

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

INAIARA CASAPULA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper* E AVALIAÇÃO
DE SUAS ATIVIDADES CONTRA O FITOPATÓGENO DO MORANGO *Botrytis*
cinerea.

CURITIBA
2018

INAIARA CASAPULA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Piper* E
AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES CONTRA O FITOPATÓGENO DO
MORANGO *Botrytis cinerea*.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para à
obtenção do grau de Mestre em Química,
Sub-Área de Química Orgânica.

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

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

F529p Casapula, Inaiara
Caracterização química de óleos essenciais de *Piper* e avaliação de suas atividades contra o fitopatógeno do morango *Botrytis cinerea* [recurso eletrônico] / Inaiara Casapula – Curitiba, 2018.

Dissertação - 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

1. Química orgânica. 2. Essências e óleos essenciais de *Piper*. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. III. Título.

CDD: 547.7

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

TERMO DE APROVAÇÃO

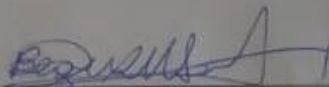
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *PIPER* E AVALIAÇÃO DE
SUAS ATIVIDADES CONTRA O FITOPATÓGENO DO MORANGO *BOTRYTIS CINEREA*

por

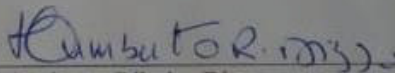
INAIARA CASAPULA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof.ª Dr.ª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Humberto Ribeiro Bizzo
Pesquisa e Desenvolvimento – EMBRAPA



Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 30 de agosto de 2018.

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. Casapula; e aos meus sobrinhos e amores da minha vida André Augusto Leite Casapula e Luiz Henrique Leite 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. Diones Krinski da UNEMAT, pela coleta do material vegetal.
- Ao Professor Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte, pela discussão dos testes biológicos, assim como todo suporte e estrutura para a realização dos testes no LEMID.
- Ao Professor Dr. Cícero Deschamps, por ceder a estrutura do Laboratório de Ecofisiologia da UFPR, para extração dos óleos.
- A Professora Dra. Loise Larrisa May de Mio, pela ajuda inicial nos testes biológicos, assim como todo suporte e estrutura para a realização dos testes no LEMID.
- A Mestranda Juliana Maia do LEMID, pela ajuda com 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 do mesmo.
- Aos professores membros da banca, Dr. Humberto Ribeiro Bizzo e Dr. Francisco de Assis Marques pela disponibilidade em contribuir e avaliar este trabalho.
- A Patrícia Wynler, do Centro de Diagnósticos Marcos Enrieti- ADAPAR, pela ajuda com o leitor de placas.
- 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 Gabardo Dias, e do LEMID Simone Nickel Chielewski e Tiago Martins Aragão Rodrigues.
- Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química e do Departamento de Química, da época de IC e do mestrado, em especial a Aurea P. Ferriani, Carmem Jost, Allan Rodrigues, Ana Paula Palaro Klein, Ana Paula Preidum, Carlos Eduardo M. Piomonte, Adson Soares da Silva, Edione F. Canzi, Emmanule Meneguetti, Rebeca

Gabriel de Camargo, Elaine Fernanda dos Santos, Leonardo, Tânia, Maria Helena Verdan, Regiane L. B. Strapasson, Emmanuel (IC), Juliana Mari Jo, Anderson R. dos Santos, Angelita Nepel, Kahlil S. Salomé, Cassiano Pires e Nelissa P. Vaz.

- 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, Rosley Kosak, Thatiane Kuczera, Vinicius Annies.

- 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!

“A mente que se abre a novas ideias jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch) é muito perecível e vulnerável à infecção de fungos, resultando em podridões e perdas econômicas, sendo que uma das principais doenças que acometem o morango é o mofo cinzento causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers. A limitação de tratamentos por molhamento de frutos de morango na pós-colheita, faz com que os óleos essenciais sejam uma boa alternativa para o controle do fungo. Visto que os óleos essenciais de *Piper* possuem propriedades antifúngicas, no presente trabalho foi analisada a composição química dos óleos essenciais de 5 espécies de *Piper*, sendo *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper mikanianum*, *Piper caldense* e *Piper mollicomun*. Avaliou-se tanto a sazonalidade dos OE, pela Análise de Componentes Principais (ACP, do inglês Principal Compounds Analysis- PCA); como a Concentração Mínima Inibitória (CIM) para o fungo *B. cinerea* pelo método de microdiluição em caldo. Os óleos essenciais das folhas secas e frescas foram extraídos por hidrodestilação, e submetidos a análise de Cromatografia em Fase gasosa acoplado à espectrometria de massas (CG-EM/EM). Os componentes majoritários presentes nos óleos essenciais de *P. aduncum* foi a miristicina, asaricina e o dilapiol; em *P. caldense*, foi a miristicina; em *P. amalago*, o 3- δ -careno e o ishwarano; em *P. mikanianum* a germacrona e em *P. mollicomun* o gibbilimbol B. O PCA mostrou que houve variações quantitativas e qualitativas na composição dos óleos essenciais de *Piper*. Os OE de *P. caldense* e *P. mikanianum* apresentaram uma forte atividade contra o *B. cinerea*, com CIM de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Palavras-Chave: Óleos Essenciais. *Piper*. *Botrytis cinerea*. Atividade antifúngica.

ABSTRACT

The Strawberry (*Fragaria* x *Ananassa* Duch) is very perishable and vulnerable to fungal infection, resulting in economic rot and loss, and one of the main diseases affecting strawberry is gray mold caused by fungus *Botrytis cinerea* Pers. The limitation of post-harvest strawberry fruit wetting treatments makes essential oils a good alternative to control this fungus. In the present work, the chemical composition of the essential oils of 5 *Piper* species was analyzed, being *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper mikanianum*, *Piper caldense* and *Piper mollicomun*; and the seasonality of essential oils is evaluated by Principal Component Analysis (PCA); and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for *B. cinerea* was evaluated by broth microdilution method. The essential oils of the dried and fresh leaves were extracted by hydrodistillation, and subjected to GC analysis coupled to mass spectrometry (GC-MS / MS). The main constituents of essential oils of *P. aduncum* were the myristicin, asaricina and dillapiole; for *P. caldense* was myristicin; for *P. amalago* were 3- δ -carene and ishwarane; for *P. mikanianum* were germacrone and elemicin and for *P. mollicomun* was gibbilimbol B. The PCA showed that there were quantitative and qualitative variations in the composition of *Piper*'s essential oils. The essential oils of *P. caldense* and *P. mikanianum* showed a strong activity against *B. cinerea*, with MIC of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Keywords: Essential oils, *Piper*. *Botrytis cinerea*. Antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. OCORRÊNCIA DO GÊNERO <i>Piper</i> NO MUNDO.....	5
FIGURA 2 PRINCIPAIS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR O ACUMULO DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS.....	6
FIGURA 3 BIOSÍNTESE DOS TERPENOS.....	7
FIGURA 4 EXEMPLOS DE MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS.....	7
FIGURA 5 PRINCIPAIS ESQUELETOS DOS SESQUITERPENOS.....	8
FIGURA 6 ROTA BIOGENÉTICA DE ARILPROPANOIDES DE OE DE PLANTA E RELAÇÃO DO SUBSTRATO/PRODUTO COM ALGUNS GRUPOS QUÍMICO	9
FIGURA 7 MOFO CINZENTO EM MORANGO.....	11
FIGURA 8 DIFERENTES NÍVEIS DE SEVERIDADE DE MOFO CINZENTO EM MORANGO.	12
FIGURA 9 IMAGEM DE MICROSCÓPICA DE CONÍDIOS DE <i>B. cinerea</i> ISOLADOS DE TOMATES.....	13
FIGURA 10 SISTEMAS DE HIDRODESTILAÇÃO UTILIZADOS NAS EXTRAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS.	17
FIGURA 11 ESTRUTURAS DOS FUNGICIDAS PROCIMIDONA E MANCOZEBE	22
FIGURA 12 CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE <i>P. aduncum</i> NA ESTAÇÃO DA PRIMAVERA	25
FIGURA 13 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>P. aduncum</i>	28
FIGURA 14 GRÁFICO DO OE DAS FOLHAS SECAS (A) E FRESCAS (B) DE <i>P. aduncum</i> - VARIAÇÃO DOS COMPOSTOS NAS 4 ESTAÇÕES DO ANO	28
FIGURA 15 SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (A) E FOLHAS FRESCAS (B) DE <i>P. aduncum</i> . (PRIMAVERA=1; VERÃO=2; OUTONO=3 E INVERNO=4).....	30
FIGURA 16 SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (A) E FOLHAS FRESCAS (B) DE <i>P. aduncum</i> . (PRIMAVERA=1; VERÃO=2; OUTONO=3 E INVERNO=4).....	31
FIGURA 17 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>P. aduncum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.	32

FIGURA 18 CROMATOGRAMA DAS FOLHAS SECAS DE <i>Piper amalago</i> NA ESTAÇÃO DA PRIMAVERA.	33
FIGURA 19 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>Piper amalago</i>	36
FIGURA 20 GRÁFICO DA VARIAÇÃO DA CLASSE DE COMPOSTOS NAS ESTAÇÕES DO ANO OEs DAS FOLHAS SECAS (A) E FRESCAS (B) DE <i>P. amalago</i>	37
FIGURA 21 GRÁFICO DE SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE <i>P. amalago</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).	38
FIGURA 22 LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE <i>P. amalago</i>	40
FIGURA 23 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>P. amalago</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.	41
FIGURA 24. CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE <i>Piper caldense</i> NA ESTAÇÃO DO VERÃO.	42
FIGURA 25. ESTRUTURA DO MAJORITÁRIO DE <i>P. caldense</i>	44
FIGURA 26. GRÁFICO DOS OE DAS FOLHAS SECAS DE <i>P. caldense</i> – VARIAÇÃO DE CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.	45
FIGURA 27. GRÁFICO DE SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS DE <i>P. caldense</i> (PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).	46
FIGURA 28. GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS DE <i>P. caldense</i>	47
FIGURA 29. ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE <i>P. caldense</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.	47
FIGURA 30. CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE <i>Piper mikanianum</i> NA ESTAÇÃO DO INVERNO.	48
FIGURA 31. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADO EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Piper mikanianum</i>	50

FIGURA 32. GRÁFICO DOS OE DAS FOLHAS SECAS (a) e FOLHAS FRESCAS (b) DE <i>P. mikanianum</i> – VARIAÇÃO DE CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO...	50
FIGURA 33. GRÁFICO DE SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE <i>P. mikanianum</i> .(PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).	52
FIGURA 34. GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS (a) E FOLHAS FRESCAS (b) DE <i>P. mikanianum</i> .	53
FIGURA 35. ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE <i>P. mikanianum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.	55
FIGURA 36.CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE <i>P. mollicomum</i> NA ESTAÇÃO VERÃO.	56
FIGURA 37. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE <i>Piper mollicomum</i> .	59
FIGURA 38. GRÁFICO DOS OE DAS FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE <i>P. mollicomum</i> – CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO POR ESTAÇÃO.	60
FIGURA 39. ESTRUTURA DO GIBBILIMBOL B.	62
FIGURA 40. ESPECTRO DE RMN ^1H DO GIBBILIMBOL B (200 MHz, CDCl_3).	63
FIGURA 41. ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO GIBBILIMBOL B (50 MHz, CDCl_3).	63
FIGURA 42.MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C EXPANDIDO, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DO ÓLEO DE <i>P. mollicomum</i> .	64
FIGURA 43. MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE NO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DO ÓLEO DE <i>P. mollicomum</i> .	64
FIGURA 44. MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C EXPANDIDO, PROVENIENTE NO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DO ÓLEO DE <i>P. mollicomum</i> .	65
FIGURA 45. ESTRUTURA DO GIBBILIMBOL B E AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE ACORDO COM O EXPERIMENTO DE HMBC ^1H - ^{13}C .	65
FIGURA 46. ESPECTRO DE MASSAS DO GIBBILIMBOL B DO O. E. DE <i>P. mollicomum</i> .	66
FIGURA 47. PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO GIBBILIMBOL B.	66

FIGURA 48. GRÁFICO DE SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (A) E FRESCAS (B) DE <i>P. mollicomum</i> . (PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).....	67
FIGURA 49. GRÁFICO DE LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS (A) E FOLHAS FRESCAS (B) DE <i>P. mollicomum</i>	69
FIGURA 50. ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE <i>P. mollicomum</i> DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.	70
FIGURA 51. ESPECTRO DE MASSAS DO (E)- BETA- CIMENO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	84
FIGURA 52. ESPECTRO DE MASSAS DO PIPERITONA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	84
FIGURA 53. ESPECTRO DE MASSAS DO ASARICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	85
FIGURA 54. ESPECTRO DE MASSAS DO MIRISTICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	86
FIGURA 55. ESPECTRO DE MASSAS DO DILAPIOL ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	87
FIGURA 56. ESPECTRO DE MASSAS DO 3-CARENO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	88
FIGURA 57. ESPECTRO DE MASSAS DO TERPINOLENO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	88
FIGURA 58. ESPECTRO DE MASSAS DO ISHWARANO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	89
FIGURA 59. ESPECTRO DE MASSAS DO BICICLOGERMACRENO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	90
FIGURA 60. ESPECTRO DE MASSAS DO MIRISTICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR) CALDENSE.....	91
FIGURA 61. ESPECTRO DE MASSAS DO GERMACRONA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	91
FIGURA 62. ESPECTRO DE MASSAS DO ELEMICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).....	92

FIGURA 63. IMAGENS DOS TESTES DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> PELO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO – 1ª HORA.....	98
FIGURA 64. IMAGENS DOS TESTES DE INIBIÇÃO DO <i>B. cinerea</i> PELO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO – 96ª HORA.....	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO CIENTÍFICA DO <i>Botrytis cinerea</i>	12
TABELA 2 LISTA DE ESPÉCIES DE PIPER E SUA LOCALIZAÇÃO DE COLETA	16
TABELA 3 MATRIZES GERADAS PARA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAL DOS OEs DE <i>Piper</i>	19
TABELA 4 .QUANTIDADES EM µL POR POÇO DA PLACA DE MICRODILUIÇÃO	20
TABELA 5 DIAGRAMA DAS DISTRIBUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES NAS PLACAS DE MICRODILUIÇÃO.....	21
TABELA 6 DIAGRAMA DAS DISTRIBUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DOS FUNGICIDAS PROCIMIDONA E MANCOZEBE NAS PLACAS DE MICRODILUIÇÃO.....	21
TABELA 7 ÉPOCAS DE COLETA.....	23
TABELA 8 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS(A) E FOLHAS FRESCAS (B) DAS ESPÉCIES DE <i>Piper</i>	23
TABELA 9 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>Piper aduncum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.....	26
TABELA 10 . ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>Piper amalago</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	34
TABELA 11 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE <i>Piper caldense</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	42
TABELA 12. ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>Piper mikanianum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.....	49
TABELA 13. ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>Piper mollicomum</i> , EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.....	57
TABELA 14. DADOS DE RMN DE ¹ H E ¹³ C PARA O MAJORITÁRIO DE P. mollicomum.....	61

TABELA 15. COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO APÓS 96 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (BD + ÁGUA); E TESTEMUNHA [ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS].	71
TABELA 16. COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO COM CONTROLE DE FUNGICIDAS (CONTROLE POSITIVO) APÓS 96 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (BD + ÁGUA); E TESTEMUNHA [ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS].	72
TABELA 17. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE LOADINGS DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>P. aduncum</i> .	93
TABELA 18. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE LOADINGS DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>P. amalago</i> .	94
TABELA 19. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE LOADINGS DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>P. mikanianum</i> .	95
TABELA 20. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE LOADINGS DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>P. mollicomum</i> .	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IA	-	Índice Aritmético
<i>B.</i>	-	<i>Botrytis</i>
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
DCM	-	Diclorometano
DMSO	-	Sulfóxido de dimetila
DO	-	Densidade óptica
DP	-	Desvio padrão
H	-	Hora
H ₂ O	-	Água
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	-	Hertz
<i>J</i>	-	Constante de acoplamento
m	-	Multipeto
NIST	-	National Institute of Advance Science and Tecnology
OE	-	Óleo essencial
OEs	-	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 ^{13}C	-	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	1
1.2 FAMÍLIA PIPERACEAE	3
1.3 O GÊNERO <i>Piper</i>	3
1.4 METABOLITOS SECUNDÁRIOS	5
1.4.1 TERPENOS.....	6
1.4.2 ARILPROPANOIDES	9
1.5 QUIMIOMETRIA.....	10
1.6 O CULTIVO DO MORANGO	10
1.7 FITOPATÓGENO <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	12
1.8 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 GERAL.....	15
2.2 ESPECÍFICOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 EQUIPAMENTOS	16
3.2 SOLVENTES E REAGENTES.	16
3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	16
3.3 SECAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO	17
3.4 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	17
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS	19
3.6 TESTES <i>in vitro</i> DO FITOPATÓGENO <i>Botrytis cinerea</i>	19
3.6.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	19
3.6.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	
20	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. aduncum</i> FOLHAS SECAS E FRESCAS	
25	
4.2. ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. amalago</i> L. FOLHAS SECAS E FRESCAS	
33	
4.2.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE <i>P. amalago</i>	38
4.3. ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. caldense</i> FOLHAS SECAS	42
4.3.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE <i>P. caldense</i>	45

4.4. ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. mikanianum</i> (Kunth) Steud. FOLHAS SECAS E FRESCAS	48
4.4.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE <i>P. mikanianum</i>	51
4.5 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>P. mollicomum</i> FOLHAS SECAS E FRESCAS	56
4.4.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE <i>P. mollicomum</i>	67
4.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	71
4.6.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA O <i>B. cinerea</i>	71
5. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES	74
6. REFERÊNCIAS	75
7. ANEXOS.....	84
7.1 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE <i>P. aduncum</i>	84
7.2 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE <i>P. amalago</i>	87
7.3 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE <i>P. caldense</i>	91
7.4 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE <i>P. mikanianum</i>	91
7.5 TABELAS COM AS ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES.	93
7.6 FOTOS DOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	98

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, atualmente, estão sendo comprovadas pela ciência. Em todo mundo é crescente a demanda por produtos naturais, especialmente devido aos problemas que são atribuídos a inúmeros produtos sintéticos tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (LIMA, 2006 e FERNANDES JUNIOR, 2011).

Muitas pessoas utilizam plantas como principal fonte de cura e as plantas constituem uma possibilidade de obtenção de fármacos para a maioria da população mundial (HOSTETTMANN et al., 1991). Desde o início do século XIX, um grande número de metabólitos secundários biologicamente ativos tem sido isolado e utilizado comercialmente como medicamentos, condimentos, pesticidas ou outro tipo de aplicação química (KINGHORN, 1987).

No mercado mundial estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo a maior parte proveniente de plantas, mais especificamente no caso de drogas anticancerígenas e de antibióticos, cerca de 70% delas, são oriundas de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

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 relevante de determinada espécie, como também a classe específica de constituintes e as substâncias responsáveis por certa atividade biológica (FOGLIO et al., 2006).

Os produtos naturais de origem vegetal são uma importante fonte de novos defensivos agrícolas usados no controle de doenças de plantas. Dentre esses produtos os óleos essenciais, caracterizados como metabólitos secundários de plantas e de baixa toxicidade a mamíferos, são amplamente testados no controle de fitopatógenos (SILVA e BASTOS, 2007).

1.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são constituídos de substâncias voláteis, geralmente líquidas, de composição complexa, possuem propriedades organolépticas e biológicas correspondentes à sua composição química (BAGHERI; MAPNAP; SOLATI, 2014). Os óleos essenciais

estão muito presentes em fitoterápicos, perfumarias, cosméticos e nas indústrias agroalimentícias. São usados para conferir aromas especiais em inúmeros produtos, tais como perfumes, cosméticos, sabonetes, condimentos, etc (SILVA *et al.*, 2003).

Óleos essenciais ou voláteis são definidos pela Organização Internacional de Padrões (ISO) como sendo os produtos obtidos de partes das plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por esmagamento de pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas, incolores ou ligeiramente amareladas, que possuem como característica básica o cheiro e o sabor. Localizam-se em estruturas secretoras especializadas, como pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou ainda em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas e podem ocorrer em apenas um órgão vegetal ou em toda a planta (MARTINS *et al.* 1998; CARDOSO *et al.* 2001; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os constituintes dos óleos essenciais são, em geral, uma mistura de hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos (oxigenados ou não) e funcionalizados como álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, etc. (FABIANE *et al.*, 2008). Devido a essa rica constituição química, podem apresentar diferentes propriedades biológicas como atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida, larvicida, anti-inflamatória, antisséptica, além de possuírem propriedades expectorante, relaxante, aromática e repelente, dentre outras (PELISSARI; PIETRO; MORREIRA, 2010).

Atualmente, os óleos essenciais são empregados na indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e produtos domissanitários, além de serem usados na aromaterapia e um novo campo de aplicação em crescimento, o da agropecuária. Estima-se que cerca de 3000 óleos essenciais sejam conhecidos, dos quais aproximadamente trezentos são comercialmente importantes, destinados principalmente, para o mercado de fragrâncias (HENRIQUES, SIMÕES-PIRES e APEL, 2007; FRANZ, 2010).

O Brasil possui um grande potencial a ser explorado nessa área em virtude de sua biodiversidade. Estima-se a existência de 350 a 550 mil espécies de plantas no país, das quais algumas ainda são desconhecidas ou pouco estudadas (OLIVEIRA; SOUZA, 2012).

Do mesmo modo, estudos fitoquímicos devem ser realizados a fim de reconhecer 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).

1.2 FAMÍLIA PIPERACEAE

A família está representada mundialmente por cerca de 2500 espécies divididas em cinco gêneros. O principal centro de diversidade da família Piperaceae está localizado nas Américas Central e do Sul, Ásia e Malásia e possuem o maior número de espécies. O Brasil apresenta alta diversidade de Piperaceae, apresentando cerca de 500 espécies pertencentes a três gêneros, sendo 283 pertencentes ao gênero *Piper* (MEDEIROS, 2006; SOUZA, *et al.*, 2009). Espécies concentradas principalmente nas florestas Amazônica e Atlântica estão distribuídas nos gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* (JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004; MONTEIRO; GUIMARÃES, 2008).

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* é oportunista, colonizando áreas de clareiras, estradas e pastos, mas há também as que crescem em locais úmidos ou florestas fechadas (MEDEIROS, 2006).

A grande maioria das piperáceas são produtoras de óleos essenciais, por isso há um grande interesse em estudar o uso de seus óleos essenciais e sua composição. O gênero *Piper* é o mais conhecido por seu valor econômico. O mais importante representante deste é a pimenta preta (*Piper nigrum* L.), o produto agrícola mais conhecido no gênero (DYER *et al.*, 2004).

1.3 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 (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 e piperolidas. Os metabólitos secundários podem ser encontrados em todo tecido das plantas (DYER *et al.*, 2004; PARMAR *et al.*, 1997; SENGUPTA e RAY, 1987).

Os óleos essenciais de espécies de *Piper* também são amplamente estudados. No Brasil, diversas espécies endêmicas têm sido investigadas quanto à composição, sazonalidade, atividades biológicas potenciais e propagação para fins de domesticação de espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2013; PERIGO *et al.*, 2016; GASPARETTO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; FERRIANI *et al.*, 2018).

Andrade e colaboradores relataram a identificação de 141 componentes do óleo essencial de *P. dilatatum*, sendo que 52 componentes no óleo essencial são mono ou sesquiterpenos (ANDRADE, 2011). MATASYOH e colaboradores, por sua vez, estudaram a atividade larvícida do óleo essencial de *P. capense* contra o vetor da malária, que é composto principalmente por mono e sesquiterpenos, e relataram que o óleo essencial desta planta pode ser usado como larvícida que não prejudica a natureza, podendo inclusive ser utilizado pelos moradores que cultivam a planta para a prevenção da doença (MATASYOH, 2011).

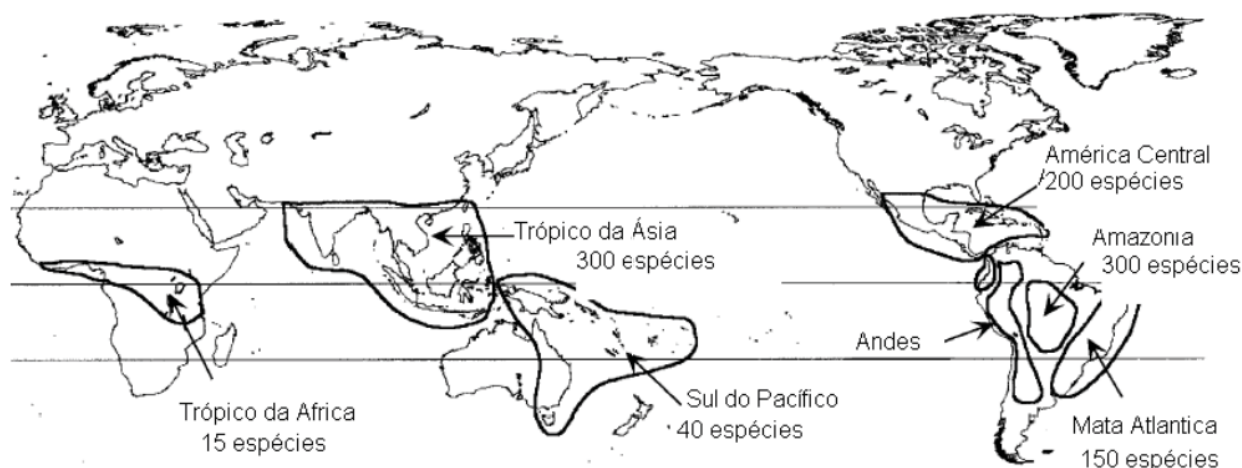
Em 2012, LIMA e colaboradores extraíram o óleo essencial de *P. aleyreanum*, composto principalmente de mono e sesquiterpenos, e verificaram que o óleo possui atividade antinociceptiva, anti-inflamatórias e propriedade gastro protetoras. Sauter e colaboradores em 2012 extraíram o óleo essencial de *P. hispidinervium*, composto também principalmente por mono e sesquiterpenos, e relataram que o óleo possui atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyphaga*. Potzernheim e colaboradores em 2012 estudaram os óleos de quatro populações de *P. aduncum* L. para verificar a variabilidade da composição do óleo essencial das folhas desta planta e observaram que em algumas regiões, o óleo essencial possui 46 constituintes enquanto em outras, possui 65 constituintes identificados, o que implica que para a comercialização deste óleo essencial, é necessário um controle sobre o crescimento da planta para que a composição química do óleo vendido seja sempre a mesma.

Em 2010, FERRAZ e colaboradores estudaram a composição do óleo essencial das partes aéreas de *P. amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides*, e concluíram que o óleo de *P. amalago* é composto majoritariamente por sesquiterpenos hidrocarbonetos (46,68%), seguido dos monoterpenos hidrocarbonetos (38,27%), sendo o composto majoritário do óleo essencial o limoneno (20,52%), e o óleo de *P. mikanianum* composto majoritariamente por arilpronoides sendo o apiol (69,89%) o composto majoritário. Neste estudo avaliou-se a atividade destes óleos contra a larva do carrapato de boi concluindo que o óleo de *P. mikanianum* foi o mais ativo com um valor de LC_{50} de $2,33 \mu\text{L mL}^{-1}$ (controle positivo, Amitraz®, LC_{50} de $2,00 \mu\text{L mL}^{-1}$).

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

O mapa mostrado na FIGURA 1 apresenta a ocorrência do gênero *Piper* no mundo (JARAMILLO et al., 2001).

FIGURA 1. OCORRÊNCIA DO GÊNERO *Piper* NO MUNDO.

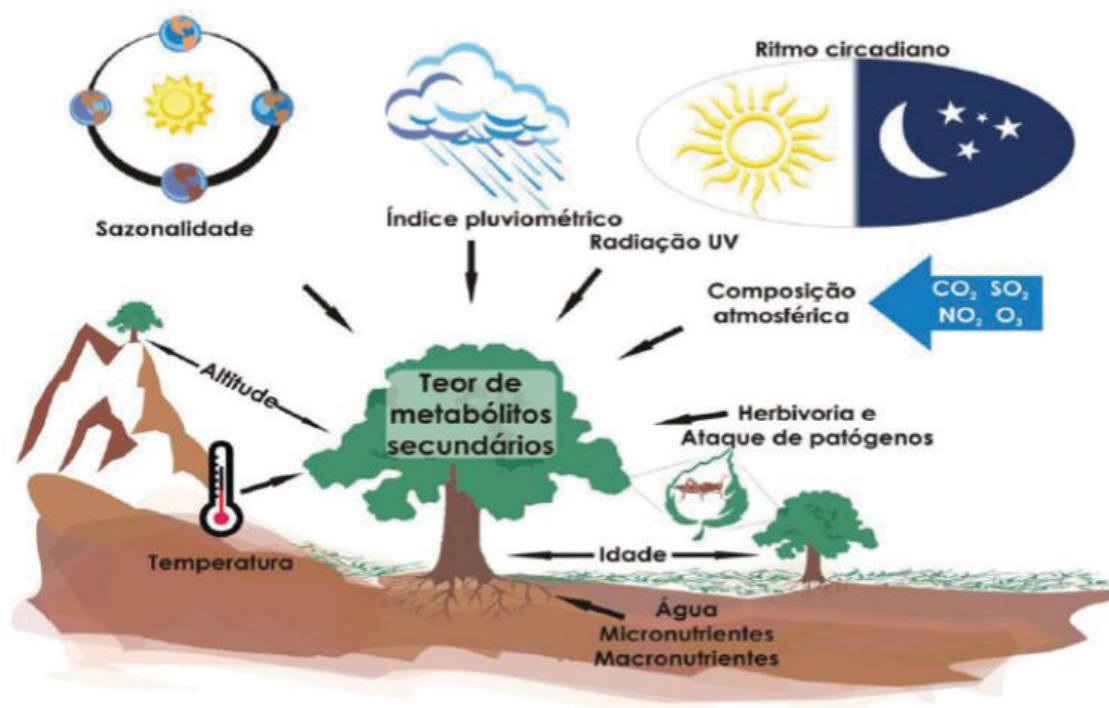


FONTE: JARAMILLO et al., 2001

1.4 METABOLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são estruturas complexas, geralmente de baixo peso molecular, possuem atividades biológicas definidas e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG e LUBERT, 2008). Alguns fatores são descritos na literatura que influenciam na sua concentração e produção na planta, entre eles estão: a sazonalidade, ciclo circadiano, ataque de herbívoros e fitopatógenos, idade da planta, altitude, entre outros. Alguns dos fatores são mostrados na FIGURA 2.

FIGURA 2 PRINCIPAIS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR O ACÚMULO DE METABOLITOS SECUNDÁRIOS.



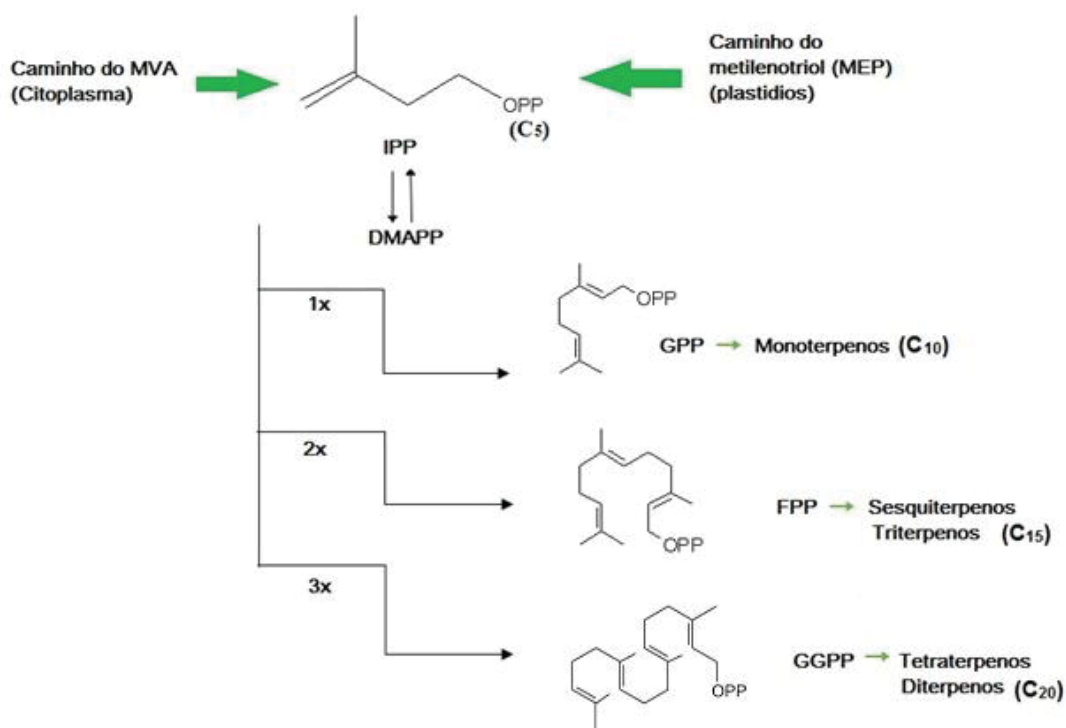
FONTE: GOBBO-NETTO e LOPES, 2007.

1.4.1 TERPENOS

Terpenos formam o maior grupo de produtos naturais de origem vegetal, compreendendo pelo menos 30 mil compostos (CONNOLLY; HILL, 1991) e contém a maior variedade de tipos estruturais. Têm recebido atenção crescente devido às propriedades relacionadas com a prevenção de doenças, atividade como inseticidas naturais e agentes antimicrobianos (CARVALHO; FONSECA, 2006).

Os terpenos são constituintes voláteis das resinas de plantas e óleos essenciais. São compostos alifáticos que apresentam ligações duplas e anéis, alguns grupos funcionais e muitos grupos metila. Possuem cadeia carbônica com uma quantidade de átomos de carbono múltipla de 5 (isopreno). A biossíntese dos terpenos acontece por dois caminhos diferentes: o caminho do mevalonato (MVA) no citoplasma das células e o caminho do metil eritritol (MEP) nos plastídios das células (DEWICK, 2009). Os precursores formados nestes caminhos são dois isômeros, o pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) que por sucessivas condensações formam os terpenos (FIGURA 3).

FIGURA 3 BIOSÍNTESE DOS TERPENOS

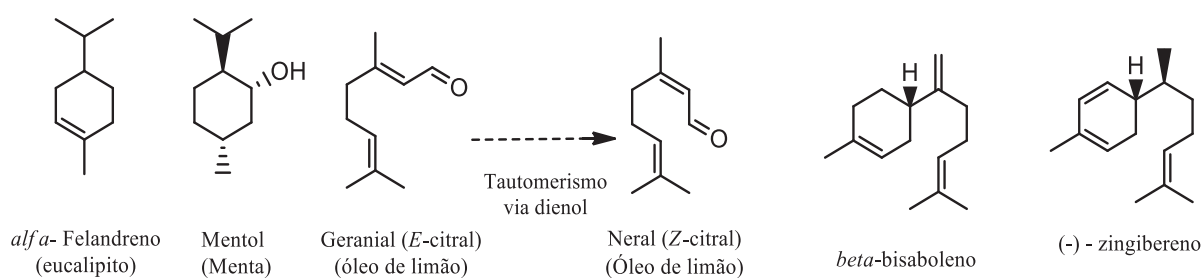


Legenda: GPP- pirofosfato de geranila; FPP – pirofosfato de farnesila e GGPP – pirofosfato de geranilgeranila

(Adaptado de DEWICK, 2009)

Os monoterpenos são formados pela condensação do tipo “cabeça-cauda” de uma unidade de pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) com uma unidade de pirofosfato de isopentenila (IPP) e os sesquiterpenos, uma condensação adicional com outra unidade de IPP. Como exemplo de monoterpenos encontrados em óleos essenciais tem-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 4).

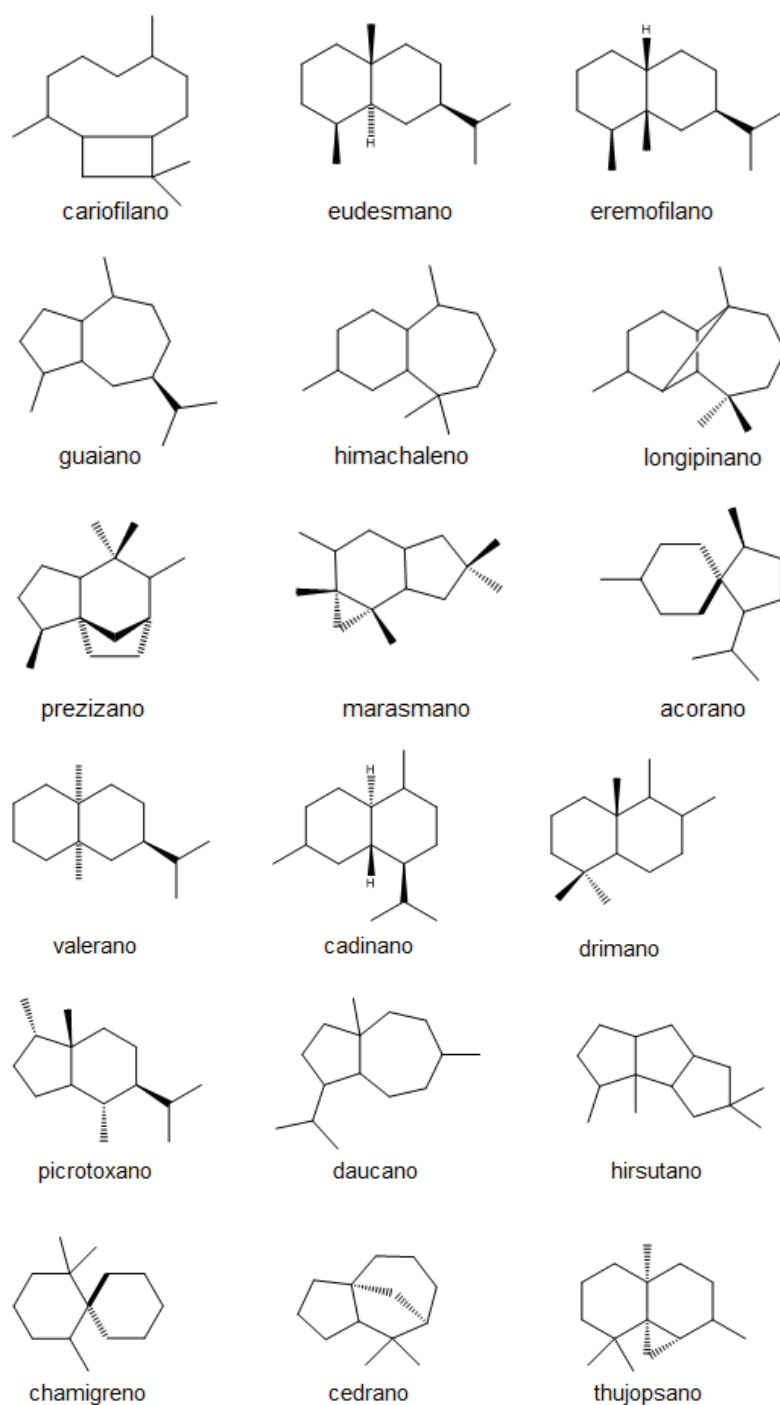
FIGURA 4 EXEMPLOS DE MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS



FONTE:DEWICK, 2009.

Os sesquiterpenos são constituídos por 15 átomos de carbono, ou seja, há aumento de uma unidade C_5 de IPP em relação aos monoterpenos. Devido a esse aumento da cadeia monoterpênica, origina-se uma grande variedade de sesquiterpenos cíclicos e acíclicos (DEWICK, 2009). Os principais núcleos básicos dessa classe são representados na FIGURA 5.

FIGURA 5 PRINCIPAIS ESQUELETOS DOS SESQUITERPENOS.



FONTE: DEWICK, 2009.

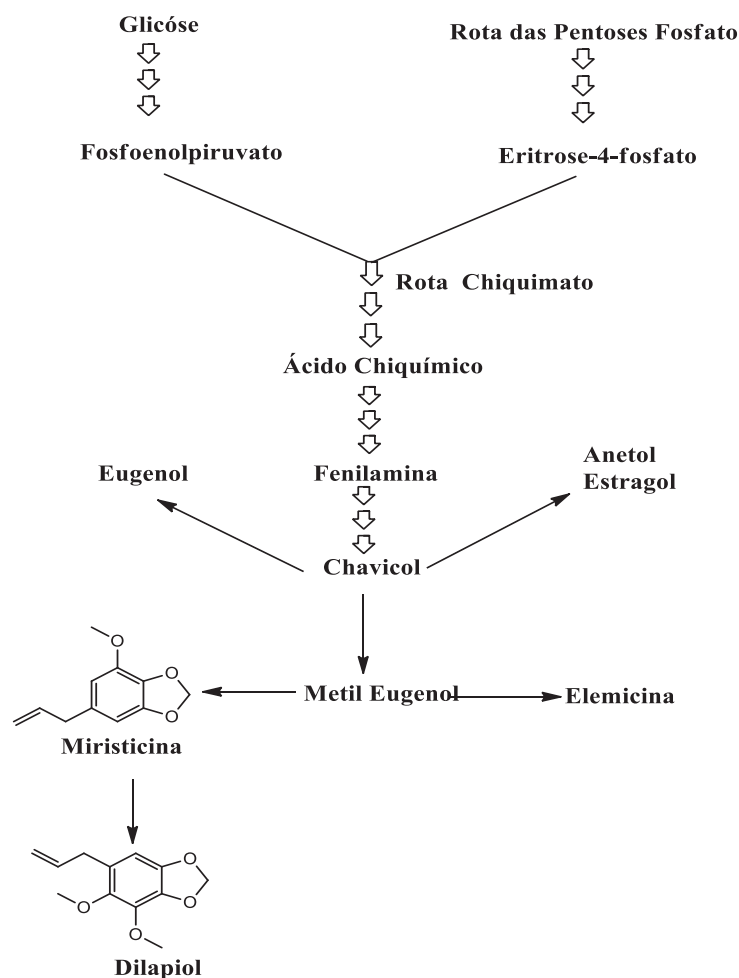
O estudo de terpenos, principalmente mono e sesquiterpenos, é feita através de técnicas de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, é uma técnica amplamente empregada na identificação de óleos essenciais (BROCHINI et al., 1999; JALALI-HERAVI; ZEKAVAT; SORESHTI, 2007).

1.4.2 ARILPROPANOIDES

Arilpropanoides são produzidos principalmente pela rota biossintética da via do ácido chiquímico, o qual é formado pela combinação do ácido fosfoenolpirúvico (PEP) e um açúcar derivado da via pentose-fosfato, a eritrose-4-fosfato, com posteriores modificações estruturais, como mostra a FIGURA 7 (DEWICK, 2009; CUNHA, CAVALEIRO e SALGUEIRO, 2005; LEITE, 2009).

Segundo Sangwan et al. (2001) a rota Biosintética dos arilpropanoides mostra que a miristicina é um precursor do dilapiol, conforme apresentado na FIGURA 6.

FIGURA 6 ROTA BIOGENÉTICA DE ARILPROPANOIDES DE OE DE PLANTA E RELAÇÃO DO SUBSTRATO/PRODUTO COM ALGUNS GRUPOS QUÍMICO



Adaptado de Sangwan et al. (2001).

1.5 QUIMIOMETRIA

A Quimiometria é uma área da química que utiliza a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos para análise de dados de origem química, com natureza multivariada, a fim de planejar e selecionar experimentos com o intuito de obter o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (OTTO, 2007). As diversas técnicas quimiométricas têm por finalidade desenvolver modelos empíricos ou semi-empíricos derivados dos dados, usados para estimar uma ou mais propriedades de um sistema, com base em medições de outras propriedades.

Visto que muitas das análises químicas convencionais são caras e/ou demandam muito tempo de análise, é altamente desejável a utilização de métodos de correlação para estimar rapidamente propriedades químicas de amostras. Dentre estes métodos de correlação podem ser citadas as análises realizadas na região do infravermelho próximo e médio, que necessitam da utilização de modelos de calibração multivariada para que se possam obter determinações quantitativas.

Entre os métodos de calibração mais empregados para análise multivariada tem-se a Análise de Componentes Principais (ACP, ou do inglês *Principal Component Analysis*–PCA) e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*–PLSR).

Para a análise de óleos essenciais, devido à grande quantidade de compostos que podem estar presentes, o PCA corresponde a uma ferramenta que pode ser utilizada para se determinar importantes características. Por exemplo, a variabilidade dos teores dos constituintes químicos em função das estações do ano (CAVALEIRO et al., 2002), de locais geográficos diferentes (KAROUSOU, KOUREAS e KOKKINI, 2005) e de diferentes partes da planta como flores e folhas (RANDRIANALIJAOANA et al., 2005), podem ser melhores demonstrados utilizando o PCA, sendo muito importante esse tipo de estudo para conhecer como as variáveis influenciam a produção de óleos essenciais.

1.6 O CULTIVO DO MORANGO

O morango 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).). Em 2014 a produção mundial de morango ficou concentrada na Ásia, com 48 % da produção mundial, seguidos da América (26 %), Europa (20 %) África (5,5 %) e Oceania com apenas 0,5 %.

A produção brasileira de morango gira em torno de 155 mil toneladas em uma superfície cultivada com 4.300 hectares, gerando uma produtividade média de 36,1 toneladas

por hectare, todavia, pesquisas já realizadas demonstraram produtividades superiores as 50 toneladas por hectare (STRASSBURGER et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2015).

Em 2017 a produção brasileira de morangos, foi a maior da América do Sul, a área cultivada é de 4.300 hectares e uma produção de 155 mil toneladas. As principais regiões produtoras são Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo e, a média da produtividade brasileira é de 36 ton/ha, tendo muitos produtores feito mais de um ciclo, o que eleva a média de produção/cultivo (de dois a três anos) (ANTUNES, 2018).

No Paraná o morango foi cultivado em 723 hectares, que produziram 22,6 mil toneladas com participação de 11,7% no VBP da Fruticultura e 1,3% no total colhido.

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

Conhecida como podridão de *Botrytis* ou mofo cinzento (FIGURA 7 e 8), o fungo ataca diversas culturas e pode sobreviver na matéria orgânica em decomposição. É uma doença que ocorre com maior frequência em culturas de morangos e uvas finas (NAVES et al., 2005).

FIGURA 7 MOFO CINZENTO EM MORANGO

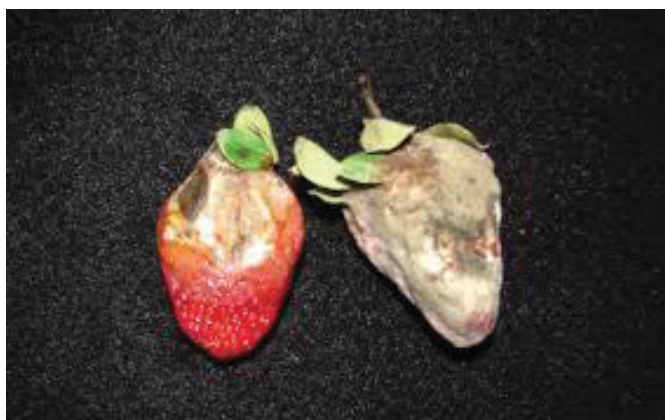


Foto: Ailton Reis

FIGURA 8 DIFERENTES NÍVEIS DE SEVERIDADE DE MOFO CINZENTO EM MORANGO.



Foto: R.J. Domingues

1.7 FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea* Pers.

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO CIENTÍFICA DO *Botrytis cinerea*

Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subfilo:	Pezizomycotina
Classe:	Leotiomycetes
Ordem:	Helotiales
Família:	Clerotiniaceae
Gênero:	<i>Botrytis</i>
Espécie:	<i>B. cinerea</i>

As espécies de *Botrytis* têm um estilo de vida necrotrófico que ocorre quando o patógeno infecta o hospedeiro específico único ou hospedeiro estreitamente relacionado, ou como o patógeno de amplo espectro como *B. cinerea* que infecta numerosas plantas hospedeiras: após infecção e morte dos tecidos estes fungos podem sobreviver e esporular como saprófitas no tecido necrótico, ou produzir estruturas de sobrevivência a longo prazo, como escleródios. Essas estruturas de sobrevivência podem ser associadas a plantas vivas

ou com detritos vegetais enterrados, ou no solo (ELAD, H.et al. 2007). A FIGURA 9 mostra uma ampliação de conídios de *B. cinerea*.

FIGURA 9 IMAGEM DE MICROSCÓPICA DE CONÍDIOS DE *B. cinerea* ISOLADOS DE TOMATES.



Foto: Paul Bachi, University of Kentucky Research and Education Center.

Em condições de laboratório, *B. cinerea* continua a esporular por 12 semanas após a produção da primeira safra de conídios (NAIR E NADTOTCHEI, 1987). Sob condições naturais, a chuva contribuiria para desalojar conídios de germinar escleródios e iniciar a produção de conídios removendo a supressão na esporulação. A formação de escleródios no campo é geralmente associada ao tecido vegetal. No entanto, também ocorre em insetos. Louis e colaboradores (1996) demonstraram que a da mosca de vinagre (*Drosophila melanogaster*) pode servir de vetor para *B. cinerea*. O *B. cinerea* já foi encontrado em vários estágios de vida do *D. melanogaster*. Os conídios germinaram no inseto, desenvolvendo o micélio, e diferenciado em microsclerócio, que pode ser transportado pelas moscas durante a vida inteira. Desde que a mosca sobreviva como um adulto, concluiu que isso pode ter um papel na conservação do *B. cinerea* no inverno (ELAD, H.et al. 2007).

Em 1954 Reavill observou que o *B. cinerea* e outras populações de *Botrytis* desenvolvem resistência a fungicidas. Foram relatadas resistências a fungicidas primeiramente a clorobenzotratos, benzimidazólicos, e posteriormente por resistência às dicarboximidas (BOLLEN E SCHOLTEN, 1971; KATAN, 1982; YARDEN E KATAN,

1993). Por isso, o tratamento de *Botrytis* por fungicidas químicos ainda representa um sério desafio para os consultores agrícolas (ELAD, H. et al. 2007).

1.8 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A utilização de substâncias naturais, de origem vegetal, pode tornar o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas. Além dos benefícios proporcionados à saúde, diversos estudos têm demonstrado o efeito inibidor no desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos veiculados por alimentos (BARA, 1992).

Vários estudos têm comprovado o efeito de compostos isolados de óleos essenciais de plantas que atuam como fungicidas naturais inibindo a atividade fúngica e, um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (CHAO & YOUNG, 2000).

Para algumas espécies de *Piper* já há estudos do potencial antifúngico como o de *P. aduncum* relatado por BASTOS & ALBUQUERQUE (2004) que o CIM para *Colletotricum musae* foi de 150 µg mL⁻¹. ALMEIDA e colaboradores relataram em 2009 que, o dilapiol presente em *P. aduncum*, apresentou ação fungicida contra o fungo *Clinipelis perniciosa* (vassoura de bruxa), além de ação larvicida e inseticida contra as larvas e os insetos adultos de *Aedes aegypti* (ALMEIDA et al., 2009).

O uso de fungicidas sintéticos industrializados em larga escala para o controle de doenças em plantas tem induzido o surgimento de populações resistentes de patógenos de plantas, fazendo com as doses dos produtos utilizados aumentem cada vez mais, como forma de manter sob controle as doenças e a viabilidade econômica da produção. Como consequência, o desenvolvimento de produtos agrícolas com baixo nível residual de pesticidas é cada vez mais demandado (SILVA, et al., 2008).

Com a crescente restrição ao uso de produtos químicos de origem sintética em pós-colheita, tem ocorrido um considerável interesse por métodos alternativos de controle de doenças, que possuam mecanismos capazes de promover a indução de resistência nos tecidos vegetais a patógenos ou que possam complementar ou substituir o uso de fungicidas e prolongar o período de armazenamento dos frutos (CIA et al., 2007).

Conforme o exposto acima se verifica a necessidade de estudos mais aprofundados em espécies do gênero *Piper* visando, sobretudo o estudo dos óleos essenciais e/ou isolamento de constituintes com possíveis atividades antifúngicas para o controle do fitopatógeno *Botrytis cinerea* do morango.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este trabalho tem o objetivo de estudar os óleos essenciais de espécies de *Piper* ampliando o conhecimento da composição química e das propriedades biológicas dessas espécies, principalmente contra o fitopatógeno do morango, *Botrytis cinerea*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterização química dos óleos essenciais através da cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- Avaliação dos óleos essenciais extraídos em função da sazonalidade considerando mudanças em relação à quantidade e a composição dos óleos obtidos.
- Realização das análises quimiométricas (ACP) dos óleos extraídos para verificar estatisticamente as diferenças entre as estações do ano em relação à composição dos mesmos;
- Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais totais e dos constituintes isolados contra o fitopatógeno do morango e da uva, *Botrytis cinerea*, através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em caldo, *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

As análises dos óleos essenciais foram realizadas em cromatógrafo CG-EM/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).

As análises de ressonância magnética nuclear 1D e 2D foram registradas em Espectrômetro de RMN BrukerDPX 200 e Avance 400, operando a 4,7 e 9,4 Tesla, observando os núcleos de ^1H a 200 e 400MHz, respectivamente, e a 50 e 100 MHz para ^{13}C .

As análises das leituras das placas de microdiluição foram feitas no Centro de Diagnósticos Marcos Enrieti, localizado no Setor de Ciências Agrárias, no equipamento da marca Biotek, modelo Elx 800 GIDX, de 5 a 96 poços com filtro de 650 nm. As leituras foram realizadas no tempo zero e 96 horas do início dos testes.

3.2 SOLVENTES E REAGENTES.

Os solventes utilizados foram diclorometano (F.Backer) para as análises no CG-EM/EM. Para análise por Ressonância Magnética Nuclear foi utilizado como solvente o clorofórmio deuterado (99,8%) (Aldrich).

3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As coletas das espécies de *Piper* foram realizadas em várias regiões do Brasil e realizadas pelo Drº Diones Krinski (UFMS). Na tabela 2 são descritas as espécies de *Piper* coletadas e respectiva localidade de coleta. As exsicatas das espécies foram depositadas e catalogadas no Herbário TANG, da Universidade do Estado de Mato Grosso, Campus Universitário de Tangará da Serra, o número de TOMBO está descrito na tabela 2:

TABELA 2 LISTA DE ESPÉCIES DE *Piper*, SUA LOCALIZAÇÃO DE COLETA E Nº DE TOMBO

Lista de espécies de Piperaceae			
Espécie	Município/UF	Coordenadas geográficas	TOMBO
<i>Piper aduncum</i> (PA)	Novo Progresso/PA	7°03'49.7"S 55°24'27.9"W	6850
<i>Piper amalago</i> (PB)	João Pessoa/PB	7°07'56.8"S 34°54'16.3"W	6833
<i>Piper caldense</i> (SP)	Tapiraí/SP	24°01'18.42"S 47°31'46.37"W	6840
<i>Piper mikanianum</i> (PR)	São José dos Pinhais /PR	25°33'01.8"S 49°14'10.8"W	6866
<i>Piper mollicomum</i> (SP 7)	Tapiraí/SP	24°00'21.2"S 47°31'31.5"W	6852

As coletas foram efetuadas uma vez por estação, realizadas nos meses de março/2015 à fevereiro/2016, para abranger o estudo de sazonalidade dos óleos.

3.3 SECAGEM DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico foi dividido em duas partes: uma parte das folhas foi separada e foram secas em estufa de ar circulante a 40°C até que a massa do material fosse constante, e a outra parte foi mantida fresca. Ambas as amostras foram submetidas à hidrodestilação.

3.4 EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O material vegetal seco foi grosseiramente triturado e submetido à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 4h (50 g em aproximadamente 1000 mL de água destilada para as amostras de folhas secas e 100 g para as folhas frescas). As extrações foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal- UFPR, campus Agrárias, devido à infraestrutura disponível, que permitiu realizar as triplicatas simultaneamente (FIGURA 10).

FIGURA 10 SISTEMAS DE HIDRODESTILAÇÃO UTILIZADOS NAS EXTRAÇÕES DE ÓLEOS ESSENCIAIS.



Depois de realizada a extração, o óleo essencial foi coletado ou extraído do hidrolato (3 x 10 mL) com hexano, posteriormente, este foi seco com sulfato de sódio anidro e filtrado.

Na análise por Cromatografia em fase Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) a amostra foi diluída a 1% (v/v) em diclorometano 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 °Cmin⁻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):

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

Onde:

- 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 óleos essenciais 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 nenhum 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 é o valor obtido e n é 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 é o valor obtido, $\bar{x}$ é o valor da média e n é o número de amostras.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS MULTIVARIADAS

Após a identificação dos óleos essenciais, a matriz de dados gerada a partir das tabelas de identificação foi submetida aos procedimentos estatísticos multivariados.

Nas matrizes foram levadas em consideração as concentrações relativas calculadas para cada composto a partir da normalização de área do cromatograma. A TABELA 3 mostra a disposição das matrizes geradas.

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

Espécies	Folhas Secas		Folhas Frescas	
	Linhas	Colunas	Linhas	Colunas
<i>P. aduncum</i>	4	32	4	30
<i>P. amalago</i>	4	43	4	51
<i>P. caldense</i>	4	48	-	-
<i>P. mikanianum</i>	4	14	4	18
<i>P. mollicomum</i>	4	42	4	26

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

Em todas as matrizes, para os compostos identificados em pelo menos uma das amostras, quando não detectados em outras amostras, atribuíram-se valores iguais a 0,01%.

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 óleos essenciais (*loadings*), a fim de gerar agrupamentos ou separações entre elas.

Para o processamento multivariados dos dados fez-se uso dos programas Excel® 2010, ORIGIN® 8 e o PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operado em ambiente Matlab 7.0.

3.6 TESTES *in vitro* DO FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea*

3.6.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

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 Fitopatologia. 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. O fungicida

usado como controle do *B. cinerea* na propriedade é o procimidona (Sumilex®). Este isolado é considerado como resistente a fungicidas.

O repique das culturas foi realizado periodicamente, e para o *Botrytis cinerea* o cultivo foi realizado a 25 °C por oito dias em incubadora tipo B.O.D. Em seguida uma quantidade de esporos foi retirada da placa após crescimento e transferido para 2 mL de caldo BD (batata dextrose), o tubo foi agitado em vortex durante 15 segundos para posterior contagem de esporos na câmara de Neubauer. A concentração final do inóculo utilizada foi de 10⁵ esporos mL⁻¹.

3.6.2 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, onde as quantidades de cada poço estão descritas na TABELA 4 e o diagrama da distribuição das placas com as concentrações dos óleos na TABELA 5 abaixo:

TABELA 4 .QUANTIDADES EM µL POR POÇO DA PLACA DE MICRODILUIÇÃO

Concentração em ppm	Quantidades por poço em µL		
	Solução estoque de 200ppm	Água	Inóculo
1	0,5	39,5	160
2	1	39	160
4	2	38	160
6	3	37	160
8	4	36	160
10	5	35	160
20	10	30	160
Concentração em ppm	Solução estoque de 10000ppm	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
600	6	34	160
800	8	32	160
1000	10	30	160
1200	12	28	160

TABELA 5 DIAGRAMA DAS DISTRIBUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES NAS PLACAS DE MICRODILUIÇÃO.

	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	1ppm	1ppm	1ppm	20ppm	20ppm	20ppm	250ppm	250ppm	250ppm	1200ppm	MC
C	MC	2ppm	2ppm	2ppm	40ppm	40ppm	40ppm	300ppm	300ppm	300ppm	1200ppm	MC
D	MC	4ppm	4ppm	4ppm	60ppm	60ppm	60ppm	400ppm	400ppm	400ppm	1200ppm	MC
E	MC	6ppm	6ppm	6ppm	80ppm	80ppm	80ppm	600ppm	600ppm	600ppm	Inc	MC
F	MC	8ppm	8ppm	8ppm	100ppm	100ppm	100ppm	800ppm	800ppm	800ppm	Inc	MC
G	MC	10ppm	10ppm	10ppm	200ppm	200ppm	200ppm	1000ppm	1000ppm	1000ppm	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

*Onde: MC: meio de cultura; Inc: solução contendo os esporos (inóculos).

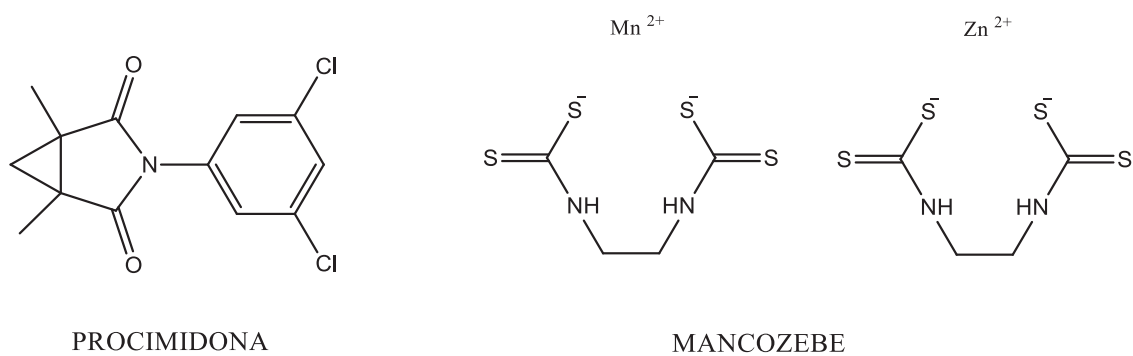
As microplacas com *B. cinerea* foram incubadas a 25 °C por 96 h em Estufa Incubadora B.O.D. Foi observado o crescimento microbiano com o auxílio do leitor de microplacas a uma absorvância de 650 nm. O valor da CIM é obtido quando as medidas de absorção das amostras dos óleos essenciais são iguais ou menores que a absorção do controle negativo (que contém apenas o meio de cultura) ou se mantiveram com valores iguais da primeira leitura, indicando que não houve crescimento do fungo, indicando assim 100 % de inibição. Os antifúngicos procimidona (Sumilex®) e mancozebe (Manzate®) foram usados como controle positivo de inibição de crescimento celular e as concentrações utilizadas no teste estão descritas na TABELA 6, e na FIGURA 11 estão as estruturas químicas dos fungicidas.

TABELA 6 DIAGRAMA DAS DISTRIBUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DOS FUNGICIDAS PROCIMIDONA E MANCOZEBE NAS PLACAS DE MICRODILUIÇÃO.

	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	1ppm	1ppm	1ppm	20ppm	20ppm	20ppm	Inc+H ₂ O	6ppm	6ppm	6ppm	MC
C	MC	2ppm	2ppm	2ppm	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	8ppm	8ppm	8ppm	MC
D	MC	4ppm	4ppm	4ppm	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	10ppm	10ppm	10ppm	MC
E	MC	6ppm	6ppm	6ppm	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	20ppm	20ppm	20ppm	MC
F	MC	8ppm	8ppm	8ppm	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	Inc+H ₂ O	30ppm	30ppm	30ppm	MC
G	MC	10ppm	10ppm	10ppm	Inc+H ₂ O	60ppm	60ppm	60ppm	40ppm	40ppm	40ppm	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

- Onde em cinza poços com as concentrações do fungicida Procimidona; em branco as concentrações usadas para o fungicida Mancozebe.

FIGURA 11 ESTRUTURAS DOS FUNGICIDAS PROCIMIDONA E MANCOZEBE



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados previamente os OE de 20 espécies de *Piper*, de diferentes regiões do Brasil, e foram escolhidas apenas as espécies que possuem em sua composição uma concentração superior a 25% do(s) composto(s) majoritário(s), e suas concentrações relativas foram comparadas entre si em relação a sazonalidade. Foram selecionados os OE de folhas de 5 espécies de *Piper*. Para a seleção dos OE das folhas, considerou a composição química e os compostos majoritários para o teste biológico posterior. As espécies escolhidas foram: *Piper aduncum*, *Piper caldense*, *Piper amalago*, *Piper mikanianum* e *Piper mollicomum*.

A TABELA 7 apresenta as espécies estudadas e os meses das respectivas coletas:

TABELA 7 ÉPOCAS DE COLETA.

Espécie	Parte da planta	Data das coletas			
		Verão	Outono	Inverno	Primavera
<i>P. aduncum</i>	Folhas	jan/16	abr/15	ago/15	out/15
<i>P. amalago</i>	Folhas	fev/16	mai/15	jul/15	nov/15
<i>P. caldense</i>	Folhas	fev/15	jun/15	set/15	dez/15
<i>P. mikanianum</i>	Folhas	mar/15	mai/15	ago/15	out/15
<i>P. mollicomum</i>	Folhas	fev/15	jun/15	set/15	dez/15

Os rendimentos dos óleos essenciais das folhas secas e frescas de *Piper* a partir de 50g de material vegetal seco estão descritos na TABELA 8.

TABELA 8 RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS(A) E FOLHAS FRESCAS (B) DAS ESPÉCIES DE *Piper*.

TABELA(a)		OEs das Folhas secas						
Espécies	Primavera		Verão		Outono		Inverno	
	Massa do OE (g)	Rendimento %	Massa do OE (g)	Rendimento %	Massa do OE (g)	Rendimento %	Massa do OE (g)	Rendimento %
<i>P.aduncum</i>	0,57	1,13	0,48	0,96	0,48	0,54	0,44	0,89
<i>P.amalago</i>	0,69	1,38	0,40	0,81	0,56	1,12	0,43	0,86
<i>P.caldense</i>	0,02	0,04	0,64	1,28	0,02	0,03	0,24	0,48
<i>P.mikanianum</i>	0,87	1,73	1,27	2,54	1,10	2,21	0,94	1,89
<i>P.mollicomum</i>	0,04	0,09	0,05	0,05	0,16	0,33	0,12	0,24

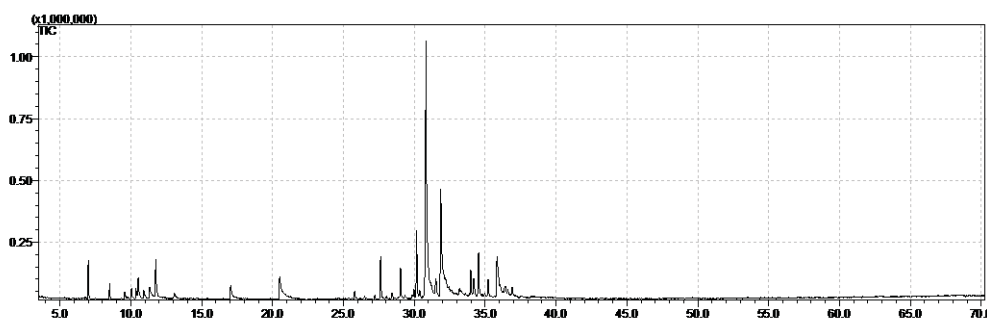
(b)	OEs das Folhas frescas							
	Primavera		Verão		Outono		Inverno	
Espécies	Massa do O E (g)	Rendimento (%)	Massa do O E (g)	Rendimento (%)	Massa do O E (g)	Rendimento (%)	Massa do O E (g)	Rendimento (%)
<i>P. aduncum</i>	0,34	0,34	0,31	0,34	0,21	0,21	0,49	0,49
<i>P. amalago</i>	0,33	0,33	0,24	0,33	0,35	0,35	0,30	0,30
<i>P. caldense</i>	0,06	0,06	0,08	0,06	0,03	0,03	0,10	0,10
<i>P. mikanianum</i>	0,79	0,79	0,65	0,79	0,51	0,51	0,41	0,41
<i>P. mollicomum</i>	0,16	0,16	0,17	0,16	0,10	0,10	0,25	0,25

A diferença do rendimento experimental observado pode ser em virtude das diferenças de locais e períodos de coleta, fatores edafo-climáticos (composição do solo, altitude, umidade, massas de ar, entre outros), de fatores fisiológicos da planta (idade, ação de herbívoros entre outros), e também, devido às práticas experimentais (como extração e armazenamento) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

4.1 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. aduncum* FOLHAS SECAS E FRESCAS

Pelas análises de CG-EM foram obtidos cromatogramas para cada triplicata de cada estação, na FIGURA 12 está mostrado o cromatograma do OE das folhas secas da estação da primavera. A quantificação dos constituintes foi realizada com base na área dos picos em relação a área total do cromatograma de cada OE, permitindo identificar 42 compostos presentes nos óleos essenciais das folhas secas e frescas de *P. aduncum* nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 9, onde está representada a média das análises em triplicata.

FIGURA 12 CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE *P. aduncum* NA ESTAÇÃO DA PRIMAVERA



Foi identificada 87% da composição dos OE das folhas secas e 91% das folhas frescas. Para os O. E. das folhas secas a asaricina foi o composto majoritário na estação da primavera ($30,23\% \pm 1,03$) com a maior concentração entre os óleos, seguido da miristicina ($15,71\% \pm 2,10$) e do dilapiol ($7,40\% \pm 0,97$), todos pertencentes a classe dos arilpropanoides. Para os O. E. das folhas frescas a asaricina também foi o composto majoritário na estação da primavera ($29,55\% \pm 6,63$) com a maior concentração entre os óleos, seguido da miristicina ($22,21\% \pm 6,20$), ambos da classe dos arilpropanoides representando 58% da composição total do OE nesta estação. A FIGURA 13 mostra a estrutura dos compostos majoritários dos O. E. das folhas secas de *P. aduncum*. A estação primavera do O. E. das folhas secas foi selecionado para avaliação dos testes com *Botrytis cinerea* devido a concentração dos compostos majoritários estar em torno de 53 %.

A literatura mostra que *P. aduncum* proveniente da região amazônica possui em seu óleo essencial o composto majoritario dilapiol. MAIA e colaboradores, em 1998 mostraram que os OEs de *P. aduncum* de várias regiões da Amazônia tinham um teor de dilapiol que varia de 31,5–97,3%. (MAIA et al., 1998). Em 2015 GAÍNZA, e colaboradores, mostraram que a concentração de dilapiol em *P. aduncum* coletada em Manaus foi de 75%.

TABELA 9. ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *Piper aduncum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

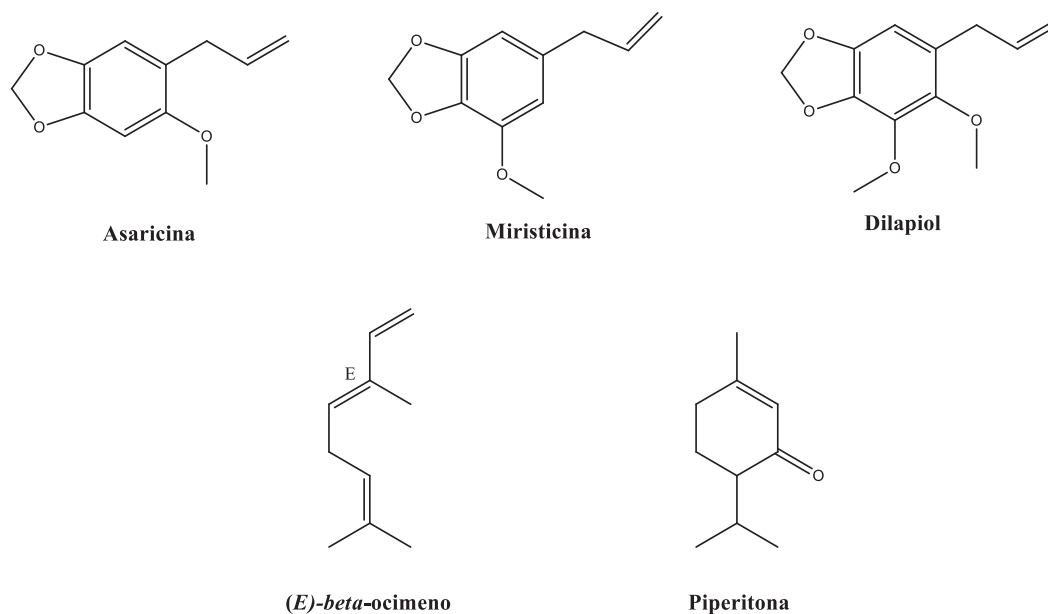
Nº	IA ¹	IA ²	Composto	Primavera				Verão				Outono				Inverno			
				Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas	
				Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)
1	925	924	α -tujeno	-	-	0,10	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	0,13
2	932	932	α -pineno	1,87	-	0,66	0,89	2,68	0,21	1,94	0,10	0,52	0,06	2,65	1,04	2,08	0,81	1,45	0,59
3	975	974	β -pineno	0,80	0,10	0,48	0,57	0,85	0,13	0,81	0,04	0,30	0,04	0,77	0,23	0,55	0,07	0,72	0,16
4	990	988	mirreno	-	-	0,14	0,24	-	-	0,57	0,02	-	-	0,71	0,23	-	-	0,43	0,11
5	1005	1002	α -felandreno	0,49	-	0,36	0,39	0,82	0,08	1,28	0,08	-	-	1,17	0,33	0,33	0,02	1,01	0,27
6	1011	1008	3- δ -careno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	0,13
7	1016	1014	α -terpineno	0,77	0,09	0,51	0,55	1,43	0,05	1,71	0,25	-	-	1,66	0,47	0,58	0,06	1,25	0,20
8	1024	1020	<i>p</i> -cimeno	0,66	0,06	0,51	0,58	1,48	0,03	1,51	0,20	-	-	4,84	1,92	0,55	0,11	0,93	0,16
9	1028	1025	β -felandreno	1,90	-	1,21	0,97	3,16	0,06	3,25	0,31	-	-	3,88	1,08	1,67	0,03	2,61	0,33
10	1037	1032	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	0,91	-	1,69	1,25	-	-	4,65	0,06	-	-	3,12	2,13	-	-	3,23	0,49
11	1047	1044	(<i>E</i>)- β -ocimeno	1,19	-	4,70	3,78	-	-	13,22	0,43	-	-	8,08	5,80	-	-	9,36	1,35
12	1057	1054	γ -terpineno	3,36	0,11	2,05	1,31	5,29	0,65	6,27	0,99	-	-	6,40	1,13	1,79	0,03	4,59	0,41
13	1089	1086	terpinoleno	0,65	0,03	0,54	0,52	0,67	0,04	1,66	0,10	-	-	1,89	0,44	-	-	1,40	0,14
14	1121	1117	desidro-sabina cetona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,12
15	1178	1174	terpinen-4ol	1,10	0,51	2,52	0,54	6,19	0,83	5,73	0,20	2,99	0,26	8,53	1,15	2,96	-	3,62	0,23
16	1255	1249	piperitona	2,98	1,53	4,93	0,82	11,13	3,13	9,48	0,43	8,51	0,06	13,67	1,67	8,90	0,23	6,40	0,39
17	1290	1285	saftol	-	-	0,76	0,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,21
18	1376	1374	α -copaeneo	0,52	-	0,24	0,21	0,40	0,01	-	-	0,47	0,06	0,08	0,14	0,60	0,06	0,33	0,03
19	1392	1389	β -elemeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28	0,02
20	1409	1409	(<i>Z</i>)-cariofileno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	0,15
21	1410	1409	α -gurjuneno	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-	-
22	1420	1417	(<i>E</i>)- cariofileno	3,04	0,87	1,51	0,54	1,90	0,24	0,92	0,14	1,31	0,07	0,97	0,09	2,18	0,09	1,77	0,38
23	1430	1430	β -copaeno	0,22	0,30	-	-	0,21	0,30	-	-	1,24	0,29	-	-	2,45	0,15	-	-
24	1439	1439	aromadendreno	0,50	0,60	0,23	0,20	0,18	0,25	0,12	0,17	-	-	-	-	-	-	0,35	0,11
25	1454	1452	α -humuleno	2,21	0,08	1,26	0,46	1,77	0,30	0,64	0,03	-	-	0,85	0,10	-	-	1,20	0,10
26	1462	1458	<i>allo</i> -aromadendreno	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	1477	1475	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	0,69	-	-	-	0,26	0,37	-	-	-	-	-	-	0,38	0,09	-	-
28	1477	1478	γ -muroleno	-	-	0,27	0,24	-	-	-	-	-	-	0,07	0,12	-	-	0,30	0,06
29	1482	1484	germacreno D	4,76	0,81	3,40	1,38	1,38	0,19	1,52	0,01	-	-	1,43	0,75	-	-	3,05	0,26
30	1498	1495	asaricina	30,23	1,03	29,55	6,63	18,92	1,48	18,12	0,67	24,95	0,13	11,49	3,35	23,90	0,53	22,26	2,22
31	1516	1511	δ -amorfanó	1,54	0,17	-	-	1,22	0,60	-	-	0,82	0,12	-	-	0,81	0,02	-	-
32	1516	1514	cubebol	-	-	1,58	0,10	-	-	0,70	0,06	-	-	0,72	0,65	-	-	1,10	0,06
33	1524	1517	miristicina	15,71	2,10	22,21	6,20	10,68	0,75	12,67	0,07	17,63	0,30	8,05	1,82	16,68	1,63	15,10	1,67
34	1560	1555	elemicina	-	-	0,84	0,13	-	-	0,62	0,27	-	-	0,10	0,17	-	-	0,59	0,22
35	1569	1568	(<i>Z</i>)-elemicina	0,24	0,34	-	-	0,31	0,03	-	-	0,69	0,18	-	-	0,67	0,11	-	-
36	1579	1577	espatulenol	1,80	0,10	0,42	0,11	4,59	0,40	0,79	0,10	4,83	0,44	1,56	0,92	3,74	0,17	0,51	0,24
37	1584	1582	óxido de cariofileno	1,65	0,05	-	-	2,71	0,19	-	-	5,33	-	-	-	3,45	0,28	-	-
38	1593	1590	globulol	3,29	0,27	2,64	0,21	5,43	0,56	3,26	0,08	9,05	0,14	4,96	0,60	4,90	0,02	2,50	1,40

Primavera										Verão						Outono						Inverno					
Nº	IA¹	IA²	Composto	Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas	
				Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)
39	1611	1608	epóxido e humuleno II	1,22	0,04	-	-	1,67	0,03	-	-	4,27	0,23	-	-	4,27	0,23	-	-	1,87	0,11	-	-	-	-		
40	1628	1620	dillapiol	7,40	0,97	4,86	4,07	2,87	0,85	5,01	0,16	3,04	0,08	3,67	0,73	7,92	1,83	7,92	1,83	6,87	0,56	6,87	0,56				
41	1644	1645	cubenol	0,63	0,14	0,55	0,27	1,38	1,13	0,61	0,33	0,97	0,13	0,58	0,38	0,92	0,16	0,58	0,38	0,43	0,25	0,43	0,25				
42	1656	1652	α-cardinol	-	-	0,82	0,07	-	-	0,71	0,02	-	-	0,75	0,13	-	-	0,75	0,13	0,76	0,09	0,76	0,09				

Primavera										Verão						Outono						Inverno					
Classe de compostos	Secas	Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas					
		Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)				
Monoterpenos	12,60	12,95		16,38		36,87		0,82		35,17		7,55		27,28		7,55		35,17		7,55		27,28					
Monoterpenos oxigenados	4,08	7,45		17,32		15,21		11,50		22,20		11,86		10,23		11,86		22,20		11,86		10,23					
Sesquiterpenos	14,03	6,91		7,32		3,20		3,84		3,40		6,42		7,45		6,42		3,40		6,42		7,45					
Monoterpenos oxigenados	8,59	6,01		15,78		6,07		24,45		8,57		14,88		5,30		14,88		8,57		14,88		5,30					
Arilpropanoides	53,58	57,46		32,78		36,42		46,31		23,31		49,17		44,82		49,17		23,31		49,17		44,82					
Total	92,88	90,78		89,58		97,77		86,92		92,65		89,88		95,08		89,88		92,65		89,88		95,08					

¹Índice de retenção calculado ²Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,05%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários.

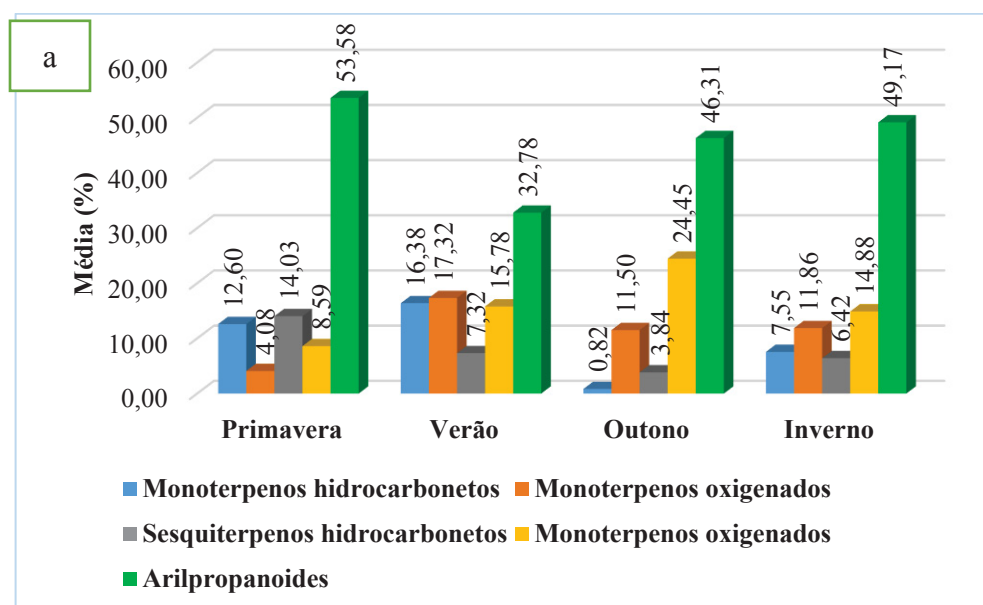
FIGURA 13 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *P. aduncum*.

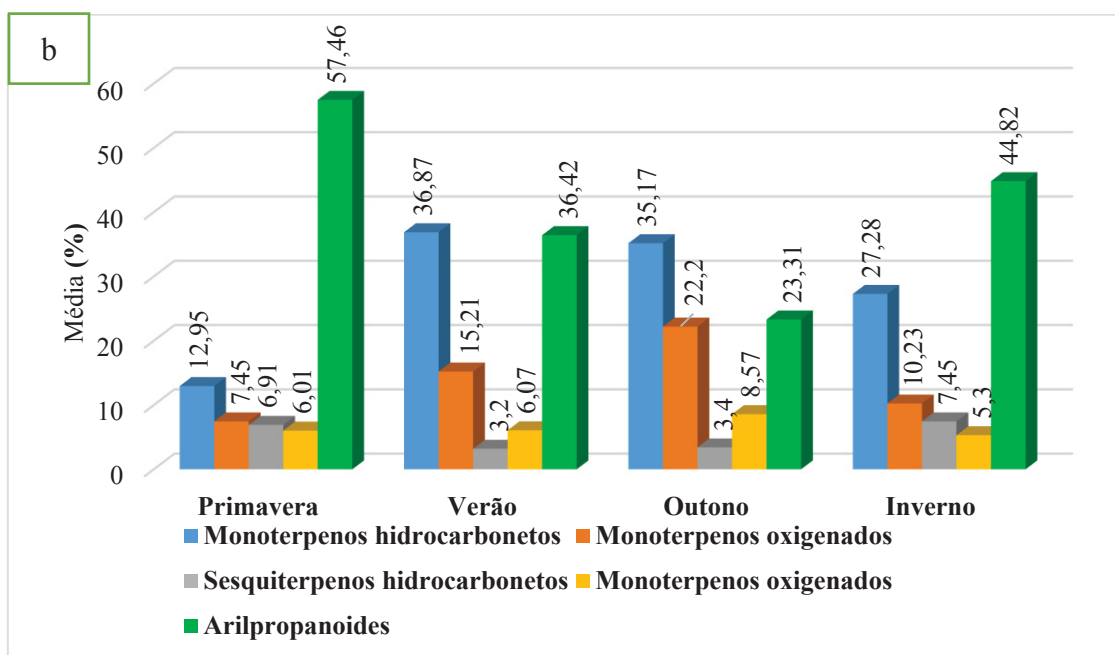


FONTE: ADAMS, 2017.

Para os OEs das folhas frescas, no verão houve um aumento na produção dos monoterpenos igualando a produção dos arilpropanoides, sendo que no outono a produção de arilpropanoides diminui e há um aumento na produção dos monoterpenos oxigenados, tendo os monoterpenos como majoritários nesta estação com 35% da composição do OE, conforme é observado no gráfico (b) (FIGURA 14).

FIGURA 14 GRÁFICO DO OE DAS FOLHAS SECAS (A) E FRESCAS (B) DE *P. aduncum* - VARIAÇÃO DOS COMPOSTOS NAS 4 ESTAÇÕES DO ANO



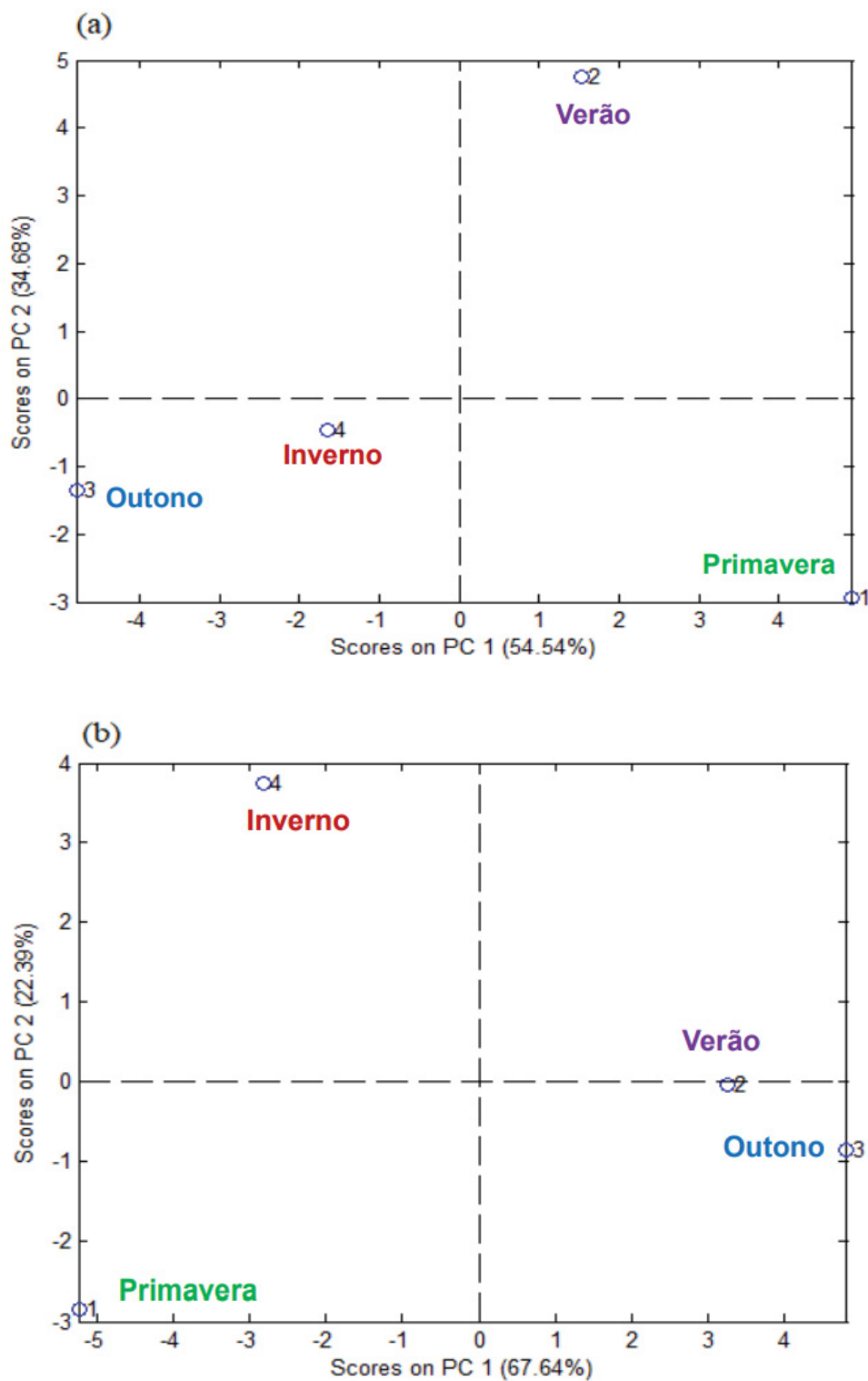


ALMEIDA e colaboradores, relataram em 2009 que o dilapiol presente em *P. aduncum* apresentou ação fungicida contra *Clinipelis pernicioso* (vassoura de bruxa), além de ação larvicida e inseticida contra as larvas e os insetos adultos de *Aedes aegypti*, com mortalidade de 100% dos insetos em 30 minutos de exposição na concentração de 600 ppm e, na concentração de 100 ppm houve uma mortalidade 100% das larvas após 48 horas de exposição ao dilapiol.

4.1.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE *P. aduncum*.

Para os resultados da constituição química dos óleos essenciais obtidos nesse trabalho, 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* e os *loadings* obtidos, para os quais foram consideradas as triplicatas de cada estação, para, simultaneamente, avaliar a reprodutibilidade do processo de extração dos óleos essenciais de cada uma das amostras.

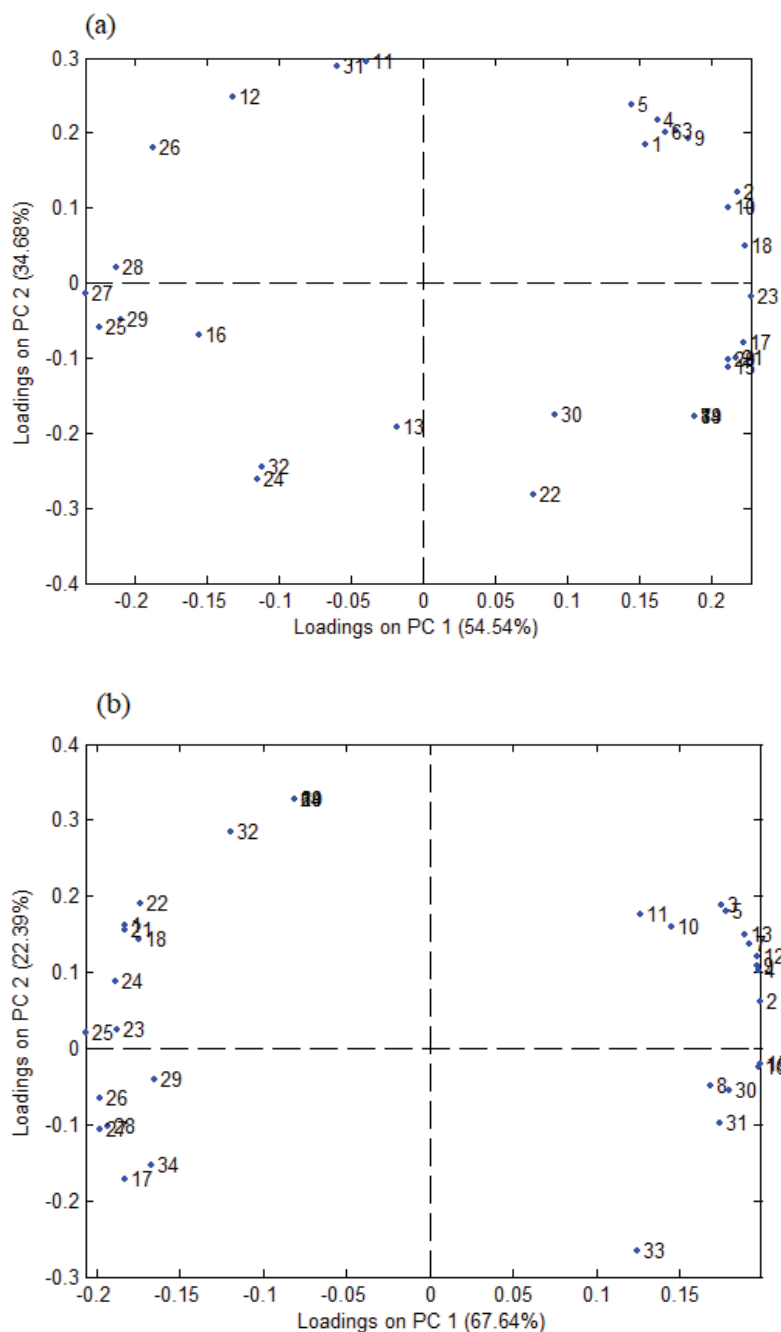
FIGURA 15 SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (A) E FOLHAS FRESCAS (B) DE *P. aduncum*. (PRIMAVERA=1; VERÃO=2; OUTONO=3 E INVERNO=4).



Para os OEs das folhas secas nota-se pelo gráfico de *scores* (FIGURA 15) que a composição da primavera e verão é distinta, mas as estações do outono e inverno são similares o que se confirma pelo gráfico de *loadings* (FIGURA 16). Para os OE das folhas

frescas pode se observar que as estações da primavera e inverno são distintas, mas há uma semelhança na composição dos óleos nas estações do verão e do outono. O gráfico de *loadings* mostra as componentes responsáveis pela distribuição das estações nos *scores*.

. FIGURA 16 SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (A) E FOLHAS FRESCAS (B) DE *P. aduncum*. (PRIMAVERA=1; VERÃO=2; OUTONO=3 E INVERNO=4).



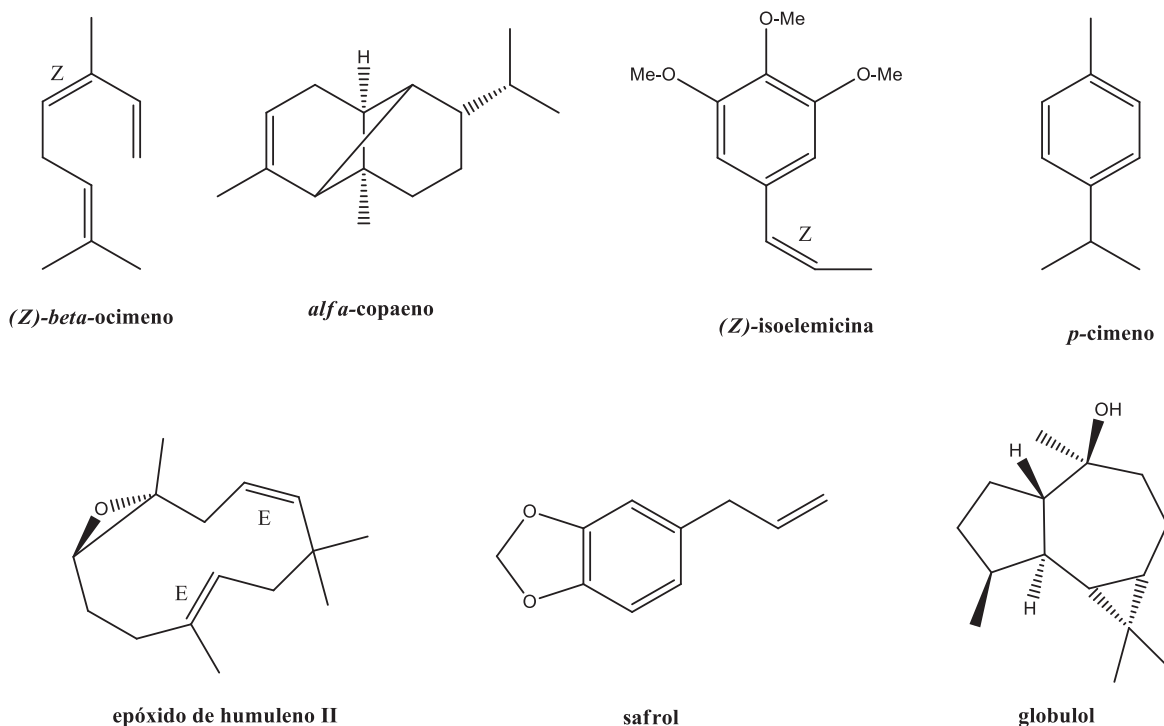
*(Dados com os compostos de cada OE correspondentes as componentes estão no anexo – página 98)

Pelo gráfico de *loadings* (FIGURA 16) observou-se que para os OE das folhas secas as componentes responsáveis pela variação na estação da primavera foi o (*Z*)- β -ocimeno (7),

para a estação do verão o *p*-cimeno (5) e o terpinen-4-ol (11), para o outono o epóxido de humuleno (29) e a (*Z*)-elemicina (25), e para o inverno o α -copaeno (13). Todos os compostos responsáveis pela variação das componentes estão em maior concentração na estação. Como as componentes do outono e inverno são próximas, observou-se apenas uma leve variação na composição destes OE se comparadas com as demais estações.

Pelo gráfico de *loadings* observou-se que para os OE das folhas frescas as componentes pela variação na estação da primavera foi o safrol (17), na estação do verão o *p*-cimeno (8), para estação do outono os sesquiterpenos oxigenados espatulenol (30) e globulol (30), e para o inverno o dilapiol (32), sendo que este teve sua maior concentração na composição do OE nesta estação com $6,87\% \pm 0,56$. A FIGURA 17 mostra alguns compostos responsáveis pela variância da sazonalidade do OE das folhas secas e frescas de *P. aduncum*.

FIGURA 17 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *P. aduncum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.

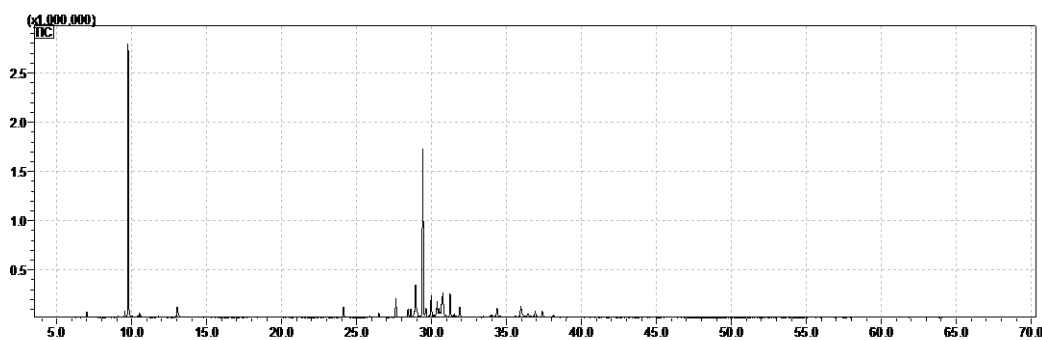


FONTE: ADAMS, 2017.

4.2. ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. amalago* L. FOLHAS SECAS E FRESCAS

Pelas análises de CG-EM foi elaborado um cromatograma de cada triplicata de cada estação dos OEs sendo um total de 12 cromatogramas, e a FIGURA 18 mostra o cromatograma do OE das folhas secas de uma triplicata da estação da primavera. A quantificação dos constituintes foi realizada com base na área dos picos em relação à área total do cromatograma de cada OE permitindo identificar 43 compostos presentes em óleos essenciais das folhas secas e frescas de *P. amalago*, nas diferentes estações do ano. Na tabela 6, está representada a média das análises em triplicata com seu respectivo desvio padrão.

FIGURA 18 CROMATOGRAMA DAS FOLHAS SECAS DE *Piper amalago* NA ESTAÇÃO DA PRIMAVERA.



Foi identificada 88% da composição dos OEs das folhas secas e 87% das folhas frescas. Para os OEs das folhas secas o 3- δ -careno é o composto majoritário em três estações, sendo a primavera com a maior concentração relativa de 33,93% $\pm$ 11,48. Na estação do verão o composto ishwarano foi o majoritário com 26,63% $\pm$ 0,03 (TABELA 10). A FIGURA 19 mostra a estrutura dos compostos majoritários dos óleos essenciais das folhas secas e frescas. Devido a sua composição em relação aos majoritários, o OE de *P. amalago* da estação da primavera das folhas secas foi selecionado para avaliação dos testes antifúngicos *in vitro*.

Para os OEs das folhas frescas o 3- δ -careno foi o majoritário em todas as estações, com sua maior concentração na estação do outono com 45,96% $\pm$ 6,73, seguido do terpinoleno com 13,70% $\pm$ 3,18.

TABELA 10. ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *Piper amalago*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

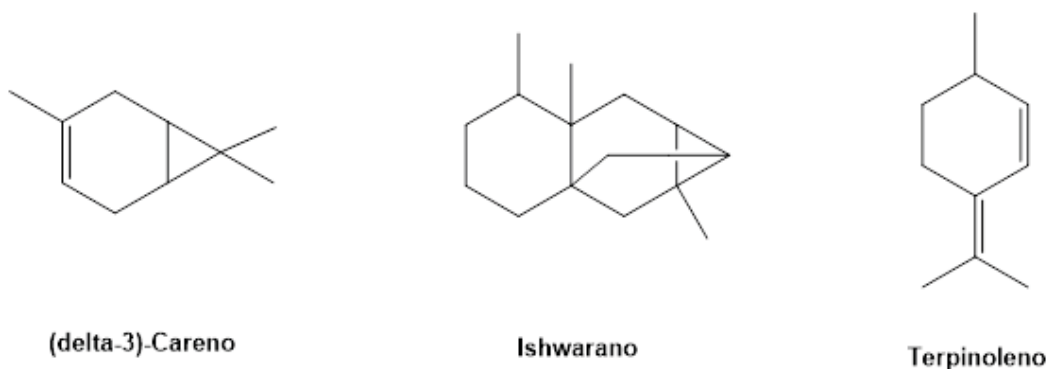
N°	IA¹	IA²	Composto identificado	Primavera				Verão				Outono				Inverno			
				Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas	
				Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)
1	932	932	<i>α</i> -pineno	0,72	0,17	0,45	0,40	0,11	0,10	0,42	0,05	0,62	0,11	0,74	0,09	0,50	0,17	0,64	0,12
2	972	974	<i>β</i> -pineno	0,19	0,05	0,04	0,08	0,18	0,13	-	-	-	-	0,06	0,01	0,17	0,11	0,06	0,02
3	991	988	mirreno	-	-	0,48	0,45	-	-	0,42	0,08	-	-	0,83	0,16	-	-	0,75	0,23
4	1004	1002	<i>α</i> -felandreno	1,18	0,52	1,23	1,12	0,21	0,27	1,25	0,16	1,20	0,18	2,13	0,65	0,72	0,22	1,88	0,49
5	1009	1008	δ-3-careno	33,93	11,48	30,09	22,30	9,32	6,19	25,71	2,32	31,90	4,35	45,96	6,73	26,01	4,62	43,89	5,39
6	1012	1014	<i>α</i> -terpineno	0,27	0,06	-	-	-	-	0,27	0,11	-	-	0,36	0,12	-	-	-	-
7	1024	1020	<i>p</i> -cimeno	0,35	0,06	0,53	0,38	-	-	0,42	0,05	-	-	0,81	0,10	0,80	0,12	0,63	0,35
8	1028	1024	limoneno	1,01	0,33	0,80	0,59	-	-	0,90	0,15	-	-	1,63	0,17	0,30	0,11	1,09	0,32
9	1058	1054	<i>γ</i> -terpineno	0,44	0,26	0,53	0,47	-	-	0,54	0,05	-	-	0,87	0,22	1,26	1,19	0,78	0,18
10	1090	1086	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno	2,61	0,84	-	-	-	-	3,35	0,47	2,83	0,28	1,51	1,99	2,36	0,69	0,33	0,02
11	1088	1086	terpinoleno	-	-	3,78	3,30	-	-	-	-	-	-	13,70	3,18	0,22	0,12	5,27	1,06
12	1338	1335	<i>δ</i> -elemeno	1,53	-	2,84	1,21	3,96	-	5,08	0,43	3,02	0,24	4,55	1,25	0,13	-	3,26	0,77
13	1376	1374	<i>α</i> -copaeno	0,08	0,11	-	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-	1,13	0,50	-	-
14	1392	1389	<i>β</i> -elemeno	1,09	0,54	1,27	0,57	9,09	0,99	1,44	0,17	1,33	0,11	0,42	0,13	2,50	0,71	0,77	0,17
15	1420	1417	(<i>E</i>)- cariofileno	1,96	1,46	1,62	0,98	4,17	0,75	1,33	0,25	1,71	0,20	1,85	0,22	0,82	0,57	1,35	0,48
16	1440	1439	aromadendreno	0,64	0,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,95	0,35	-	-
17	1444	1442	guaia-6,9-dieno	0,84	0,44	0,65	0,29	-	-	0,55	0,01	0,56	0,02	0,45	0,06	0,61	0,19	0,41	0,07
18	1450	1448	<i>cis</i> -muurola-3,5-dieno	0,34	0,48	-	-	-	-	-	-	0,26	0,22	-	-	4,44	1,47	-	-
19	1452	1452	<i>trans</i> -muurola-3,5-dieno	3,99	1,61	1,63	0,80	7,32	0,61	1,40	0,12	2,92	0,01	0,59	0,10	0,29	0,50	0,80	0,01
20	1453	1452	<i>α</i> -humuleno	1,03	0,12	-	-	1,13	0,42	-	-	0,78	-	-	-	-	-	-	-
21	1456	1458	allo-aromadendreno	0,15	0,21	2,63	1,19	-	-	2,54	0,22	-	-	2,10	0,29	0,70	0,46	1,95	0,62
22	1463	1465	ishwarano	21,21	1,24	16,30	8,53	26,65	0,03	15,06	1,92	14,08	0,98	2,46	1,19	19,90	5,54	6,66	0,97
23	1469	1469	<i>β</i> -acoradieno	-	-	-	-	1,66	1,52	-	-	1,03	0,04	-	-	-	-	-	-
24	1474	1475	<i>trans</i> -cardina-1(6),4-dieno	0,18	0,25	-	-	-	-	-	-	0,23	-	-	-	0,36	0,03	-	-
25	1477	1478	<i>γ</i> -muuroleno	1,76	2,07	0,77	0,18	-	-	0,36	0,09	0,39	0,03	0,56	0,05	1,78	1,08	0,64	0,49
26	1481	1483	<i>α</i> -amorfanô	-	-	1,06	0,91	-	-	0,93	0,23	-	-	0,76	0,17	-	-	0,71	0,15
27	1482	1484	germacreno D	0,67	0,10	-	-	0,95	1,50	-	-	1,09	0,07	-	-	0,86	0,24	-	-
28	1485	1487	<i>cis</i> -eudesma-6,11-dieno	1,55	1,56	-	-	-	-	-	-	0,57	0,17	-	-	0,63	0,42	-	-
29	1487	1489	aristochoeno	0,66	0,94	-	-	1,13	0,32	-	-	0,19	0,08	-	-	1,64	1,06	-	-
30	1489	1492	<i>β</i> - <i>cis</i> -guaieno	-	-	-	-	1,74	0,17	-	-	-	-	-	-	0,53	0,34	-	-
31	1492	1492	<i>δ</i> -selineno	0,53	0,01	-	-	-	-	-	-	0,09	0,13	-	-	-	-	-	-
32	1494	1493	<i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno	1,83	0,13	-	-	-	-	-	-	1,55	0,13	-	-	0,33	0,28	-	-
33	1494	1496	valenceno	-	-	1,56	0,57	-	-	1,30	0,64	-	-	0,11	0,19	-	-	0,68	0,08
34	1497	1496	viridifloreno	4,68	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,69	0,16	-	-

Nº	AI¹	AI²	Composto identificado	Primavera				Verão				Outono				Inverno			
				Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas	
				Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)
35	1499	1500	biciclogermacreno	-	-	7,10	3,70	11,43	2,31	13,05	0,74	9,84	0,49	3,96	2,72	6,09	2,53	5,65	0,82
36	1501	1500	α -muuroleno	0,55	-	0,47	0,17	-	-	0,66	0,06	0,80	-	0,31	0,13	0,63	0,12	0,49	0,10
37	1505	1505	premaspirodieno	-	-	0,45	0,16	-	-	1,44	0,17	-	-	1,26	0,65	-	-	0,71	0,24
38	1508	1511	δ -amorfano	2,36	1,37	1,76	0,78	-	-	2,48	0,28	2,34	0,19	0,88	1,08	3,12	0,82	1,69	0,49
39	1515	1513	γ -cardineno	-	-	0,63	0,24	-	-	0,93	0,04	-	-	0,60	0,22	-	-	0,69	0,10
40	1519	1522	δ -cadineno	1,81	0,08	-	-	4,49	0,01	2,06	1,04	3,38	0,29	0,90	0,57	-	-	1,68	0,36
41	1525	1537	α -cadineno	0,08	0,11	-	-	3,86	0,69	-	-	-	-	-	-	1,70	1,64	-	-
42	1565	1562	butanoato de geranila	-	-	0,83	0,26	-	-	0,65	0,19	-	-	0,94	0,14	-	-	0,80	0,28
43	1576	1577	espatulenol	-	-	2,15	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,29	0,77
44	1589	1590	globulol	0,99	0,55	-	-	0,40	0,46	-	-	0,47	0,02	-	-	0,25	0,24	-	-
45	1593	1592	viridiflorol	0,11	0,15	-	-	1,43	0,11	-	-	1,43	0,11	-	-	1,02	0,88	-	-
46	1627	1627	1- <i>epi</i> -cubenol	0,11	0,15	-	-	0,08	1,40	-	-	0,08	0,11	-	-	0,23	0,01	-	-
47	1631	1630	muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1,36	1,36	2,96	2,15	1,18	0,75	0,90	0,27	1,18	1,40	1,60	0,17	2,93	0,58	1,33	0,70
48	1644	1645	cubenol	0,60	0,35	-	-	0,77	1,77	-	-	0,77	0,75	-	-	1,20	0,44	-	-
49	1643	1644	α -muurolol (=torreiol)	-	-	1,19	0,62	-	-	0,69	0,30	-	-	0,36	0,12	-	-	1,12	0,36
50	1661	1652	α -cardinol	0,84	0,30	1,89	1,09	1,27	0,55	1,81	0,17	1,27	1,54	0,72	0,49	-	-	1,82	0,41
51	1663	1668	14-hidroxi-9- <i>epi</i> -(<i>e</i>)-cariofileno	1,03	0,13	-	-	0,47	0,33	-	-	0,47	0,54	-	-	-	-	-	-

Classe de compostos	Nº	AI¹	AI²	Composto identificado	Primavera				Verão				Outono				Inverno			
					Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas	
					Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)	Média	DP(±)
Monoterpenos	35	1499	1500	biciclogermacreno	-	-	7,10	3,70	11,43	2,31	13,05	0,74	9,84	0,49	3,96	2,72	6,09	2,53	5,65	0,82
	36	1501	1500	α -muuroleno	0,55	-	0,47	0,17	-	-	0,66	0,06	0,80	-	0,31	0,13	0,63	0,12	0,49	0,10
Sesquiterpenos	38	1508	1511	δ -amorfano	2,36	1,37	1,76	0,78	-	-	2,48	0,28	2,34	0,19	0,88	1,08	3,12	0,82	1,69	0,49
	39	1515	1513	γ -cardineno	-	-	0,63	0,24	-	-	0,93	0,04	-	-	0,60	0,22	-	-	0,69	0,10
Sesquiterpenos oxigenados	40	1519	1522	δ -cadineno	1,81	0,08	-	-	4,49	0,01	2,06	1,04	3,38	0,29	0,90	0,57	-	-	1,68	0,36
	41	1525	1537	α -cadineno	0,08	0,11	-	-	3,86	0,69	-	-	-	-	-	-	1,70	1,64	-	-
Total	42	1565	1562	butanoato de geranila	-	-	0,83	0,26	-	-	0,65	0,19	-	-	0,94	0,14	-	-	0,80	0,28
	43	1576	1577	espatulenol	-	-	2,15	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,29	0,77
Total	44	1589	1590	globulol	0,99	0,55	-	-	0,40	0,46	-	-	0,47	0,02	-	-	0,25	0,24	-	-
	45	1593	1592	viridiflorol	0,11	0,15	-	-	1,43	0,11	-	-	1,43	0,11	-	-	1,02	0,88	-	-
Total	46	1627	1627	1- <i>epi</i> -cubenol	0,11	0,15	-	-	0,08	1,40	-	-	0,08	0,11	-	-	0,23	0,01	-	-
	47	1631	1630	muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1,36	1,36	2,96	2,15	1,18	0,75	0,90	0,27	1,18	1,40	1,60	0,17	2,93	0,58	1,33	0,70
Total	48	1644	1645	cubenol	0,60	0,35	-	-	0,77	1,77	-	-	0,77	0,75	-	-	1,20	0,44	-	-
	49	1643	1644	α -muurolol (=torreiol)	-	-	1,19	0,62	-	-	0,69	0,30	-	-	0,36	0,12	-	-	1,12	0,36
Total	50	1661	1652	α -cardinol	0,84	0,30	1,89	1,09	1,27	0,55	1,81	0,17	1,27	1,54	0,72	0,49	-	-	1,82	0,41
	51	1663	1668	14-hidroxi-9- <i>epi</i> -(<i>e</i>)-cariofileno	1,03	0,13	-	-	0,47	0,33	-	-	0,47	0,54	-	-	-	-	-	-
Total					95,26		87,70		93,00		87,93		88,52		93,95		88,80		91,84	

¹Índice de retenção calculado ²Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,05%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários.

FIGURA 19 ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *Piper amalago*.



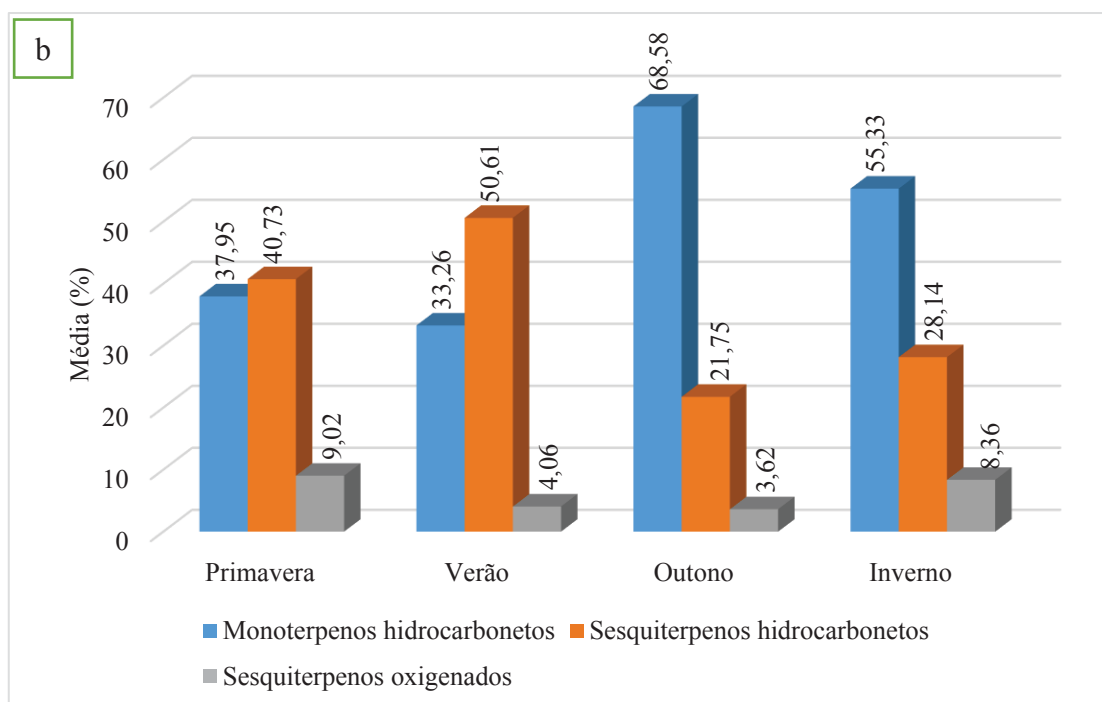
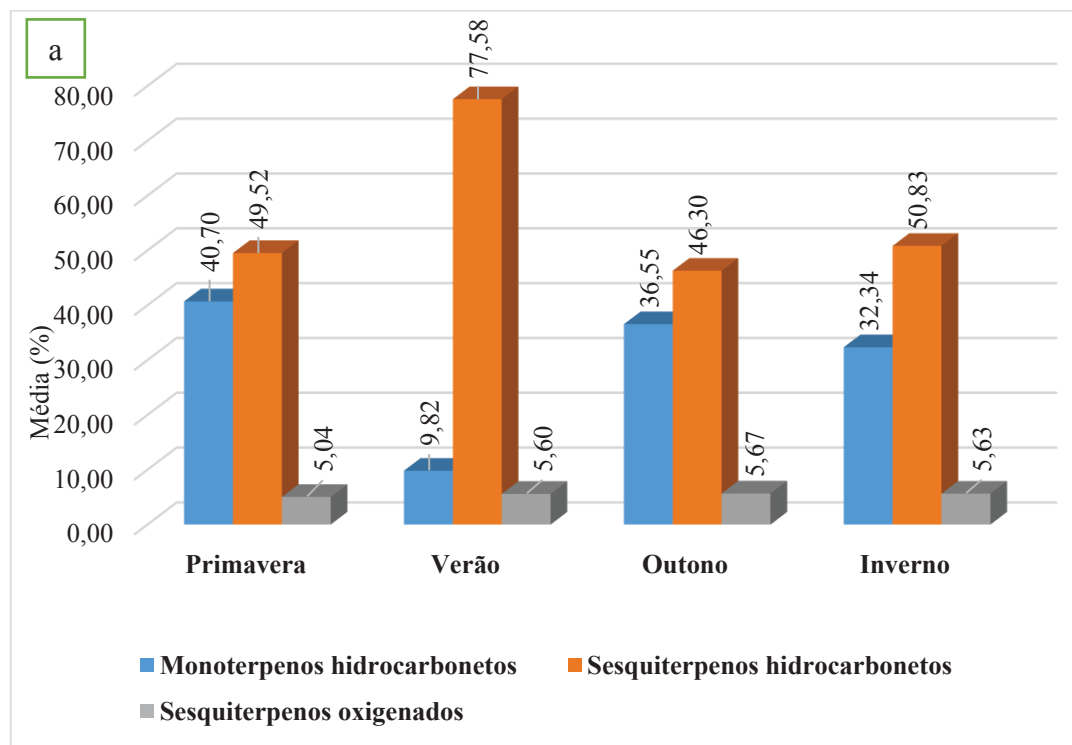
FONTE: ADAMS, 2017

A literatura mostra que para a *P. amalago* a sua composição muda de acordo com a região brasileira onde a espécie foi coletada. Para a região centro-oeste especificamente o Distrito Federal-DF, há uma predominância de monoterpenos como α -pineno (30,5 %), canfeno (8,9 %) e limoneno (6,8 %) (POTZERNHEIM et al., 2006). Para a região sudeste, espécies coletadas no Parque Estadual de Rio Doce em Minas Gerais mostram uma predominância de sesquiterpenos como o *E*-cariofileno (17,80 %), germacreno D (10,9 %) e biciclogermacreno (16,4 %), mas no ano de 1999 e em 2000 observou-se a predominância de sesquiterpenos oxigenados como o elemol (36,5 %); além de sesquiterpenos oxigenados e monoterpenos (MESQUITA et al., 2005). E as espécies coletadas na região sul (Rio Grande do Sul) mostram como majoritários o limoneno (20,52 %), δ -elemeno (6,82 %) e zingibereno (11,18 %) (FERRAZ et al., 2010).

Comparando o óleo estudado aqui com a literatura observa diferença na composição com relação aos majoritários, mas está de acordo com os compostos minoritários que compõem o OE, como germacreno D, biciclogermacreno e α -cadineno. Com relação a predominância da classe dos compostos observou-se que houve uma predominância de sesquiterpenos em todas as estações dos OE das folhas secas. O que se pode observar no gráfico (FIGURA 20). Pelo gráfico nota-se que os sesquiterpenos são predominantes em todas as estações, e que há um salto na sua produção no verão e uma diminuição na produção dos monoterpenos.

No gráfico 20b em relação aos OE das folhas frescas pode-se observar que houve uma predominância da classe dos sesquiterpenos apenas na primavera e no verão e nas estações do outono e inverno houve a predominância dos monoterpenos.

FIGURA 20 GRÁFICO DA VARIAÇÃO DA CLASSE DE COMPOSTOS NAS ESTAÇÕES DO ANO OES DAS FOLHAS SECAS (A) E FRESCAS (B) DE *P. amalago*.

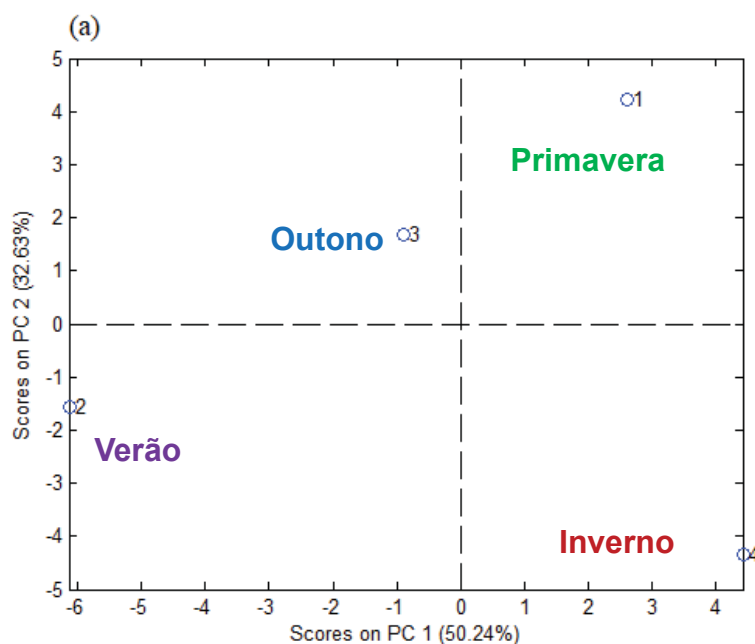


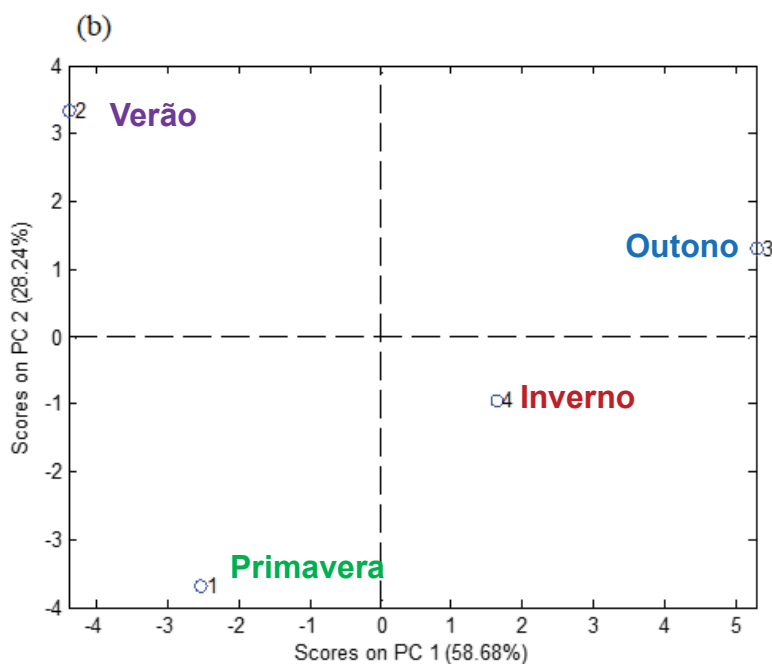
4.2.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE *P. amalago*

Para os resultados da constituição química dos óleos essenciais de *P. amalago* de folhas secas e frescas, 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* e os *loadings* obtidos, nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças dos óleos essenciais de cada uma das amostras de cada estação.

Para esta análise elaborou-se duas tabelas, uma dos OE das folhas secas com 4 linhas e 43 colunas e outra das folhas frescas com 4 linhas e 32 colunas, onde apenas os compostos identificados respectivamente em cada óleo fez parte da tabela. Os resultados do ACP estão expressos em gráficos (FIGURA 21).

FIGURA 21 GRÁFICO DE SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE *P. amalago*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).





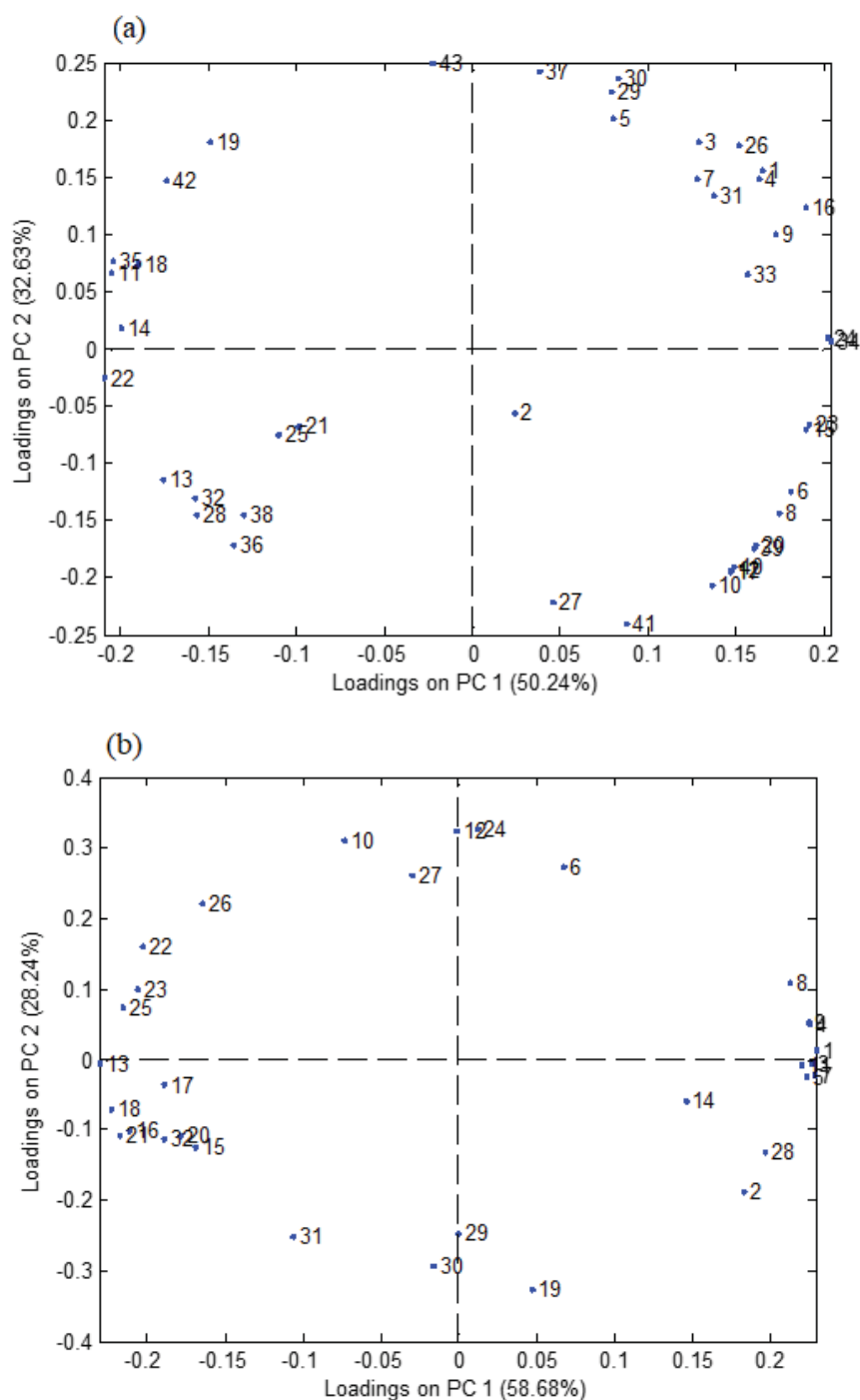
Pode-se verificar que para os OE das folhas secas de *P. amalago* a Componente Principal 1 (PC1) explica 50,24% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 32,63% totalizando 82,87% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os óleos essenciais extraídos em amostras de diferentes estações do ano.

Para os OE das folhas frescas de *P. amalago* a Componente Principal 1 (PC1) explica 58,68% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 28,24% totalizando 86,92% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os óleos essenciais extraídos em amostras de diferentes estações do ano.

Pelo gráfico de *scores* podemos ver que há distinção na composição dos OE das folhas frescas e das folhas secas de *P. amalago* entre as estações, isso devido as estações estarem separadas, uma em cada quadrante.

Através do gráfico de *loadings* foi possível verificar quais são os principais compostos responsáveis pela diferenciação entre as amostras de cada estação; já que os *loadings* representam o peso de cada composto na construção das componentes principais (FIGURA 22).

FIGURA 22 LOADINGS CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE *P. amalago*.



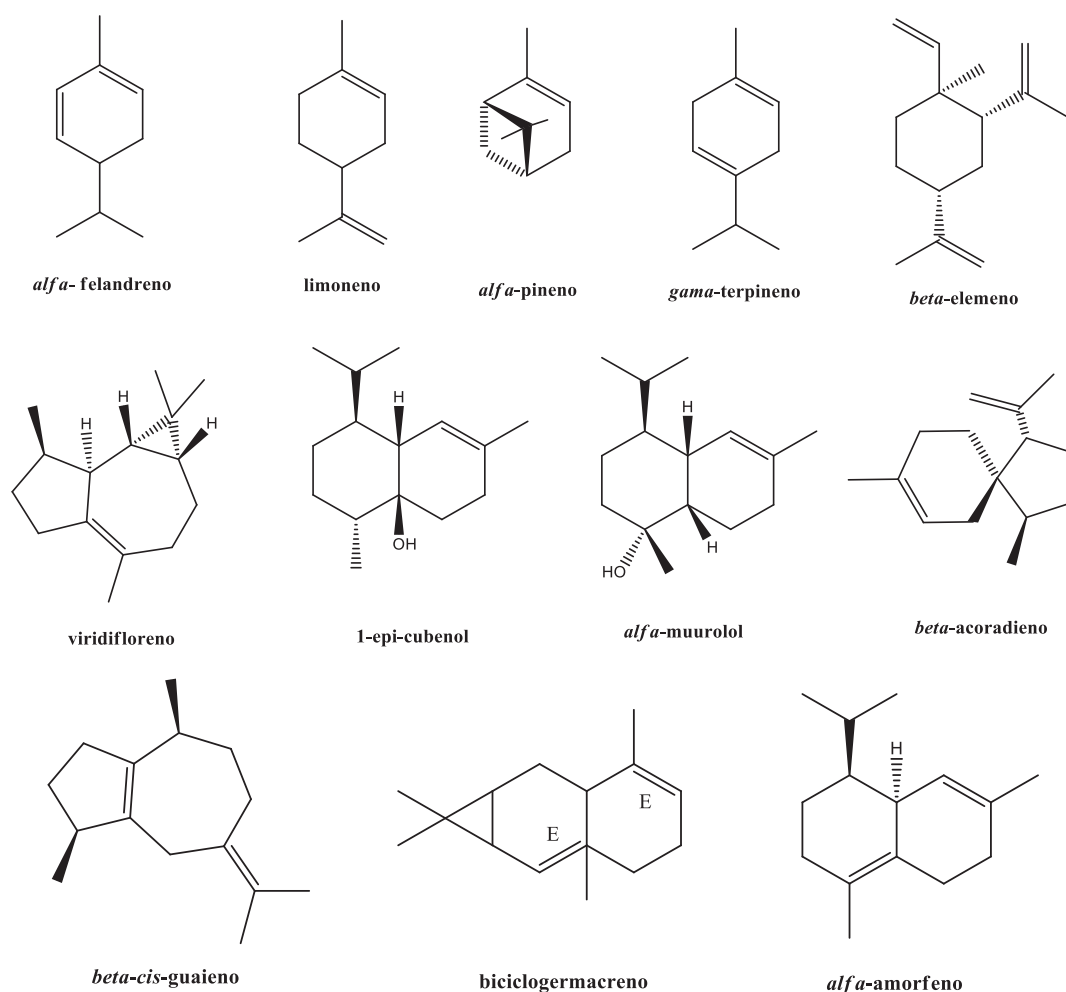
*tabelas com as atribuições das componentes de cada OE estão no anexo- página 99.

Nos OEs das folhas secas notamos que na primavera o α -felandreno (3), é um dos responsáveis pela diferenciação dos óleos essenciais, assim como o limoneno, que aparece na primavera (1,01%) e no inverno (0,30%), o *cis*-eudesma-6,11-dieno (26) e o viridifloreno (38). No verão constatou-se a maior concentração dos compostos β -elemeno (13), β -acoradieno (22), β -*cis*-guaieno (28) e biciclogermacreno (32) em relação aos OE das demais estações. No

outono não foi notado nenhuma componente que se diferencia dos demais nos OE das folhas secas. No inverno o *allo*-aromadendreno (20) e o *trans*-muurola-4(14),5-dieno (30), são responsáveis pela diferenciação deste OE dos demais óleos entre as estações.

Nos OEs das folhas frescas notou-se que para a estação da primavera o composto responsável pela variância dos dados é o α -muulorol (31), e para o verão o composto do biciclogermacreno (22) é o responsável pela variância dos dados assim como o α -muuroleno (23), δ -amorfenol (25) e o γ -cardineno (26). Na estação do outono os monoterpenos α -pineno (1), limoneno (8) e γ -terpineno (9), são responsáveis pela variância dos dados devido a sua concentração ser maior nesta estação. Para a estação do inverno os compostos responsáveis pela variância são γ -muuroleno e espatulenol. Os compostos responsáveis pela variância dos dados para OE das folhas secas e frescas estão representados na FIGURA 23.

FIGURA 23 ESTRUTURA DE ALGUNS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *P. amalago* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL

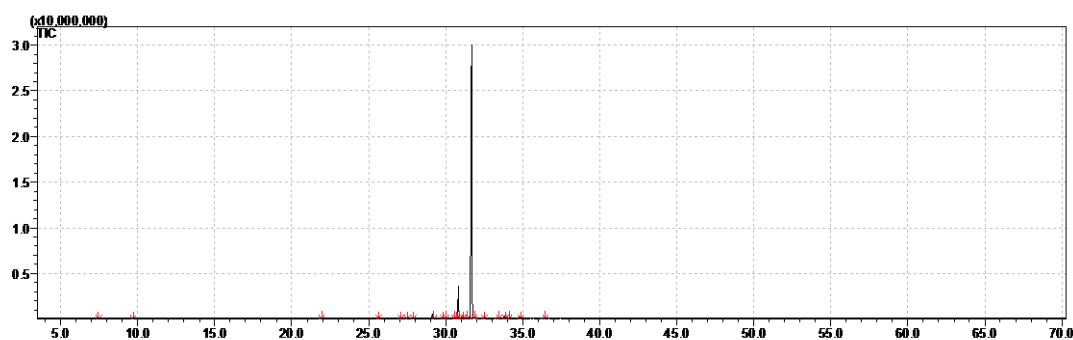


FONTE: ADAMS,2017.

4.3. ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. caldense* FOLHAS SECAS

Nas análises em CG-EM dos OE das folhas secas de *P. caldense*, obteve-se um cromatograma de cada análise de cada uma das triplicatas de cada estação, a FIGURA 24 mostra o cromatograma do OE de uma triplicata da estação do verão.

FIGURA 24. CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE *Piper caldense* NA ESTAÇÃO DO VERÃO.



A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais das folhas de *P. caldense* foi realizada com base na área dos picos em relação à área total do cromatograma, permitindo identificar 48 compostos nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 11, onde está representada a média das análises em triplicata.

Cerca de 90% da composição dos óleos essenciais foi identificada. A miristicina foi o composto majoritário em todas as estações, sendo que o verão apresentou maior concentração ($74,17\% \pm 11,89$), seguido da estação da primavera ($32,46\% \pm 4,57$). Os sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados estão presentes em todas as amostras, em quantidades significativas, como α -muulerano ($2,79\% \pm 0,11$), ledol (6,95%) e allo-aromadendreno (9,85%) todos na estação do verão, em que se observou uma diminuição na produção de monoterpenos oxigenados e um aumento na produção de sequiterpenos.

TABELA 11 ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS DE *Piper caldense*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

<i>Piper caldense</i> - Secas				Primavera		Verão		Outono *		Inverno	
Nº	IA ¹	IA ²	Composto	Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)
1	929	932	α -pineno	0,34	0,3(1	0,09	0,10	2,52	0,00	0,06	0,09
2	943	946	canfeno	0,18	0,21	0,19	0,17	0,48	0,00	0,16	0,04
3	972	974	β -pineno	0,13	0,14	0,03	0,05	1,14	0,00	-	-
4	1007	1008	3- δ -careno	0,12	0,14	0,19	0,16	0,27	0,00	-	-
5	1025	1024	limoneno	0,09	0,08	-	-	0,45	0,00	-	-
6	1043	1044	(E)- β -ocimeno	0,16	0,15	-	-	0,55	0,00	-	-

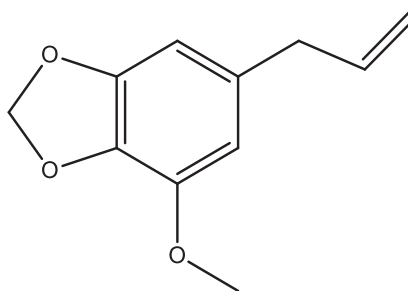
Nº	IA ¹	IA ²	Composto	Primavera		Verão		Outono		Inverno	
				Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)
7	1096	1095	linalol	0,07	0,06	-	-	0,16	0,00	0,06	0,08
8	1345	1345	α -cubebeno	0,20	0,05	0,12	0,21	0,15	0,00	0,15	0,08
9	1361	1369	ciclosativeno	0,49	0,09	0,03	0,05	0,24	0,00	0,06	0,08
10	1365	1373	α -ylangeno	0,56	0,12	0,03	0,05	0,35	0,00	0,09	0,03
11	1370	1374	α -copaeno	2,80	0,52	0,31	0,44	2,79	0,00	0,71	0,22
12	1385	1387	β -cubebeno	0,16	0,05	-	-	0,10	0,00	0,06	0,08
13	1387	1389	β -elemeneno	0,17	0,03	-	-	0,13	0,00	-	-
14	1405	1409	α -gurjuneno	1,19	0,22	0,39	0,26	2,61	0,00	0,75	0,24
15	1415	1417	(E)- cariofileno	5,03	0,67	0,55	0,42	3,69	0,00	1,29	0,42
16	1425	1430	β -copaeno	1,11	0,21	0,35	0,20	0,84	0,00	0,59	0,23
17	1431	1432	α -trans- bergamoteno	0,26	0,06	0,02	0,04	0,29	0,00	0,08	0,11
18	1434	1439	aromadendreno	0,89	0,15	0,15	0,15	1,90	0,00	0,56	0,19
19	1439	1442	6,9- guaiadieno	0,20	0,04	-	-	0,33	0,00	0,14	0,02
20	1446	1448	cis- muurola- 3,5-dieno	0,37	0,09	-	-	0,26	0,00	0,37	0,21
21	1448	1451	trans- muurola- 3,5-dieno	2,26	0,02	0,23	0,23	1,50	0,00	0,45	0,64
22	1452	1454	(E)- β -farneseno	0,27	0,08	0,18	0,16	0,15	0,00	-	-
23	1457	1458	allo- aromadendreno	6,26	0,45	2,04	1,11	9,85	0,00	3,17	0,55
24	1469	1471	dauca-5,8-dieno	0,80	0,17	-	-	0,51	0,00	0,34	0,10
25	1472	1478	γ -muuroleno	2,06	0,21	0,37	0,29	2,51	0,00	0,63	0,15
26	1476	1484	germancreno D	1,47	0,16	0,68	0,53	1,39	0,00	0,36	0,11
27	1482	1489	β -selineno	0,77	0,12	0,04	0,06	0,77	0,00	0,28	0,08
28	1491	1493	epi-cubebol	1,88	1,63	0,41	0,44	3,36	0,00	1,05	0,21
29	1492	1500	biciclogermacre no	2,07	0,40	0,91	0,98	4,30	0,00	1,96	0,32
30	1496	1500	α -muuroleno	2,79	0,11	0,19	0,33	2,40	0,00	1,82	0,30
31	1498	1505	β -bisaboleno	4,00	0,77	9,18	2,35		0,00	0,19	0,27
32	1503	1505	(E,E)- α - farneseno	1,84	0,40	1,06	0,26	0,89	0,00	0,16	0,09
33	1510	1511	δ -amorpheno	1,51	0,07	0,68	0,32	1,81	0,00	0,76	0,16
34	1518	1517	miristicina	32,46	4,57	74,51	11,89	16,17	0,00	62,30	6,77
35	1531	1533	trans-cadina- 1,4-dieno	0,20	0,10	-	-	0,47	0,00	0,24	0,00
36	1539	1544	α -calacoreno	1,65	0,15	0,38	0,19	2,22	0,00	0,53	0,04
37	1553	1559	germacreno B	0,11	0,02	-	-	0,22	0,00	0,05	0,08
38	1558	1561	(E)-nerolidol	1,87	0,38	0,28	0,31	1,29	0,00	0,75	0,30
39	1564	1567	palustrol	1,43	0,16	0,30	0,20	2,29	0,00	0,86	0,12
40	1573	1577	espatulenol	1,16	0,12	1,17	0,51	1,91	0,00	3,20	0,32
41	1579	1586	thujopsan-2- α -ol	2,47	0,03	0,57	0,57	0,08	0,00	2,02	0,19

Nº	IA ¹	IA ²	Composto	Primavera		Verão		Outono		Inverno	
				Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)	Médi a (%)	DP(±)
42	1588	1590	globulol	0,72	0,10	0,04	0,06	1,08	0,00	0,42	0,07
43	1599	1602	ledol	3,23	0,22	1,14	0,61	6,95	0,00	3,10	0,12
44	1624	1627	1-epi-cubenol	1,13	0,07	0,21	0,21	1,52	0,00	0,90	0,07
45	1628	1630	muurola- 4,10(14)-dien- 1β-ol	0,58	0,02	0,36	0,40	0,81	0,00	0,35	0,01
46	1638	1640	epi-α-muurolol	1,66	0,41	0,35	0,17	3,23	0,00	1,56	0,11
47	1650	1652	α-cardinol	1,28	0,24	0,34	0,33	2,51	0,00	1,10	0,20
48	1671	1675	cadaleno	1,07	0,10	0,27	0,25	1,49	0,00	0,39	0,03
Classe de compostos				Primavera		Verão		Outono		Inverno	
Monoterpeno				1,02		0,50		5,41		0,22	
Monoterpeno Oxigenado				0,07		0		0,16		0,06	
Sesquiterpeno				44,44		18,57		47,52		17,23	
Sesquiterpeno Oxigenado				15,53		4,76		21,60		14,26	
Arilpropanoide				32,46		74,51		16,17		62,30	
Total				93,54		98,34		90,96		94,07	

¹Índice aritmético calculado. ²Índice aritmético da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,03%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários. * Na estação do outono não houve material suficiente para a triplicata.

A FIGURA 25 mostra a estrutura do composto majoritário miristicina da estação do verão com 72,14%± 11,89; por isso este óleo foi também selecionado para avaliação nos testes contra o fitopatôgeno.

FIGURA 25. ESTRUTURA DO MAJORITÁRIO DE *P. caldense*



miristicina

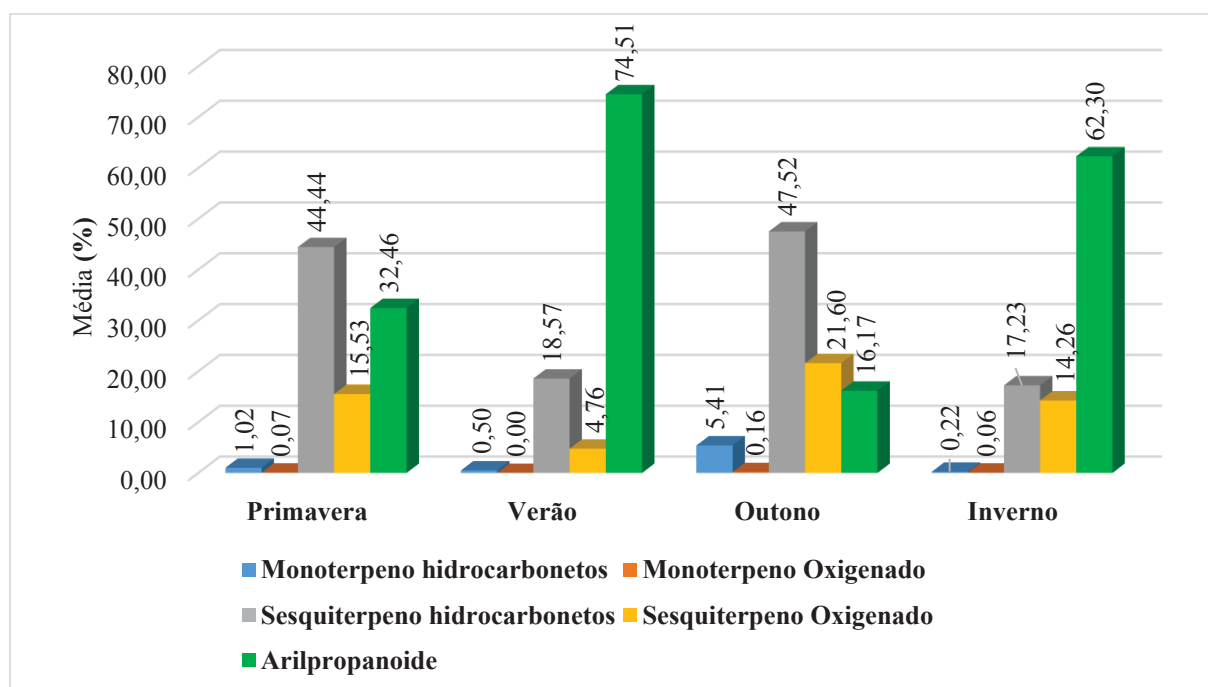
FONTE: ADAMS, 2017.

A miristicina é um arilpropanoide e é classificada também como precursor do MDA (metilenoanfetamina), e pode produzir efeitos psicoativos (TRUITT et al., 1961). Lee, Jerong e Kim em sua análise sobre a ação da noz moscada (*Myristica fragans*, Houtt), mostraram que são necessários 20 gramas de noz moscada pra desencadear os efeitos psicoativos, sendo então

necessários 210 mg de miristicina para que haja a sua conversão no organismo, e atue como uma espécie de anfetamina. Embora a miristicina possa causar efeitos psicoativos, ela é encontrada em outros alimentos como a cenoura, cravo da Índia e óleos essenciais utilizados como flavorizantes de bebidas (YATES&ENGLAND, 1982; SOUZA et al., 2016; RAFFO et al., 2013). Efeitos benéficos também são atribuídos a miristicina destacando-se dentre eles as ações inseticidas, fungicidas e apresenta atividade hepatoprotetora, em testes com camundongos (MORITA et al., 2003).

O gráfico (FIGURA 26) mostra a variação das classes de compostos por estação nos OEs de *P. caldense*.

FIGURA 26. GRÁFICO DOS OE DAS FOLHAS SECAS DE *P. caldense* – VARIAÇÃO DE CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.



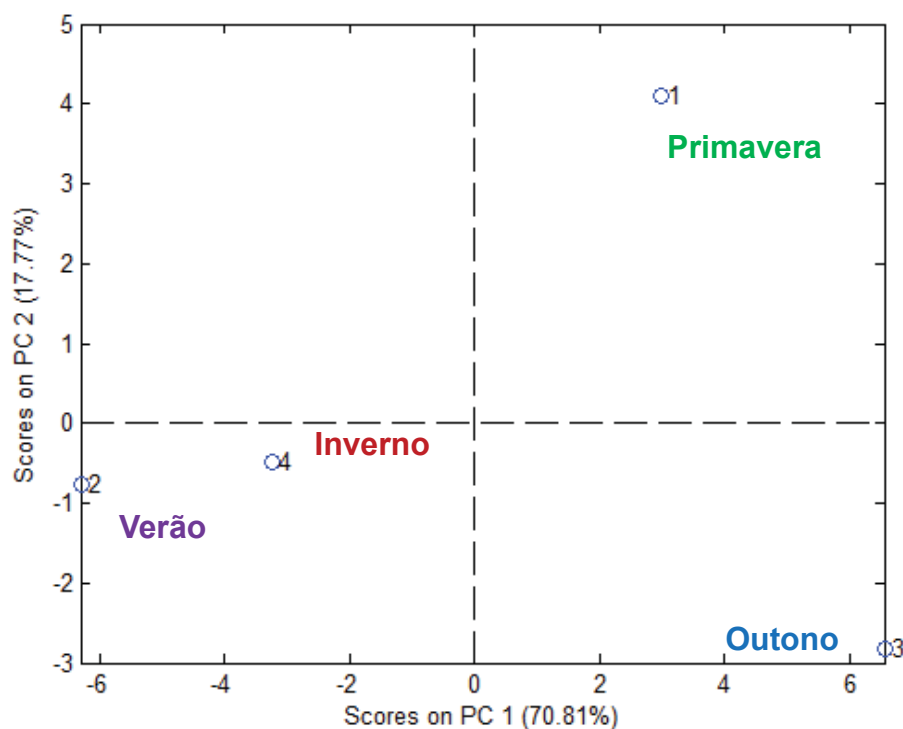
Pelo gráfico notou-se que na estação da primavera e do outono, houve uma predominância na composição do óleo essencial dos sesquiterpenos, seguida dos arilpropanoides na primavera e de sesquiterpenos oxigenados no outono. Na estação do verão e do inverno houve a predominância dos arilpropanoides seguida dos sesquiterpenos.

4.3.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE *P. caldense*

Para os resultados da constituição química dos óleos essenciais obtidos de *P. caldense*, 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* e os *loadings* obtidos, nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos óleos essenciais de cada uma das amostras de cada estação (FIGURA 27).

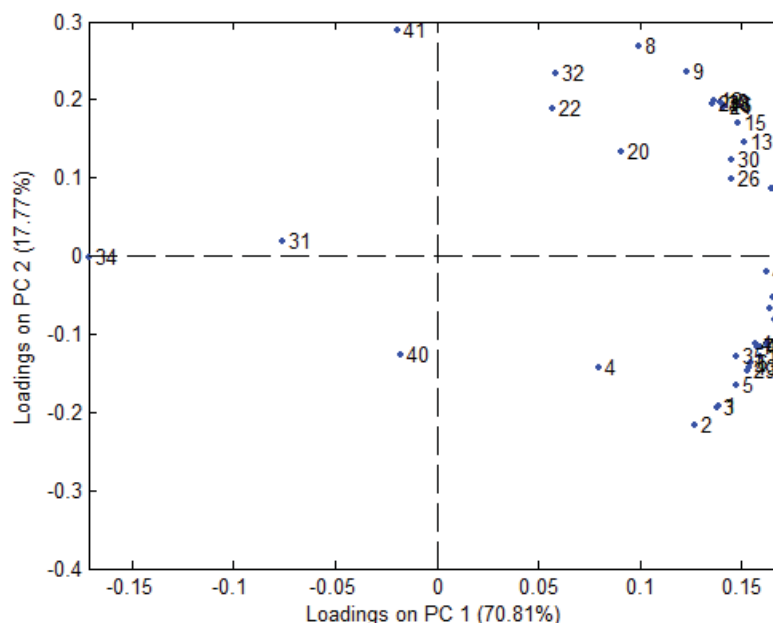
FIGURA 27. GRÁFICO DE SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS DE *P. caldense* (PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).



No gráfico de *scores* dos O. E. das folhas secas, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 70,81% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 17,77% totalizando 88,58 da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os óleos essenciais extraídos em amostras de diferentes estações do ano (FIGURA 27).

Pelo gráfico de *scores* pode-se ver que há distinção na composição dos OE das folhas secas de *P. caldense* de algumas estações, mas para a estação do verão e do inverno se observa similaridades na composição do OE. Pelo gráfico de *loadings* podem-se observar as componentes responsáveis pela distribuição no gráfico de *scores* (FIGURA 28).

FIGURA 28. GRÁFICO DE *LOADINGS* CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS DE *P. caldense*.

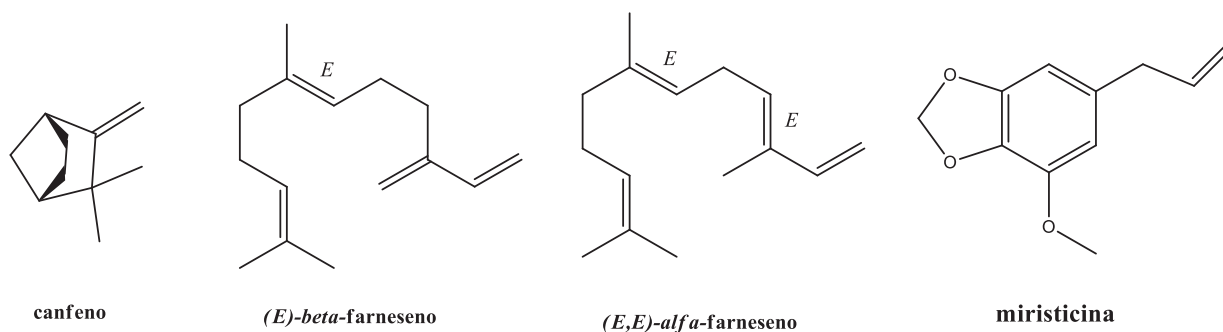


*As atribuições das componentes do OE, são as mesmas da elucidação.

Pelo gráfico de *loadings* (FIGURA 29) se observa que na estação da primavera os compostos ciclosativeno (9), (*E*)- β -farneseno (22) e (*E,E*)- α -farneseno (32), são os responsáveis pela distribuição desta estação no gráfico de *scores*, devido a maiores concentrações nesta estação. As estações do verão e do inverno estão no mesmo quadrante, o que sugere que a composição dos OE seja similar, isso por que a componente responsável por essa distribuição é a miristicina (34), que está em maior concentração nestas duas estações.

Para a estação do outono notamos que o responsável pela sua distribuição foi o canfeno (2), que é um monoterpene, cuja classe tem um aumento nesta estação em relação a composição do OE. A FIGURA 31 mostra a estrutura de alguns compostos responsáveis pela distribuição das componentes.

FIGURA 29. ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE *P. caldense* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.



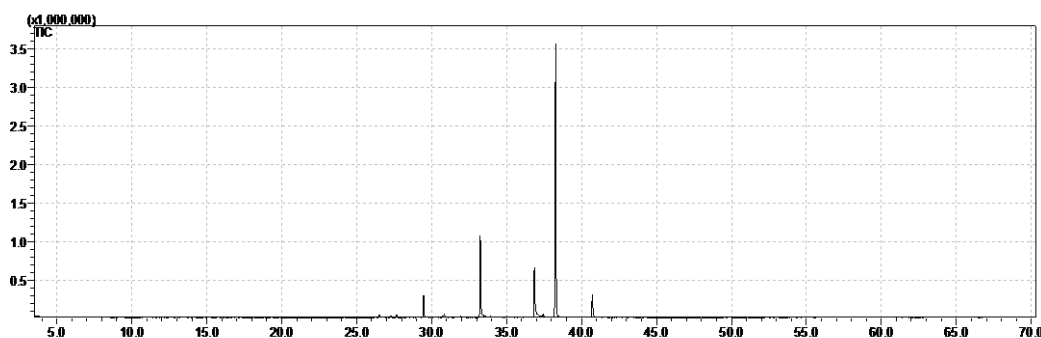
FONTE: ADAMS,2017.

4.4. ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. mikanianum*(Kunth) Steud. FOLHAS SECAS E FRESCAS

Nas análises em CG-EM dos OE das folhas secas e frescas de *P. mikanianum*, obteve-se um cromatograma de cada análise, e a FIGURA 30 mostra o cromatograma do OE das folhas secas referente à estação do inverno.

A quantificação dos constituintes foi realizada com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo identificar 21 compostos presentes em óleos essenciais das folhas secas e frescas de *P. mikanianum*, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 12, onde está representada a média das análises em triplicata.

FIGURA 30. CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE *Piper mikanianum* NA ESTAÇÃO DO INVERNO.



Para os OE das folhas secas foi identificada 95% da composição dos óleos essenciais. A germacrona foi o composto majoritário em todas as estações, sendo o outono ($56,98\% \pm 1,13$) com a maior concentração dentre os demais compostos dos óleos, seguido pelo 4,6-dimetoxi-5vinil-1,2-benzodioxido, com $21,88\% \pm 1,06$ na estação do inverno e $19,87\% \pm 0,33$ na estação do outono.

Foi identificada 96% da composição dos óleos essenciais das folhas frescas de *P. mikanianum*. A germacrona foi o composto majoritário em três estações, sendo o inverno com a maior concentração ($61,65\% \pm 1,26$), seguido pelo 4,6-dimetoxi-5vinil-1,2-benzodioxido, ($18,68\% \pm 4,56$) e a elemicina ($7,64\% \pm 3,54$), os dois arilpropanoides também foram os majoritários nas estações da primavera e verão; e outono respectivamente.

TABELA 12. ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *Piper nigrum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

N°	IA¹	IA²	Composto identificado	PRIMAVERA				VERÃO				OUTONO				INVERNO			
				Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas	
				Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)	Média (%)	DP(±)
1	934	932	<i>α</i> -pineno	-	-	0,07	0,13	-	-	0,10	0,18	-	-	0,60	0,38	-	-	0,40	0,08
2	974	974	<i>β</i> -pineno	-	-	0,05	0,08	-	-	0,60	0,33	-	-	-	-	-	-	0,05	0,08
3	1030	1024	limoneno	-	-	0,56	0,08	-	-	-	-	-	-	0,40	0,38	-	-	0,21	0,06
4	1090	1086	terpinoleno	-	-	-	-	-	-	0,67	0,22	-	-	0,61	0,35	-	-	0,41	0,06
5	1390	1389	<i>β</i> -elemeno	1,63	2,01	0,24	0,06	0,40	0,15	0,22	0,19	0,38	0,12	0,24	0,23	0,33	0,07	0,12	0,11
6	1408	1408	(<i>Z</i>)- cariofileno	0,60	0,15	0,20	0,18	0,75	0,11	0,81	0,43	0,26	0,07	0,64	0,14	0,76	0,07	-	-
7	1411	1409	<i>α</i> -guiruneno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	0,09	-	-	0,35	0,09
8	1421	1417	(<i>E</i>)- cariofileno	0,79	0,08	0,57	0,07	1,22	0,14	1,24	0,27	0,54	0,10	0,59	0,06	1,04	0,05	1,80	0,23
9	1465	1465	ishwarano	3,51	0,74	2,50	0,36	5,78	0,98	5,19	1,54	3,53	0,67	2,24	1,79	3,42	0,20	0,13	0,12
10	1483	1484	germacrenolD	0,33	0,15	0,18	0,18	0,34	0,14	0,38	0,40	-	-	0,37	0,05	0,45	0,07	0,08	0,14
11	1496	1496	viridifloreno	-	-	-	-	0,29	2,41	-	-	0,30	0,05	-	-	-	-	-	-
12	1495	1496	valenceno	2,38	0,67	-	-	0,13	0,17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1499	1499	biciclogermacreno	7,89	6,18	0,68	0,18	1,30	0,32	2,54	1,30	0,82	0,26	1,89	0,48	2,19	0,28	0,55	0,02
14	1507	1508	germacreno A	-	-	0,18	0,16	-	-	0,31	0,32	-	-	0,24	0,21	-	-	0,22	0,06
15	1526	1526	<i>δ</i> -cardineno	0,43	0,04	0,10	0,09	0,29	5,46	0,27	0,30	-	-	0,23	0,21	-	-	-	-
16	1561	1555	elemicina	21,40	5,28	2,63	0,40	3,10	2,09	0,89	0,03	16,80	0,33	31,93	12,23	7,73	0,80	7,64	3,54
17	1578	1576	espatulenol	-	-	0,20	0,17	-	-	0,39	0,34	-	-	1,08	0,40	-	-	0,29	0,15
18	1656	1653	4,6-dimetoxi-5vinil-1,2-benzodioxido	17,43	2,67	33,56	1,55	19,87	2,41	33,53	2,62	13,07	0,54	7,21	3,68	21,88	1,06	18,68	4,56
19	1671	1661	allobimachalol	0,37	0,04	-	-	0,37	0,32	-	-	0,54	0,02	-	-	0,41	0,05	-	-
20	1694	1693	germacrona	34,35	5,28	48,61	4,02	50,73	5,46	38,37	5,18	56,98	1,13	28,82	16,37	44,74	3,43	61,65	1,26
21	1763	1759	ciclocolorenona	7,21	2,67	6,89	1,78	14,02	2,09	12,11	1,87	6,12	0,55	19,15	8,37	15,10	1,10	4,98	0,51
Classe de compostos				Primavera				Verão				Outono				Inverno			
Monoterpenos				Secas	0,00	Frescas	0,68	Secas	0,00	Frescas	1,37	Secas	0,00	Frescas	1,61	Secas	0,00	Frescas	1,07
Sesquiterpenos				17,56		4,66		10,5		10,96		5,83		6,49		8,17		3,26	
Sesquiterpenos oxigenados				41,63		55,70		55,11		50,86		63,94		49,05		60,45		66,92	
Arlpropanoides				39,13		36,19		22,97		34,43		29,87		39,14		29,61		26,33	
Total				98,32		97,23		88,58		97,62		99,64		96,29		98,23		97,57	

¹Índice de retenção calculado. ²Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,05%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários.

A FIGURA 31 mostra as estruturas dos compostos majoritários da estação do inverno e devido a concentração dos compostos majoritários, este óleo foi selecionado para avaliação nos testes *in vitro* com o fungo *B. cinerea*.

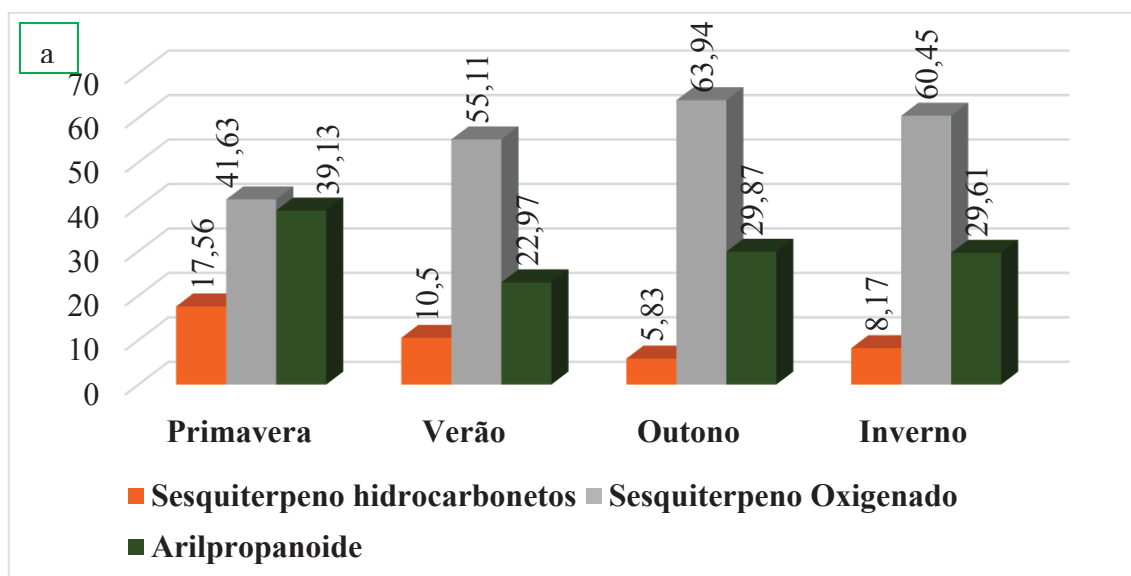
FIGURA 31.ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADO EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Piper mikanianum*.

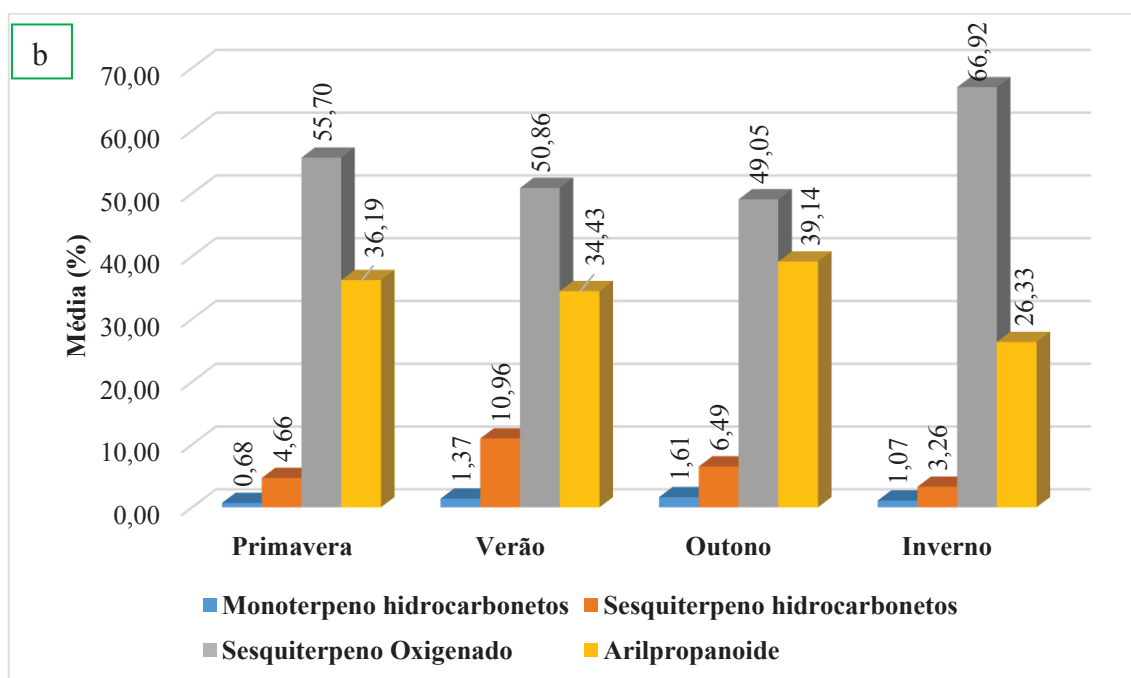


FONTE: ADAMS, 2017.

No gráfico (FIGURA 32) pode-se observar a distribuição da classe dos compostos nos OE das folhas secas e frescas nas estações do ano.

FIGURA 32. GRÁFICO DOS OE DAS FOLHAS SECAS (a) e FOLHAS FRESCAS (b) DE *P. mikanianum*– VARIAÇÃO DE CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO.



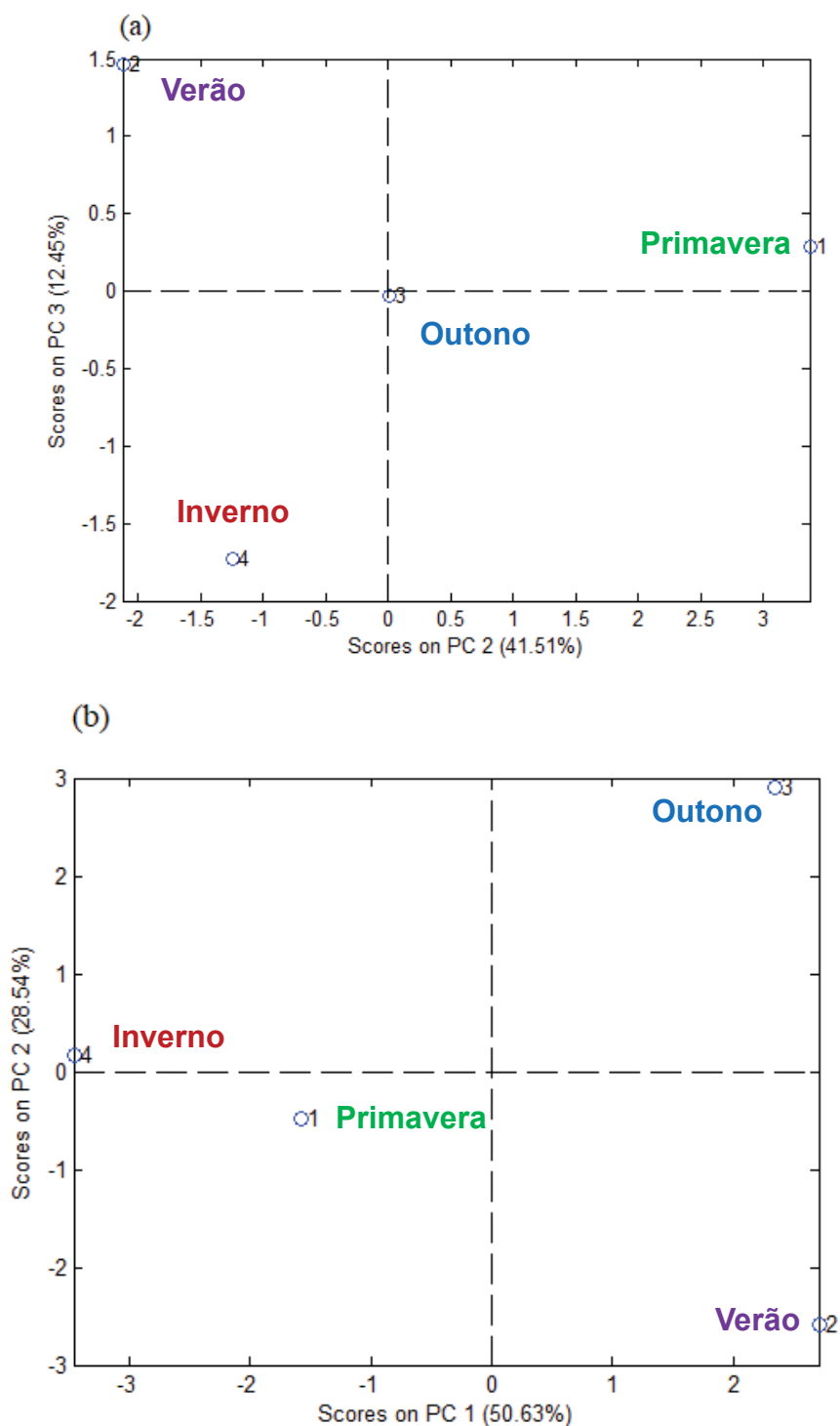


ABREU e colaboradores (2011) mostram em seu artigo que para *P. mikanianum* coletada no município de Itajai-SC, o composto majoritário na composição do óleo essencial das folhas secas é o safrol com cerca de 82% (ABREU et al., 2011). LEAL e colaboradores estudaram os OE das folhas de *P. mikanianum* coletadas em Curitiba-PR, OE não apresentou safrol em sua composição, o que corrobora com a composição dos óleos essenciais de *P. mikanianum* coletados em São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba (LEAL et al., 2005).

4.4.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE *P. mikanianum*

Para os resultados da constituição química dos óleos essenciais obtidos de *P. mikanianum*, 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* e os *loadings* obtidos, nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças óleos essenciais de cada uma das amostras de cada estação (FIGURA 33).

FIGURA 33. GRÁFICO DE SCORES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE *P. mikanianum*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).



No gráfico de *scores* (FIGURA 34) dos OE das folhas secas, observou-se que a Componente Principal 2 (PC2) explica 41,51% da variância dos dados e a Componente Principal 3 (PC3) explica 12,45% totalizando 53,96% da variância dos dados, que foram

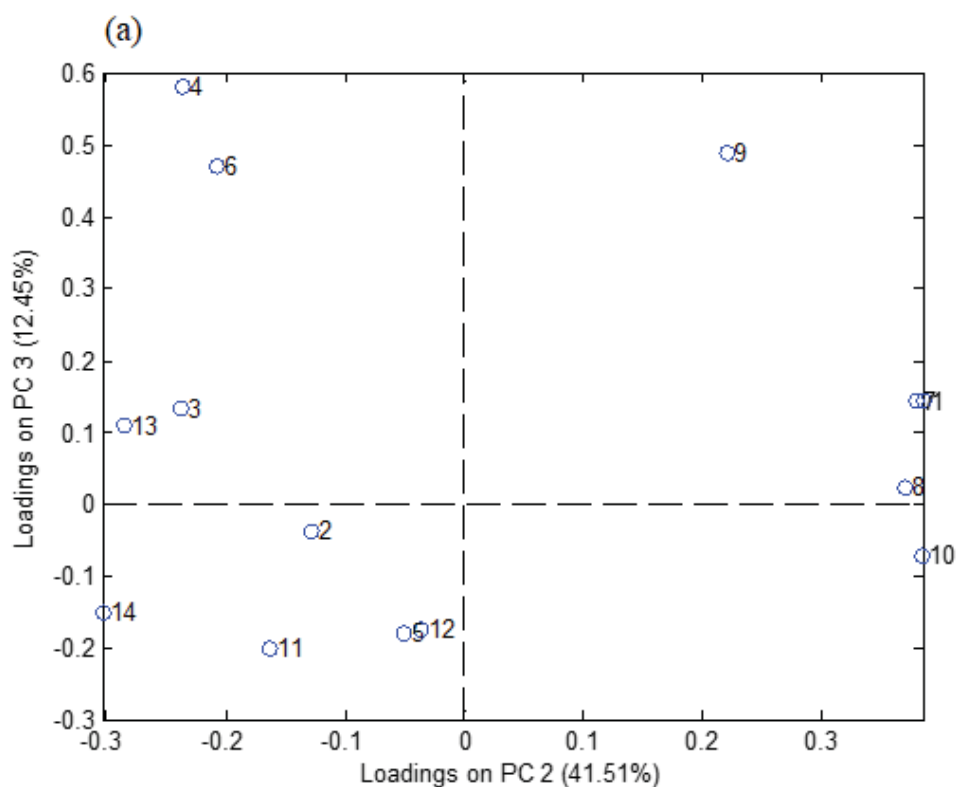
suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os óleos essenciais extraídos em amostras de diferentes estações do ano.

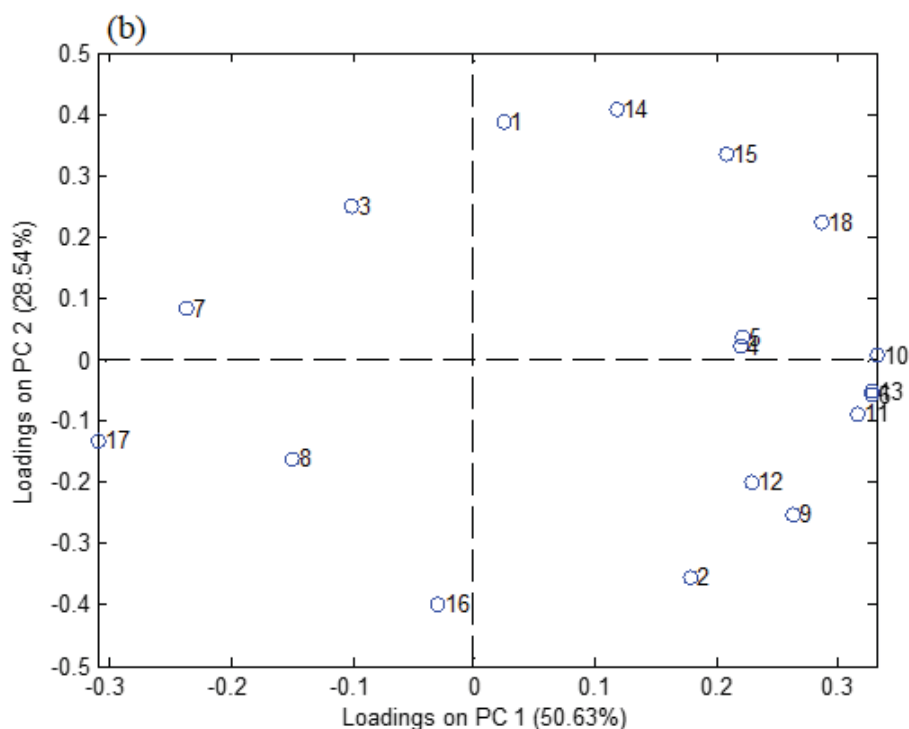
Pelo gráfico de *scores* pode-se observar que há distinção na composição dos OEs das folhas secas de *P. mikaninum* entre as estações, isso devido as estações estarem separadas, uma em cada quadrante, embora a estação do outono esteja no meio do gráfico.

Já para os OEs das folhas frescas, observou-se que a Componente Principal 1 (PC1) explica 50,63% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 28,54% totalizando 79,17% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os óleos essenciais extraídos em amostras de diferentes estações do ano, devido as suas componentes estarem cada uma em cada quadrante do gráfico.

Através do gráfico de *loadings* (FIGURA 34) foi possível verificar quais são os principais compostos responsáveis pela diferenciação entre as amostras de cada estação; já que os *loadings* representam o peso de cada composto na construção das componentes principais.

FIGURA 34. GRÁFICO DE *LOADINGS* CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS (a) E FOLHAS FRESCAS (b) DE *P. mikanianum*.



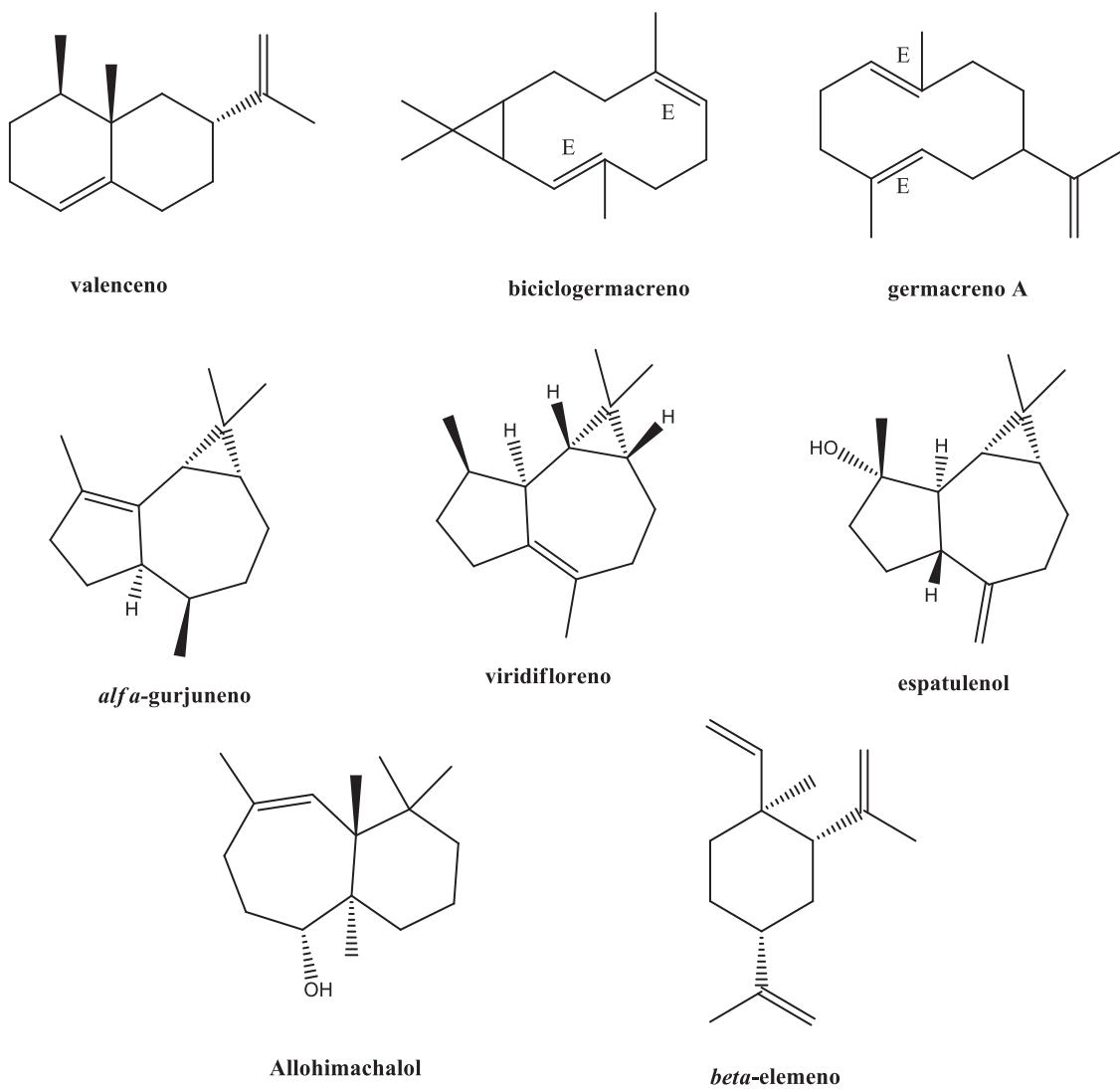


*tabelas com as atribuições das componentes de cada OE estão no anexo- página 100.

Pelo gráfico de *loadings* do OE das folhas secas pode-se observar que os compostos ishwarano (4) e viridifloreno (6) são os responsáveis pela diferenciação da estação do verão com as demais estações, devido a sua maior concentração nesta estação. Para a estação da primavera, os compostos responsáveis pela variação foram o β -elemeno (1), valenceno (7) e o biciclogermacreno (8), que apresentaram uma maior concentração nesta estação; e no outono tem-se o allo-himachalol (12) como responsável pela variação nesta estação. Compostos responsáveis pela variância dos dados dos OE das folhas secas e frescas de *P. mikanianum* estão representados na FIGURA 35.

Para a análise sazonal das folhas frescas, pode-se observar pelo gráfico de *loadings* que na estação do verão as componentes responsáveis pela diferenciação desta estação são o ishwarano e o germacreno A, pois ambos têm uma concentração maior nesta estação do que as demais. No outono observa-se um aumento significativo na produção do espatulenol e no inverno há a produção de α -gurjuneno, o qual só é encontrado nas estações do outono e inverno, e embora seu valor seja pequeno, este já é o suficiente para a diferenciação dos demais óleos.

FIGURA 35. ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE *P. mikanianum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.

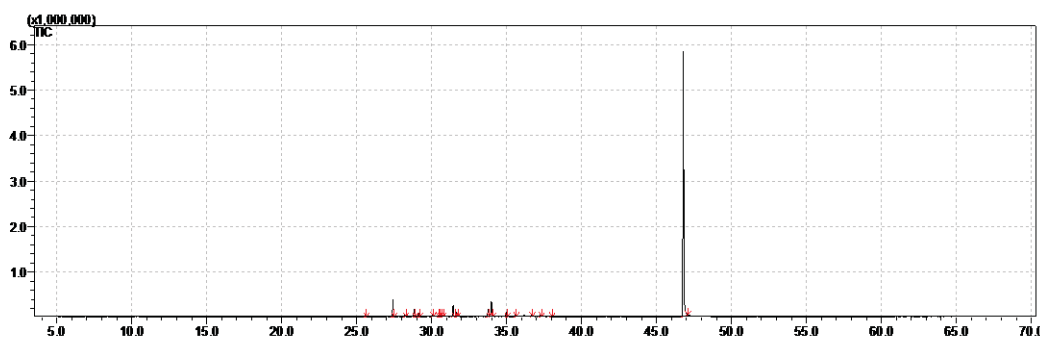


FONTE: ADAMS, 2017.

4.5 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P. mollicomum* FOLHAS SECAS E FRESCAS

A quantificação dos constituintes do óleo essencial das folhas frescas de *P. mollicomum* foi realizada com base na área dos picos em relação área total do cromatograma, permitindo-se identificar 26 compostos, nas diferentes estações do ano, conforme TABELA 13, onde está representada a média das análises em triplicata. O cromatograma da FIGURA 36 representa a análise do OE das folhas secas na estação verão.

FIGURA 36. CROMATOGRAMA DO OE DAS FOLHAS SECAS DE *P. mollicomum* NA ESTAÇÃO VERÃO.



Foi identificada 90% da composição dos óleos essenciais das folhas secas e 94% da composição das folhas frescas de *P. mollicomum*. O gibbilibol B [*p*-(3-decenil)-fenol] foi o composto majoritário na estação do verão ($68,01\% \pm 7,46$) com a maior concentração dentre os demais compostos dos óleos das folhas secas, em seguida o (*E*)-cariofileno aparece como composto majoritário nas estações inverno e primavera com ($16,58\% \pm 3,38$ e $16,20\% \pm 1,8$) respectivamente. O gibbilibol B foi o majoritário em todas as estações das folhas frescas, seguida do β -felandreno na estação do outono.

SANTOS e colaboradores relataram em 2001, que a composição da *P. mollicomum*, apresenta como majoritários o (*E*)-nerolidol (23,20%) e o (*E, E*)-farnesol (10,48%), sendo que apenas 65% do OE foi identificado, e que houve uma predominância de sesquiterpenos oxigenados e sesquiterpenos (SANTOS et al., 2001). Já em 2014 SOUZA e colaboradores identificaram 18 compostos nos OE das folhas frescas de *P. mollicomum* que foram cultivadas na FIOCRUZ do Rio de Janeiro- RJ, e que os majoritários foram, o (*E*)-ocimeno (14,07%), (*Z*)-ocimeno (14,14%), ambos monoterpenos, e o germacreno D (10,82%) e o germacreno B (13,39%), ambos sesquiterpenos (SOUZA et al., 2014).

TABELA 13. ÍNDICES ARITMÉTICOS E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *Piper mollicomum*, EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

N°	IA*	IA'	Composto	Primavera			Verão			Outono			Inverno						
				Secas		Frescas	Secas		Frescas	Secas		Frescas	Secas		Frescas				
				Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)				
1	932	932	α -pineno	0,82	0,41	0,35	0,32	0,07	0,09	1,93	0,52	0,29	0,01	0,85	0,46	0,42	0,51	0,38	0,35
2	969	961	verbeneno	-	-	0,57	0,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	972	974	β -pineno	1,25	0,37	0,48	0,45	0,05	0,07	3,6	0,9	0,24	0,03	1,15	1,12	0,68	0,7	0,72	0,66
4	987	988	mirceno	2,56	1,12	1,77	1,17	-	-	8,58	5,73	-	-	1,05	0,53	0,41	0,39	1,89	1,48
5	1005	1002	α -felandreno	-	-	-	-	-	-	0,6	0,32	-	-	0,57	0,26	-	-	0,22	0,19
6	1007	1008	3- δ -careno	14,43	4,28	7,27	11,08	0,05	0,07	-	-	0,04	0,06	6,11	7,53	1,89	2	2,89	2,23
7	1021	1020	<i>p</i> -cimeno	2,69	0,52	0,68	0,63	0,04	0,06	0,71	0,51	-	-	7,99	13,01	0,47	0,43	0,16	0,17
8	1025	1025	β-felandreno	10,55	2,59	1,19	1,66	0,07	0,1	10,43	6,14	-	-	1,73	0,99	1,90	1,49	3,37	2,61
9	1038	1032	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	-	-	-	-	-	-	0,43	0,33	-	-	0,83	0,85	-	-	0,07	0,13
10	1048	1044	(<i>E</i>)- β -ocimeno	-	-	-	-	-	-	2,79	0,87	-	-	1,80	1,34	-	-	1,4	1,22
11	1361	1369	ciclosativeno	0,35	0,02	-	-	0,07	0,1	-	-	0,12	0,02	-	-	0,21	0,18	-	-
12	1372	1374	α -copaeno	1,91	0,11	2,72	3,18	0,65	0,14	0,52	0,11	0,51	0,07	0,37	0,02	2,57	0,52	0,29	0,51
13	1405	1400	sibereo	0,22	0,07	-	-	0,05	0,06	-	-	1,03	0,14	-	-	0,16	0,14	-	-
14	1415	1417	(<i>E</i>)- cariofileno	16,2	1,80	1,66	1,96	4,34	0,37	7,12	1,91	3,29	0,45	3,66	0,11	16,58	3,38	4,18	1,59
15	1429	1430	β -copaeno	0,63	0,04	2,84	2,19	0,12	0,17	-	-	0,6	0,1	-	-	0,71	0,08	0,1	0,17
16	1439	1439	aromadendreno	2,11	0,22	0,81	0,44	0,7	0,16	0,63	0,15	0,85	0,16	0,6	0,06	1,80	0,24	0,59	0,13
17	1446	1449	espirolepechineno	0,05	0,07	-	-	0,11	0,16	-	-	0,36	0,05	-	-	0,29	0,25	-	-
18	1449	1452	α -humuleno	6,39	0,72	1,52	0,65	1,96	0,1	2,25	0,27	0,68	0,08	0,56	0,16	6,17	1,06	1	0,48
19	1457	1458	<i>allo</i> -aromadendreno	3,65	0,45	2,32	1,01	1,16	0,07	1,12	0,3	2,69	3,8	2,04	0,66	3,97	0,78	1,97	0,65
20	1458	1465	Ishwarano	1,59	0,22	-	-	-	-	-	-	3,41	4,82	-	-	1,28	0,38	-	-
21	1472	1478	γ -muuroleno	0,34	0,08	-	-	0,18	0,25	-	-	0,48	0,02	-	-	0,45	0,4	-	-
22	1477	1484	germacreno D	0,19	0,02	-	-	0,05	0,08	-	-	0,54	-	-	-	0,23	0,2	-	-
23	1480	1487	aristolocheno	-	-	0,71	0,96	0,83	0,13	-	-	0,37	0,01	-	-	2,12	0,35	-	-
24	1482	1489	β -selineno	0,56	0,05	-	-	0,18	0,26	-	-	0,45	0,02	-	-	0,8	0,04	-	-
25	1491	1492	<i>cis</i> - β -guaieno	1,37	0,12	-	-	0,82	0,28	-	-	2,09	0,11	-	-	4,81	3,75	-	-
26	1497	1496	viridifloreno	-	-	1,15	0,88	-	-	1,8	0,98	-	-	1,25	0,66	-	-	1,45	0,68
27	1495	1500	biciclogermacreno	2,72	0,51	-	-	0,36	0,03	-	-	2,32	0,11	-	-	2,41	2,1	-	-
28	1496	1500	α -muuroleno	0,77	0,12	0,34	0,3	0,42	0,03	-	-	2,27	0,09	-	-	1,1	0,01	0,36	0,17
29	1499	1502	<i>trans</i> - β -guaieno	0,74	0,07	-	-	0,08	0,11	0,18	0,16	0,1	0,01	-	-	0,54	0,04	-	-
30	1509	1505	(<i>E</i>)-(<i>E</i>)- α -farneseno	-	-	2,1	3,4	-	-	0,57	0,5	-	-	0,87	0,48	-	-	0,56	0,25
31	1510	1512	γ -cadineno	0,78	0,13	-	-	0,2	0,28	-	-	1,67	-	-	-	1,24	0,2	-	-
32	1514	1520	7- <i>epi</i> - α -selineno	0,18	0,01	-	-	3,06	0,08	-	-	1,04	0,01	-	-	7,19	1,55	-	-
33	1519	1517	miristicina	1,02	0,09	-	-	1,32	0,14	-	-	4,54	0,13	-	-	4,59	0,81	-	-
34	1523	1522	δ -cadineno	-	-	-	-	-	-	0,56	0,06	-	-	0,42	0,01	-	-	-	-
35	1539	1544	α -calacoreno	0,24	0,03	-	-	0,09	0,13	-	-	1,09	0,07	-	-	0,18	0,15	-	-
36	1574	1577	espatulenol	2,09	0,24	1,43	1,96	2,19	0,04	1,23	0,54	1,36	1,78	-	-	4,03	3,71	-	-

Primavera										Verão						Outono						Inverno					
Nº	IA*	IA¹	Composto	Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas					
				Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)	Média %	DP(±)				
37	1579	1590	globulol	3,84	0,72	-	-	5,10	0,01	1,16	0,94	1,36	1,48	-	-	6,04	0,08	-	-	6,04	0,08	-	-				
38	1588	1592	viridiflorol	0,39	0,11	-	-	0,14	0,19	-	-	1,00	1,41	-	-	0,98	0,08	-	-	0,98	0,08	-	-				
39	1590	1595	cubeban-11-ol	0,27	0,05	-	-	0,08	0,12	-	-	8,32	0,16	-	-	0,24	0,21	-	-	0,24	0,21	-	-				
40	1596	1600	guaíol	0,31	0,27	-	-	-	-	-	-	2,67	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
41	1599	1602	ledol	0,52	0,14	-	-	0,17	0,24	-	-	0,41	0,01	-	-	0,67	0,58	-	-	0,67	0,58	-	-				
42	1602	1608	epóxido de humuleno II	0,11	0,05	-	-	0,63	0,89	-	-	25,47	3,82	-	-	0,11	0,09	-	-	0,11	0,09	-	-				
43	1618	1630	γ-eudesmol	0,37	0,1	-	-	0,49	0,3	-	-	0,76	0,05	-	-	0,37	0,32	-	-	0,37	0,32	-	-				
44	1634	1640	epi-α-cardinol	0,25	0,04	-	-	0,13	0,18	-	-	1,61	0,01	-	-	0,56	0,49	-	-	0,56	0,49	-	-				
45	1637	1644	α-murolol (=torreyol)	0,93	0,2	-	-	0,42	0,6	-	-	3,5	0,18	-	-	1,50	0,39	-	-	1,50	0,39	-	-				
46	1651	1652	α-cardinol	0,92	0,2	-	-	0,91	0,24	-	-	3,01	0,12	-	-	1,18	1,03	-	-	1,18	1,03	-	-				
47	1664	1668	14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	0,19	0,02	-	-	0,21	0,3	-	-	0,09	0,13	-	-	0,07	0,06	-	-	0,07	0,06	-	-				
48	1686	1675	cadaleno	0,17	0,03	-	-	0,50	0,12	-	-	-	-	-	-	0,34	0,29	-	-	0,34	0,29	-	-				
49	1971	-	gibbimbol B [#]	7,10	2,74	65,28	24,84	68,01	7,46	49,34	12,62	-	-	62,91	5,52	9,96	2,53	75,58	13,97	-	-	-	-				

Classe de compostos	Primavera				Verão				Outono				Inverno			
	Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas		Secas		Frescas	
Monoterpenos	32,3		12,31		0,28		29,08		0,57		22,09		5,77		11,1	
Sesquiterpenos	41,16		16,17		15,93		15,91		25,96		9,77		55,15		10,51	
Sesquiterpenos Oxigenados	10,19		1,43		10,47		2,39		49,56		-		15,75		-	
Arilpropanoide	1,02		-		1,32		-		4,54		-		4,59		-	
Alquil fenol	7,1		65,28		68,01		49,34		-		62,91		9,96		75,58	
Total	91,62		95,19		91,33		96,72		99,86		94,77		91,23		97,19	

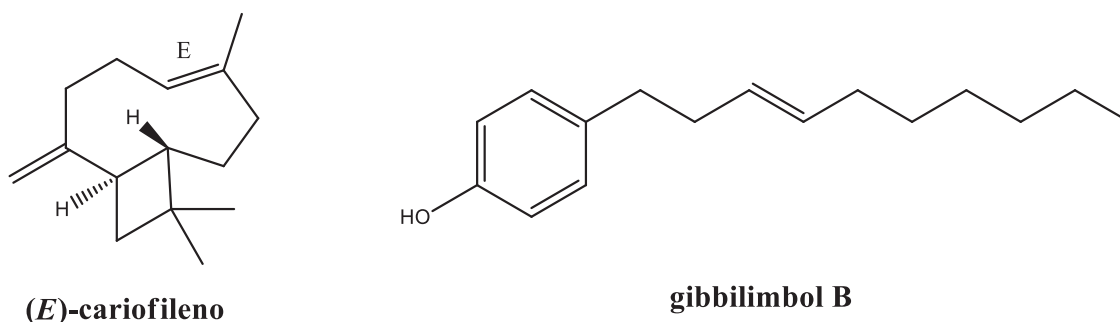
¹Índice de retenção calculado. ²Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2017). DP - Desvio padrão. # composto elucidado via experimentos de RMN. Compostos não detectados ou em traço (concentração <0,01%) são representados por (-). São destacados em negrito os compostos majoritários

Comparando a composição dos OEs de *P. mollicomum* descritos na literatura e a composição dos OEs de *P. mollicomum* deste trabalho, nota-se uma grande diferença entre a composição dos OEs, principalmente nos majoritários, mas isso se deve 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 dos OEs de mesma espécie (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A literatura relata a atividade antiprotozoária do gibbilibol B ao protozoário *Trypanosoma cruzi*, com um EC_{50} de 17,49 $\mu\text{g} / \text{mL}$, que foi cerca de 10 vezes mais eficaz do que o medicamento padrão benzonidazol (EC_{50} de 187 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (OLIVEIRA et al., 2012). Apresenta também a atividade antibacteriana dos gibbilibol (A-D), frente a *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus* (ORJALA et al., 1998).

A FIGURA 37 mostra a estrutura dos compostos majoritários da estação do verão, e este óleo foi selecionado para avaliação dos testes com o fungo *B. cinerea* devido a concentração dos compostos majoritários.

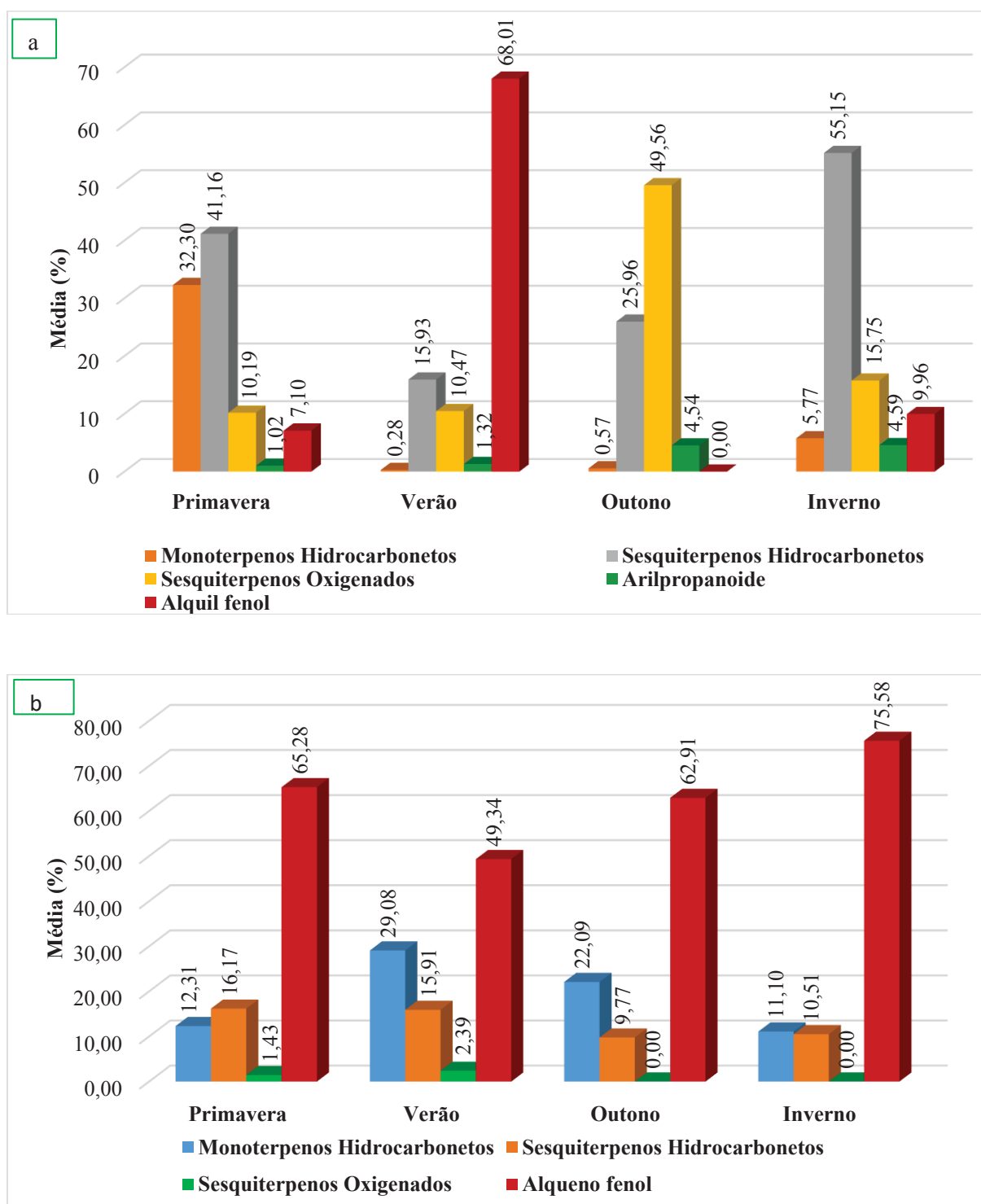
FIGURA 37. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ENCONTRADOS EM ÓLEOS ESSENCIAL DE FOLHAS DE *Piper mollicomum*.



FONTE: ADAMS, 2017; ORJALA; MIAN&STICHER, 1998.

No gráfico (FIGURA 38) pode-se observar a distribuição da classe dos compostos nos OE das folhas secas e frescas nas estações do ano.

FIGURA 38. GRÁFICO DOS OE DAS FOLHAS SECAS (a) E FRESCAS (b) DE *P. mollicomum*– CLASSE DE COMPOSTOS POR ESTAÇÃO POR ESTAÇÃO.



Pelo gráfico observou-se que os sesquiterpenos são predominantes nas estações da primavera e do inverno para o OE de folhas secas, e na estação do outono há a predominância de sesquiterpenos oxigenados. No verão houve a predominância do alqueno fenol e isso se deu pela concentração de gibilimbol B nesta estação estar em cerca de $(68,01\% \pm 7,46)$. Nos OE

das folhas frescas, observa-se que o alqueno fenol é o composto majoritário em todas as estações com concentrações acima de 45% da composição o OE.

No verão observa-se que nos OEs das folhas frescas há um aumento na produção de monoterpenos, nesta estação há um aumento da incidência luminosa e aumento da temperatura. Os monoterpenos promovem ação fotoprotetora, antioxidante e termoprotetora, e, o aumento da produção desses compostos durante o verão pode estar relacionado aos fatores desta estação (LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003).

Como não foi possível identificar o gibbilimbol B pelo IA e comparação na base de espectros de massas, a estrutura do gibbilimbol B, foi confirmada com técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Essa estrutura já foi descrita na literatura, e apenas identificado nos óleos dos frutos e no extrato de EP das folhas de *Piper gibbilimum* (RALI, et al., 2007) e nos extratos de *Piper melacophilum* (OLIVEIRA et al., 2012).

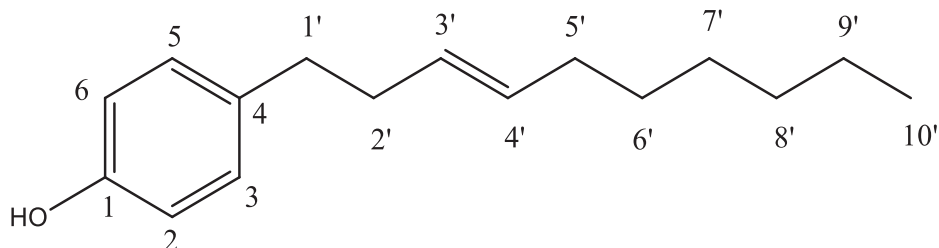
Os resultados obtidos nas análises de RMN de ^1H , e ^{13}C , estão descritos na TABELA 14, juntamente com os dados da literatura.

TABELA 14. DADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C PARA O COMPOSTO MAJORITÁRIO DE *P. mollicomum*.

Composto Majoritário de <i>P. mollicomum</i>				gibbilimbol B*		
Posição	^{13}C (δ) ^a	^1H (δ) ^b	mult. J em Hz	^{13}C (δ)a	^1H (δ)	mult. J em Hz
1	153,63	-	-	153,40	-	-
2,6	115,04	6,744	8,64 (<i>d</i> ; 2H)	115,00	6,75	8,4 (<i>d</i> ; 2H)
3,5	129,32	7,04	8,65 (<i>d</i> ; 2H)	129,50	7,05	8,4 (<i>d</i> ; 2H)
6	134,36	-	-	134,90	-	-
1'	35,25	2,591	7,63 (<i>t</i> ; 1H)	34,40	2,6	7,8 (<i>t</i> ; 1H)
2'	31,75	2,258	(<i>m</i> ; 1H)	31,60	2,27	(<i>m</i> ; 1H)
3'	32,57	5,417		32,30	5,43	
4'	129,50	5,417		129,80	5,43	
5'	131,14	1,96	(<i>m</i> ; 1H)	131,00	1,98	(<i>m</i> ; 1H)
6'	34,69	1,268		32,60	1,27	
7'	29,53	1,268		29,30	1,27	
8'	29,80	1,268		31,80	1,27	
9'	22,64	1,268		22,60	1,27	
10'	14,10	0,88	6,97 (<i>t</i> ; 1H)	14,10	0,89,	6,7 (<i>t</i> ; 1H)
OH		nd			nd	

^a Experimento realizado em 50MHz para ^{13}C em CDCl_3 . ^b Experimento realizado em 200 MHz para ^1H . *ORJALA, MIANe STICHER, 1998.

FIGURA 39. ESTRUTURA DO GIBBILIMBOL B.



Através dos dados de RMN ^1H (FIGURA 40) foi possível verificar a presença de dois dupletos, cada um com integração para dois hidrogênios em: δ 7,0 e δ 6,73 ppm com constantes de acoplamento de 8,7 Hz referentes ao acoplamento *orto* do anel aromático *para* substituído. O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 41) apresentam sinais referentes a seis átomos de carbono do anel aromático sendo dois átomos de carbono quaternários dentre eles, apenas um é oxigenado. A ligação dupla foi observada pelo multipletto com integração para dois hidrogênios em δ 5,4 ppm onde há uma sobreposição dos sinais, não sendo possível definir suas constantes de acoplamento. Esses hidrogênios fazem correlações com os átomos de carbono em δ 131,2 e δ 129,3 ppm, de acordo com o mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (FIGURA 42). Pelo mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância observa-se o hidrogênio em δ 2,48 ppm com correlações a três ligações com os átomos de carbono em δ 131,2 ppm e δ 129,4 ppm, evidenciando estar ligado no C-7 (FIGURA 43, 44, 45). Multipletto no RMN ^1H em δ 1,25 ppm com integração para dez hidrogênios, indica uma sobreposição de sinais nesta região, confirmado pela análise do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C que correlaciona com quatro átomos de carbono.

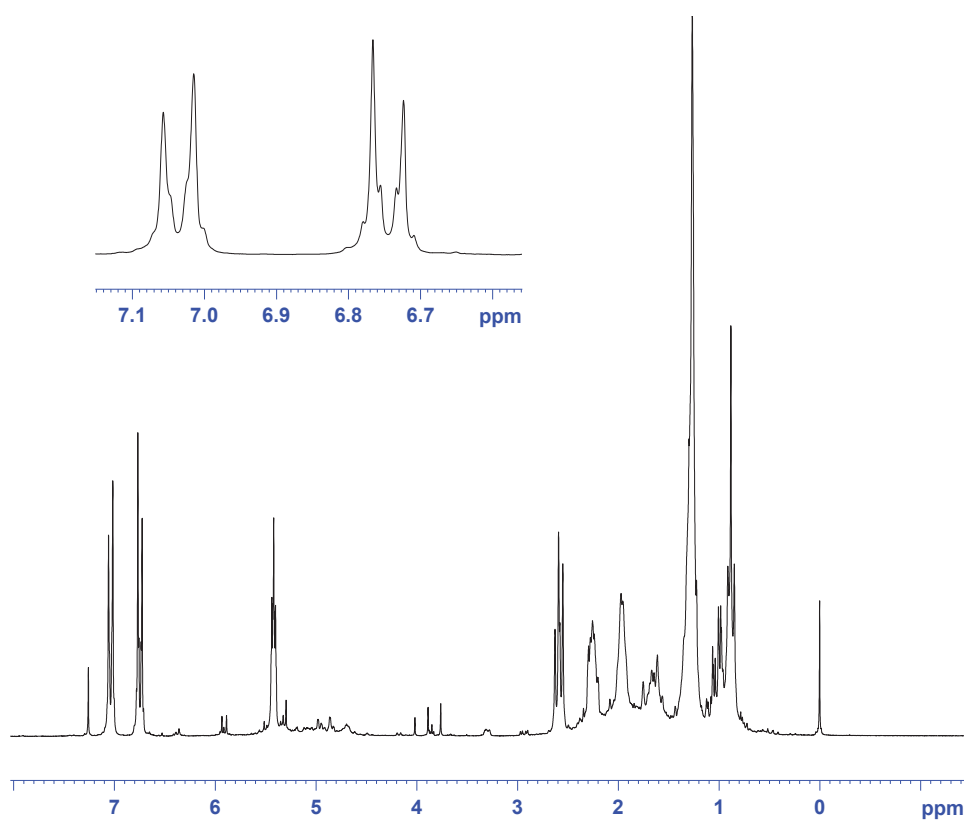
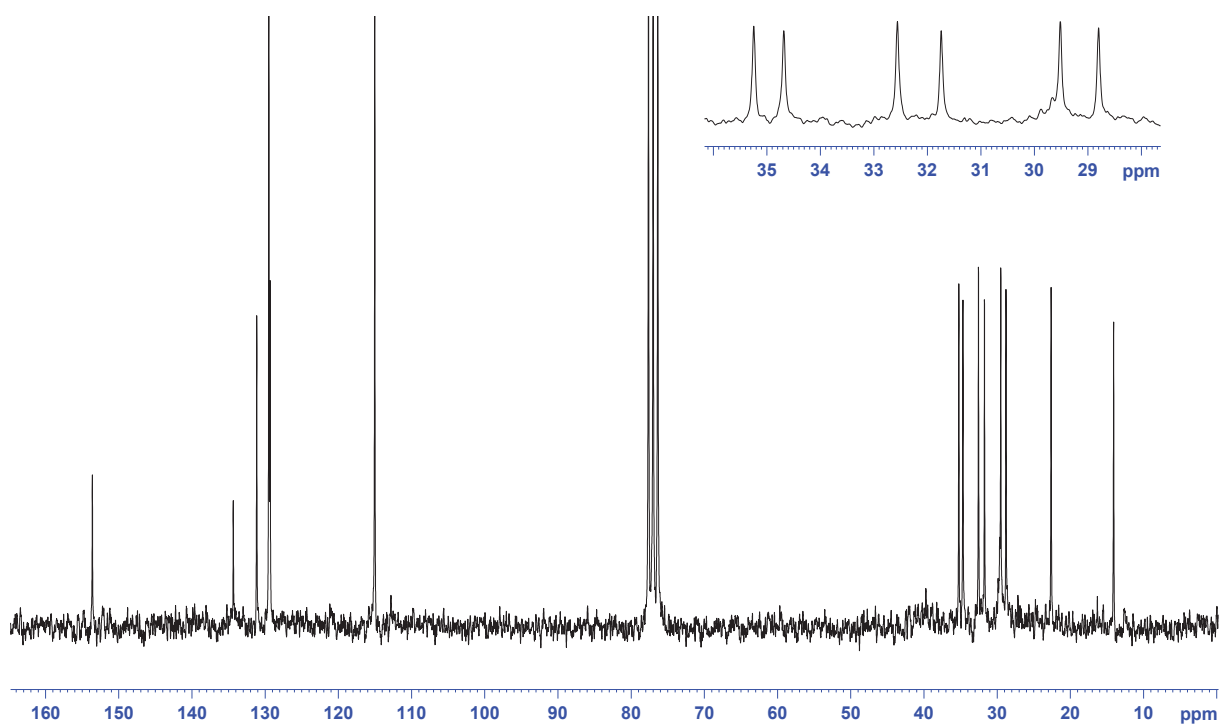
FIGURA 40. ESPECTRO DE RMN ^1H DO GIBBILIMBOL B (200 MHz, CDCl_3).FIGURA 41. ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO GIBBILIMBOL B (50 MHz, CDCl_3).

FIGURA 42. MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C EXPANDIDO, PROVENIENTE DO EXPERIMENTO DE HSQC (400 MHz, CDCl_3) DO ÓLEO DE *P. mollicomum*.

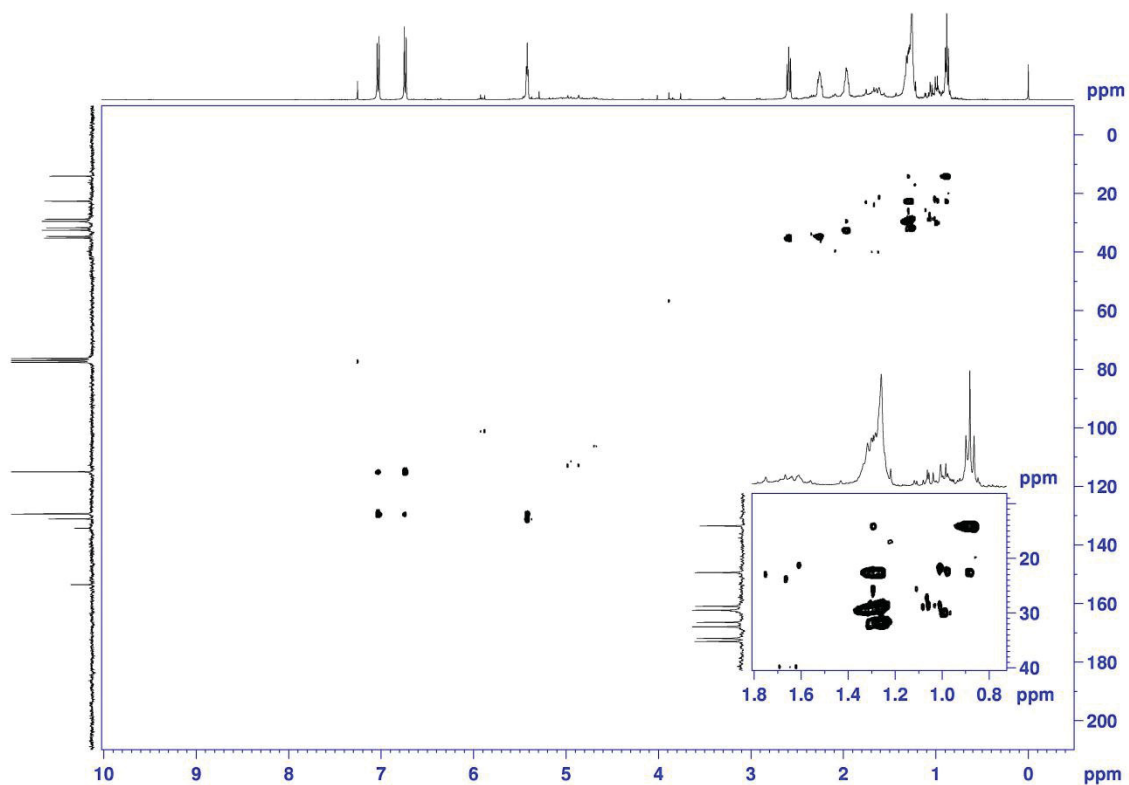


FIGURA 43. MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C , PROVENIENTE NO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DO ÓLEO DE *P. mollicomum*.

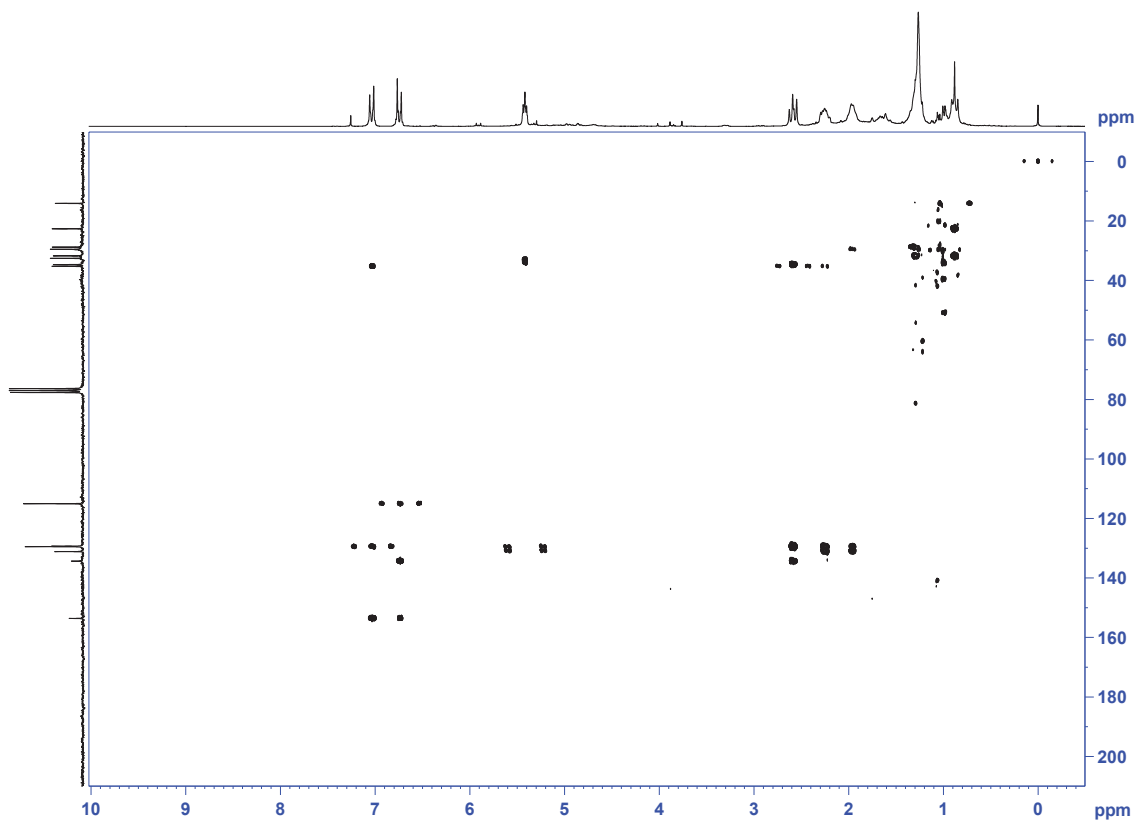


FIGURA 44. MAPA DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA ^1H - ^{13}C EXPANDIDO, PROVENIENTE NO EXPERIMENTO DE HMBC (400 MHz, CDCl_3) DO ÓLEO DE *P. mollicomum*.

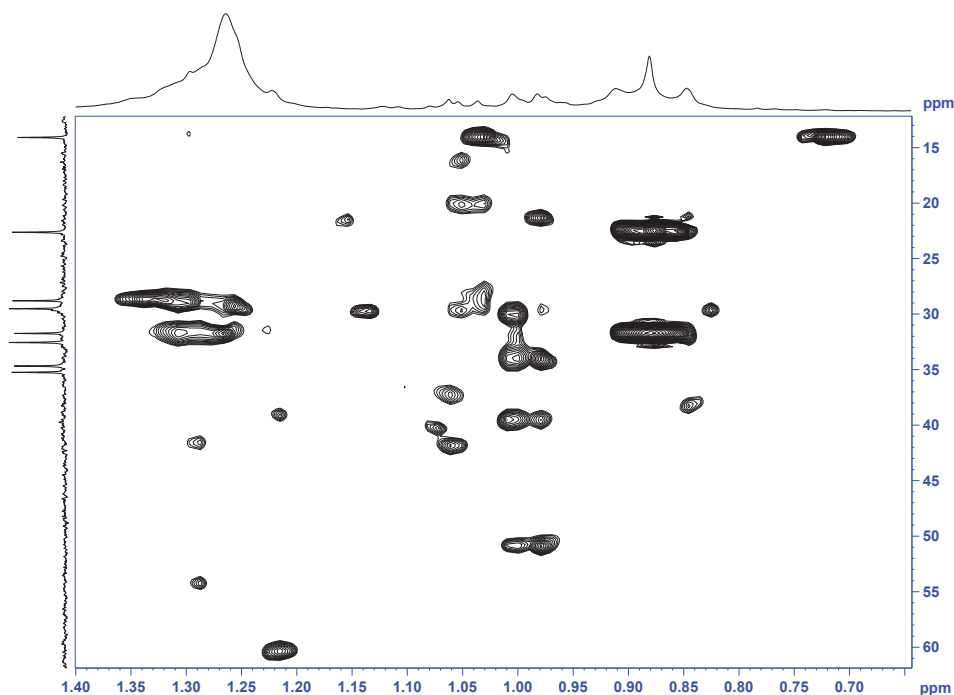
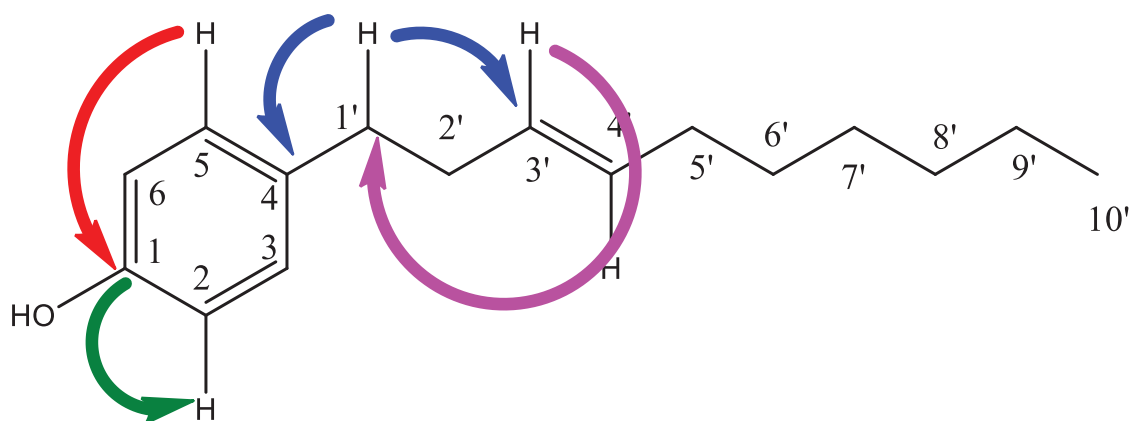


FIGURA 45. ESTRUTURA DO GIBBILIMBOL B E AS PRINCIPAIS CORRELAÇÕES DE ACORDO COM O EXPERIMENTO DE HMBC ^1H - ^{13}C .



A sua fórmula molecular foi confirmada pelo espectro de massas, no qual foi observado o pico molecular em m/z 232 calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}$ e o pico base em m/z 107 referente a perda da cadeia carbônica lateral (C_9H_{17}) gerando um cátion benzílico que se rearranja para o íon tropílio substituído (FIGURA 46). A FIGURA 47 mostra a proposta de fragmentação do gibbilimbol B.

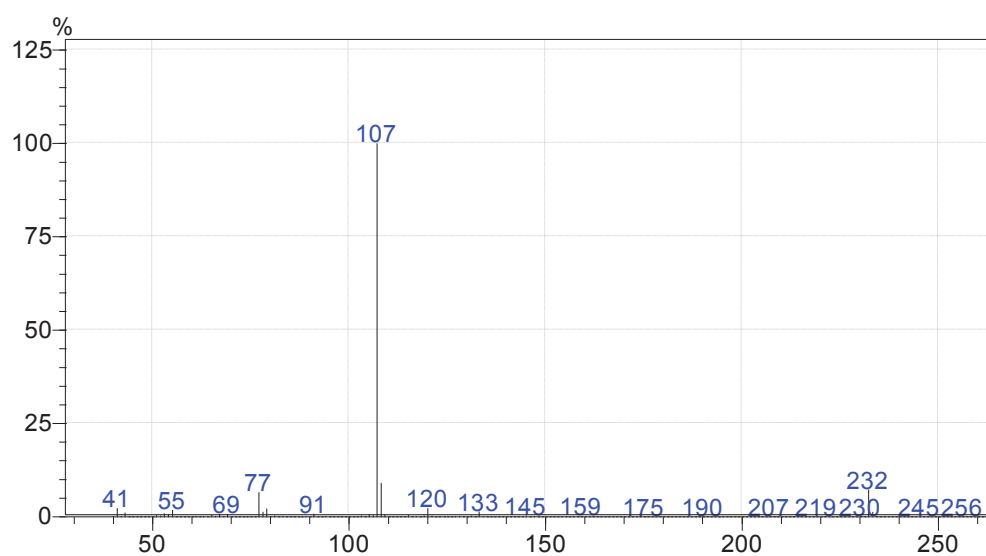
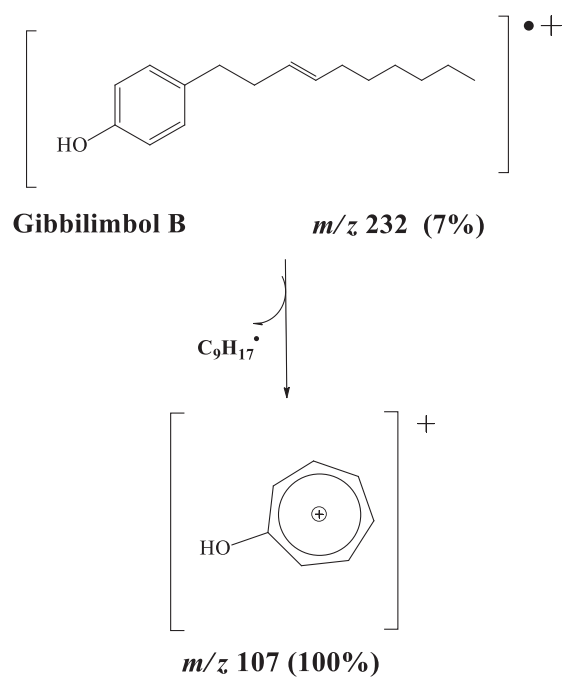
FIGURA 46. ESPECTRO DE MASSAS DO GIBBILIMBOL B DO OE DE *P. mollicomum*.

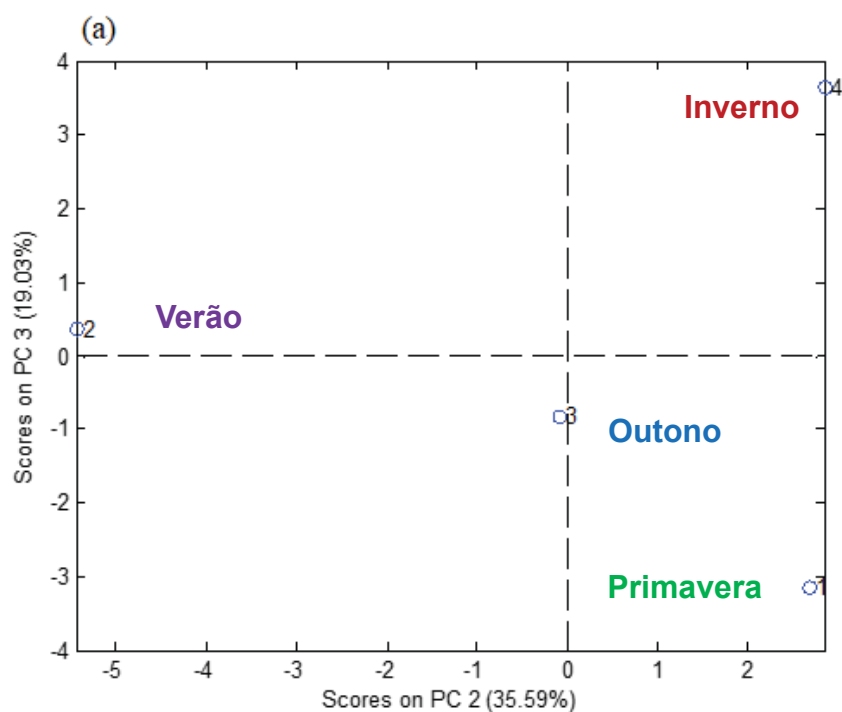
FIGURA 47. PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DO GIBBILIMBOL B.

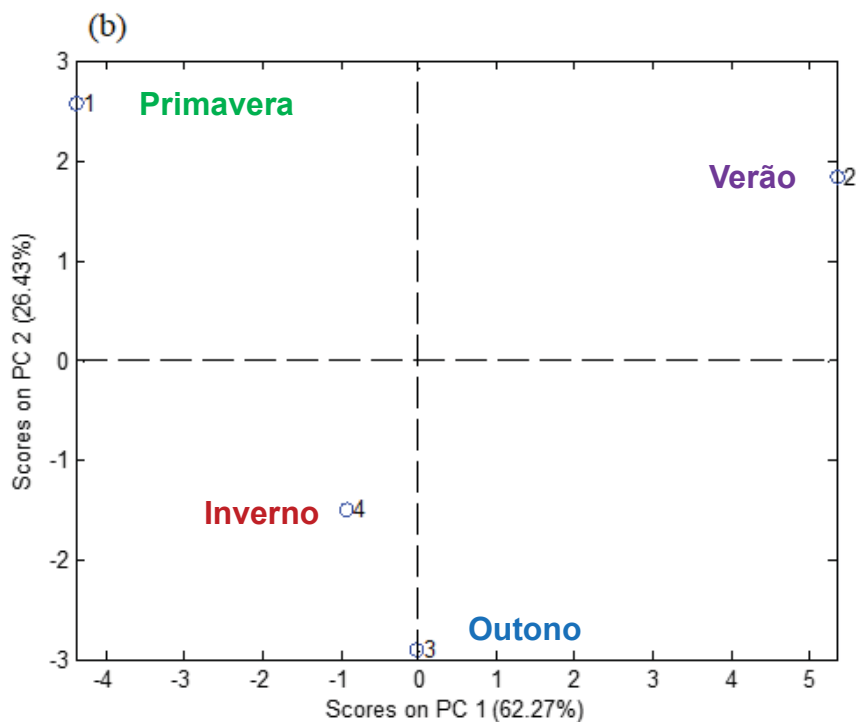


4.4.1 AVALIAÇÃO SAZONAL DOS OE DE *P. mollicomum*

Para os resultados da constituição química dos óleos essenciais obtidos de *P. mollicomum*, 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* e os *loadings* obtidos, nos quais foram consideradas as médias de cada estação, para, simultaneamente, avaliar as diferenças nos óleos essenciais de cada uma das amostras de cada estação. A FIGURA 48 apresenta o gráfico de *scores*.

FIGURA 48. GRÁFICO DE *SCORES* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE FOLHAS SECAS (A) E FRESCAS (B) DE *P. mollicomum*. (PRIMAVERA=1, VERÃO=1, OUTONO=3 E INVERNO=4).

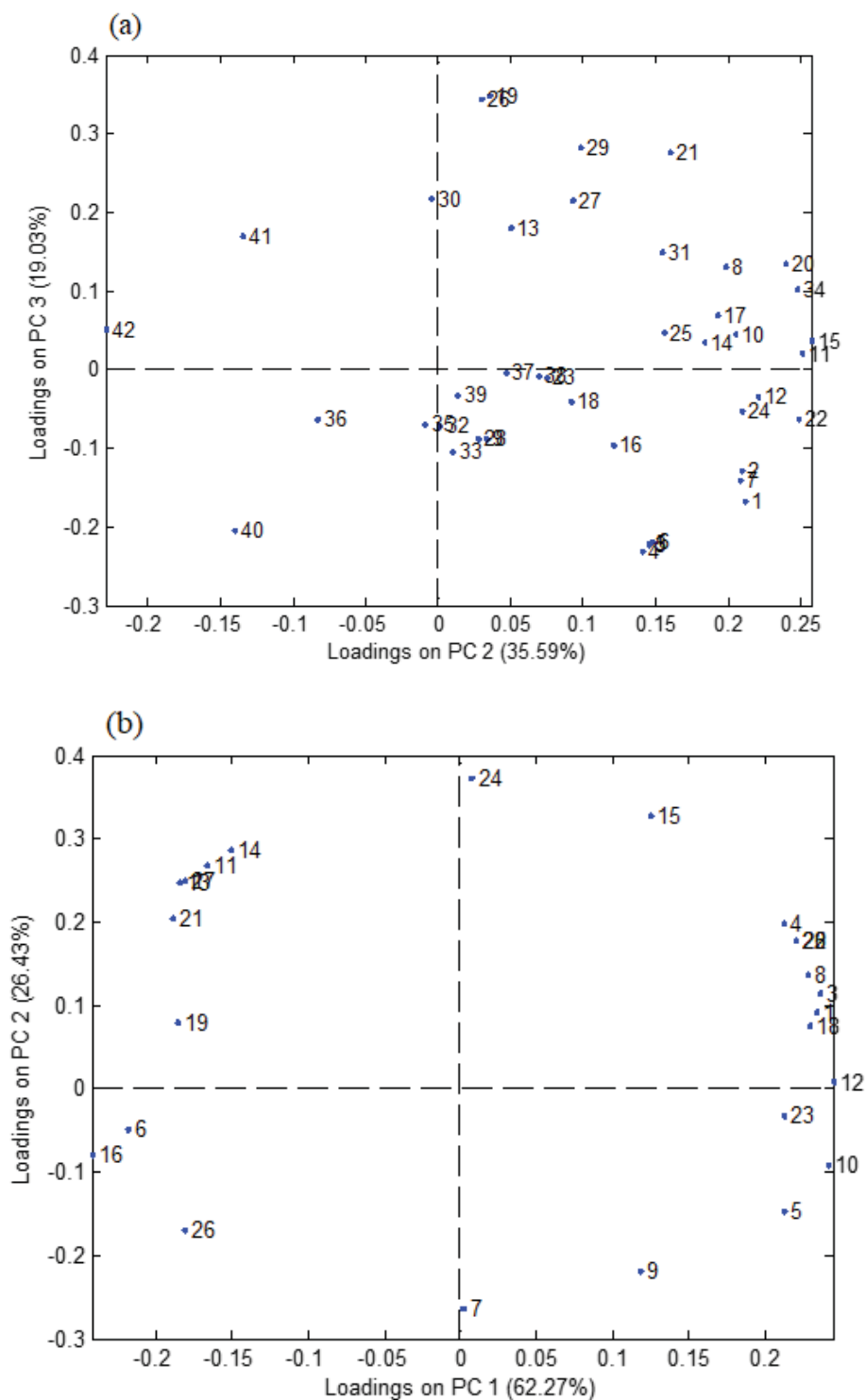




No gráfico de *scores* dos OE das folhas secas, observou-se que a Componente Principal 2 (PC2) explica 35,59% da variância dos dados e a Componente Principal 3 (PC3) explica 19,03% totalizando 54,62% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os óleos essenciais extraídos em amostras de diferentes estações do ano, devido as suas componentes estarem cada uma em um quadrante do gráfico (FIGURA 49).

Já para os OEs das folhas frescas, o gráfico de *scores* mostrou que a Componente Principal 1 (PC1) explica 62,27% da variância dos dados e a Componente Principal 2 (PC2) explica 26,43% totalizando 88,70% da variância dos dados, que foram suficientes para evidenciar as diferenças de composição entre os óleos essenciais extraídos em amostras de diferentes estações do ano. Pelo gráfico de *scores* pode se ver que há distinção na composição dos OEs das folhas frescas de *P. mollicomum* entre as estações, isso devido as estações estarem separadas, uma em cada quadrante, embora a estação do outono e do inverno estejam próximas, o que evidencia uma similaridade na sua composição (FIGURA 48). Através do gráfico de *loadings* é possível verificar quais são os principais compostos responsáveis pela diferenciação entre as amostras de cada estação, já que os *loadings* representam o peso de cada composto na construção das componentes principais (FIGURA 49).

FIGURA 49. GRÁFICO DE *LOADINGS* CORRESPONDENTE À SAZONALIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS SECAS (A) E FOLHAS FRESCAS (B) *DEP. mollicomum*.



*tabelas com as atribuições das componentes de cada OE estão no anexo- página 101.

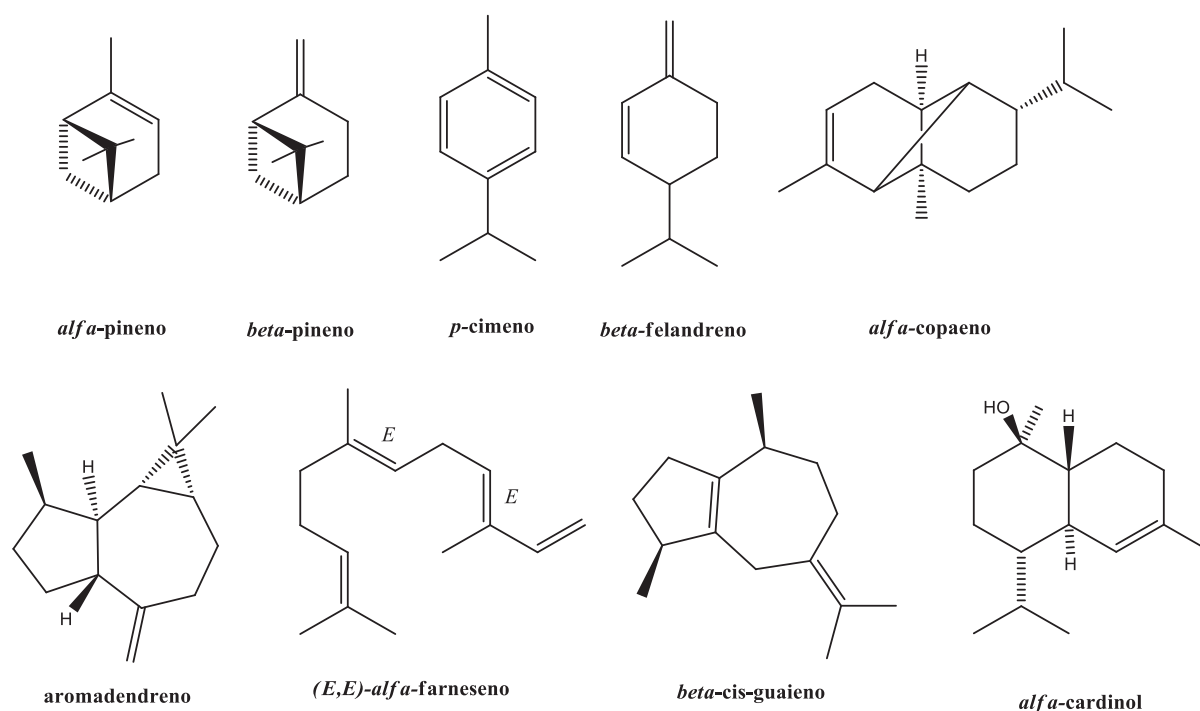
Pelo gráfico de *loadings* do OE das folhas secas podemos observar que os compostos α -pineno, β -pineno (2) e ciclosativeno (7) são responsáveis pela diferença da composição do O.

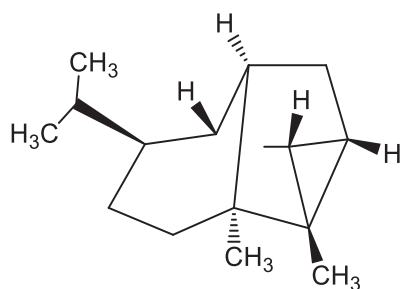
E. na estação da primavera, se comparado com as demais estações, devido a sua maior concentração nesta estação. E para a estação do verão, os compostos responsáveis pela variação foram o gibbilibol B (42), que apresentou uma maior concentração nesta estação com $68,01\% \pm 7,46$; e no outono tem-se como responsável o epóxido de humuleno II (35), guaiol (33) e o α -calacoreno (28), que são sesquiterpenos oxigenados e responsáveis pela variância nesta estação.

Pelo gráfico de *loadings* do OE das folhas frescas podemos observar que os compostos α -copaeno (11), aromadendreno (14) e (*E,E*)- β -farneseno (21), são os responsáveis pela distribuição desta estação no gráfico de *scores*. E que no verão a componente mirceno (4) e a β -felandreno (8), ambos monoterpênicos, são os responsáveis pela diferenciação entre as estações, devido a esses compostos terem maior concentração nesta estação em relação às demais. E no outono houve um aumento na produção de *p*-cimeno (7) o que fez com que essa estação ficasse mais afastada das demais estações.

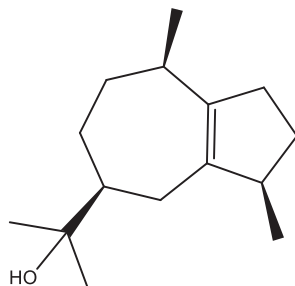
Compostos responsáveis pela variância dos dados dos OE das folhas secas e frescas de *P. mikanianum* estão representados na FIGURA 50.

FIGURA 50. ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS SECAS DE *P. mollicomum* DE CARACTERÍSTICA SAZONAL.

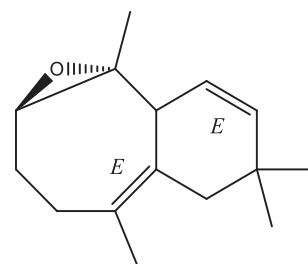




ciclosativeno



guaiaol



epóxido de humuleno II

FONTE: ADAMS, 2017.

4.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os OEs de *P. aduncum*, *P. caldense*, *P. amalago*, *P. mikanianum* e *P. mollicomum*, foram submetidos aos testes de atividade antifúngica. Os resultados da CIM (Concentração Inibitória Mínima) foram avaliados contra o fungo *Botrytis cinerea* de dois isolados distintos.

Para algumas espécies de *Piper* já há estudos do potencial antifúngico como o de *P. aduncum* relatado por Bastos & Albuquerque (2004) que o CIM para *Colletotricum musae* foi de 150 µg mL⁻¹.

4.6.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA O *B. cinerea*

A TABELA 15 faz um comparativo dos resultados de inibição do fungo pelos óleos essenciais das cinco espécies estudadas.

TABELA 15. COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO APÓS 96 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (BD + ÁGUA); E TESTEMUNHA [ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS].

		<i>P. aduncum</i>		<i>P.amalago</i>		<i>P.caldense</i>	
		DO	DP(±)	DO	DP(±)	DO	DP(±)
Controle Negativo	1 hora	0,060	0,005	0,062	0,004	0,058	0,003
	96 horas	0,066	0,003	0,065	0,005	0,059	0,004
Testemunha	1 hora	0,065	0,002	0,068	0,002	0,069	0,002
	96 horas	0,510	0,075	0,588	0,058	0,486	0,072
Valor do CIM	1 hora	0,071	0,002	0,124	0,010	0,061	0,001
	96 horas	0,085	0,009	0,084	0,003	0,066	0,002

CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		250	400	20	
		<i>P. mikanianum</i>		<i>P. mollicomum</i>	
		DO	DP($\pm$)	DO	DP($\pm$)
Controle Negativo	1 hora	0,060	0,004	0,058	0,005
	96 horas	0,067	0,004	0,057	0,003
Testemunha	1 hora	0,068	0,002	0,064	0,066
	96 horas	0,616	0,070	0,617	0,043
Valor do CIM	1 hora	0,060	0,001	0,299	0,018
	96 horas	0,067	0,005	0,304	0,010
CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		20		250	

*No ensaio, foram utilizadas três repetições. DO – densidade ótica. DP – desvio padrão

Observa-se que não houve alteração na medida de DO no controle negativo entre as duas medidas, como é esperado. Já para o controle positivo (testemunha), que serve para verificar a viabilidade do fungo, observa-se em todos os testes seu crescimento na leitura de 96 horas (aumento da DO). Os óleos essenciais de *P. mikanianum* e *P. caldense* apresentaram forte atividade contra o *B. cinerea*, com CIM de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os compostos majoritários são a germacrona e a miristicina, respectivamente.

Hoje o fungo *B. cinerea* é controlado por dois principais fungicidas, cujos princípios ativos são: proximidona na dose discriminatória de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (indicação do fabricante Sumilex®) e o mancozebe (Manzate®) na dose de controle de 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O mesmo teste realizado com os óleos essenciais foi feito utilizando os dois fungicidas para uma comparação da atividade. A TABELA 16 mostra os resultados desses testes.

TABELA 16. COMPARAÇÃO DA DENSIDADE ÓPTICA (DO) DO ENSAIO ANTIFÚNGICO COM CONTROLE DE FUNGICIDAS (CONTROLE POSITIVO) APÓS 96 HORAS USANDO: CONTROLE NEGATIVO (BD + ÁGUA); E TESTEMUNHA [ÁGUA + SOLUÇÃO DE SUSPENSÃO DE ESPOROS].

		Proximidona		Mancozebe	
		DO	DP($\pm$)	DO	DP($\pm$)
Controle Negativo	1 hora	0,060	0,003	0,060	0,003
	96 horas	0,059	0,004	0,059	0,004
Testemunha	1 hora	0,064	0,008	0,064	0,008
	96 horas	0,491	0,151	0,491	0,151
Valor do CIM	1 hora	0,082	0,005	0,106	0,013
	96 horas	0,224	0,029	0,099	0,009
CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		20*		40	

*Dose máxima utilizada no teste com o fungicida procimidona.

Pelo teste não foi possível definir um CIM para o fungicida proximidona (a dose de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ é uma dose extremamente elevada, levando em conta que este fungicida é sistêmico e sua dose máxima é de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Mas isso se deve provavelmente ao fato de que na propriedade em que o fungo foi coletado utiliza esse fungicida, e o fungo pode ter adquirido uma resistência ao proximidona, como é evidenciado no teste (GHINI&KIMATI, 2002). Já o mancozebe inibiu o crescimento do *B. cinerea* em 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que está de acordo com a dosagem recomendada pelo fabricante, que é de 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5. CONSIDERAÇÕES E CONCLUSÕES

A caracterização química do óleo essencial por CG-EM/EM revelou que dentre os óleos essenciais das vinte espécies de *Piper* analisados apenas cinco apresentaram compostos majoritários com concentração acima de trinta por cento da composição total do óleo essencial e apenas estas cinco espécies tiveram seus óleos essenciais estudados quimicamente em detalhes.

Os componentes majoritários nos óleos essenciais estudados foram, para *P. aduncum* a asaricina, miristicina e dilapiol; para *P. caldense*, a miristicina; para *P. amalago*, o 3- δ -careno e o ishwarano; para *P. mikanianuma* germacrona, 4,6-dimetoxi-5vinil-1,2-benzodioxido e a elemicina; e para *P. mollicomun* o gibbilimbol B.

O arilpropanoide miristicina é o composto majoritário em duas espécies de *Piper*, *P. aduncum* e *P. caldense*. É um composto promissor para atividade contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea* que ataca os morangos, pois existem relatos na literatura de arilpropanoides com atividade antifúngica (MAIA et al., 1998; ALMEIDA et al., 2009).

Pela análise sazonal dos OE, foi possível observar as diferenças nas composições dos OE de cada espécie tanto nas folhas secas como as frescas.

Para a espécie *P. mollicomum*, a análise do OE através da técnica de RMN ^1H e ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC, permitiu elucidar a estrutura do composto majoritário na estação do verão, o composto gibbilimbol B (*p*-(3-decenil)-fenol), o qual é a primeira vez que este composto é relatado nesta espécie.

Nos testes realizados com o fungo *in vitro* observou-se que os OE de *P. mikaninum* e *P. caldense* possuem um CIM de $20\ \mu\text{g mL}^{-1}$ para inibição dos esporos de *Botrytis cinerea*, em comparação ao fungicida comercial mancozebe ($40\mu\text{g mL}^{-1}$). Este resultado é excelente, tornando o OE dessas duas espécies promissores fungicidas comerciais.

Novos estudos serão realizados com os compostos majoritários de ambas espécies, para confirmação do composto responsável por essa atividade observada.

6. REFERÊNCIAS

ABREU, A. M.; SEVEGNANI, L.; MACHICADO, A. R.; ZIMERMANN, D.; REBELO, R. A. *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil—a New Source of Safrole. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 361-363, 2002.

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.

ANDRADE, P. F. S. Análise da Conjuntura Agropecuária- Safra 2016/17. **Secretária da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná**. Março de 2017.

ANTUNES, L. E. C. Brasil no pódio da produção de morangos. **Campo & Negócios**, Maio de 2018. <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.

BARA, M. T. F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica***. 1992. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3, n. 22, p. 441-443, 1997.

BASTOS, N. B.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle póscolheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 55-557, 2004.

BENCHIMOL, R. L.; FERNANDO, C. A.; LUZ, S. P.; DINALDO, R. T.; MULLER, C. H. Podridão do estirpe da pupunheira. In: Luz, E. D. M. N.; SANTOS, A. F.; MATSOUKA, K.;

BEZERRA, J. L. **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**, Editora Ruaral, campinas-SP, 2001, p. 608-628.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2008

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.

BROCHINI, C. B.; NUÑEZ, C. V.; MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CHAVES, M. H.; MARTINS, D. Identificação de componentes de óleos voláteis: Análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p 36- 40, 1999.

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.

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

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.

CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; BENATO, E. A. Introdução de resistência no manejo de doenças pós colheita. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Org.). Indução de resistência em plantas a patógenos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS, 3., 2007. Anais... Viçosa: UFV, 2007. v. 1, p. 245-268

CONNOLLY, J.D.; HILL, R.A. **Dictionary of Terpenoids**. London: Chapman and Hill, 1991.

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

DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products**. 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.

ELAD, H. et al. **Botrytis: Biology, Pathology and Control - BOTRYTIS SPP. AND DISEASES THEY CAUSE IN AGRICULTURAL SYSTEMS – AN INTRODUCTION**.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organisation Statistics Database. 2014. Produção mundial de pequenos frutos. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. Acessado em 29 de maio de 2018.

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.

FEHLBAUM, P. et al., Insect immunity. septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 52, p. 33159-33163, 1994.

FERRAZ, A. B. F.; BALBINO, J. M.; ZINI, C. A.; RIBEIRO, V. L.; BORDINGNON, S. A.; VON POSER, G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 243-248, 2010.

FERRIANI, A. P.; DESCHAMPS, C.; AMARAL, W.; SILVA, L.E. Propagation of three native Brazilian *Piper* species by cuttings with indole butyric acid, *Revista Colombiana de Ciências Hortícolas*, v. 12, n. 2, P. 492-500, 2018.

FIEIRA, C. et al., In Vitro and In Vivo antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 33, n. 1, p. 40-46, 2013

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf, acesso em 06 de agosto de 2018.

FRANZ, C. M. Essential oil: past, presente and future. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 112-113, 2010.

GAÍNZA, Y. A.; FANTATTO, R. R.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; ESTEVES, S. N.; CHAGAS, A. C. S. *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* isolates: cross resistance and the research of natural bioactive compounds. **The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 383-393, 2016.

GASPARETTO, A.; BELLA CRUZ, A.; WAGNER, T. M.; BONOMINI, T. J.; CORREA, R.; MALHEIROS, A. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from *Piper cernuum*. **Industrial Crops and Products**, 95:256-263, 2017.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 2 ed. EMBRAPA, Jaguariuna-SP, 78 p. 2002.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30, n. 2, p. 374-381., 2007.

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, A.G. et al. Productive potential of strawberry cultivars. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.37, n.1, 112-120, 2015.

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.

JALALI-HERAVI, M.; ZEKAVAT, B.; SERESHTI, H. Use of chromatography-mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian *cumin* and *caraway*. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 215 -226, 2007.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

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

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.

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

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.

LEAL, L. F.; MIGUEL, O. G.; SILVA, R. Z.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. S.; CHECHINEL-FILHO, V. Chemical Composition of *Piper mikanianum* Essential Oil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p. 316-317, 2005.

LEE, H. S.; JERONG, T. C.; KIM, J. H. In vitro and vivo metabolism of myristicin in the rat. **Journal of Chromatography B**, v. 705, p. 367-372, 1998.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: uma abordagem biossintética. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 47-97.

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

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 Agrobiochemistry) Federal University of Lavras, MG.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A. V. M. INFLUÊNCIA DOS FATORES ABIÓTICOS NA PRODUÇÃO E VIABILIDADE DE TERPENÓIDES EM PLANTAS. **FLORAM- Floresta e Ambiente**, v.10, n.2, p.71-77, 2003.

LOUIS, C. et al. Persistence of *Botrytis cinerea* in its vector *Drosophila melanogaster*. **Phytopathology** n.86, p. 934-939, 1996.

MAIA J.G.; ZOGHBI, M.G.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; DA-SILVA, M. H. L.; LUZ, A.I.R; BASTOS, C.N. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region, **Flavour Fragrance Journal**. n. 13, p. 269-272,1998.

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.

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.

MORITA, T.; JINNO, K.; KAWAGISHI, H.; ARIMOTO, Y. SUGANUMA, H. INAKUMA, T.; SUGIYAMA, K. Hepatoprotective Effect of Myristicin from Nutmeg (*Myristica fragrans*) on Lipopolysaccharide/d-Galactosamine-Induced Liver Injury. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p.1560-1565, 2003.

NAIR, N.G. e NADTOTCHEI, A. Sclerotia of Botrytis as a source of primary inoculum for bunch rot of grapes in New South Wales, Australia. **Journal of Phytopathology** n.119, p. 42-51, 1987.

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.

OLIVEIRA, A.; MESQUITA, J.; TEMPONE, A. G.; LAGO, J. H. G.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. Leishmanicidal activity of analkenylphenol from *Piper malacophyllum* is related to plasma membrane disruption. **Experimental Parasitology**, n. 132, p. 383-387, 2012.

OLIVEIRA, W. P. de; SOUZA, M. E. A. O. de. Comparação dos métodos de extração de óleo essencial de arraste a vapor e hidrodestilação utilizando casca de manga nos estados de desidratação e in natura. **VII CONNEPI**, 2012.

PERIGO, C. V; TORRES, R. B; BERNACCI, GUIMARAES, E. F. HABER, L. L; FACANALI, R; VIEIRA, MARIA, A. R; QUECINI, V; MARQUES, M. O. M. (2016) The

chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. **Industrial Crops and Products** v. 94, p. 528–539.

ORJALA, J.; MIAN, P.; RALI, T.; STICHER, O. Gibbilibols A-D, Cytotoxic and Antibacterial Alkenylphenols from *Piper gibbilimum*. **Journal Natural Products**, n. 61, p. 939-941, 1998.

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

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

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/ BrazilianJournalofPharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 70-74, jan/ mar, 2010.

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

RAFFO, A.; D'ALOISE, A.; MAGRI, A. L.; LECLERCQ, C. Quantitation of *tr*-cinnamaldehyde, safrole and myristicin in cola-flavoured soft drinks to improve the assessment of their dietary exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 626-635, 2013.

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.

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, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547-551, 2001.

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.

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

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

SILVA, L. F. da. **Fungos: um estudo sobre a sua ocorrência nos alimentos**. 2008. 30 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso - Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SILVA, J. K.; TRINDADE, R.; ALVES, N. S.; FIGUEIREDO, P. L.; MAIA, J. G.S.; SETZER, W. N. Essential oils from Neotropical *Piper* species and their biological activities. **International Journal of Molecular Science**, v. 18, p. 2571, pp. 1-42, 2017. doi:10.3390/ijms18122571

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004, p. 467-95.

SOUZA, S. P.; VALVERDE, S.S.; COSTA, N.F.; CALHEIROS, A. S.; LIMA, K. S.C.; LIMA, A. L. S. Chemical composition and antinociceptive activity of the essential oil of *Piper mollicomum* and *Piper rivinoides*. **Journal of Medicinal Plant Research**, vol. 8 (22), p. 788-793, 2014.

SOUZA, A. A.; DIAS, N. A. A.; PICCOLI, R. H.; BERTOLUCCI, S.K.V. Composição química e concentração mínima bactericida de dezesseis óleos essenciais sobre *Escherichia coli* enterotoxigênica. **Revista Brasileira de Plantas. Medicinais**, Campinas, v.18, n.1, p.105-112, 2016.

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.

STRASSBURGER, A.S. et al. Crescimento do morangueiro: influência da cultivar e da posição da planta no canteiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.2, 223-226, 2011.

TRUITT - Jr, E. B.; CALLAWAY- 3rd, E.; BRAUDE, M.C.; KRANTZ - Jr, J. C. The pharmacology of myristicin. A contribution to the psychopharmacology of nutmeg. **Journal of Neuropsychiatry**, v. 2, p. 205-210, 1961

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.

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.

YATES, S. G.; ENGLAND, R. E. Isolation and analysis of carrot constituents: myristicin, falcarinol, and falcarindiol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 317-320, 1982.

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

7. ANEXOS

7.1 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE *P. aduncum*

FIGURA 51. ESPECTRO DE MASSAS DO (E)- BETA- CIMENO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).

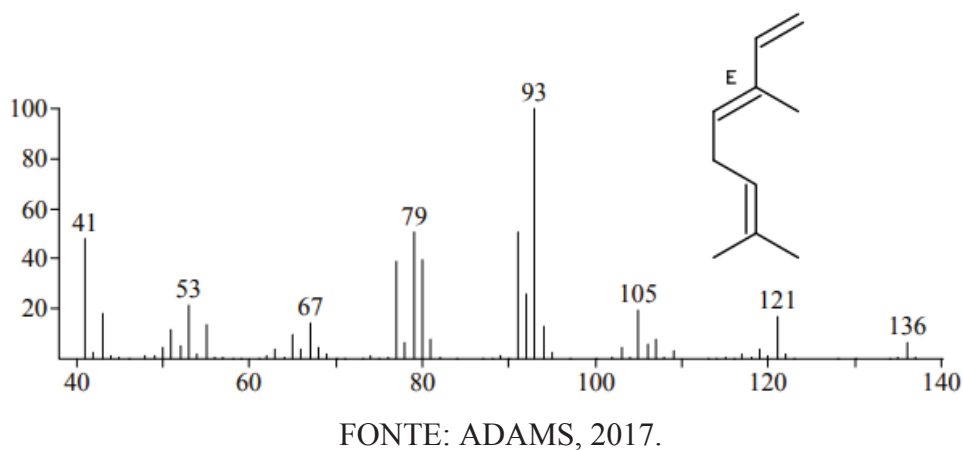
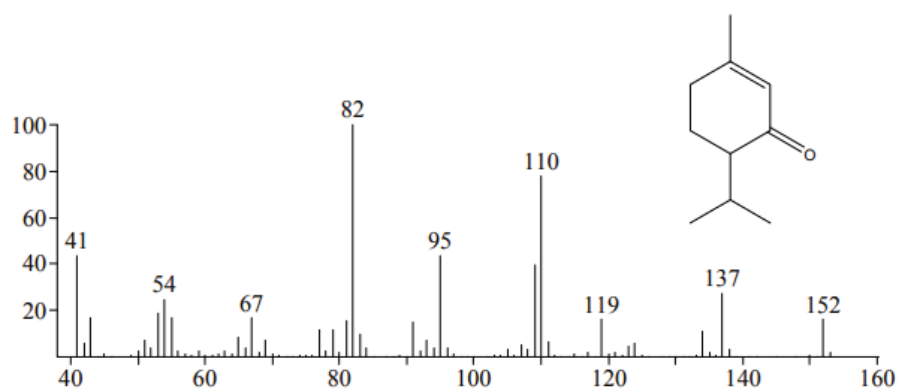


FIGURA 52. ESPECTRO DE MASSAS DO PIPERITONA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).



FONTE: ADAMS, 2017.

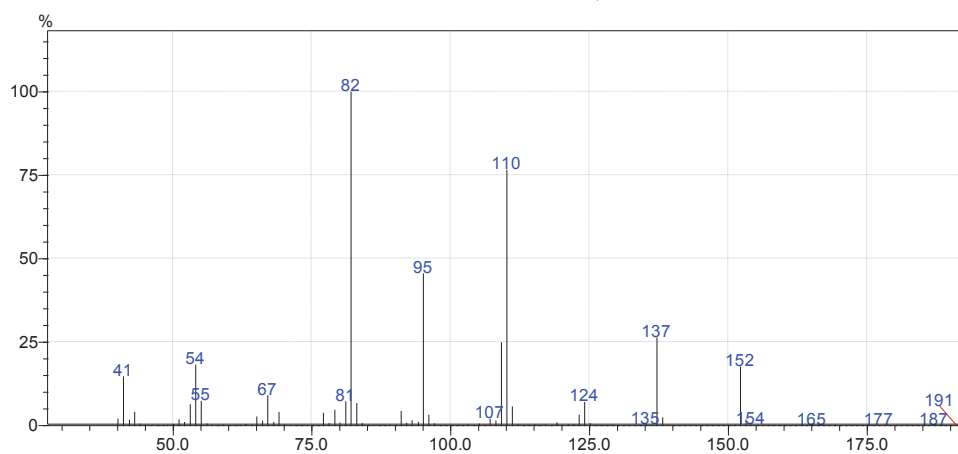
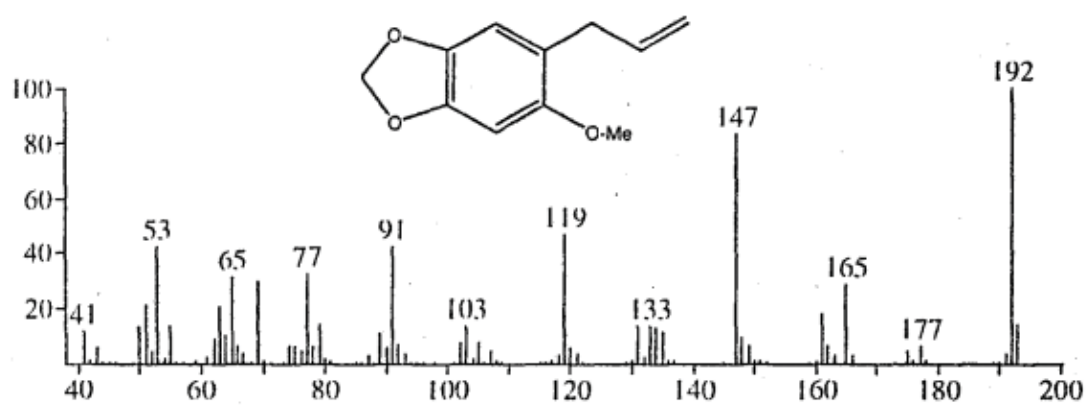


FIGURA 53. ESPECTRO DE MASSAS DO ASARICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).



FONTE: ADAMS, 2017.

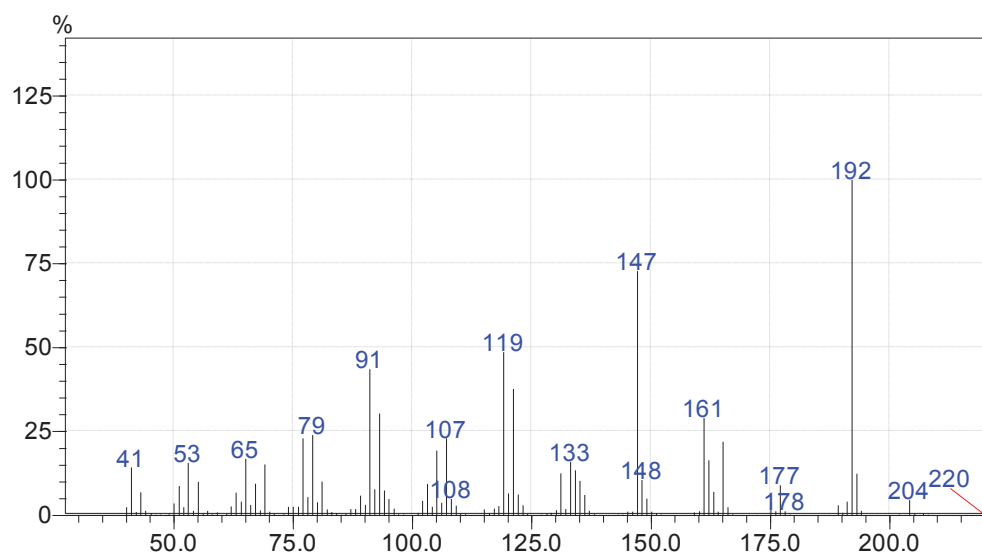
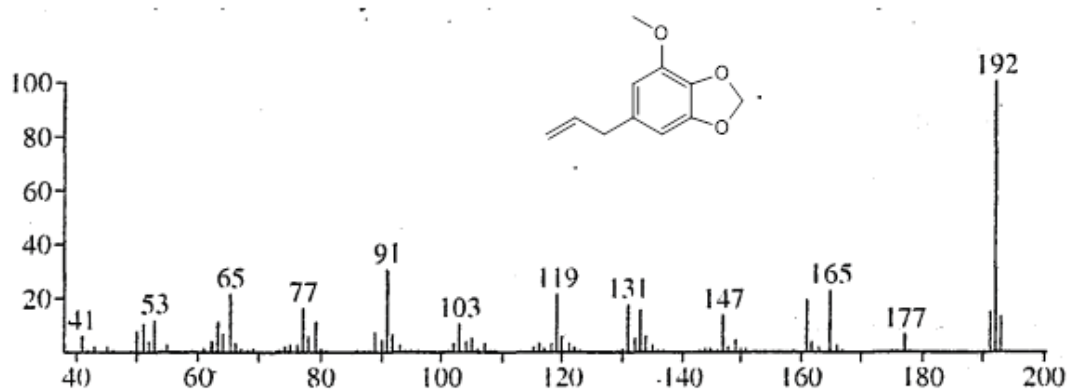


FIGURA 54. ESPECTRO DE MASSAS DO MIRISTICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).



FONTE: ADAMS, 2017.

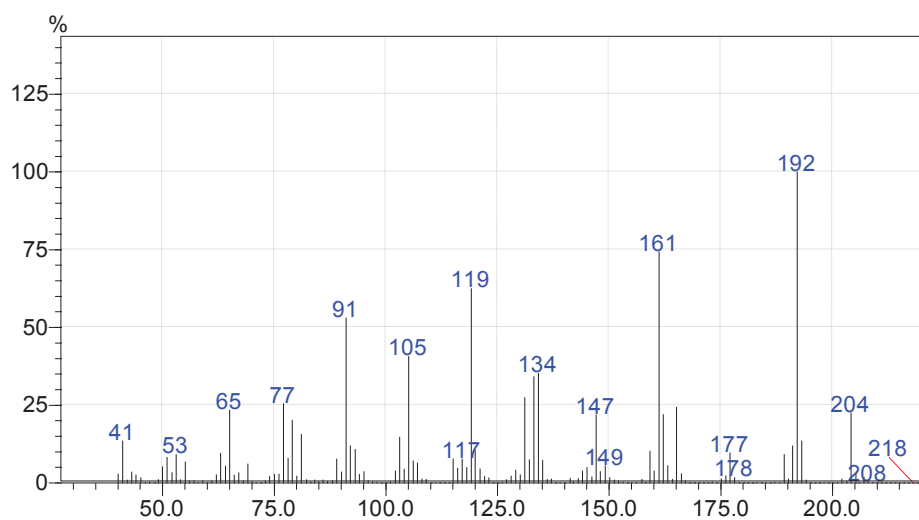
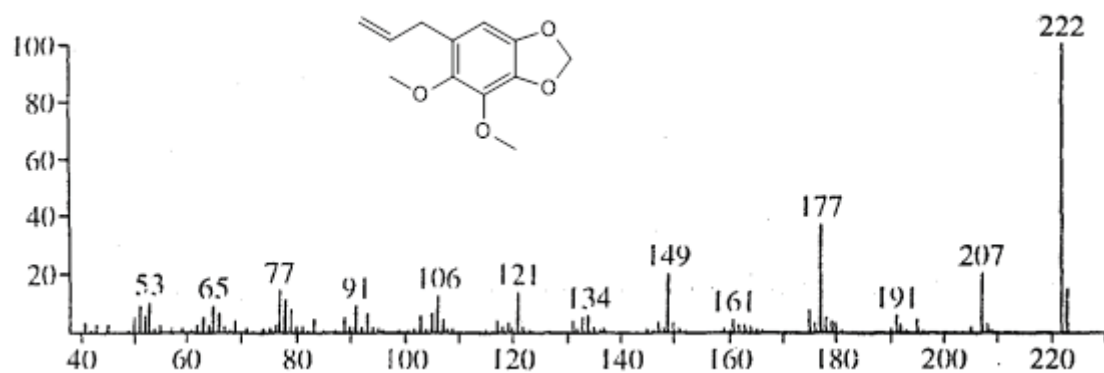
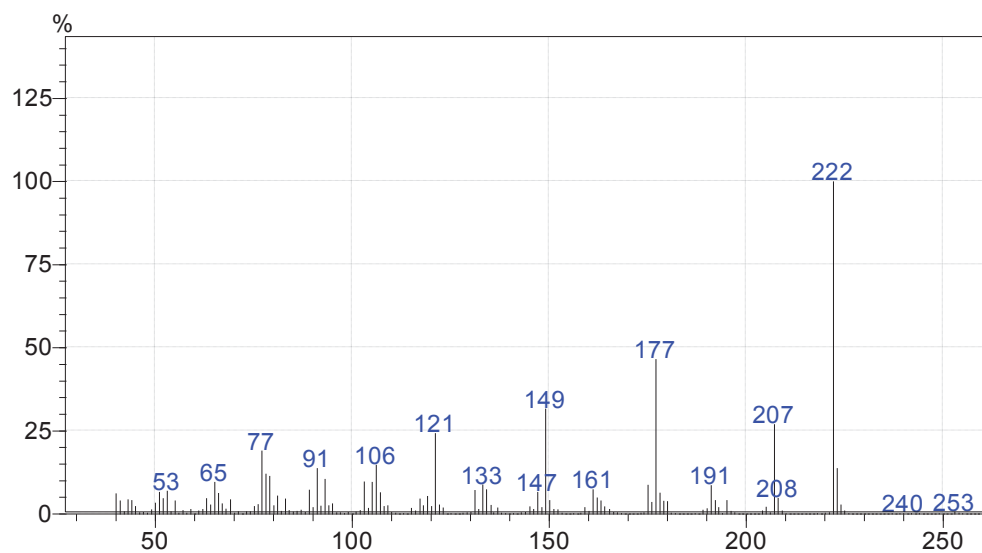


FIGURA 55. ESPECTRO DE MASSAS DO DILAPIOL ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).



FONTE: ADAMS, 2017.



7.2 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE *P. amalago*

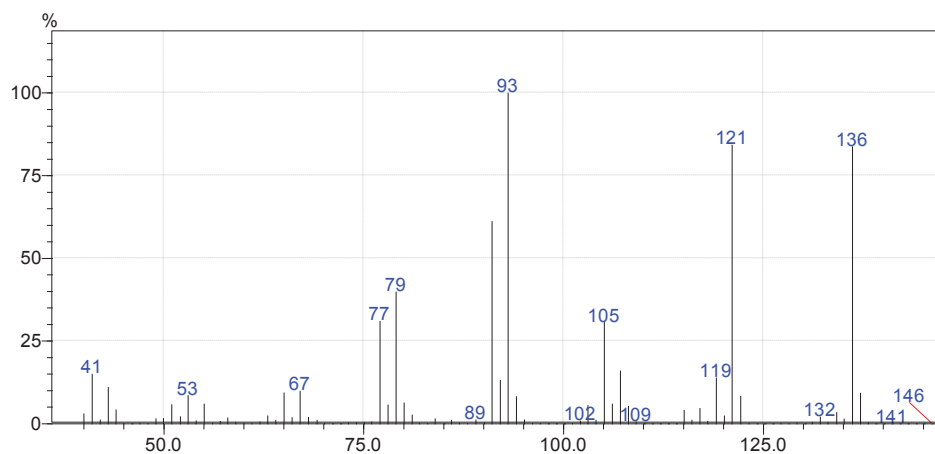
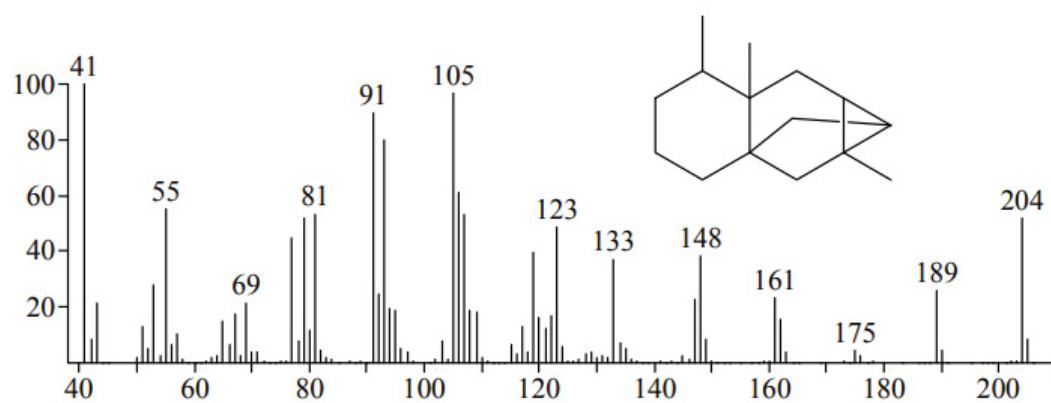


FIGURA 58. ESPECTRO DE MASSAS DO ISHWARANO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).



FONTE: ADAMS, 2017.

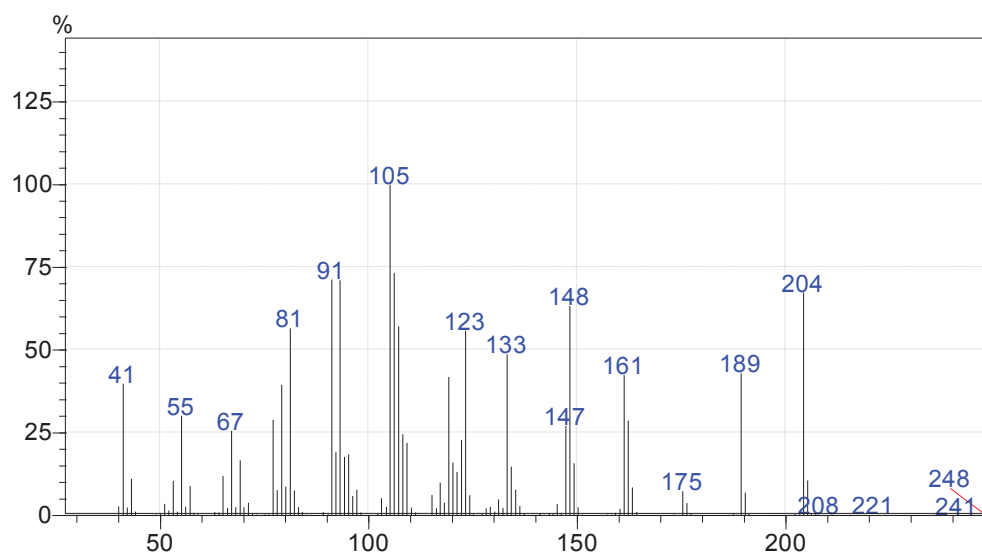
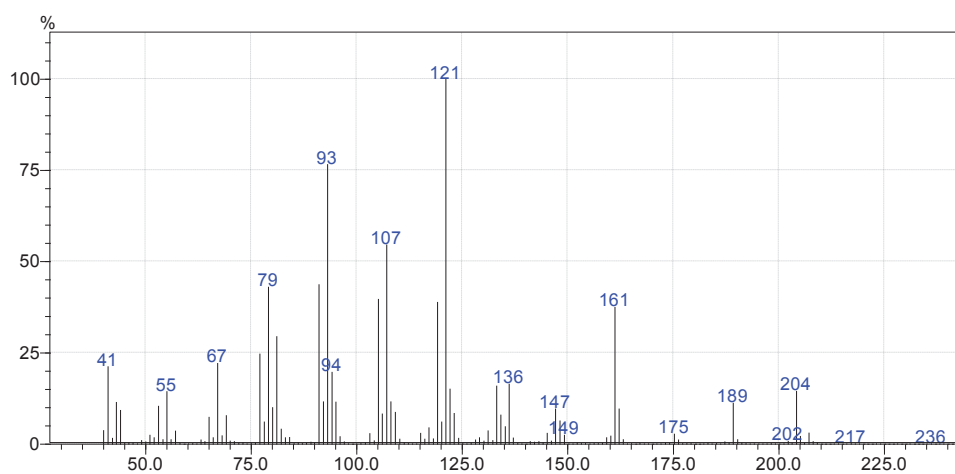
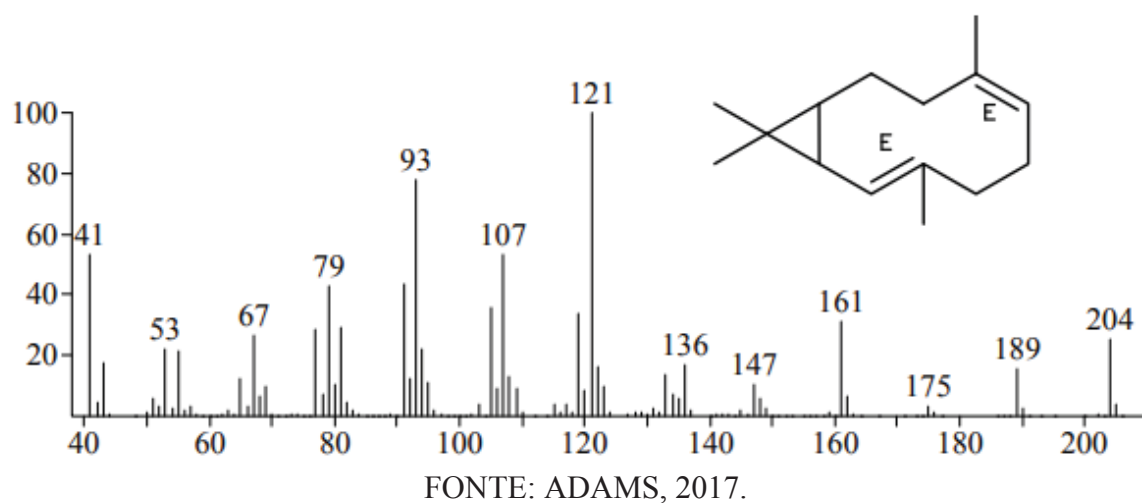
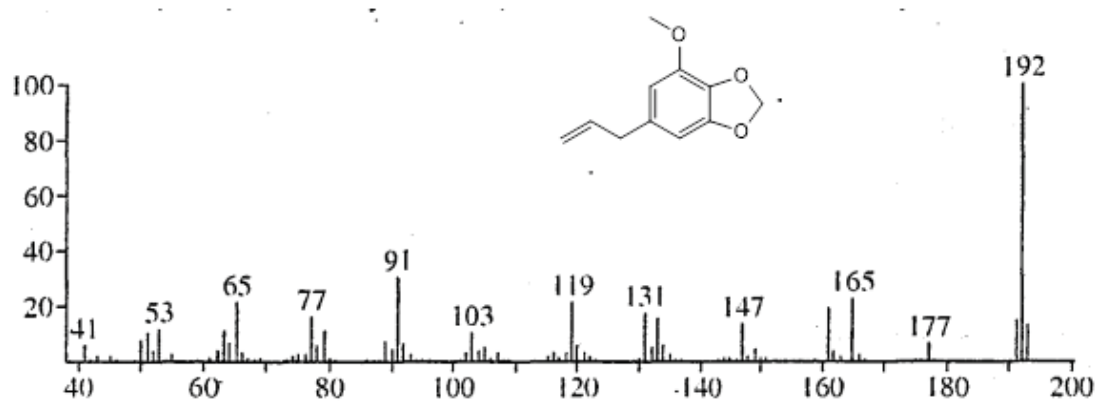


FIGURA 59. ESPECTRO DE MASSAS DO BICICLOGERMACRENO ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).

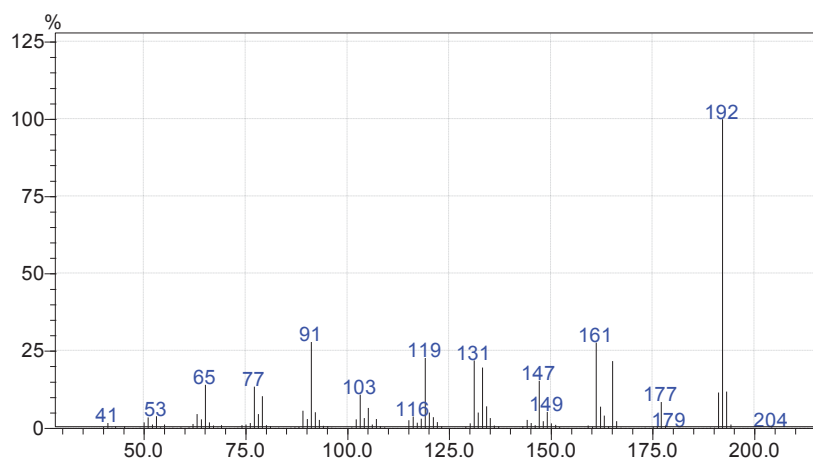


7.3 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE *P. caldense*

FIGURA 60. ESPECTRO DE MASSAS DO MIRISTICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR) CALDENSE.

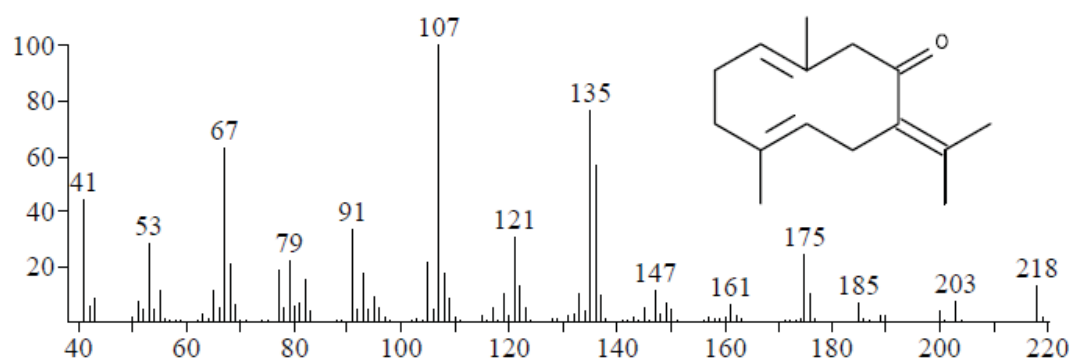


FONTE: ADAMS, 2017.



7.4 ESPECTROS DE MASSAS DOS MAJORITÁRIOS DOS OE *P. mikanianum*

FIGURA 61. ESPECTRO DE MASSAS DO GERMACRONA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).



FONTE: ADAMS, 2017.

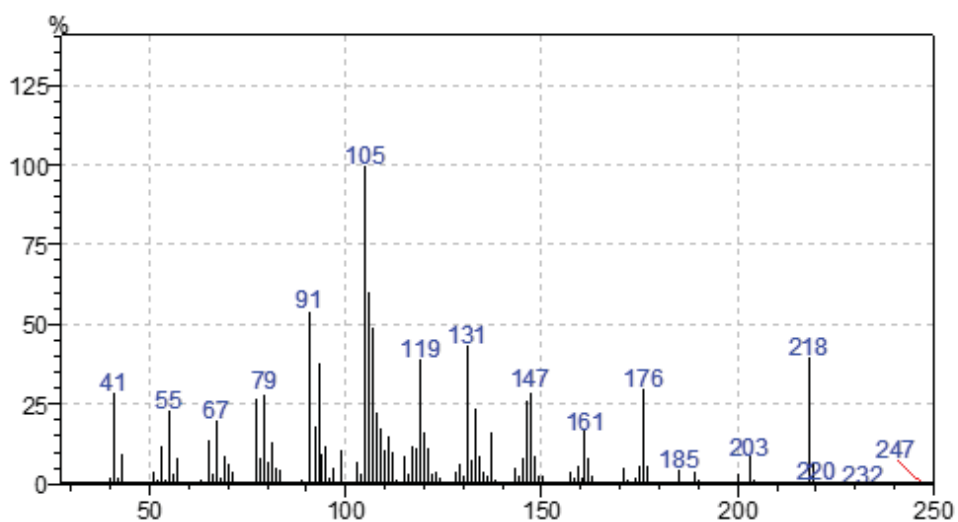
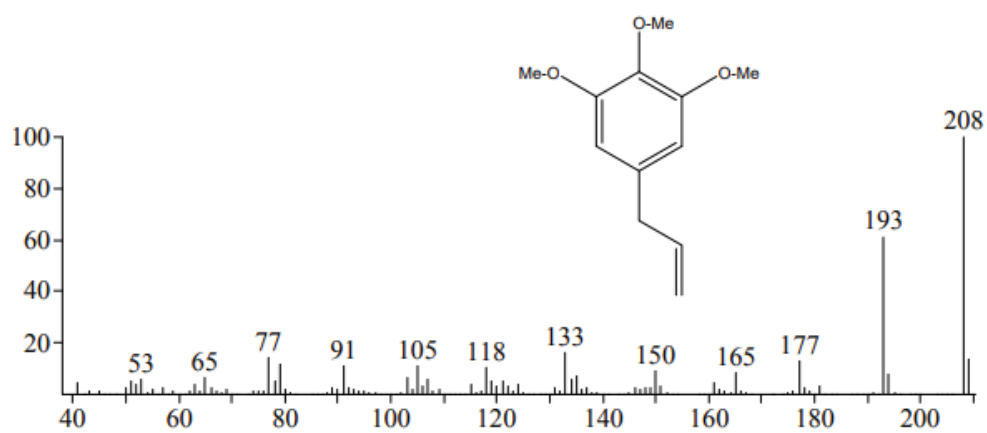
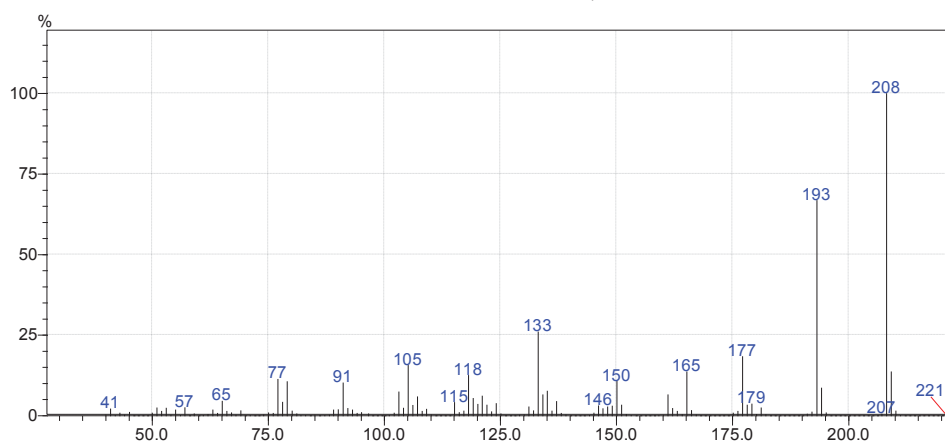


FIGURA 62. ESPECTRO DE MASSAS DO ELEMICINA ENTRE A LITERATURA ADAMS (SUPERIOR) E A AMOSTRA (INFERIOR).



FONTE: ADAMS, 2017.



7.5 TABELAS COM AS ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES.

TABELA 17. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE LOADINGS DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *P. aduncum*.

<i>P. aduncum</i> - folhas secas	
Nº	Composto
1	α -pineno
2	β -pineno
3	α -felandreno
4	α -terpineno
5	<i>p</i> -cimeno
6	Silvestreno
7	(<i>Z</i>)- β -ocimeno
8	(<i>E</i>)- β -ocimeno
9	γ -terpineno
10	β -menta-2,4(8)-dieno
11	Terpinen-4ol
12	Piperitona
13	α -copaeno
14	α -gurjuneno
15	(<i>E</i>)- cariofileno
16	β -copaeno
17	Aromadendreno
18	α -humuleno
19	allo-aromadendreno
20	trans-cadina-1(6),4-dieno
21	germacrenoD
22	asaricina
23	δ -amorfano
24	miristicina
25	(<i>Z</i>)-elemicina
26	espatulenol
27	óxido de cariofileno
28	globulol
29	epóxido e humulenoii
30	dilapiol
31	cubenol
32	α -cardinol

<i>P. aduncum</i> - frescas	
Nº	Composto
1	α -tujeno
2	α -pineno
3	β -pineno
4	mirceno
5	α -felandreno
6	3- δ -careno
7	α -terpineno
8	<i>p</i> -cimeno
9	β -felandreno
10	(<i>Z</i>)- β -ocimeno
11	(<i>E</i>)- β -ocimeno
12	γ -terpineno
13	terpinoleno
14	deidro-sabina cetona
15	terpinen-4-ol
16	piperitona
17	safrol
18	α -copaeno
19	β -elemeno
20	(<i>Z</i>)-cariofileno
21	(<i>E</i>)-cariofileno
22	aromadendreno
23	α -humuleno
24	γ -muuroleno
25	germacreno D
26	asaricina
27	cubebol
28	miristicina
29	elemicina
30	espatulenol
31	globulol
32	dilapiol
33	cubenol
34	α -cardinol

TABELA 18. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE *LOADINGS* DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *P. amalago*.

<i>P. amalago</i> -folhas secas	
Nº	Composto identificado
1	α -pineno
2	β - pineno
3	α -filandreno
4	δ -3-careno
5	α -terpineno
6	<i>p</i> -cimeno
7	limoneno
8	γ -terpineno
9	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno
10	terpinoleno
11	δ -elemeno
12	α -copaeno
13	β -elemeno
14	(<i>E</i>)- cariofileno
15	aromandendreno
16	guaia-6,9-dieno
17	<i>cis</i> -muurola-3,5-dieno
18	<i>trans</i> -muurola-3,5-dieno
19	α -humuleno
20	allo-aromadendreno
21	ishwarano
22	β -acoradieno
23	<i>trans</i> -cardina-1(6),4-dieno
24	γ -muuroleno
25	germacreno D
26	<i>cis</i> -eudesma-6,11-dieno
27	aristocheno
28	β - <i>cis</i> -guaiano
29	δ -selineno
30	<i>trans</i> -muurola-4(14),5-dieno
31	viridifloreno
32	biciclogermacreno
33	α -muuroleno
34	δ -amorfano
35	δ -cadineno
36	α -cadineno
37	globulol
38	viridiflorol
39	1- <i>epi</i> -cubenol

<i>Piper amalago</i> - folhas frescas	
Nº	Composto
1	α -pineno
2	β - pineno
3	Mirceno
4	α -felandreno
5	3- δ -careno
6	α -terpineno
7	<i>p</i> -cimeno
8	limoneno
9	γ -terpineno
10	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dieno
11	Terpinoleno
12	δ -elemeno
13	β -elemeno
14	(<i>E</i>)-cariofileno
15	6,9-guaiadieno
16	<i>trans</i> -muurola-3,5-dieno
17	alloaromadendreno
18	ishwarano
19	γ -muuroleno
20	α -amorfano
21	valenceno
22	biciclogermacreno
23	α -muuroleno
24	premnaspirodieno
25	δ -amorfano
26	γ -cadineno
27	δ -cadineno
28	butanoato de geranila
29	espatulenol
30	muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol
31	α -muurolol (=torreiol)
32	α -cardinol

<i>P. amalago</i> -folhas secas	
Nº	Composto identificado
40	muurola-4,10(14) -dien-1- β-ol
41	cubenol
42	α-cardinol
43	14-hidroxi-9-epi-(<i>E</i>)- cariofileno

TABELA 19. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE *LOADINGS* DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *P. mikanianum*

<i>P. mikanianum</i>- folhas secas	
Nº	Composto identificado
1	β-elemenol
2	(<i>Z</i>)- cariofileno
3	(<i>E</i>)- cariofileno
4	ishwarano
5	germancrenoD
6	viridifloreno
7	valenceno
8	biciclogermancreno
9	δ-cardineno
10	elemicina
11	4,6-dimetoxi-5vinil-1,2- benzodioxido
12	allohimachalol
13	germacrona
14	ciclocolorenona

<i>P. mikanianum</i>- folhas frescas	
Nº	Composto
1	α-pineno
2	β-pineno
3	limoneno
4	terpinoleno
5	β-elemenol
6	(<i>Z</i>)- cariofileno
7	α-gurjuneno
8	(<i>E</i>)- cariofileno
9	ishwarano
10	germacreno D
11	biciclogermacreno
12	germacreno A
13	δ-cardineno
14	elemicina
15	espetulenol
16	4,6-dimetoxi-5vinil-1,2-benzodioxido
17	germacrona
18	ciclocolorenona

TABELA 20. ATRIBUIÇÕES DAS COMPONENTES DOS GRÁFICOS DE *LOADINGS* DOS OE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *P. mollicomum*

<i>P. mollicomum</i> - folhas secas	
Nº	Composto
1	α -pineno
2	β -pineno
3	mirceno
4	3- δ -careno
5	<i>p</i> -cimeno
6	β -filandreno
7	ciclosativeno
8	α -copaeno
9	sibereno
10	(<i>E</i>)-cariofileno
11	β -copaeno
12	aromadendreno
13	espirolepechineno
14	α -humuleno
15	allo- aromadendreno
16	Ishwarano
17	γ -muuroleno
18	germancreno D
19	aristolocheno
20	β -selineno
21	<i>cis</i> - β -guaieano
22	biciclogermacreno
23	α -muuroleno
24	<i>trans</i> - β -guaieano
25	γ -cardineno
26	7-epi- α -selineno
27	miristicina
28	α -calacoreno
29	espathulenol
30	globulol
31	viridiflorol
32	cubeban-11-ol
33	guaiol
34	ledol
35	epóxido de humuleno II
36	γ -eudesmol
37	α -cardinol
38	α -muurolol (=torreyol)
39	α -cardinol

<i>P. mollicomum</i> - folhas frescas	
Nº	Composto
1	α -pineno
2	verbeneno
3	β -pineno
4	mirceno
5	α -felandreno
6	δ -3-areno
7	<i>p</i> -cimeno
8	β -felandreno
9	(<i>Z</i>)- β -ocimeno
10	(<i>E</i>)- β -ocimeno
11	α -copaeno
12	(<i>E</i>)-cariofileno
13	β -copaeno
14	aromadendreno
15	α -humuleno
16	allo-aromadendreno
17	aristolocheno
18	viridifloreano
19	α -muuroleno
20	<i>trans</i> - β -guaieano
21	(<i>E</i>)-(<i>E</i>)- α -farneseno
22	7-epi- α -selineno
23	δ -cardineno
24	espatulenol
25	globulol
26	gibbilimbol B

<i>P. mollicomum</i> - folhas secas	
Nº	Composto
40	14-hidroxi-9-epi-(<i>E</i>)- cariofileno
41	cadaleno
42	gibbilimbol B

7.6 FOTOS DOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

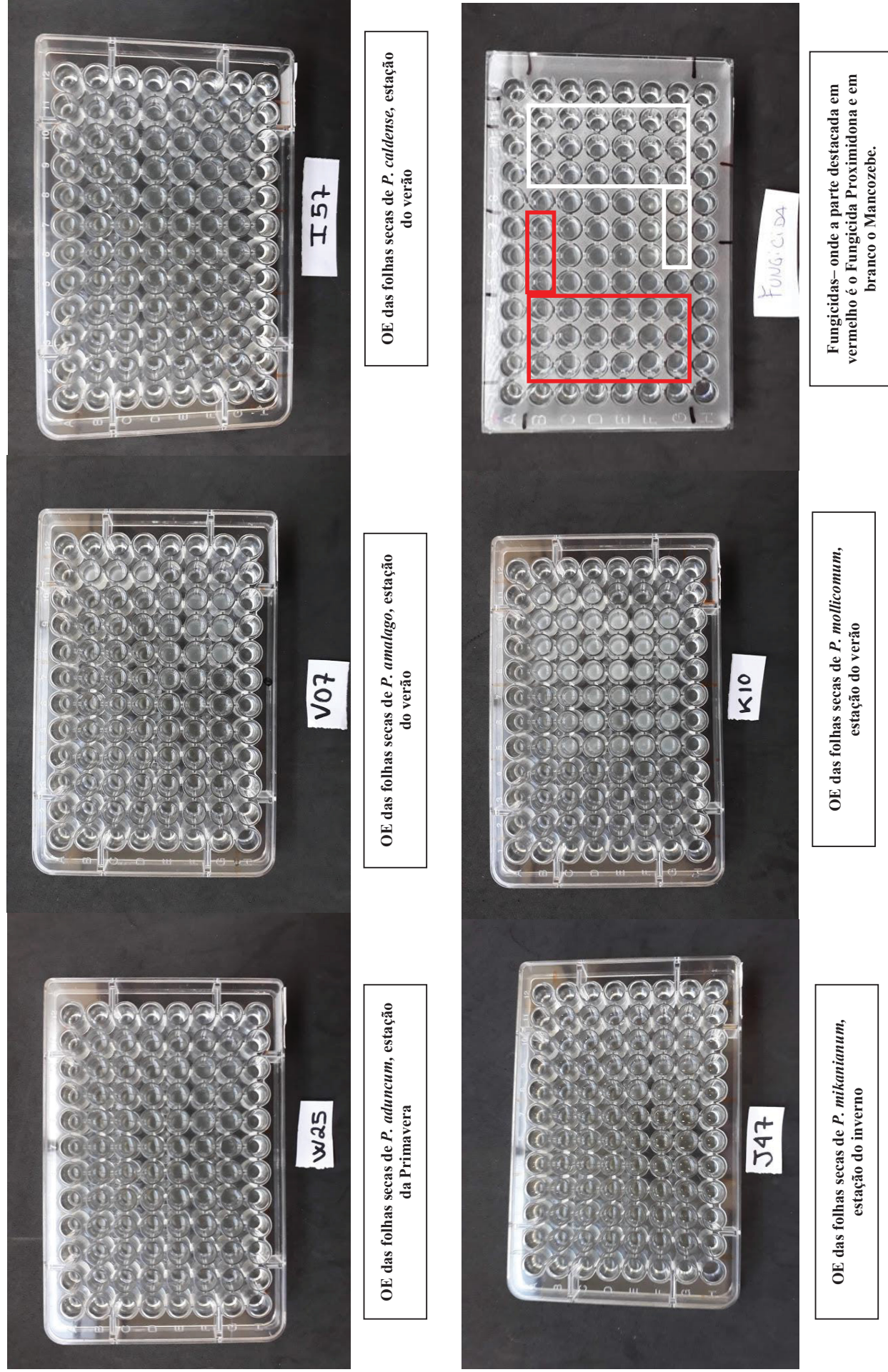
FIGURA 63. IMAGENS DOS TESTES DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* PELO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO – 1ª HORA

FIGURA 64. IMAGENS DOS TESTES DE INIBIÇÃO DO *B. cinerea* PELO TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO – 96ª HORA

