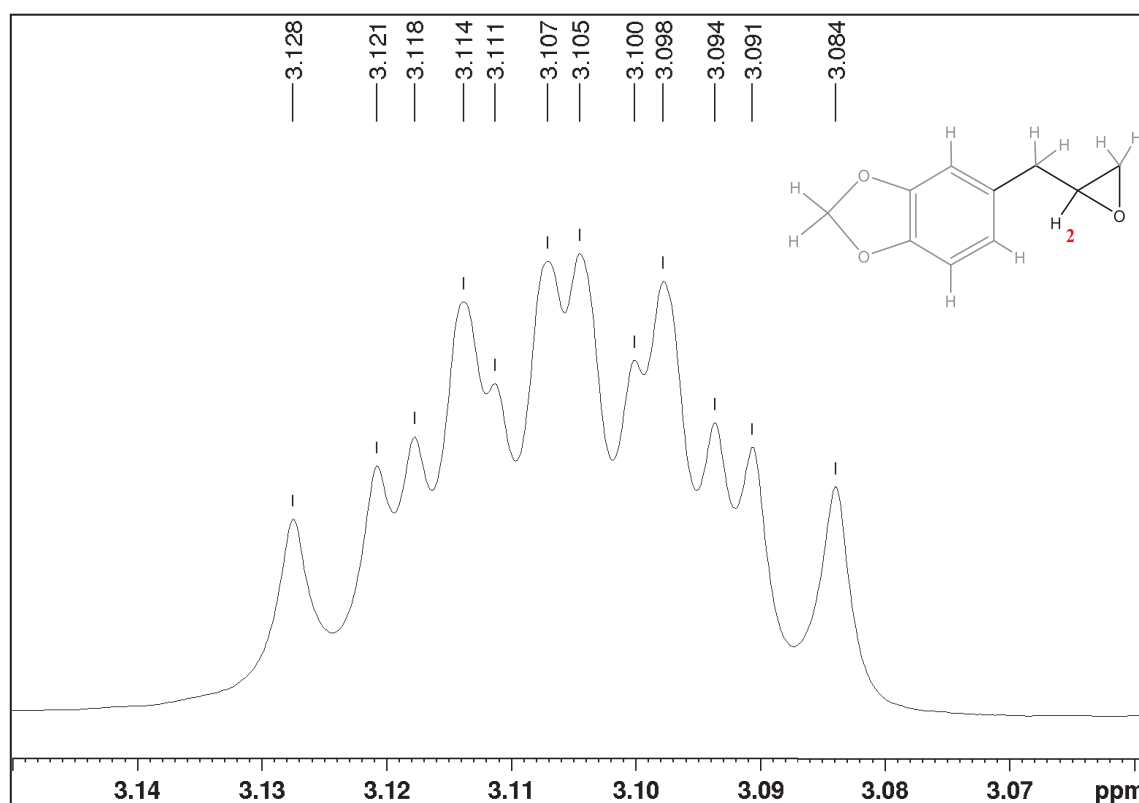
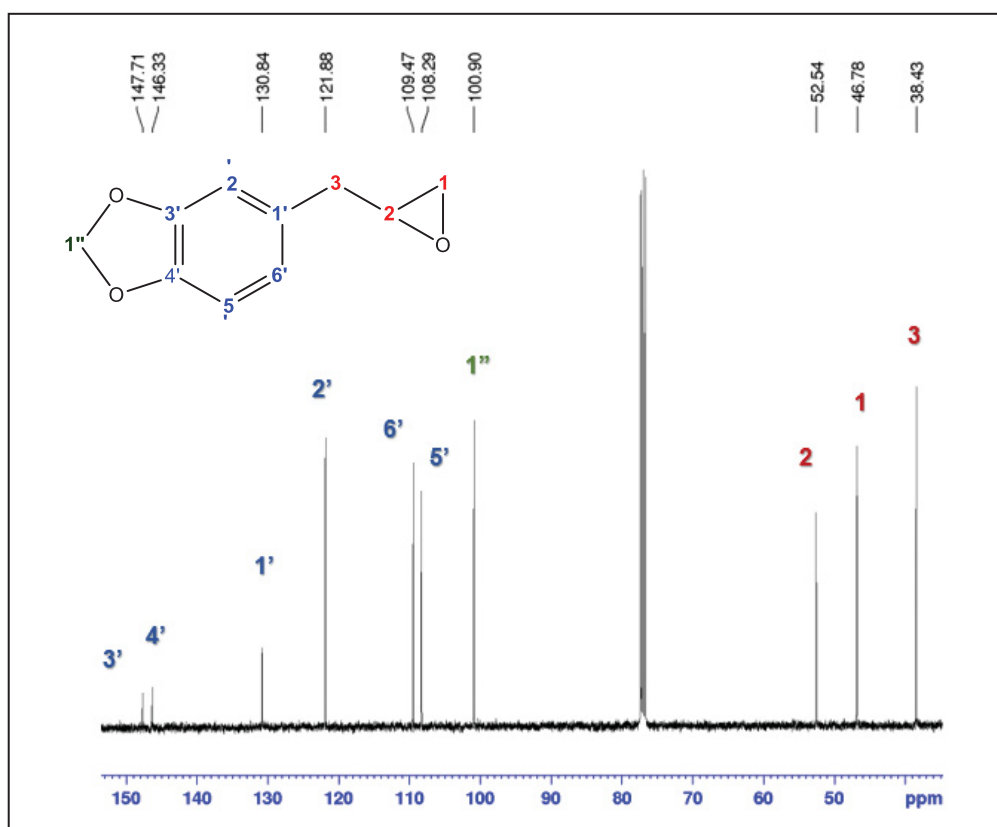


FIGURA 73 ESPECTRO DE RMN DE ^1H EM 400 MHZ DO H_2 

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 74) revelou um total de 10 átomos de carbono. Destes, o sinal em δ_c 52,54 ppm (1C, C-2) e 46,78 (1C, C-1') confirma a presença de e carbono sp^3 ligado ao átomo de oxigênio, indicando a formação do epóxido. Além disso o sinal em δ_c 38,43 ppm (1C, C-3) foi atribuído ao carbono benzílico sp^3 . Os sinais em 108,29 ppm (1C, C-5'), 109,29 ppm (1C, C-6') e 121,88 ppm (1C, C-2') foram atribuídos a átomos de carbonos aromáticos ligados a átomos de hidrogênio, e os sinais em 146,33 ppm (1C, C-3') e 147,71 ppm (1C, C-4') carbonos quaternários ligados ao grupamento metilenodioxido, e em 130,84 ppm (1C, C-1') carbono quaternário ligado a carbono sp^3 , e o sinal em 100,50 ppm (1C, C-1'') referente ao carbono sp^3 ligado a dois átomos de oxigênio do cetel.

FIGURA 74 ESPECTRO EM RNM ^{13}C EM 200MHz

Pelo experimento de espectroscopia de Correlação homonuclear $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY) (FIGURA 75) é possível observar o acoplamento entre os hidrogênios. Por meio desta técnica foi possível determinar os deslocamentos dos hidrogênios (1a, 1b e 3b), os quais tem deslocamentos químicos muito próximos e com sobreposição de sinais, conforme pode ser observado na FIGURA 76. Também foi possível determinar o acoplamento vicinal do H2 com H1a, H1b, H3a, e H3b, além dos acoplamento geminais dos hidrogênios. Na FIGURA 77 se observou o acoplamento *orto* de H5'e H6'.

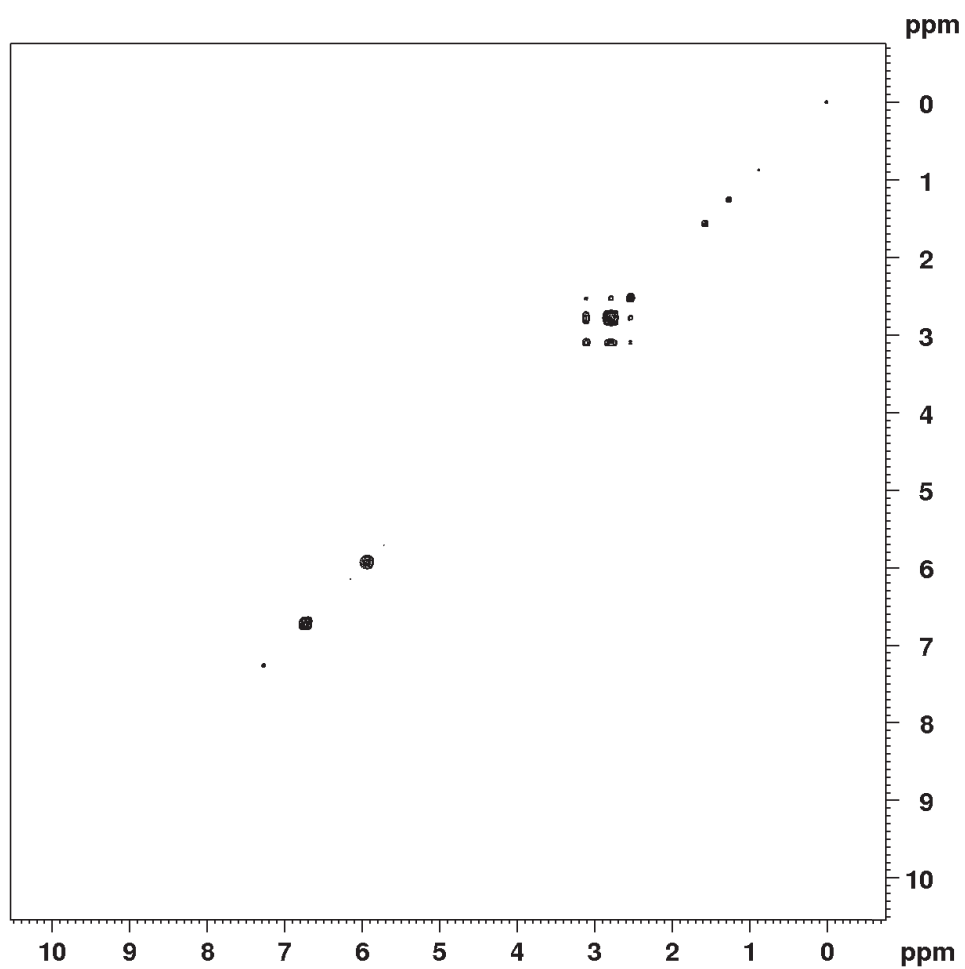
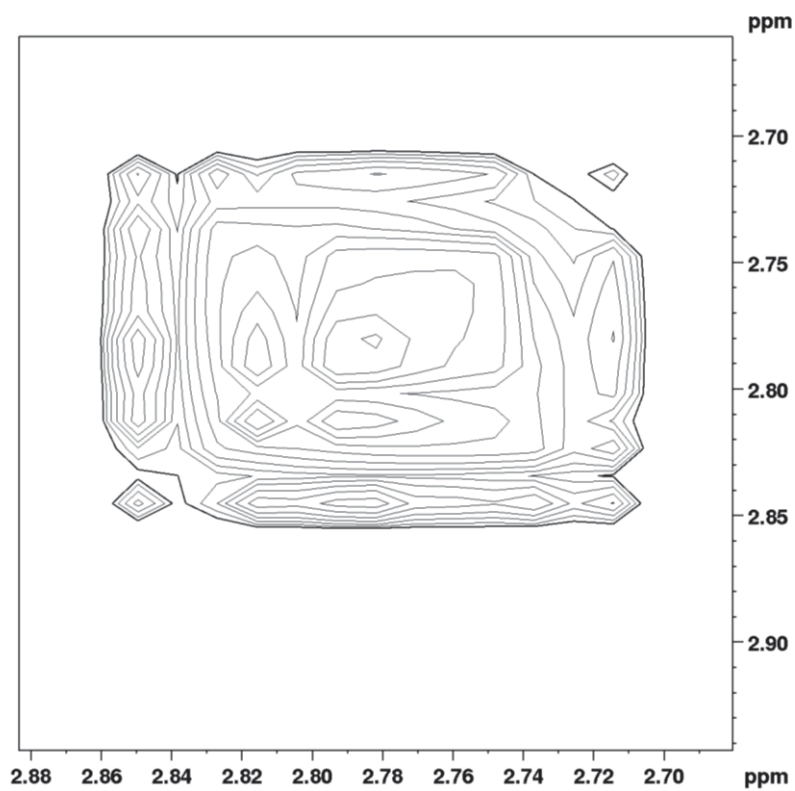
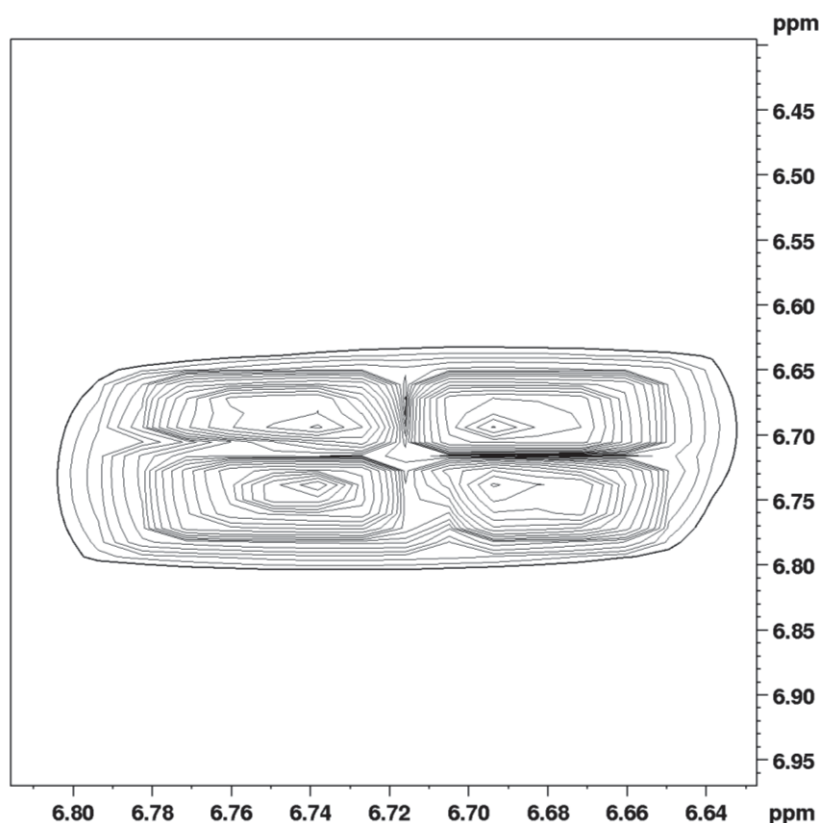
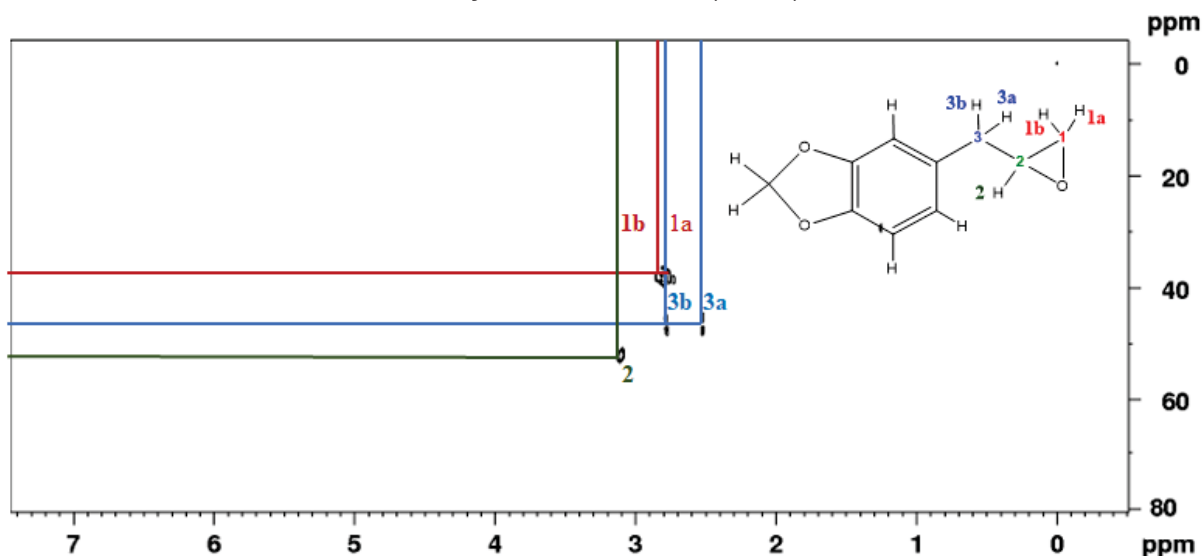
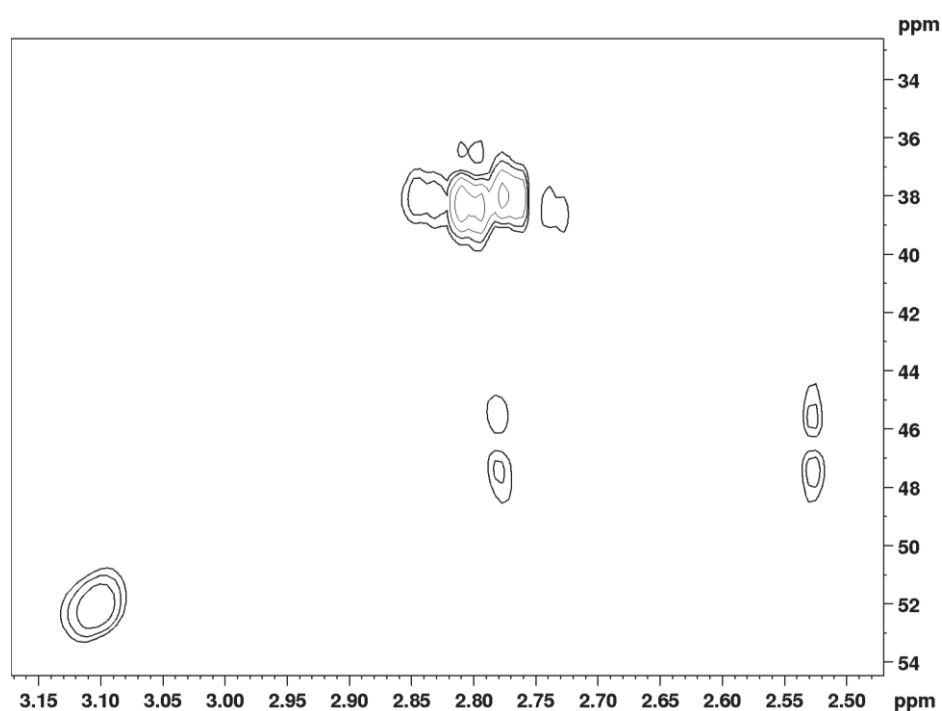
FIGURA 75 MAPA DE CORRELAÇÃO COSY ^1H - ^{13}C **FIGURA 76** MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^1H AMPLIADO NA REGIÃO DE 2,88 A 2,70 ppm

FIGURA 77 MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^1H AMPLIADO NA REGIÃO DE 6,80 A 6,50 ppm

Os hidrogênios de anel aromático em EPSAF 6,73 ppm (H-5') e 6,68 ppm (H-6') revelaram no mapa de correlação do Correlação heteronuclear a uma ligação- editado (HSQC-ED) correlação direta com os carbonos em 108,0 ppm (C-5') e 109,5 ppm (C-6'), respectivamente, e em 6,73 ppm (H-2') correlação com o carbono em 121,88 ppm (C-2'). Através do mapa de correlação foi possível observar os átomos de hidrogênios heterotópicos, no qual pode ser observado na FIGURA 78 , na qual observamos os sinais em 2,78 (H-1a) e 2,81 (H-1b) correlacionados com o carbono em 52,51 ppm (C-1), e os sinais em 2,53 (H-3a) e 2,84 (H-3b), correlacionados com o carbono em 38,43 (C- 3). E a correlação direta do sinal em 3,10 ppm (H-2) com o carbono em 52,54 ppm (C-2).

FIGURA 78 MAPA DE CORRELAÇÃO DO HSQC-ED (^1H - ^{13}C) DO EPÓXIDO.**FIGURA 79** MAPA DE CORRELAÇÃO DO HSQC-ED (^1H - ^{13}C) DO EPÓXIDO AMPLIADA.

Pelo experimento de RMN de Correlação heteronuclear de múltipla-ligação (do inglês- Heteronuclear multiple-bond coherence – HMBC) [^1H - ^{13}C] realizado em 400 MHz, foi possível determinar a posição do H2' pelo acoplamento a longa distância, que acopla a 2 ligações com o sinal em 130,84 (C-1') e a 3 ligações com os sinais em 121,88 (C-6'), 147,71 (C-4') e 38,43 (C-

3). E do H-6' pelo acoplamento a longa distância, que acopla a 2 ligações com o sinal em 109,29 (C-5') e a 3 ligações com os sinais em, 147,71 (C-4') e 38,43 (C-3), conforme a FIGURA 80 .

Pelo mapa de correlação do HMBC, foi possível atribuir a posição do epóxido pelo acoplamento do sinal do H-2 com os sinais a 2 ligações de 38,43 (C-3) e a 3 ligações do sinal em 130,84 (C-1'). Assim sendo possível determinar a estrutura do epóxido safrol (FIGURA 81).

FIGURA 80 MAPA DE CORRELAÇÃO HMBC DE ^1H - ^{13}C EM 400 MHz AMPLIADO.

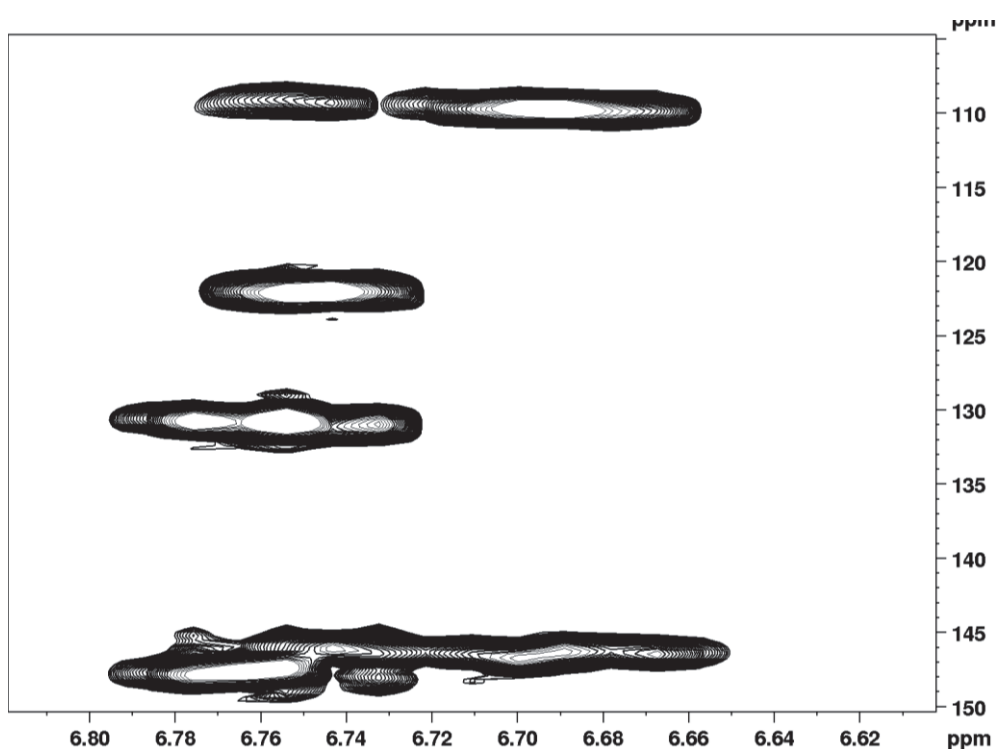
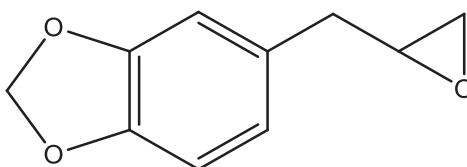


FIGURA 81 ESTRUTURA DO EPÓXIDO SAFROL



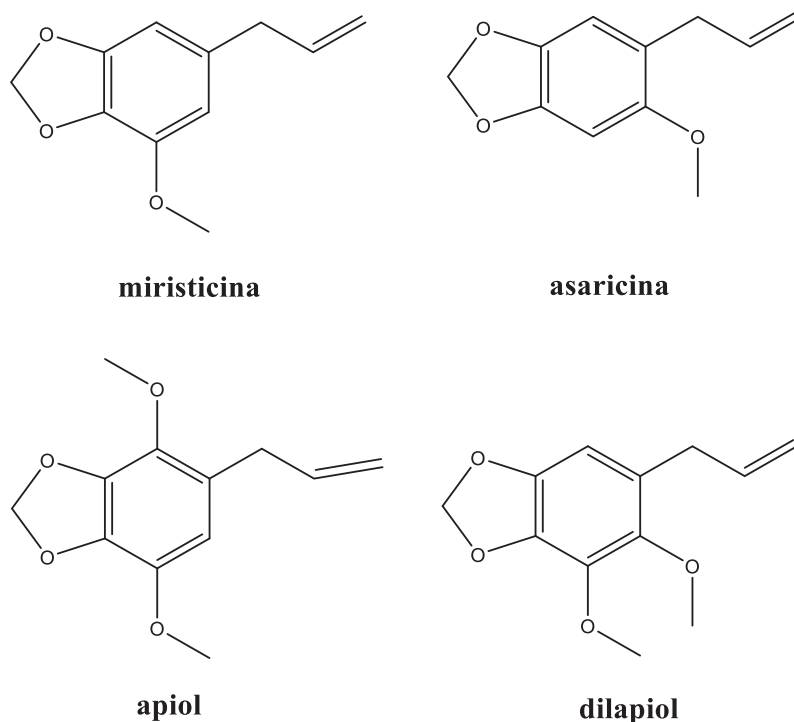
5.11 TESTES BIOLÓGICOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA PARA *B. cinerea*

A TABELA 15 traz os comparativos dos resultados de inibição do fungo *B. cinerea* pelos OEs das sete espécies estudadas. Alguns OEs da mesma espécie que apresentaram diferenças nos seus constituintes majoritários em função da estação do ano foram submetidos ao teste, como a *P. gaudichaudianum* que na estação do verão tem como majoritário o dilapiol $56,47 \pm 2,44$ e o apiol $12,76 \pm 0,89$ e na estação do outono o majoritário é a miristicina $31,16 \pm 1,91$ seguido do dilapiol $15,20 \pm 1,21$ e apiol $17,02 \pm 2,21$.

Observa-se que não houve alteração na medida de Densidade óptica (DO) na amostra testemunha entre as duas medidas, como é esperado. Já para o controle negativo, que serve para verificar a viabilidade do fungo, observa-se, em todos os testes, seu crescimento na leitura de 72 horas (aumento da DO). Os OE de *P. gaudichadianum* da estação do verão apresentou forte atividade contra o *B. cinerea*, com CIM de $20 \mu\text{L mL}^{-1}$, e *P. aduncum* apresentou um CIM de $60 \mu\text{L mL}^{-1}$. Os compostos majoritários são dilapiol ($56,44\% \pm 2,44$) e apiol ($12,76\% \pm 0,89$) e mostrados na FIGURA 82.

Os demais OE apresentaram uma CIM superior a $400 \mu\text{L mL}^{-1}$. Os OE de *P. lhotzkyanum* da estação do verão e *P. malacophyllum* da estação da primavera não apresentaram um valor de CIM dentro da faixa estudada. Para *P. tuberculatum* a CIM foi de $1000 \mu\text{L mL}^{-1}$, o valor obtido é corroborado pelo estudo de Ruiz-Vasquez e colaboradores (2022), em que o OE desta espécie coletada no Peru apresentou uma CIM de $800 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando baixa inibição frente ao *B. cinerea*.

FIGURA 82 – ESTRUTURA DOS MAJORITÁRIOS DO OE DE *P. gaudichaudianum* E *P. aduncum* DA ESTAÇÃO DO VERÃO.



Atualmente o fungo *B. cinerea* é controlado por dois principais agrotóxicos, os quais foram utilizados como controle positivo, cujos princípios ativos são: procimidona (Sumilex®) e o iprodiona (ROVRAL®). O mesmo teste realizado com os OEs foi feito, utilizando o iprodiona para uma comparação da atividade. A TABELA 18 mostra os resultados desses testes.

Foram realizados os testes de microdiluição em placa de 96 poços com o composto miristicina, dilapiol e misturas de arilpropanoides dilapiol: apiol (40:60), e asaricina: miristicina: dilapiol (39:42:19), os resultados estão descritos na TABELA 16. A miristicina teve o melhor resultado com uma CIM de 40 $\mu\text{L mL}^{-1}$, seguido dos valores das misturas de arilpropanoides com 60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em ambas as amostras, o resultado do dilapiol foi de 800 $\mu\text{L mL}^{-1}$, o que mostra que o dilapiol tem baixa atividade contra os esporos de *B. cinerea*. Embora o OE de *P. gaudichaudianum* e de *Piper aduncum* possuam em sua composição o dilapiol, o valor baixo da CIM pode ser explicado pelo fato do efeito sinérgico, devido a mistura complexa dos OEs (BENATO et al, 2018).

Um estudo relata que o dilapiol efetivamente tem a eficácia sinérgica da piretrina em cepas resistentes do besouro da batata do Colorado. Um estudo piloto de um pequeno conjunto de análogos de dilapiol com o larvicida botânico, α -tertienil, mostrou que a modificação da molécula poderia levar a sinérgistas

mais eficazes. Fazolim e colaboradores (2023) mostraram que o dilapiol isolado de *P. aduncum* mostrou-se eficaz tanto separadamente quanto em misturas binárias frente a larva do caruncho (*Spodoptera frugiperda*), com um $LD_{50} = 0,35$ ppm puro e de $LD_{50} = 0,03$ ppm na combinação binária com β -cariofileno. Isso mostra o potencial deste arilpropanoide para ser usado em combinação com agroquímicos devido ao seu efeito sinergista, já que isolado não apresentou efeito significativo frente aos esporos de *B. cinerea* e o OE apresentou uma CIM de $20 \mu\text{L mL}^{-1}$ (BELZILE et al., 2000; BUDZINSKI et al., 2008; CARBALLO-ARCE et al., 2019; FAZOLIM et al., 2023; GOMES et al., 2016; LIU et al., 2014; OMAR et al., 2003).

O safrol foi escolhido devido a sua semelhança estrutural com os arilpropanoides majoritários das espécies de *Piper*, que apresentaram atividade biológica frente ao *B. cinerea*, e por ser um composto comercial, já que o dilapiol, apiol e miristicina até o presente momento só são obtidos através do isolamento vegetal e tem alto valor comercial agregado. Os resultados estão apresentados na TABELA 17. O melhor resultado foi do epóxido safrol com uma CIM de $100 \mu\text{L mL}^{-1}$, e o safrol e o isosafrol tiveram o mesmo valor de CIM de $200 \mu\text{L mL}^{-1}$, e o diidrosafrol uma CIM de $400 \mu\text{L mL}^{-1}$. Isso mostra que mudança na estrutura do safrol pode aumentar ou diminuir a sua atividade, e que a remoção da ligação dupla no caso da hidrogenação diminuiu em 100% a atividade biológica.

5.12 TESTES BIOLÓGICOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA *Colletotrichum* sp..

Para o fitopatógeno *Colletotrichum* sp. foram feitos os testes com os OEs de *Piper*, produtos de reação do safrol e a mistura de arilpropanoides asaricina: miristicina: dilapiol (39:42:19).

Os resultados estão apresentados na TABELA 19, nos quais os OEs de *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum* apresentaram resultados promissores com a CIM de $200 \mu\text{L mL}^{-1}$, e três espécies não foi possível determinar o valor do CIM. Isso mostra que para esse fitopatógeno os OEs de *Piper* não possuem uma alta atividade se comparados com os resultados contra *B. cinerea*. Para se entender os motivos das atividades observadas, experimentos de mecanismo de ação do OEs frente aos fitopatógenos são necessários.

Os resultados para o safrol produtos de reação e a mistura de arilpropanoides estão apresentados na TABELA 20. Os resultados mostraram que o isosafrol e a mistura de arilpropanoides o CIM foi de 200 $\mu\text{L mL}^{-1}$, para o epóxido safrol foram de 250 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e de 600 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para o diidrosafrol e o safrol. O valor obtido para o isosafrol e o epóxido safrol são os mesmos apresentados para o fitopatógeno *B. cinerea*. Embora tenham uma CIM com valor relativamente superior ao controle positivo (6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o isosafrol pode ser um produto promissor em seu uso como biofungicida, embora testes sejam necessários para comprovar sua eficácia contra a doença da antracnose. Os valores obtidos pelo controle positivo estão apresentados na TABELA 21.

TABELA 15 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO NA PRIMEIRA HORA E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *B. cinerea*); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)].

Estação do ano	Verão		Verão		Outono		Verão		Outono		Primavera		Outono	
Espécie	<i>P. aduncum</i>	<i>P. crassinervium</i>	<i>P. crassinervium</i>	<i>P. fuligineum</i>	<i>P. gaudichaudianum</i>	<i>P. gaudichaudianum</i>	<i>P. ihotzkyanum</i>	<i>P. malacophyllum</i>	<i>P. tuberculatum</i>					
Controle negativo	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)
	0,18	0,01	0,10	0,08	0,12	0,01	0,11	0,01	0,10	0,00	0,10	0,04	0,11	0,00
Testemunha	1 hora	0,18	0,01	0,08	0,12	0,01	0,11	0,01	0,10	0,00	0,10	0,04	0,11	0,00
	72 horas	1,01	0,21	0,36	0,07	1,52	0,27	1,32	0,24	0,09	0,35	0,03	0,88	0,13
Valor CIM	1 hora	0,07	0,01	0,07	0,00	0,06	0,00	0,07	0,00	0,00	0,07	0,01	0,07	0,00
	72 horas	0,07	0,01	0,08	0,04	0,06	0,00	0,07	0,00	0,01	0,08	0,01	0,07	0,00
CIM (µg mL ⁻¹)	1 hora	0,23	0,00	0,75	0,04	0,00	0,00	0,26	0,02	0,10	0,14	0,01	0,41	0,00
	72 horas	0,25	0,01	0,75	0,02	0,00	0,00	0,25	0,03	0,13	0,11	0,01	0,45	0,04
		60	800	Não há	400	20	600	800	1250	800	1000			

* No ensaio, foram utilizadas três repetições. DP – Desvio Padrão.
BD –Meio de cultura de caldo de batata dextrose

TABELA 16 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DOS COMPOSTOS ISOLADOS E DE ASSOCIAÇÃO DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *B. cinerea*); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA

Composto	miristicina		dilapiol		dilapiol e apiol		miristicina, asaricina e dilapiol	
	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)
Controle negativo	1 hora	0,10	0,01	0,07	0,00	0,08	0,00	0,08
	72 horas	0,12	0,02	0,46	0,05	0,08	0,00	0,08
Testemunha	1 hora	0,10	0,00	0,07	0,00	0,10	0,01	0,1
	72 horas	0,56	0,06	0,07	0,00	0,41	0,08	0,35
Valor CIM	1 hora	0,10	0,01	0,18	0,04	0,11	0,01	0,11
	72 horas	0,12	0,02	0,18	0,04	0,11	0,01	0,09
CIM (µL mL ⁻¹)		40	800	60	60			

* No ensaio, foram utilizadas três repetições. DP – Desvio Padrão.

TABELA 17 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DO SAFROL E SEUS PRODUTOS DE REAÇÃO DOS ISOLADOS E DE ASSOCIAÇÃO DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *B. cinerea*); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)]

Composto	safrol		diidrosafrol		isosafrol		epóxido safrol	
	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)
Controle negativo	1 hora	0,1	0,01	0,11	0,1	0,01	0,1	0,01
	72 horas	0,36	0,03	0,50	0,45	0,07	0,53	0,08
Testemunha	1 hora	0,08	0,00	0,08	0,08	0,00	0,08	0,00
	72 horas	0,08	0,00	0,08	0,08	0,00	0,08	0,00
Valor CIM	1 hora	0,11	0,00	0,12	0,11	0,01	0,11	0,01
	72 horas	0,09	0,00	0,11	0,12	0,01	0,12	0,01
CIM (µg mL ⁻¹)		200	400	200	100			

* No ensaio, foram utilizadas três repetições. DP – Desvio Padrão.

TABELA 18 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO COM CONTROLE DE FUNGICIDAS (CONTROLE POSITIVO) DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *B. cinerea*); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)].

controle positivo	iprodiona	
	DO	DP (±)
Controle negativo	1 hora	0,19
	72 horas	0,87
Testemunha	1 hora	0,09
	72 horas	0,10
Valor CIM	1 hora	0,51
	72 horas	0,50
CIM (µg mL ⁻¹)		10

No ensaio, foram utilizadas três repetições. DP – Desvio Padrão.

TABELA 19 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DOS OES DE *Piper* DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Colletotrichum* sp); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)]

Estação do ano	Verão		Verão		Inverno		Outono		Primavera		Primavera		Outono	
	<i>P. aduncum</i>		<i>P. crassinervium</i>		<i>P. crassinervium</i>		<i>P. gaudichaudianum</i>		<i>P. lhotzkyanum</i>		<i>P. malacophyllum</i>		<i>P. tuberculatum</i>	
Espécie	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)
Controle negativo	1 hora	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,00
	72 horas	1,04	0,10	1,05	0,11	1,02	0,10	1,08	0,13	1,00	0,10	1,00	0,10	0,10
Testemunha	1 hora	0,11	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01	0,01
	72 horas	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,01	0,10	0,01	0,10	0,01	0,01
Valor CIM	1 hora	0,10	0,00	0,14	0,00	-	-	0,10	0,00	-	-	-	0,18	0,03
	72 horas	0,11	0,00	0,13	0,02	-	-	0,11	0,02	-	-	-	0,16	0,02
CIM (µg mL ⁻¹)	200		600		não há		200		não há		não há		1000	

TABELA 20 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO DO SAFROL E SEUS PRODUTOS DE REAÇÃO DOS ISOLADOS E DE ASSOCIAÇÃO, DE MISTURA DE ARIL PROPANOIDES, DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Colletotrichum* sp); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)]

Composto	safrol		diidrosafrol		isosafrol		epóxido safrol		miristicina, asaricina e dilapiol	
	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)	DO	DP (±)
Controle negativo	1 hora	0,10	0,00	0,10	0,00	0,01	0,10	0,00	0,08	0,00
	72 horas	1,05	0,11	0,99	0,05	0,91	0,08	1,03	0,10	0,08
Testemunha	1 hora	0,11	0,01	0,11	0,00	0,08	0,00	0,10	0,00	0,01
	72 horas	0,10	0,00	0,10	0,00	0,08	0,00	0,10	0,00	0,35
Valor CIM	1 hora	0,13	0,02	0,11	0,01	0,16	0,04	0,10	0,00	0,00
	72 horas	0,01	0,02	0,11	0,00	0,14	0,04	0,08	0,00	0,11
CIM (µg mL ⁻¹)	600		600		200		250		200	

TABELA 21 COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO COM CONTROLE DE FUNGICIDAS (CONTROLE POSITIVO) DA HORA INICIAL E APÓS 72 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Colletotrichum sp*); E TESTEMUNHA [(BD + ÁGUA)].

Composto	Propineb		
		DO	DP (±)
Controle negativo	1 hora	0,09	0,00
	72 horas	1,04	0,13
Testemunha	1 hora	0,11	0,00
	72 horas	0,10	0,01
Valor CIM	1 hora	0,10	0,00
	72 horas	0,09	0,00
CIM (µg mL ⁻¹)		6	

5.13 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE *Piper* FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR CONTATO PARA O FITOPATÓGENO *B. cinerea*.

A TABELA 22 traz os resultados obtidos da inibição do crescimento micelial do *B. cinerea* frente aos óleos selecionados. Alguns OEs da mesma espécie que apresentaram diferenças nos seus constituintes majoritários em função da estação do ano foram submetidos aos testes, como a *P. aduncum* e a *P. crassinervium*.

Pode-se observar que os OEs de *P. aduncum*, *P. fuligenium* e *P. gaudichaudianum*, apresentam uma inibição ao crescimento micelial superior a 80%, com destaque para *P. gaudichaudianum* com uma inibição superior de 90% em concentrações de 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Como em sua grande maioria os OE que apresentaram atividade possuem em sua composição arilpropanoides, isso mostra o potencial destes compostos na inibição do fitopatógeno *B. cinerea*. Nas FIGURAS 83 a 85 (anexo 1, páginas 128 e 129) traz as fotos das placas de petri na 1ª hora e em 72 horas nas concentrações utilizadas nos tratamentos com os OEs de *Piper*.

Foram testados os arilpropanoides isolados, conforme a TABELA 23, no qual pode-se observar que alguns compostos e misturas tiveram uma inibição acima de 80%, como a miristicina, dilapiol:apiol (40:60) e miristicina:dilapiol:apiol (16:36:48) em uma concentração de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O que se observa é que os arilpropanoides isolados dos OEs *Piper* possuem atividade contra o fitopatógeno *B. cinerea*. Embora esta inibição não seja igual ou superior ao do controle positivo, esse é um excelente resultado, visto que os compostos são de origem vegetal com toxidez menor que os agroquímicos comerciais, podendo ser uma alternativa no controle do *B. cinerea*. Mas para isso são necessários testes para avaliação dos níveis de toxidez dos compostos naturais em seres vivos (BHAVANIRAMY et al., 2019; BEDNARCZUK et al, 2010). Nas FIGURAS 86 a 88 (anexo 1, páginas 128 e 129) traz as fotos das placas de petri na 1ª hora e em 72 horas das concentrações utilizadas nos tratamentos dos compostos isolados dos OEs de *Piper* e produtos de reação do safrol.

5.14 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE *Piper* FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR VOLATILIZAÇÃO PARA O FITOPATOGENO *B. cinerea*.

Os resultados obtidos dos testes biológicos estão descritos na TABELA 24. Os OEs que apresentam inibição por volatilização são *P. aduncum*, *P. fuligineum* e *P. gaudichaudianum*, tendo uma inibição acima de 90 %, sendo os melhores resultados em concentração de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *B. cinerea*. E para *P. fuligineum* e *P. gaudichaudianum* que tem inibição acima de 80% na concentração de 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Analisando a composição dos OEs, identificou-se que arilpropanoides são os componentes majoritários, sugerindo seu potencial como agentes fungicidas ou fungistáticos contra *B. cinerea*. As FIGURAS 89 a 91 (Anexo 1, páginas 131 e 130) apresentam fotografias das placas de Petri imediatamente após o início do experimento (1ª hora) e após 72 horas, mostrando os efeitos dos tratamentos com os OEs de Piper nas concentrações utilizadas nos tratamentos.

Nerilo e colaboradores (2020) em seu estudo mostrou a atividade do OE de *Zingiber officinale* Roscoe contra *Aspergillus flavus* em grãos de milho armazenados, indicando uma possível atividade pós-colheita deste OE em locais de estoque dos grãos de milho evitando o aparecimento do fitopatógeno *A. flavus*. Estudos mostram que a atividade antifúngica dos OEs se deve a um efeito sinérgico dos metabólitos especiais, e que também foram observadas as diferenças da atividade antifúngica dos seus compostos isolados e as atividades dos óleos (RAKASH et al., 2015; WANG et al., 2018; LASRAM et al., 2019).

Foram testados os arilpropanoides isolados, conforme a TABELA 25, e observou-se que os isolados apresentaram valores significativos na inibição por volatilização, a miristicina teve uma inibição acima de 86 %, mas destaca-se o safrol que apresentou uma inibição superior a 70%. Nos compostos de modificação estrutural do safrol, o isosafrol se destaca, pois apresentou uma inibição de acima de 99% em uma concentração de 75 $\mu\text{L mL}^{-1}$, isso mostra que a posição da ligação dupla aumenta a reatividade da molécula do isosafrol, já o epóxido safrol não apresentou atividade por volatilização; isto mostra que a atividade desta molécula pode estar ligada ao grupamento alila (CARRASCO et al., 2012). Nas FIGURAS 92 a 94 (anexo 1, páginas 132 e 133) traz as fotos das

placas de petri na 1ª hora e em 72 horas nas concentrações utilizadas nos tratamentos dos isolados dos OEs de *Piper* e produtos de reação do safrol.

5.15 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE *Piper* FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR CONTATO PARA O FITOPATOGENO *Colletotrichum* sp.

A TABELA 26 traz os resultados da inibição dos OEs contra o fungo *Colletotrichum* sp. pelos OE das sete espécies estudadas. O OE da *P. crassinervium* que apresentou diferenças na composição do majoritários, foram submetidos aos testes da conforme já apresentado neste trabalho.

Pela TABELA 26, pode-se observar que apenas a *P. aduncum* da estação do verão teve uma inibição de $91,24\% \pm 6,58$, na concentração de $100 \mu\text{L mL}^{-1}$ e a *P. gaudichaudianum* da estação do outono apresentou uma inibição de $80,27\% \pm 5,51$ na concentração de $100 \mu\text{L mL}^{-1}$. Como nas composições destes dois OEs tem-se como majoritários os arilpropanoides, testar estes compostos isolados podem dar um melhor entendimento sobre a atividade deste OE, se sua ação se deve aos compostos majoritários ou pela ação sinérgica presente nos OEs.

Na TABELA 27 apresenta os resultados do safrol e os produtos de reação. O safrol não apresentou resultado significativo para a inibição, mas os produtos derivados do safrol, apresentaram valores superiores com aumento da inibição, sendo de $75,41\% \pm 6,89$ para o isosafrol e para o epóxido safrol um valor de $67,23\% \pm 6,87$. Em seu estudo Sánchez e colaboradores (2011), avaliaram o OE de *P. marginatum* contra *Alternaria solani*, o qual apresentou um bom efeito fungistático, e na sua composição tem-se o composto majoritário isosafrol com 37,31%. Isso mostra o potencial deste composto no controle de fitopatógenos.

TABELA 22 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - *B. cinerea* (MOFO CINZENTO) NOS OES DE *Piper*.

n	Identificação	Concentração (µL/ mL)	média de inibição (%)	DP (±)
1	<i>P. aduncum</i> (MT) Outono	20	82,94	3,88
2	<i>P. aduncum</i> (MT) Outono	50	93,94	5,43
3	<i>P. aduncum</i> (MT) Outono	100	99,97	0,04
4	<i>P. aduncum</i> (MT) Verão	20	81,10	7,01
5	<i>P. aduncum</i> (MT) Verão	50	97,13	4,02
6	<i>P. aduncum</i> (MT) Verão	100	99,94	0,08
7	<i>P. crassinervium</i> SP (verão)	20	0,00	0,00
8	<i>P. crassinervium</i> SP (verão)	50	26,08	2,53
9	<i>P. crassinervium</i> SP (verão)	100	46,23	6,30
10	<i>P. crassinervium</i> SP (inverno)	20	0,00	2,40
11	<i>P. crassinervium</i> SP (inverno)	50	27,87	0,50
12	<i>P. crassinervium</i> SP (inverno)	100	50,69	0,23
13	<i>P. fuligineum</i> SP (verão)	20	60,46	3,50
14	<i>P. fuligineum</i> SP (verão)	50	95,55	0,40
15	<i>P. fuligineum</i> SP (verão)	100	99,87	0,50
19	<i>P. gaudichaudianum</i> PR (outono)	20	91,92	3,55
20	<i>P. gaudichaudianum</i> PR (outono)	50	99,16	1,06
21	<i>P. gaudichaudianum</i> PR (outono)	100	99,66	0,48
22	<i>P. lhotzkianum</i> PR (Primavera)	20	0,00	0,00
23	<i>P. lhotzkianum</i> PR (Primavera)	50	0,00	0,00
24	<i>P. lhotzkianum</i> PR (Primavera)	100	19,58	0,00
25	<i>P. malacophyllum</i> PA (primavera)	20	0,00	0,00
26	<i>P. malacophyllum</i> PA (primavera)	50	0,00	0,00
27	<i>P. malacophyllum</i> PA (primavera)	100	0,00	0,00
28	<i>P. tuberculatum</i> (MT) Outono	20	0,00	0,00
29	<i>P. tuberculatum</i> (MT) Outono	50	0,00	0,00
30	<i>P. tuberculatum</i> (MT) Outono	100	18,02	0,00
31	Iprodiona (controle positivo)	20	93,38	0,00
32	Iprodiona (controle positivo)	50	100,00	0,00
33	Iprodiona (controle positivo)	100	100,00	0,00
31	Controle negativo	0	0,00	0,00

TABELA 23 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - *B. cinerea* (MOFO CINZENTO) NOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OES DE *Piper* E DO SAFROL E PRODUTOS DE REAÇÃO

n	Identificação	Concentração (µL/ mL)	média de inibição (%)	DP (±)
1	miristicina	20	51,89	8,96
2	miristicina	50	63,83	5,92
3	miristicina	100	80,25	4,95
4	dilapiol	20	35,85	8,64
5	dilapiol	50	62,80	5,41
6	dilapiol	100	77,83	1,54
7	dilapiol (40%) + apiol (60%)	20	54,84	8,24
8	dilapiol (40%) + apiol (60%)	50	80,11	5,09
9	dilapiol (40%) + apiol (60%)	100	86,92	2,25
10	miristicina (16%) + dilapiol (36%) + apiol (48%)	20	48,27	1,34
11	miristicina (16%) + dilapiol (36%) + apiol (48%)	50	67,26	1,78
12	miristicina (16%) + dilapiol (36%) + apiol (48%)	100	82,32	1,43
13	saflol	20	0,00	0,00
14	saflol	50	0,00	0,00
15	saflol	100	0,00	0,00
16	isosaflol	20	7,59	0,17
17	isosaflol	50	14,02	0,25
18	isosaflol	100	28,00	0,57
19	epóxido saflol	20	0,00	0,00
20	epóxido saflol	50	8,21	1,47
21	epóxido saflol	50	27,32	0,97
22	Iprodiona (controle positivo)	20	93,38	2,02
23	Iprodiona (controle positivo)	50	98,23	0,89
24	Iprodiona (controle positivo)	100	96,88	1,64
25	Controle negativo	0	0	0

TABELA 24 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR VOLATILIZAÇÃO - *B. cinerea* (MOFO CINZENTO) NOS OSs DE *Piper*

n	Identificação	Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	média de inibição (%) [*]	DP (±)
1	<i>P. aduncum</i> (MT) Outono	25	93,50	4,32
2	<i>P. aduncum</i> (MT) Outono	50	93,41	4,22
3	<i>P. aduncum</i> (MT) Outono	75	94,82	0,95
4	<i>P. aduncum</i> (MT) Verão	25	92,95	8,38
5	<i>P. aduncum</i> (MT) Verão	50	94,55	7,58
6	<i>P. aduncum</i> (MT) Verão	75	95,21	6,00
7	<i>P. crassinervium</i> SP (verão)	25	0,00	0,00
8	<i>P. crassinervium</i> SP (verão)	50	0,00	0,00
9	<i>P. crassinervium</i> SP (verão)	75	0,00	0,00
10	<i>P. crassinervium</i> SP (inverno)	25	0,00	0,00
11	<i>P. crassinervium</i> SP (inverno)	50	0,00	0,00
12	<i>P. crassinervium</i> SP (inverno)	75	0,00	0,00
13	<i>P. fuligineum</i> SP (verão)	25	75,20	8,65
14	<i>P. fuligineum</i> SP (verão)	50	74,37	0,74
15	<i>P. fuligineum</i> SP (verão)	75	83,03	2,85
16	<i>P. gaudichaudianum</i> PR (outono)	25	76,30	12,77
17	<i>P. gaudichaudianum</i> PR (outono)	50	78,86	7,83
18	<i>P. gaudichaudianum</i> PR (outono)	75	85,01	2,32
19	<i>P. lhotzkianum</i> PR (Primavera)	25	0,00	0,00
20	<i>P. lhotzkianum</i> PR (Primavera)	50	0,00	0,00
21	<i>P. lhotzkianum</i> PR (Primavera)	75	0,00	0,00
22	<i>P. malacophyllum</i> PA (primavera)	25	0,00	0,00
23	<i>P. malacophyllum</i> PA (primavera)	50	0,00	0,00
92	<i>P. malacophyllum</i> PA (primavera)	75	0,00	0,00
25	<i>P. tuberculatum</i> (MT) Outono	25	0,00	0,00
26	<i>P. tuberculatum</i> (MT) Outono	50	0,00	0,00
27	<i>P. tuberculatum</i> (MT) Outono	75	0,00	0,00
28	lprodiona (controle positivo)	25	0,00	0,00
29	lprodiona (controle positivo)	50	0,00	0,00
30	lprodiona (controle positivo)	75	0,00	0,00
28	Controle negativo	0	0,00	0,00

TABELA 25 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL POR VOLATILIZAÇÃO - *B. cinerea* (MOFO CINZENTO) NOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OEs de *Piper* E DO SAFROL E PRODUTOS DE REAÇÃO.

n	Identificação	Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	média de inibição (%)	DP (±)
1	miristicina	25	65,73	2,61
2	miristicina	50	75,02	1,09
3	miristicina	75	86,63	3,08
4	saflol	25	46,93	3,56
5	saflol	50	68,83	5,84
6	saflol	75	75,71	6,17
7	isosafrol	25	46,50	8,92
8	isosafrol	50	78,10	6,17
9	isosafrol	75	99,47	0,65
10	epóxido saflol	25	0,00	0,00
11	epóxido saflol	50	0,00	0,00
12	epóxido saflol	75	0,00	0,00
13	lprodiona (controle positivo)	25	0,00	0,00
14	lprodiona (controle positivo)	50	0,00	0,00
15	lprodiona (controle positivo)	75	0,00	0,00
16	controle negativo	0	0,00	0,00

TABELA 26 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - *Colletotrichum* sp. (ANTRACNOSE) NOS OES DE *Piper*.

n	Identificação	Concentração (µL/ mL)	Média de inibição (%)	DP (±)
1	<i>P. aduncum</i> (verão) (MT)	20	62,24	9,23
2	<i>P. aduncum</i> (verão) (MT)	50	70,10	6,23
3	<i>P. aduncum</i> (verão) (MT)	100	91,24	6,58
4	<i>P. crassinervium</i> (verão) (SP)	20	33,36	7,54
5	<i>P. crassinervium</i> (verão) (SP)	50	54,40	3,78
6	<i>P. crassinervium</i> (verão) (SP)	100	46,83	7,68
7	<i>P. crassinervium</i> (inv) (SP)	20	29,45	0,40
8	<i>P. crassinervium</i> (inv) (SP)	50	49,23	10,98
9	<i>P. crassinervium</i> (inv) (SP)	100	57,23	5,42
10	<i>P. gaudichaudianum</i> (out) (PR)	20	60,25	0,03
11	<i>P. gaudichaudianum</i> (out) (PR)	50	72,12	10,65
12	<i>P. gaudichaudianum</i> (out) (PR)	100	80,27	5,51
13	<i>P. lhotzkyanum</i> (Prim) (SP)	20	60,60	5,87
14	<i>P. lhotzkyanum</i> (Prim) (SP)	50	64,23	4,41
15	<i>P. lhotzkyanum</i> (Prim) (SP)	100	62,98	9,51
16	<i>P. malacophyllum</i> (Prim) (PA)	20	45,79	6,57
17	<i>P. malacophyllum</i> (Prim) (PA)	50	52,62	9,05
18	<i>P. malacophyllum</i> (Prim) (PA)	100	63,81	6,78
19	<i>P. tuberculatum</i> (out) (MT)	20	0,00	0,15
20	<i>P. tuberculatum</i> (out) (MT)	50	44,89	4,66
21	<i>P. tuberculatum</i> (out) (MT)	100	53,12	7,05
22	Propineb (controle positivo)	20	100,00	0,00
23	Propineb (controle positivo)	50	100,00	0,00
24	Propineb (controle positivo)	100	100,00	0,00
25	Controle negativo	0	0,00	0,79

TABELA 27 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL CONTATO - *Colletotrichum* sp. (ANTRACNOSE) NOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OES DE *Piper* E DO SAFROL E PRODUTOS DE REAÇÃO

n	Identificação	Concentração (µL/ mL)	média de inibição (%)	DP (±)
1	saflol	20	32,37	5,23
2	saflol	50	32,45	0,45
3	saflol	100	42,67	8,12
4	isosaflol	20	41,23	4,23
5	isosaflol	50	55,45	6,23
6	Isosaflol	100	75,41	6,89
7	epóxido saflol	20	44,82	5,49
8	epóxido saflol	50	46,73	3,67
9	epóxido saflol	100	67,23	6,87
10	Propineb (controle positivo)	20	100,00	0,00
11	Propineb (controle positivo)	50	100,00	0,00
12	Propineb (controle positivo)	100	100,00	0,00
13	Controle negativo	0	0,00	0,00

TABELA 28 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL VOLATILIZAÇÃO - *Colletotrichum* sp. (ANTRACNOSE)
NOS OEs DE *Piper*.

n	Identificação	Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	média de inibição (%)	DP (\pm)
1	<i>P. aduncum</i> (verão) (MT)	25	59,39	2,92
2	<i>P. aduncum</i> (verão) (MT)	50	74,4	3,27
3	<i>P. aduncum</i> (verão) (MT)	75	77,73	4,32
4	<i>P. crassinervium</i> (verão) (SP)	25	0,00	0,00
5	<i>P. crassinervium</i> (verão) (SP)	50	0,00	0,00
6	<i>P. crassinervium</i> (verão) (SP)	75	23,46	4,23
7	<i>P. crassinervium</i> (inv) (SP)	25	14,23	1,33
8	<i>P. crassinervium</i> (inv) (SP)	50	20,56	1,78
9	<i>P. crassinervium</i> (inv) (SP)	75	27,42	3,78
10	<i>P. gaudichaudianum</i> (out) (PR)	25	34,23	1,04
11	<i>P. gaudichaudianum</i> (out) (PR)	50	55,12	7,46
12	<i>P. gaudichaudianum</i> (out) (PR)	75	60,12	6,23
13	<i>P. lhotzkyanum</i> (Prim) (SP)	25	14,23	2,45
14	<i>P. lhotzkyanum</i> (Prim) (SP)	50	25,91	4,67
15	<i>P. lhotzkyanum</i> (Prim) (SP)	75	32,96	6,25
16	<i>P. malacophyllum</i> (Prim) (PA)	25	13,15	0,89
17	<i>P. malacophyllum</i> (Prim) (PA)	50	17,36	0,45
18	<i>P. malacophyllum</i> (Prim) (PA)	75	30,62	0,78
19	<i>P. tuberculatum</i> (out) (MT)	25	29,66	0,78
20	<i>P. tuberculatum</i> (out) (MT)	50	36,71	2,35
21	<i>P. tuberculatum</i> (out) (MT)	75	44,12	1,98
22	propineb (controle positivo)	25	14,12	0,63
23	propineb (controle positivo)	50	14,23	0,48
24	propineb (controle positivo)	75	15,11	0,78
25	Controle negativo	0	0	0

TABELA 29 TESTE DE CRESCIMENTO MICELIAL VOLATILIZAÇÃO - *Colletotrichum* sp. (ANTRACNOSE)
DO SAFROL E ISOSAFROL

n	Identificação	concentração ($\mu\text{L/ mL}$)	média de inibição (%) *	DP (\pm)
1	Safrol	25	50,42	6,27
2	Safrol	50	54,12	5,79
3	Safrol	75	64,23	5,42
4	Isosafrol	25	41,23	3,49
5	Isosafrol	50	55,77	4,23
6	Isosafrol	75	68,23	4,80
7	Propineb (controle positivo)	25	0,00	0,00
8	Propineb (controle positivo)	50	0,00	0,00
9	Propineb (controle positivo)	75	0,00	0,00
10	Controle negativo	0 #	0,00	0,00

5.16 TESTE DE INIBIÇÃO DOS OEs DE *Piper*, ISOLADOS E PRODUTOS DE REAÇÃO, FRENTE AO CRESCIMENTO MICELIAL RADIAL POR VOLATILIZAÇÃO PARA O FITOPATÓGENO *Colletotrichum* sp..

Os resultados obtidos dos testes biológicos estão descritos na TABELA 28 os OEs que apresentam inibição por volatilização são *P. aduncum*, da estação do verão $77,73 \pm 4,32$ respectivamente, em uma concentração de $75 \mu\text{L mL}^{-1}$, sendo os melhores resultados para *Colletotrichum* sp., já que o controle positivo não apresenta valor significativo de inibição por volatilização, podendo estes OEs serem um alternativa para o pós colheita em armazéns e câmaras de estoque agindo por fumigação (NERILO et al.,2020). Os demais OEs ficaram com valores abaixo de 60%.

Para o safrol e o isosafrol os resultados estão apresentados na TABELA 29, que mostra para o safrol e isosafrol o resultado da taxa de inibição do crescimento micelial por volatilização frente ao *Colletotrichum* sp., foi de $68,23\% \pm 4,80$ e $64,23 \pm 5,42$ respectivamente, em uma concentração de $75 \mu\text{L mL}^{-1}$, isso mostra que neste caso a mudança da posição da ligação dupla não alterou a interação na inibição do *Colletotrichum* sp., o que é diferente ao observado para o *B. cinerea*.

6. CONCLUSÕES

A análise química dos OEs das sete espécies de *Piper*, revelou que em cada um dos óleos há compostos majoritários com concentração superior a vinte por cento de área relativa. Os majoritários nos OEs estudados foram para *P. aduncum* a miristicina, dilapiol e asaricina; para *P. crassinervium* o germacreno D e o *E*-nerolidol; *P. fuligineum* a asaricina e o δ -cardineno; para *P. gaudichaudianum*, o dilapiol, apiol e a miristicina; para *P. lhotzkyanum* o biciclogermareno; *P. malacophyllum* o γ -terpineno e o α -selineno e para *P. tuberculatum* o amorfa-4,7(11)-dieno.

Pela análise sazonal dos OEs, foi possível observar as diferenças nas composições dos OEs de cada espécie, podendo notar as componentes responsáveis por essa diferenciação, o que ampliam o entendimento da produção dos OEs das Piperaceas.

Através da técnica de Cromatografia em camada delgada foi possível realizar o isolamento da miristicina e do dilapiol dos OEs de *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum*.

A reação de redução do safrol teve um rendimento de 70% (m/m). A reação de isomerização do safrol obteve-se um rendimento de 80% (m/m) e do epóxido safrol um rendimento de 78% (m/m).

Os testes biológicos dos OEs e dos arilpropanoides, foram promissores, apontando para o óleo de *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum* da estação do verão que têm como majoritários o dilapiol, asaricina e miristicina, que são compostos promissores para inibição do *B. cinerea* e *Colletotrichum* sp..

Nos testes realizados com o fungo *in vitro*, observou-se que o OE de *P. gaudichadianum* (verão) possui uma CIM de 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e a *P. aduncum* (verão) 60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para inibição dos esporos de *Botrytis cinerea*, em comparação ao fungicida comercial iprodiona (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados são excelentes, tornando os OEs dessas espécies como possíveis alternativas aos fungicidas comerciais.

Os OE de *P. lhotzkyanum* da estação do outono e de *P. fuligineum* da estação do verão, apresentaram uma CIM de 400 $\mu\text{L mL}^{-1}$; os OE de *P. crassinervium* 600 $\mu\text{L mL}^{-1}$ da estação do inverno e *P. gaudichaudianum* da estação do outono apresentaram uma CIM de 600 $\mu\text{L mL}^{-1}$; o OE de *P. crassinervium* da estação do verão apresentou uma CIM de 800 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e os OE de *P. tuberculatum* da estação do outono uma CIM de 1000 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Estes resultados são promissores pois os OEs tendem a possuir menor toxidez que os agroquímicos comerciais. Os OEs de *P. malacophyllum* da estação da primavera não apresentou um valor de CIM.

Nos testes de crescimento micelial radial por contato para *B. cinerea*, foi possível observar que o OE de *P. aduncum*, *P. gaudichaudianum* e *P. fuligineum* apresentaram altos valores de inibição, superiores a 90% em concentrações acima de 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Para os compostos isolados e de modificação estrutural, a miristicina e a mistura de arilpropanoides se destacou com uma inibição acima de 80% em concentrações superiores a 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Nos testes de crescimento micelial radial por volatilização para *B. cinerea*, notou-se que o OE de *P. aduncum*, apresentou valores de inibição superiores a 90% em concentrações acima de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, e que a *P. gaudichaudianum* e *P. fuligineum* uma inibição acima de 80%

em uma concentração superior a $75 \mu\text{L mL}^{-1}$. Para os compostos isolados, o safrol apresentou uma inibição superior a 70% e destaque para o isosafrol que apresentou uma inibição de 99%, o que mostra que a posição da ligação dupla é importante na atividade fungicida.

Os valores de CIM obtidos para *Colletotrichum* sp., do mostrou que o OE de *P. aduncum* e *P. gaudichaudianum* tiveram o melhor resultado com uma CIM de $200 \mu\text{L mL}^{-1}$, em três OEs das espécies de *Piper*, não foi possível determinar o valor da CIM como a *P. crassinervium*, *P. lhotzkianum* e *P. malacophyllum*. O safrol apresentou um CIM de $600 \mu\text{L mL}^{-1}$ juntamente com o diidrosafrol, já o isosafrol apresentou um CIM de $\mu\text{L mL}^{-1}$ e o epóxido de $250 \mu\text{L mL}^{-1}$, isso mostra que a mudança estrutural afeta diretamente a atividade biológica.

Nos testes de crescimento micelial radial por contato para *Colletotrichum* sp., pode-se observar que o OE de *P. aduncum* apresentou valores de inibição superiores a 70% em concentrações acima de $75 \mu\text{L mL}^{-1}$.

Nos testes de crescimento micelial radial por volatilização para *Colletotrichum* sp, os valores obtidos foram abaixo de 70% para os OEs, assim como o safrol e o isosafrol.

7. PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos a perspectiva deste trabalho é, realizar as reações de modificação estrutural na miristicina e no dilapiol. A elucidação da espécie do isolado de *Colletotrichum* sp. . Elaborar os ensaio *ex-vivo* no morango e pimentão com os OEs que apresentaram melhores resultados, os compostos isolados e derivados para *B. cinerea* e *Colletotrichum* sp.. Analisar o mecanismo de ação dos OEs e compostos isolados, nos fitopatógenos através da técnica de microscopia de fluorescência. Essas etapas são necessárias para um entendimento sobre os mecanismos de ação dos OEs e compostos.

Com os resultados apresentados, fazer propostas de microencapsulação dos OEs para uso em campo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectroscopy**. 4.1th ed. Alfred Publishing Corporation, 804 p., 2017.
- ALMEIDA, R. P.; SOUTO, R. N. P.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J.G.S. Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 6, p. 1427-1434, 2009.
- ANDRADE, E. H. A., et. al. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 4–6, p. 669-675, 2011.
- ANTUNES, L. E. C. Brasil no pódio da produção de morangos. **Campo & Negócios**, maio de 2018. Disponível em: <<http://www.revistacampoenegocios.com.br/brasil-no-podio-da-producao-de-morangos/>>. Acesso em 26 de julho de 2018.
- BAGHERI, H.; MANAP, M. Y. B. A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hidro-distillation. **Talanta**, v. 121, p. 220-228, 2014.
- BASTOS, N. B.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle pós colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 55-557, 2004.
- BENATO, E.A.; SIGRIST, J.M.M.; OLIVEIRA, J.J.V.; DIAS, M.S.C.; CORREA, A.C.C. Controle de doenças pós-colheita de uva 'Itália' e avaliação dos níveis residuais de SO₂ e thiabendazol. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.1, p.107-112, 1998.
- BENATO, E. A., BELLETTI, T. C., TERAPO, D., FRANCO, D. A. D. S.. Óleos essenciais e tratamento térmico no controle pós-colheita de bolor verde em laranja. **Summa Phytopathologica**, v. 44, p. 65-71, 2018.
- BENITEZ, C.; DUPRAT, F.; INSUA, E. Almacenamiento de peras y manzanas em atmosfera controlada. **La Alimentacion Latinoamericana**, v.210, p.27-33, 1996.
- BHAVANIRAMYA, S., VISHNUPRIYA, S., AL-ABOODY, M. S., VIJAYAKUMAR, R., BASKARAN, D. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. **Grain & oil science and technology**, v. 2, n. 2, p. 49-55, 2019.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: Aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594 2009.

BOLLEN, G. J. e SCHOLTEN, G. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in Cyclamen. Netherlands. **Journal of Plant Pathology** n.77, p. 83-90. 1971.

BRAGA, A. G. S. et al. Acaricidal activity of extracts from different structures of *Piper tuberculatum* against larvae and adults of *Rhipicephalus microplus*. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 57-62, 2018.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CAMILI, E. C. BENATO, E. A. PASCHOLATI, S. F. CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathol.** Botucatu, v. 33, n. 3, p. 215-221, 2007.

CARNEIRO, J. N. P. et al. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 135, p. 110987, 2020.

CARVALHO, C. C. C. R. De; FONSECA, M. M. R. De. Biotransformation of Terpenes. **Biotechnology Advances**, v.24, p.134-142. 2006.

CARRASCO, H.; RAIMONDI, M.; SVETAZ, L.; LIBERTO, M. D.; RODRIGUEZ, M. V.; ESPINOZA, L.; MADRID, A.; ZACCHINO, S. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1002–1024, 2012.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils ou selected bacteria, fungi and viruses. **Journal Essentials Oil Research**, v. 12, p. 630-649, 2000.

CUNHA, A. P. D.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Fármacos aromáticos (plantas aromáticas e óleo essenciais). In: CUNHA, A. P. D. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p. 339-401, 2005.

DA COSTA-OLIVEIRA, C., RAMOS, Y. J., DE QUEIROZ, G. A., GUIMARÃES, E. F., VIÇOSA, A. L., DE LIMA MOREIRA, D. Essential oils from *Piper lhotzkyanum* Kunth leaves from Brazilian Atlantic forest: Chemical composition and stability in different storage conditions. **Journal of Oleo Science**, v. 70, n. 7, p. 995-1005, 2021.

DE PERNAMBUCO-BRASIL, Mata Atlântica. Acaracidal Property and Repellent Action Against *Tetranychus Urticae* Koch of Essential Oils from Three Species of *Piper* That Occur in Fragments of the Atlantic Forest in the State of Pernambuco, Brazil. **Revista Virtual Quimica**, v. 12, n. 3, p.629-638, 2020.

DE OLIVEIRA, M. D. L. B., DE FRANÇA, T. A. R., CAVALCANTE, F. S. A., LIMA, R. A. O gênero *Piper* no Brasil: O estado da arte da pesquisa. **Biodiversidade**, v. 19, n. 3, 2020.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed. - Londres: John Wiley & Son LTD; p. 539, 2009.

DYER, L. A.; RICHARDS, J.; DODSON, C. D. Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of *Piper* Amides. (2004). In: Dyer, L. A.; Palmer, A. D. N. ***Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution***, p. 117-139.

DOS SANTOS SALES, V., CABRAL, F. R., DO NASCIMENTO SALES, E. P., CARVALHO, T. B., COSTA, M. H. N., DE OLIVEIRA, V. A. P., KERNTOPF, M. R. Central depressant effects of *Piper tuberculatum* Jacq essential oil in mice. **Food Bioscience**, v. 48, p. 101813, 2022.

DUARTE, M. C. T., LEME, E. E., DELARMELINA, C., SOARES, A. A., FIGUEIRA, G. M., SARTONATTO, A Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DALEN, N. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – an introduction. In. ***Botrytis: Biology, Pathology and Control***, Springer, Dordrecht, p. 1-6, 2007.

FABIANE, K. C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A. C. dos; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia/ Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 197-203, 2008.

FAZOLIN, M., BIZZO, H. R., MONTEIRO, A. F., LIMA, M. E., MAISFORTE, N. S., GAMA, P. E. Synergism in Two-Component Insecticides with Dillapiol against Fall Armyworm. **Plants**, v. 12, n. 17, p. 3042, 2023.

FERNANDES-JUNIOR, A.; MACHADO, B. F. M. T. M. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos acadêmicos**, Tubarão, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Editora da Unicamp, p. 493, 2015.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. Disponível em:

<https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf>. Acesso em 06 de agosto de 2018.

FRATIANNI, F. et al. Biochemical characterization of traditional varieties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) of the Campania Region, Southern Italy. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 556, 2020.

FRIZZONE, José Antônio; GONÇALVES, Antônio Carlos Andrade; REZENDE, Roberto. Produtividade do pimentão amarelo, *Capsicum annuum* L., cultivado em ambiente protegido, em função do potencial mátrico de água no solo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 23, p. 1111-1116, 2001.

GAO, SHEN; SINGH, JAGDISH. In vitro percutaneous absorption enhancement of a lipophilic drug tamoxifen by terpenes. **Journal of controlled release**, v. 51, n. 2-3, p. 193-199, 1998.

GARRIDO, C.; CARBÚ M.; FERNÁNDEZ-ACERO, F. J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, V.E.; CANTORAL, J. M. New insights in the study of strawberry fungal pathogens. In: **Genomics, Transgenics, Molecular Breeding and Biotechnology of Strawberry**, Vol. 5. (Husaini, A.M. and Mercado, J.A., eds), pp. 24–39. Genes, Genomes and Genomics.

Japan: Global Science Books, Miki cho, 2011.

GARRIDO, L.R. SÔNEGO, O. R. **Doenças fúngicas e bacterianas do pessegueiro. Sistema de Produção de Pêssego de Mesa na Região da Serra Gaúcha**. Embrapa, Janeiro de 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessegueiro/PessegodoMesaRegiaoSerraGaucha/doenca.htm>>. Acesso em 14 de julho de 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

GUERRINI, A., SACCHETTI, G., ROSSI, D., PAGANETTO, G., MUZZOLI, M., ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M., MALDONADO, M. E., BRUNI, R.. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from eastern Ecuador. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 39-48, 2009.

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

GUIMARÃES, E. F.; 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.

GUIMARÃES, E.F.; QUEIROZ, G.A.; MEDEIROS, E.V.S.S.; MONTEIRO, D.; CARVALHO-SILVA, M. Manekia in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12870>>. Acesso em: 10 maio 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/FB12735>>. Acesso em: 10 maio 2023.

GUTIÉRREZ, Y., MONTES, R., SCULL, R., SÁNCHEZ, A., COS, P., MONZOTE, L., & SETZER, W. N. Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of *Piper aduncum* var. *ossanum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 12, p. 1715-1719, 2016.

HEMATPOOR, A., LIEW, S. Y., AZIRUN, M. S., & AWANG, K. Insecticidal activity and the mechanism of action of three phenylpropanoids isolated from the roots of *Piper sarmentosum* Roxb. **ScientificReports**, v. 7, n. 1, 2017.

HENZ, G. P.; COSTA, C. S. R. da; CARVALHO, S.; BANCI, C. A. Como cultivar pimentão: alta produtividade. **Revista Cultivar Hortalças e Frutas**, n.42, fev./mar. p.1-7, 2007.

HENRIQUES, A.T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CECHIMEL FILHO, V. (orgs.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2.ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, p.219-256, 2009.

HOLTZ, G.; COERTZE, S.; WILLIAMSON, B. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: ***Botrytis: Biology, Pathology and Control***, Springer, Dordrecht, p. 9-27, 2007.

HUANG, A. C.; OSBOURN, A. Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection. ***Pest management science***, v. 75, n. 9, p. 2368-2377, 2019.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S.; ZIMMER, E. A. Phylogenetic Relationships of the Perianthles piperales: Reconstructing the Evolution of Floral Development. ***International Journal of Plant Sciences***, v. 165, n. 3, p. 403-416, 2004.

JING, G.X.; TAO, N.G.; JIA, L.; ZHOU, H.E. Influence of α -terpineol on the growth and morphogenesis of *Penicillium digitatum*. ***Botanical studies***, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2015.

KADER, A. A. Quality and its maintenance in relation to the postharvest physiology of strawberry. In: DALE, A.; LUBY, J. J. (eds.). *The strawberry into 21st century*. Portland: Timber Press, 1991. p. 145-152

KARPIŃSKI, Tomasz M. Essential oils of Lamiaceae family plants as antifungals. ***Biomolecules***, v. 10, n. 1, p. 103, 2020.

KATAN, T. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ('dicarboximide') fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. ***Plant Pathology*** n. 31, p. 133-141. 1982.

KAROUSOU, R.; KOUREAS, D., N.; KOKKINI, S. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. ***Phytochemistry***, v. 66, p. 2668-2673, 2005.

KINGHORN, A. D. Biologically Active Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties. ***Journal of Natural Products***, v.50, p. 1009-1024, 1987.

KRINSKI, D; FOERSTER, L. A. Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 40, p. 676-687, 2016.

LASRAM, S., ZEMNI, H., HAMDİ, Z., CHENENAOUİ, S., HOUİSSA, H., TOUNSI, M. S., GHORBEL, A. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi* L.,

Coriandrum sativum L. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. **Industrial crops and products**, v. 134, p. 11-18, 2019.

LIMA, R. K. **Chemical characterization and bioactivity of the essential guava tree oil upon fall armyworm**, 2006. 57 p. Dissertation (Master in Agronomy/Agrochemistry and Agrobiotechnology) Federal University of Lavras, MG.

LIMA, D. K. S., et. al. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C. DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 274-282, 2012.

LOPEZ, A., MING, D. S., TOWERS, G. H. N. Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper lanceaefolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 62–64, 2002.

LOPES, S. M. et al. AVALIAÇÃO DE FRUTOS DE PIMENTÃO SUBMETIDOS AO ENSACAMENTO NO CULTIVO ORGÂNICO. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, 2018.

MA, B.; BAN, X.; HUANG, B.; HE, J.; TIAN, J.; ZENG, H.; CHEN, Y.; WANG, Y. Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing Sclerotinia rot of rapeseed. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131733, 2015.

MARRIOTT, J. P.; SHELLIE, R.; CORNWELL, C. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 1–22, 2001.

MATASYOH, J. C., et. al. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, p. 26-28, 2011.

MEDEIROS, A. S. S. **Flora do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil - família Piperaceae**. Escola Nacional de Botânica Tropical do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2006.

MEDEIROS, E., GUIMARÃES, E. (2007). Piperaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim De Botânica**, 25(2), 227-252

MELO, R. C. de A. e. Plantas medicinais, óleos essenciais e aromas – Parte I: Definições. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n 2, mar/abr, 2005.

MELLO, L. M. R. Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015. **Noticias EMBRAPA**, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>>.

Acesso em 13 de agosto de 2018.

MOHR, F. B. M., LERMEN, C., GAZIM, Z. C., GONÇALVES, J. E., ALBERTON, O. Antifungal activity, yield, and composition of *Ocimum gratissimum* essential oil. **Genet. Mol. Res**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2017.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional do Itatiaia – Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 59, p. 161-195, 2008.

MORAIS L.A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p.: 4050- 4063, 2009.

NAVES, R. L. TESSMANN, D. J. GARRIDO, L. R. SÔNEGO, O. R. Sistema de Produção de Uva de Mesa no Norte do Paraná. Embrapa Uva e Vinho Sistemas de Produção, 10. EMBRAPA.2005.

NERILO, S. B., ROMOLI, J. C. Z., NAKASUGI, L. P., ZAMPIERI, N. S., MOSSINI, S. A. G., ROCHA, G. H. O., GLORIA, E. M., FILHO, B. A.A., MACHINSKI JR, M. Atividade antifúngica e inibição da produção de aflatoxinas pelo óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe contra *Aspergillus flavus* em grãos de milho armazenados. **Ciência Rural**, v. 50, n. 6, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly FourDecades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, n. 83, p. 770-803, 2020.

OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**, 2ª ed. - Alemanha: Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the Genus *Piper*. **Phytochemistry**. GrãBretanha. v. 46, n. 4, p 591-673. 1997.

PEDROSO, M. P.; GODOY, L. A. F. de; FIDÉLIS, C. H. de V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (CG xGC). **Química nova**, v. 32, n. 2, 421-430,2009.

PELISSARI, G. P.; PIETRO, R. C. L. R.; MOREIRA, R. R. D. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodiumdivaricatum* (Rich.) DC.,

Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia/ Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 70-74, jan/ mar, 2010.

PEREIRA FILHO, A. A., PESSOA, G. C. D. Á., YAMAGUCHI, L. F., STANTON, M. A., SERRAVITE, A. M., PEREIRA, R. H., KATO, M. J.. Larvicidal activity of essential oils from *Piper* species against strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 685864, 2021.

PRAKASH, B., KEDIA, A., MISHRA, P. K., DWIVEDY, A. K., DUBEY, N. K. Assessment of chemically characterised *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its major compounds as plant-based preservative in food system based on their efficacy against food-borne moulds and aflatoxin secretion and as antioxidant. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 8, p. 1792-1798, 2015.

RAMAGE, G.; MILLIGAN, S.; LAPPIN, D.F.; SHERRY, L.; SWEENEY, P.; WILLIAMS, C.; BAGG, J.; CULSHAW, S. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 220, 2012.

RANDRIANALIJONA, J.; RAMANOELINA, P.A.R.; RASOARAHONA, J.R.E.; GAYDOUB, E.M. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, p. 46-52, 2005.

RAHMAN, S. F. S. A.; SIJAM, K.; OMAR, D.; WAHAB, M.Z.I A. Identification of phenolic compounds and evaluation of antibacterial properties of *Piper sarmentosum* Roxb. against rice pathogenic bacteria. **Malaysian Journal of Microbiology**, vol. 12, n. 6, p. 475-484, 2016.

RUIZ-VÁSQUEZ, L., RUIZ MESIA, L., CABALLERO CEFERINO, H. D., RUIZ MESIA, W., ANDRÉS, M. F., DÍAZ, C. E., GONZALEZ-COLOMA, A. Antifungal and Herbicidal Potential of Piper Essential Oils from the Peruvian Amazonia. **Plants**, v. 11, n. 14, p. 1793, 2022.

SANGWAN, N. S.; FAROQUI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, n. 3, p. 3-21, 2001.

SANTOS, T. G.; FUKUDA, K.; KATO, M. J.; SARTORATO, A.; DUARTE, M. C.T.; RUIZ, A. L. T.G.; CARVALHO, J. E.; AUGUSTO, F.; MARQUES, F. A.; MAIA, B. H. L.N. S. Characterization of the essential oils of two species of Piperaceae by one-

and two-dimensional chromatographic techniques with quadrupole mass spectrometric detection. **Microchemical Journal**, v.115, p. 113-120, 2014.

SANTOS, P. R. D. et al. Effect of Essential Oil of *Piper tuberculatum* var. minus C. DC. Leaves on the Hepatic Microsomal 7-Ethoxyresorufin O-Deethylase (EROD) and 7-Ethoxycoumarin O-Deethylase (ECOD) Activity in Rats. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 2, p. 329-334, 2015.

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, p. 477-481, 2012.

SANTOS, D. Y. A. C. (org). **Biossíntese, funções e aplicações dos metabólitos secundários de plantas**. Curitiba: Appris, 2020,

SAUTER, I. P., et. al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 292-295, 2012.

SCHINDLER, B., HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: Seasonal Characterization of the Essential Oil Chemical Composition of Leaves and Reproductive Organs. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 60, 2017.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**. v. 58, n. 3, p. 147-166. 1987.

SHEN, Q.; ZHOU, W.; LI, H.; HU, L.; MO, H. ROS involves the fungicidal actions of thymol against spores of *Aspergillus flavus* via the induction of nitric oxide. **PLoS one**, v. 11, n. 5, p. e0155647, 2016.

SILVA, D.M.H. & BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira** 32:143-145. 2007

SILVA, M. G., VELOSO, M. P., CHAGAS, T. A., CORDEIRO, M. M., ALVES, L. B., MONTI, P. A., SOUZA, R. V. Molecular Modeling and Chemical Synthesis of New Safrol Oxime Ether Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 1476-1490, 2021.

SOARES, K. D.; BORDIGNON, S. A. L; APEL, M. A. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the essential oils of *Piper gaudichaudianum* and *Piper mikanianum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 297, p. 115533, 2022.

SOUZA, L. A. D. et al. Vegetative propagation in Piperacea especies. **Brazilian Archives od Biology and Technology**, v. 52, n. 6, p. 1357-1361, 2009.

SOUZA, D. P., PIMENTEL, R. B., SANTOS, A. S., ALBUQUERQUE, P. M., FERNANDES, A. V., JUNIOR, S. D., OLIVEIRA, J. T. A., RAMOS, M. V., RATHINASABAPATHI, B., GONÇALVES, J. F. Fungicidal properties and insights on the mechanisms of the action of volatile oils from Amazonian Aniba trees. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111914, 2020.

SPEROTTO, A. R. M., et. al. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57-68, 2013.

DE SOUZA, M. T. et al. Chemical composition of essential oils of selected species of Piper and their insecticidal activity against *Drosophila suzukii* and *Trichopria anastrephae*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 13056-13065, 2020.

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

WANG, H., YANG, Z., YING, G., YANG, M., NIAN, Y., WEI, F., KONG, W. Antifungal evaluation of plant essential oils and their major components against toxigenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 180-186, 2018.

WANKE, S.; JARAMILLO, M. A.; BORSCH, T.; SAMAIN, M-S.; QUANDT, D.; NEINHUIS, C. Evolution of piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 42, p. 477-497, 2007.

WILLHALM, B.; THOMAS, A. F.; GAUTSCHI, F. Mass spectra and organic analysis—II: Mass spectra of aromatic ethers in which the oxygen forms part of a ring. **Tetrahedron**, v. 20, n. 5, p. 1185-1209, 1964.

YARDEN, O. e KATAN ,T. Mutations leading to substitution at amino acids 198 and 200 of betatubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**.n.83, p. 1478-1483. 1993.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; **Química de produtos naturais, novos fármacos ea moderna farmacognosia**. 3 ed. In. _____. Novas perspectivas dos Produtos Naurais na Química Medicinal Moderna. 2014.

XIANG, C.-P. et al. Chemical Composition and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Essential Oils from *Piper* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 18, p. 3702–3710, 2017.

XU, Z., CHANG, J., ZHANG, P., GUAN, X., CHEN, Y., FAN, H. Collagen modified with epoxidized safrole for improving antibacterial activity. **RSC Advances**, v. 7, n. 79, p. 50300–50306, 2017.

ZAPPI, D. C.; et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Vol. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ANEXO I – TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS DE APOIO

TABELA 30 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE *P. aduncum*

Nº no gráfico de loadings	Composto
1	α - pineno
2	β - pineno
3	α - cubebeno
4	ciclosativeno
5	α - copaeno
6	β - bourboneno
7	β - elemeno
8	α - gurjuneno
9	<i>E</i> - cariofileno
10	β - copaeno
11	aromadendreno
12	<i>trans</i> -muurola-3,5-dieno
13	α - humuleno
14	<i>allo</i> aromadendreno
15	<i>trans</i> -cardina-1(6),4-dieno
16	γ - muuroleno
17	germacreno D
18	asaricina
19	n-pentadecano
20	biciclogermacreno
21	cubebol
22	miristicina
23	<i>trans</i> - cadina-1,4-dieno
24	elemicina
25	(<i>E</i>) - nerolidol
26	espatulenol
27	óxido de cariofileno
28	ledol
29	epóxido de humuleno
30	dilapiol
31	1- <i>epi</i> -cubenol
32	α - acorenol
33	α - muurolol (=torreyol)
34	cubenol
35	α - cadinol

TABELA 31 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE *P. crassinervium*

Nº no gráfico de loadings	Composto
1	α -copaeno
2	β -bourboneno
3	β -elemeno
4	α -gurjuneno
5	<i>E</i> - cariofileno
6	β -copaeno
7	aromadendreno
8	α -humuleno
9	<i>allo</i> -aromadendreno
10	γ -muuroleno
11	germacreno D
12	aristolocheno
13	biciclogermacreno
14	α -muuroleno
15	γ -cardineno
16	α -cardineno
17	<i>trans</i> -calameneno
18	<i>trans</i> -douca-4(11),7-dieno
19	<i>E</i> -nerolidol
20	espatulenol
21	óxido de cariofileno
22	globulol
23	epi- α -cardinol
24	epi- α -muurolol
25	α -muurolol (=torreyol)
26	α -cardinol

TABELA 32 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE *P. fuligineum*

Nº no gráfico de loadings	Composto
1	α -pineno
2	β -pineno

3	α -felandreno
4	<i>p</i> -cimeno
5	limoneno
6	(<i>Z</i>)- β -ocimeno
7	(<i>E</i>)- β -ocimeno
8	<i>cis</i> -óxido de linolool(furanoide)
9	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno
10	linolol
11	safrol
12	α -cubebeno
13	α -ylangeno
14	β -cubebeno
15	α -gurjuneno
16	<i>E</i> - cariofileno
17	β -copaeno
18	aromadendreno
19	α -humuleno
20	<i>allo</i> -aromadendreno
21	dauca-5,8-dieno
22	<i>trans</i> -cardina-1(6),4-dieno
23	γ -muuroleno
24	<i>cis</i> - β -guaieno
25	asaricina
26	γ -cardineno
27	δ -cardineno
28	<i>trans</i> -cardina-1,4-dieno
29	α -cardineno
30	(<i>E</i>)-nerolidol
31	palustrol
32	espatulenol
33	globulol
34	cubeban-11-ol
35	rosifoliol
36	epóxido de humuleno II
37	10-epi- γ -eudesmol
(Continuação tabela 24)	
Nº no gráfico de loadings	Composto
38	dilapiol
39	α -muurolol (=torreyol)

40	α -cadinol
----	-------------------

TABELA 33 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE *P. gaudichaudianum*

Nº no gráfico de loadings	Composto
1	α -pineno
2	β -pineno
3	α -copaeno
4	α -gurjuneno
5	<i>E</i> - cariofileno
6	β -copaeno
7	aromadendreno
8	α -humuleno
9	<i>allo</i> -aromadendreno
10	γ -muuroleno
11	germacreno D
12	biciclogermacreno
13	α -muuroleno
14	δ -amorfenol
15	miristicina
16	α -colacoreno
17	elemicina
18	<i>E</i> -nerolidol
19	espatulenol
20	ledol
21	dilapiol
22	apiol

TABELA 34 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE *P. lhotzknianum*

Nº no gráfico de loadings	Composto
1	α -pineno
2	β -pineno

3	limoneno
4	α -copaeno
5	β -elemeno
6	α -gurjuneno
7	<i>E</i> -cariofileno
8	aromadendreno
9	α -humuleno
10	<i>allo</i> -aromadendreno
11	germacreno D
12	aristochoeno
13	biciclogermacreno
14	α -muuroleno
15	γ -cardineno
16	α -cardineno
17	<i>trans</i> -douca-4(11),7-dieno
18	espatulenol
19	óxido de cariofileno
20	rosifoliol
21	epóxido de humuleno II
22	β -acorenol
23	cubenol
24	α -muurolol (=torreyol)
25	selin-11-en-4- α -ol

TABELA 35 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE *P. malacophyllum*

Nº no gráfico de loadings	Composto
1	α -pineno
2	β -pineno
3	α -terpineno

4	<i>o</i> -cimeno
5	γ -terpineno
6	terpinoleno
7	terpinen-4-ol
8	α -copaeno
9	α -gurjuneno
10	(<i>E</i>)-cariofileno
11	<i>aromadendreno</i>
12	α -humuleno
13	<i>allo</i> -aromadendreno
14	4,5-di-epi-aristochoeno
15	aristocheleno
16	β -selineno
17	α -selineno
18	α -muuroleno
19	γ -cardineno
20	7-epi- α -selineno
21	δ -cardineno
22	<i>trans</i> -cardina-1,4-dieno
23	α -cardineno
24	α -calacoreno
25	espatulenol
26	Thujopsan-2- β -ol
27	globulol
28	viidiflorol
29	cubeban-11-ol
30	guaiol
31	β -oplopenona
32	epóxido de humuleno II
33	<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno
34	α -muurolol (=torreyol)
35	α -eudesmol
36	selin-11-en-4- α -ol
37	allohimachalol

TABELA 36 NÚMERO DOS COMPOSTOS RELACIONADOS AO GRÁFICO DE LOADINGS DO OE DE *P. tuberculatum*

Nº no gráfico de loadings	Composto
1	α -pineno
2	β -pineno

3	β -(Z)-ocimeno
4	δ -elemeno
5	α -copaeno
6	β -bourboleno
7	β -elemeno
8	(E)-cariofileno
9	β -copaeno
10	α -humuleno
11	<i>allo</i> -aromadendreno
12	γ -muuroleno
13	<i>amorfa</i> -4,7(11)-dieno
14	<i>biciclogermacreno</i>
15	β -bisaboleno
16	δ -amorfeno
17	δ -cardineno
18	<i>elemicina</i>
19	(E)-nerolidol
20	<i>espatulenol</i>
21	<i>Dilapiol</i>
22	δ -cardinol

FIGURA 83 IMAGENS DAS TESTES DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR CONTATO DOS OEs DE *Piper* NA CONCENTRAÇÃO DE 20 µL mL⁻¹


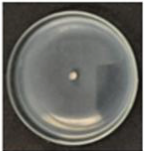




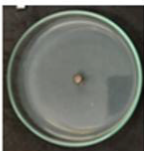

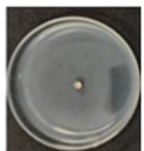
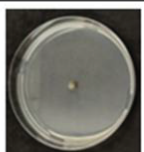
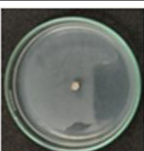
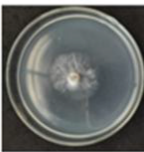
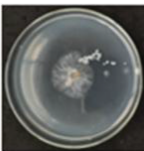
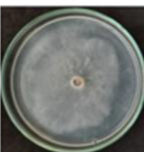
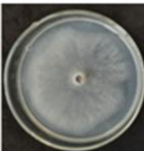
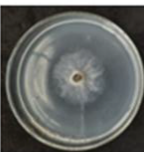
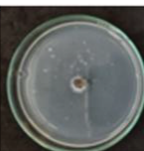
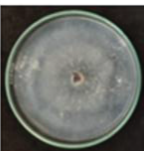

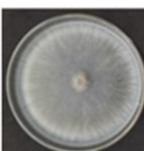

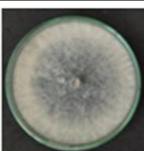
	<i>P. aduncum</i> (verão)	<i>P. aduncum</i> (outono)	<i>P. crassinervium</i> (verão)	<i>P. crassinervium</i> (inverno)	<i>P. fuliginum</i> (Verão)	<i>P. gaudichaudianum</i> <i>m</i> (outono)	<i>P. lhotzianum</i> (primavera)	<i>P. malacophyllum</i> (primavera)	<i>P. tuberculatum</i> (primavera)	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora											
72 horas											

FIGURA 84 IMAGENS DAS TESTES DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR CONTATO DOS OEs DE *Piper* NA CONCENTRAÇÃO DE 50 µL mL⁻¹

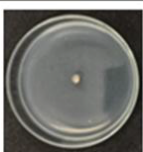



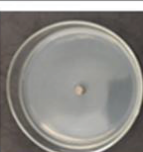
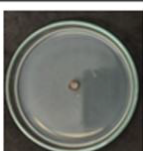


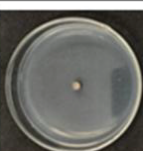
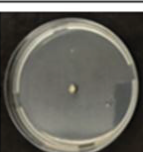








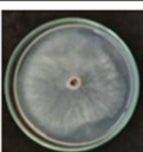

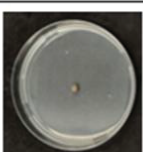

	<i>P. aduncum</i> (verão)	<i>P. aduncum</i> (outono)	<i>P. crassinervium</i> (verão)	<i>P. crassinervium</i> (inverno)	<i>P. fuliginum</i> (Verão)	<i>P. gaudichaudianum</i> <i>m</i> (outono)	<i>P. lhotzianum</i> (primavera)	<i>P. malacophyllum</i> (primavera)	<i>P. tuberculatum</i> (primavera)	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora											
72 horas											

FIGURA 85 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR CONTATO DOS OES DE *Piper* NA CONCENTRAÇÃO DE 100 µL mL⁻¹

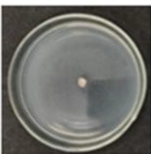
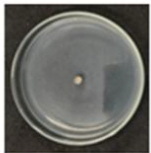


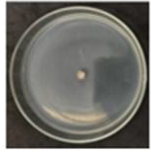


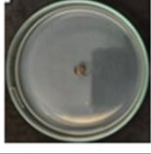
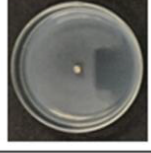
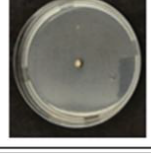
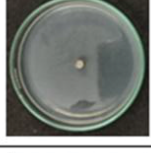

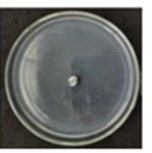
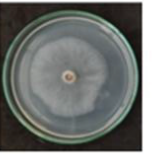




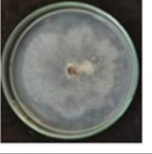


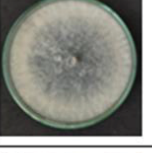
	<i>P. aduncum</i> (verão)	<i>P. aduncum</i> (outono)	<i>P. crassinervium</i> (verão)	<i>P. crassinervium</i> (inverno)	<i>P. fuliginum</i> (Verão)	<i>P. gaudichaudianu</i> <i>m</i> (outono)	<i>P. lhotzianum</i> (primavera)	<i>P. malacophyllum</i> (primavera)	<i>P. tuberculatum</i> (primavera)	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora											
72 horas											

FIGURA 86 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR CONTATO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OES DE *Piper* E DO ISOSAFROL E EPÓXIDO SAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 20 µL mL⁻¹

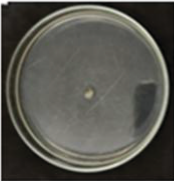
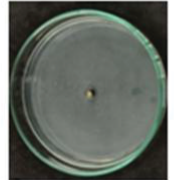
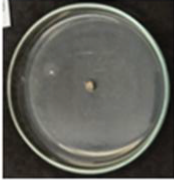

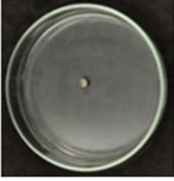
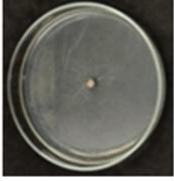
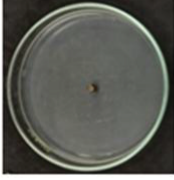
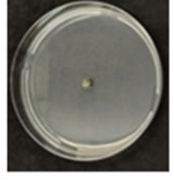
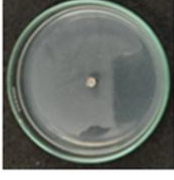
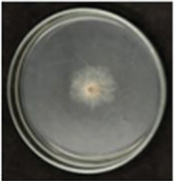

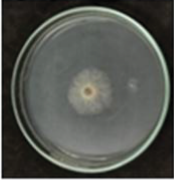
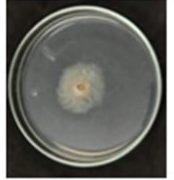


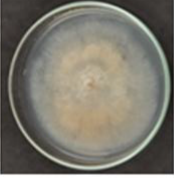
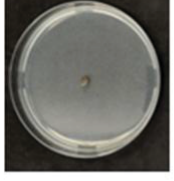
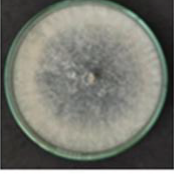
	miristicina	dilapiol	dilapiol (40%) + apiol (60%)	miristicina (16%) + dilapiol (36%) + apiol (48%)	safrol	isosafrol	epóxido safrol	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora									
72 horas									

FIGURA 87 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR CONTATO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OES DE *Piper* E DO ISOSAFAROL E EPÓXIDO SAFAROL NA CONCENTRAÇÃO DE 50 µL mL⁻¹



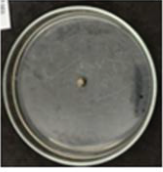
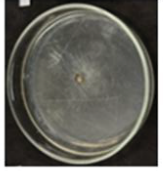

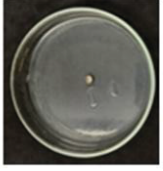

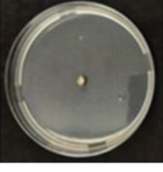
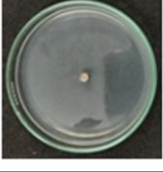
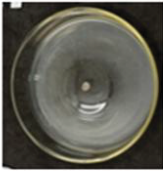
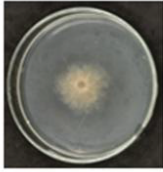
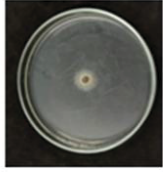
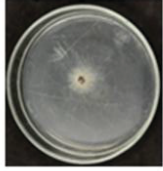


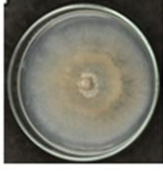
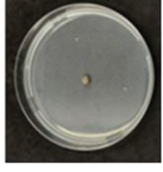
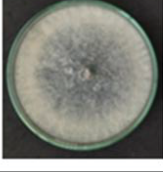
	miristicina	dilapiol	dilapiol (40%) + apiol (60%)	miristicina (16%) + dilapiol (36%) + apiol (48%)	safrol	isosaftrol	epóxido safrol	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora									
72 horas									

FIGURA 88 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR CONTATO DOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS OES DE *Piper* E DO ISOSAFAROL E EPÓXIDO SAFAROL NA CONCENTRAÇÃO DE 100 µL mL⁻¹

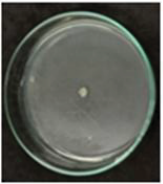




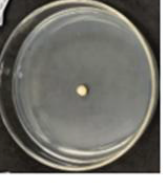

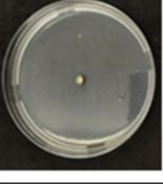

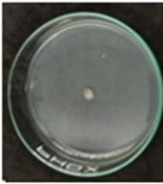
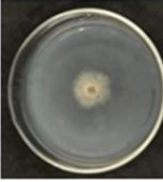



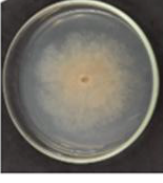


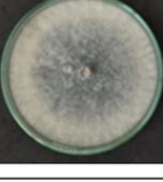
	miristicina	dilapiol	dilapiol (40%) + apiol (60%)	miristicina (16%) + dilapiol (36%) + apiol (48%)	safrol	isosaftrol	epóxido safrol	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora									
72 horas									

FIGURA 89 IMAGENS DAS TESTES DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR VOLATILIZAÇÃO DOS OEs DE *Piper* NA CONCENTRAÇÃO DE 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$

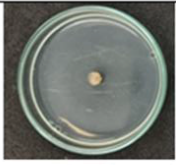


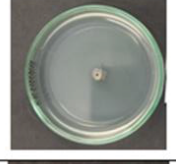
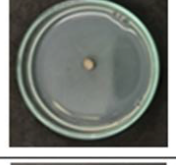
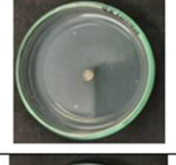

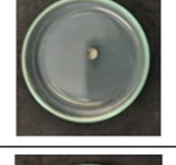
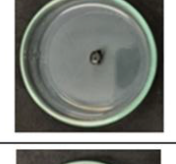
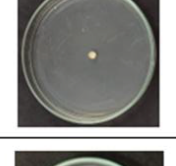
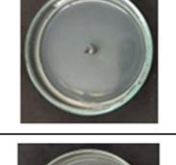
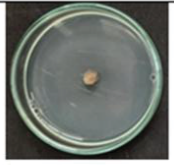

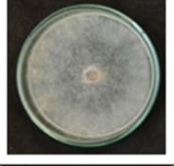
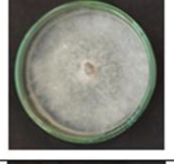

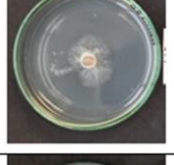
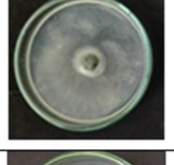
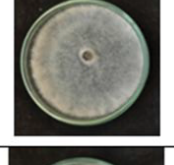
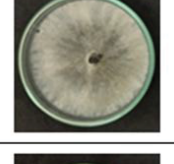
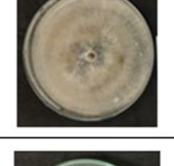
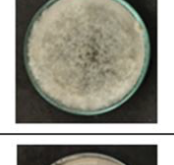
	<i>P. aduncum</i> (verão)	<i>P. aduncum</i> (outono)	<i>P. crassinervium</i> (verão)	<i>P. crassinervium</i> (inverno)	<i>P. fuliginenum</i> (Verão)	<i>P. gaudichaudianu</i> <i>m</i> (outono)	<i>P. lhotzkianum</i> (primavera)	<i>P. malacophyllum</i> (primavera)	<i>P. tuberculatum</i> (primavera)	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora											
72 horas											

FIGURA 90 IMAGENS DAS TESTES DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR VOLATILIZAÇÃO DOS OEs DE *Piper* NA CONCENTRAÇÃO DE 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$

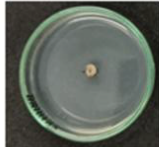
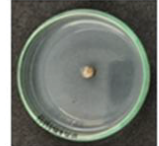





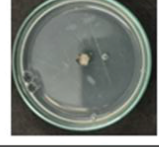

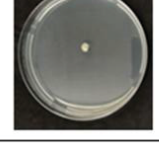




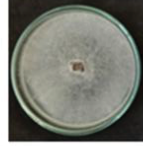


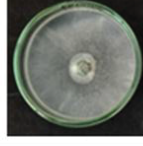
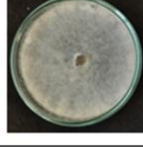
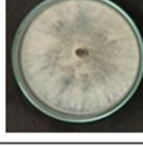


	<i>P. aduncum</i> (verão)	<i>P. aduncum</i> (outono)	<i>P. crassinervium</i> (verão)	<i>P. crassinervium</i> (inverno)	<i>P. fuliginenum</i> (Verão)	<i>P. gaudichaudianu</i> <i>m</i> (outono)	<i>P. lhotzkianum</i> (primavera)	<i>P. malacophyllum</i> (primavera)	<i>P. tuberculatum</i> (primavera)	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora											
72 horas											

FIGURA 91 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* POR VOLATILIZAÇÃO DOS OEs DE *Piper* NA CONCENTRAÇÃO DE 75 µL mL⁻¹








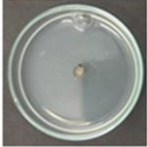

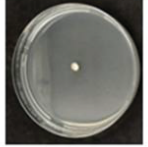



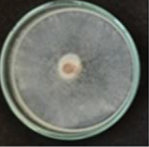
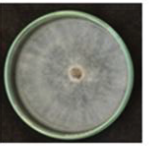


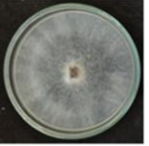
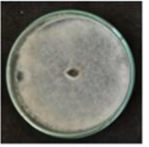
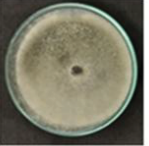


	<i>P. aduncum</i> (verão)	<i>P. aduncum</i> (outono)	<i>P. crassinervium</i> (verão)	<i>P. crassinervium</i> (inverno)	<i>P. fuligineum</i> (Verão)	<i>P. gaudichaudianum</i> (outono)	<i>P. lhotzkianum</i> (primavera)	<i>P. malacophyllum</i> (primavera)	<i>P. tuberculatum</i> (primavera)	Controle positivo Iprodiona	Controle negativo
1 hora											
72 horas											

FIGURA 92 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea*. POR VOLATILIZAÇÃO DOS ISOLADOS DOS OEs DE *Piper*: EPÓXIDO SAFROL E ISOSAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 25 µL mL⁻¹

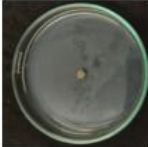
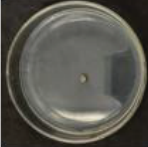
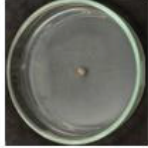

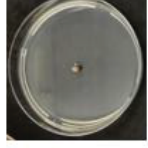

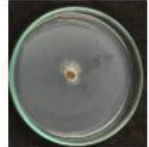

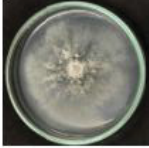


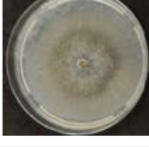
	miristicina	safrol	isosafrol	epóxido safrol	Controle positivo iprodiona	Controle negativo
1 hora						
72 horas						

FIGURA 93 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea*. POR VOLATILIZAÇÃO DOS ISOLADOS DOS OEs DE *Piper*, EPÓXIDO SAFROL E ISOSAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 50 µL mL⁻¹





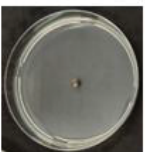


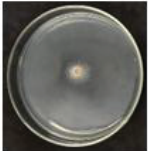










	miristicina	safrol	isosafrol	epóxido safrol	Controle positivo iprodiona	Controle negativo
1 hora						
72 horas						

FIGURA 94 IMAGENS DAS TESTE DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea*. POR VOLATILIZAÇÃO DOS ISOLADOS DOS OEs DE *Piper*, EPÓXIDO SAFROL E ISOSAFROL NA CONCENTRAÇÃO DE 100 µL mL⁻¹

	miristicina	safrol	isosafrol	epóxido safrol	Controle positivo iprodiona	Controle negativo
1 hora						
72 horas	