

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper gaudichaudianum* Kunth:
RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE FUNGITÓXICA *in vitro***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bianca Schindler

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper gaudichaudianum* Kunth:
RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
FUNGITÓXICA *in vitro***

por

Bianca Schindler

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Berta Maria Heinzmann

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper gaudichaudianum* Kunth:
RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
FUNGITÓXICA *in vitro***

elaborada por
Bianca Schindler

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Berta Maria Heinzmann, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Sérgio Augusto Loreto Bordignon, Dr.(UNILASALLE)

Ivanor Müller, Dr.(UFSM)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Schindler, Bianca
ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper gaudichaudianum* Kunth:
RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE FUNGITÓXICA in
vitro / Bianca Schindler.-2015.
100 p.; 30cm

Orientadora: Berta Maria Heinzmann
Coorientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2015

1. Piperaceae 2. Extrativo vegetal 3. Produto
florestal não-madeireiro 4. Fenilpropanóides 5. Fungicida
I. Heinzmann, Berta Maria II. Brião Muniz, Marlove
Fátima III. Título.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais, Tati e Edgar, e irmão Lucas, pelo carinho, apoio e força nesta jornada, mas principalmente ao meu namorado Maurício pelo seu amor, ajuda e compreensão que foram essenciais em todos os momentos. Vocês são meus exemplos de perseverança e humildade;
- À prof. Dra. Berta M. Heinzmann por ter me aceitado como orientada desde a graduação como “IC” e agora no mestrado, pela sua atenção, amizade e confiança em mais um trabalho concluído, além de todos os ensinamentos que foram e sempre serão lembrados tanto na vida profissional quanto pessoal;
- À minha co-orientadora prof. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz e a funcionária Maria Nevis Deconto Weber por terem me acolhido no laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, possibilitando o desenvolvimento dos experimentos, bem como pelas orientações recebidas;
- À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal (PPGEF), por viabilizarem a realização deste estudo;
- À CAPES pela bolsa de estudos e demais órgãos de fomento que custearam os experimentos desenvolvidos;
- Aos colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais, pela amizade e auxílio nas atividades realizadas;
- Aos Engenheiros Florestais Caciara Gonzatto Maciel e Fernando Nunes Gouveia, pelo fornecimento das cepas de fungos utilizadas neste estudo;
- Ao Fernando Saccol Gnocato e Deise Cagliari pelo auxílio e empréstimo de materiais;
- Ao Dr. Sérgio Bordignon, Dr. Ivanor Müller e Dra. Marlove Fátima Brião Muniz por aceitarem o convite para compor a Banca Examinadora do presente trabalho;
- E a todos aqueles que direta ou indiretamente me apoiaram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!!!

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1.....22

Tabela 1 - Estações, datas das coletas e órgãos vegetais amostrados de uma população de *Piper gaudichaudianum* Kunth, em Santa Maria, RS, Brasil.....25

Tabela 2 - Valores médios dos rendimentos (%) de OE, considerando massa fresca à base seca (MF BS), massa fresca à base úmida (MF BU) e folhas secas (FS) de seis amostras por estação, no ano de 2013 (duas coletas por estação, em triplicata), bem como densidade do OE (g/mL) de folhas MF BU e FS e teor de umidade (TU %). EPM: erro padrão da média.....28

MANUSCRITO 2.....34

Tabela 1 - Dados meteorológicos do ano de 2013 para o município de Santa Maria, RS, Brasil.....40

Tabela 2 - Composição química dos OE de folhas e órgãos reprodutivos de *Piper gaudichaudianum* Kunth, nas quatro estações do ano de 2013. C: constituinte; * \geq constituintes incluídos na ACP; INF: inflorescências; FR: frutos; FF: folhas frescas; FS: folhas secas; coleta: número 1 ou 2; Exp.: experimental; Lit.: literatura.....44

MANUSCRITO 3.....56

Tabela 1 - Composição química dos óleos essenciais obtidos de folhas (pool F) e órgãos reprodutivos (pool OR) de *Piper gaudichaudianum* Kunth.....66

Tabela 2 - Valores médios de crescimento micelial (mm) nos diferentes dias de avaliação e valor médio de Índice de Crescimento Micelial (ICM) para as testemunhas absolutas de cada fungo.....68

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i>	15
Figura 2 - A: exemplares da espécie <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth no sub-bosque da floresta em Santa Maria, RS; B: detalhe das espigas; C: detalhe das folhas; D: entrenós do caule/ramos.....	17
Figura 3 - Distribuição geográfica de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth no Brasil.....	17
MANUSCRITO 1.....	22
Figura 1 - Rendimentos médios (%) e EPM dos óleos essenciais de folhas frescas à base seca (MF BS), à base úmida (MF BU) e de folhas secas (FS) de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, nas quatro estações do ano de 2013 (duas coletas por estação), em triplicata. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de rendimento entre as estações e letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os rendimentos dentro da estação, pelos testes de Tukey, Mann-Whitney e teste- <i>t</i> , $p < 0,05$	27
Figura 2 - Representação gráfica do rendimento sazonal do óleo essencial de folhas frescas e órgãos reprodutivos (outono e inverno: inflorescências; primavera: frutos), ambos à base seca (MF BS e MOR BS, respectivamente) de <i>Piper gaudichaudianum</i>	28
Figura 3 - Dendrograma do rendimento (%) de todas as amostras do óleo essencial de folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> , considerando MF BU, MF BS e FS (duas coletas em quatro estações no ano de 2013, com extrações em triplicata), através do método de ligação pela média e com a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade.....	30
MANUSCRITO 2.....	34
Figura 1 - Classes químicas detectadas nos óleos essenciais de folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth nas quatro estações (Outono, Inverno, Primavera, Verão) no ano de 2013.....	43
Figura 2 - Dendrograma com a Análise Hierárquica de Cluster da composição química de todas as amostras de OE de folhas e órgãos reprodutivos de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth (duas coletas nas quatro estações do ano de 2013), através do método de ligação pela média e com a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade, mostrando a divisão em dois grupos químicos (GQ I e II).....	47
Figura 3 - Biplot da Análise de Componentes Principais (ACP), baseada na composição química de 20 amostras de óleos essenciais obtidos a partir de folhas (frescas e secas) e órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos) de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, nas quatro estações do ano de 2013.....	48

MANUSCRITO 3.....56

Figura 1 - Colônias fúngicas das testemunhas absolutas dos fungos: *Botryosphaeria rhodina* (A); *Pycnoporus sanguineus* (B); *Gloeophyllum trabeum* (C) e *Fusarium moniliforme* (D).....67

Figura 2 – Índice Antifúngico médio (IA%) e desvio padrão da média (DPM) para os óleos essenciais (OE) de órgãos reprodutivos (OR) e folhas (F) nas concentrações C1, C2 e C3 equivalentes a 0,25; 0,50 e 1,0 µL/mL, respectivamente. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa para o tratamento com o OE de mesmo órgão vegetal e diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre todos os tratamentos pelos testes de Tukey, Mann-Whitney e teste-t, $p < 0,05$70

LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância
BSA - Batata-Sacarose-Ágar
CG-DIC - Cromatografia Gasosa acoplada a Ionização por Chama
CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CP - Componente Principal
F - Folhas
FF- Folhas Frescas
FRU - Frutos
FS - Folhas Secas
GQ - Grupo Químico
AHC - Análise Hierárquica de Cluster
IA - Índice Antifúngico
ICM - Índice de Crescimento Micelial
INF - Inflorescências
MF BS - Massa Foliar Base Seca
MF BU - Massa Foliar Base Úmida
MOR BS - Massa de Órgãos Reprodutivos Base Seca
MOR BU - Massa de Órgãos Reprodutivos Base Úmida
OE - Óleos Essenciais
OR - Órgãos Reprodutivos
ACP - Análise de Componentes Principais
PFNM - Produtos Florestais Não-Madeireiros
TU - Teor Umidade
UPGMA (inglês) – método de agrupamento pela média aritmética

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper gaudichaudianum* Kunth: RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE FUNGITÓXICA *in vitro*

AUTORA: BIANCA SCHINDLER

ORIENTADORA: DRa. BERTA MARIA HEINZMANN

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

Este trabalho descreve a análise sazonal do rendimento e composição química do óleo essencial (OE) da espécie nativa *Piper gaudichaudianum* Kunth em uma população de Santa Maria, RS, com o objetivo de determinar a época mais adequada para coleta. Também foi verificado o efeito da secagem de folhas sobre o rendimento e a composição química dos OE, a fim de avaliar a possível influência desse processo pós-colheita sobre estas características do extrativo. O OE bem como seu constituinte majoritário tiveram sua atividade fungitóxica avaliada contra fungos fitopatogênicos e apodrecedores da madeira. Os OE de folhas frescas, secas e órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos) foram extraídos separadamente através do método de hidrodestilação e em seguida foram determinados seus rendimentos (m/m %). A composição química foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC). Adicionalmente, os testes fungitóxicos foram realizados através do método de diluição em Ágar usando BSA (batata-sacarose-ágar). A presença de órgãos reprodutivos (OR) não alterou o rendimento do OE de folhas (F) de *P. gaudichaudianum* no ano observado, apresentando valor mínimo de 1,32% e máximo de 1,61% sem diferença significativa ($p > 0,05$). A análise química dos OE de F e OR evidenciou que estes são formados preponderantemente pelo fenilpropanóide dilapiol (59,2-87,8%) enquanto que a miristicina foi identificada apenas para os OE de OR. A composição química dos OE não teve influência da sazonalidade e das fenofases, sendo possível a coleta do material vegetal em qualquer época do ano. A secagem das folhas não alterou o rendimento e composição química dos OE. Os OE de F e OR de *P. gaudichaudianum* apresentaram atividade fungitóxica para os fungos fitopatogênicos (*Fusarium moniliforme* e *Botryosphaeria rhodina*) e também para os apodrecedores da madeira (*Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum*) em concentrações de 0,25-1,0 µL/mL. Os resultados indicaram que o constituinte majoritário dilapiol é o responsável pela atividade.

Palavras-chave: Piperaceae, extrativo vegetal, produto florestal não-madeireiro, fungicida.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Forest Engineering
University Federal of Santa Maria, RS, Brazil

ESSENTIAL OIL OF *Piper gaudichaudianum* Kunth: YIELD, CHEMICAL COMPOSITION AND FUNGITOXIC ACTIVITY *in vitro*

AUTHOR: BIANCA SCHINDLER

ADVISOR: DRa. BERTA MARIA HEINZMANN

DATE AND PLACE: Santa Maria, 26th February 2015.

This work describes the seasonal analysis of the yield and chemical composition of the essential oil (EO) for the native species *Piper gaudichaudianum* Kunth in a population of Santa Maria, in order to determine the best time for collection. The effect of leaves drying on the yield and chemical composition of EO was also verified, in order to evaluate the possible influence of this post-harvest process on the extractive features. The EO oil and its major constituent had their fungitoxicity assessed against phytopathogenic and wood decay fungi. EO from fresh and dried leaves, and reproductive organs (inflorescences and fruits) were extracted separately by hydrodistillation, and then had their yields determined (w/ w %). The chemical composition was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Additionally, fungitoxic assays were performed by the agar dilution method using PSA (potato-sucrose-agar). The presence of reproductive organs (RO) did not affect the leaves (L) EO of *P. gaudichaudianum* on the observed year, with a minimum value of 1.32% and a maximum of 1.61% without significant difference ($p > 0.05$). Chemical analysis of L and RO EO revealed that these are predominantly formed by phenylpropanoid dilapiolle (59.2 to 87.8%), while myristicin was identified only in the EO of the RO. The chemical composition of EO oils had no influence of seasonality and phenophases, being possible to collect the plant material at any time of year. Drying of the leaves did not affect the yield and composition of EO. The L and RO EO of *P. gaudichaudianum* presented fungitoxic activity for phytopathogenic fungi (*Fusarium moniliforme* and *Botryosphaeria rhodina*) and also for wood decay fungi (*Pycnoporus sanguineus* and *Gloeophyllum trabeum*) at concentrations of 0.25-1.0 $\mu\text{L} / \text{mL}$. The results indicated that the major constituent dilapiolle is responsible for the activity.

Keywords: Piperaceae, vegetal extractive, non-timber forest product, fungicide.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	12
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 HIPÓTESES	21
4 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS	22
4.1 Manuscrito 1- Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth.....	22
4.2 Manuscrito 2 - Caracterização sazonal da composição química do óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth (Piperaceae).	34
4.3 Manuscrito 3 - Ação antifúngica do óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth contra fungos fitopatogênicos e apodrecedores da madeira.....	56
5 DISCUSSÃO GERAL	79
6 CONCLUSÕES	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	95

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação está organizada da seguinte forma: primeiramente é apresentada uma breve introdução que contempla os aspectos mais relevantes da revisão bibliográfica relacionada ao assunto deste estudo. Na sequência são descritos os objetivos deste trabalho e hipóteses. Os resultados encontram-se organizados na forma de três manuscritos científicos. Ressalta-se que o primeiro está formatado de acordo com o periódico ao qual foi submetido, enquanto que os demais se encontram nas normas da Universidade Federal de Santa Maria (MDT). De forma geral, o manuscrito 1 aborda o efeito da sazonalidade e da secagem do material vegetal no rendimento dos OE de *P. gaudichaudianum*; o manuscrito 2 trata de caracterização sazonal da composição química dos OE de diferentes órgãos vegetais de *P. gaudichaudianum*; e por fim, o manuscrito 3 descreve a atividade fungitóxica dos OE de folhas e órgãos reprodutivos de *P. gaudichaudianum* e do constituinte majoritário isolado, dilapiol, frente a fungos apodrecedores da madeira e fitopatogênicos. Na Discussão Geral, buscou-se realizar uma interpretação dos resultados obtidos, bem como correlacioná-los com a literatura e entre si. A Dissertação é, então, finalizada pelas Conclusões, Referências Bibliográficas.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil possui uma vasta área territorial e uma rica biodiversidade, sendo considerado uma valiosa fonte de espécies vegetais, muitas delas pouco estudadas. Portanto, nosso país constitui-se em um grande acervo biológico para a investigação científica. Segundo Raven et al. (1996), a análise das plantas silvestres para o uso potencial do homem deve ser acelerada e espécies promissoras devem ser preservadas em bancos de sementes, culturas ou preferencialmente em reservas naturais antes de serem extintas. Os estudos devem ser estimulados para que se possa produzir alternativas sustentáveis e deste modo preservar a biodiversidade. Uma das opções promissoras é a pesquisa com produtos do metabolismo secundário vegetal, que têm a vantagem de apresentar uma grande variedade de estruturas químicas, sendo que muitos constituintes são moléculas relativamente pequenas e que apresentam múltiplas propriedades biológicas (McCHESNEY, 1993).

Neste sentido, a obtenção de produtos florestais não madeireiros (PFNM) no Brasil tem apresentado a cada dia crescente importância social, econômica e ambiental, já que se concentra prioritariamente em pequenas propriedades e preserva parte importante da biodiversidade das florestas nativas (FIEDLER, SOARES, SILVA, 2008). Uma classe de PFNM que vem tomando espaço nos estudos para a produção é a dos óleos essenciais (MACHADO, 2008).

Os óleos essenciais (OE) desempenham na natureza um papel importante na proteção das plantas, atuando como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra a ação de herbívoros, além de atrair a fauna e polinizadores, favorecendo a dispersão de pólen e sementes. Economicamente são conhecidos por terem inúmeras atividades biológicas, na conservação de alimentos e também pelos seus aromas (BAKKALI et al., 2008; PICHERSKY, GERSHENZON, 2002; BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009).

A composição química e o rendimento dos óleos essenciais podem variar de acordo com diversos fatores que podem ser inerentes à planta, além de fatores climáticos, sazonais, nutricionais do solo, umidade, relacionados ao método de extração, entre outros (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; SARTOR, 2009; BELTRAME et al., 2010). No entanto, independentemente do método de extração utilizados seus componentes são de baixo peso molecular, constituindo-se de misturas bastante variáveis de fenilpropanóides e terpenóides, mais especificamente por monoterpenóides (C₁₀) e sesquiterpenóides (C₁₅), embora diterpenóides (C₂₀) também possam estar presentes.

Além desses, uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados ou insaturados), ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres, óxidos, peróxidos, ésteres acíclicos ou lactonas, furanos, cumarinas e até compostos com enxofre podem ocorrer em óleos essenciais (SIMÕES, SPITZER, 1999; HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL, 2007).

À grande variabilidade de constituintes pertencentes a estas classes de metabólitos secundários são atribuídas as características organolépticas e principais atividades biológicas dos OE, que são de grande importância medicinal. Porém, a presença dos OE no reino vegetal é bem mais frequente em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias: Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras (BRUNETON, 1991; SIMÕES, SPITZER, 1999).

A família Piperaceae segundo o APG III (2009), pertence ao clado das Magnolídeas e está classificada na ordem Piperales. Tem ampla distribuição no mundo e é composta por 10 gêneros, com aproximadamente 2.500 espécies. O gênero *Piper* L., inclui mais de 1000 espécies distribuídas pantropicalmente nos hemisférios (PARMAR et al., 1997; JARAMILLO, MANOS, 2001; GUIMARÃES, MONTEIRO, 2006), conforme representado na Figura 1.

No Brasil a família Piperaceae ocorre em todos os biomas, com cerca de 458 espécies de quatro gêneros: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Ottonia* Spreng. e *Manekia* Trel (GUIMARÃES et al., 2015). No entanto, outros autores aceitam apenas a ocorrência de três gêneros: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav. e *Manekia* Trel (SOUZA, LORENZI, 2008). De acordo com Di Stasi e Hiruma-Lima (2002), no Brasil os representantes da família Piperaceae são de complexa identificação taxonômica pela semelhança entre as características das inflorescências de diferentes espécies.

As Piperáceas têm aspecto geralmente herbáceo ou arbustivo e são sempre odoríferas, pois normalmente apresentam células produtoras de óleos essenciais (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). Destacam-se na família as espécies de *Piper* pelas suas atividades biológicas já descritas (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI, MATOS, 2008).

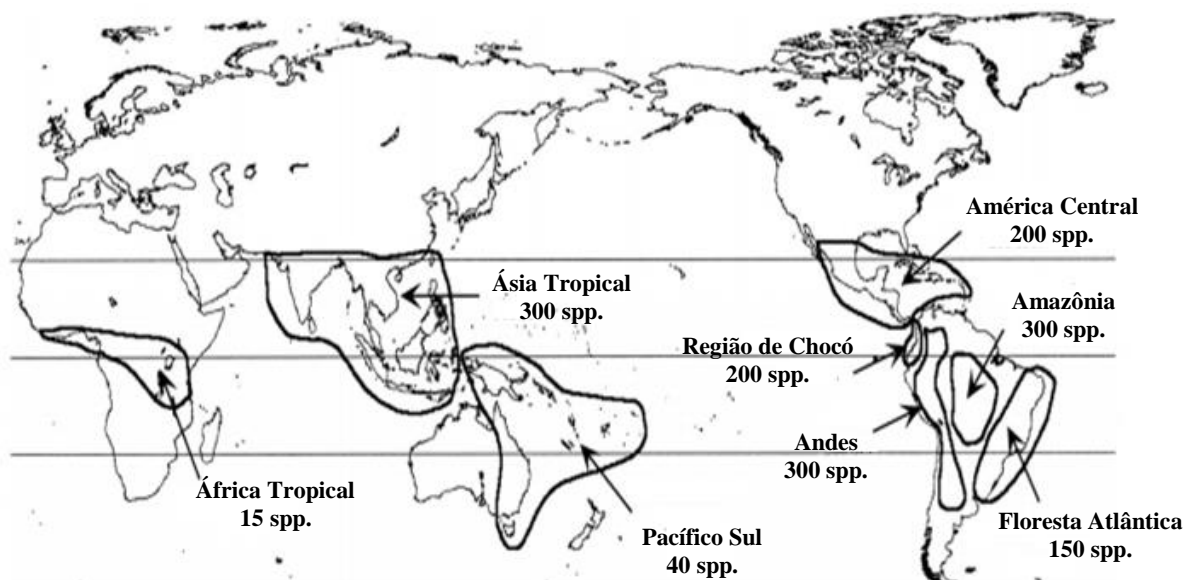


Figura 4 – Distribuição geográfica do gênero *Piper*. Número de espécie estimado para cada centro de diversidade do grupo.

Fonte: adaptada de Jaramillo e Manos, 2001.

Os dois maiores gêneros em número de espécies são *Piper* e *Peperomia*, os quais são os mais estudados quimicamente e comercializados mundialmente, a exemplo da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) como condimento; as espécies de *Peperomia* e *Piper* como ornamentais, cuja beleza reside principalmente em sua folhagem; e também sua comercialização em feiras, principalmente espécies de *Piper*, para utilização na medicina popular (PARMAR et al., 1997; GUIMARÃES, MONTEIRO, 2006). O uso de modo empírico de outras espécies da família para o tratamento de diferentes doenças é advindo da grande diversidade estrutural de constituintes químicos. As classes de substâncias mais encontradas são alcalóides, neolignanais, lignanas, flavonóides, fenilpropanóides e isobutilamidas (PARMAR et al., 1997).

No Brasil o gênero *Piper* L. encontra-se classificado em 290 espécies, sendo que destas 179 são endêmicas (GUIMARÃES et al., 2015). No Rio Grande do Sul são registradas 12 espécies nativas de *Piper* e uma cultivada (RUSCHEL, WAECHTER, 2004).

Piper gaudichaudianum Kunth é conhecida vulgarmente como pariparoba ou jaborandi. É um arbusto de 1-3 m de altura e apresenta caule provido de entrenós, variando entre 4-6 cm. Folhas com pecíolos providos de bainha curta na base, com lâmina assimétrica-aguda na base, diferindo

um lado em relação ao outro em cerca de 4,5cm. As flores são sésseis, dispostas sempre em “espigas” sendo curvas e sustentadas por um pedúnculo piloso, que supera em mais de duas vezes o tamanho do pecíolo (GUIMARÃES, VALENTE, 2001). Algumas destas características botânicas podem ser visualizadas na Figura 2.

É uma espécie latino-americana, de ocorrência no Paraguai, Argentina e Brasil (GUIMARÃES, VALENTE, 2001). Sua distribuição geográfica no Brasil se dá no Norte (Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo), Centro-Oeste (Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e no Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), conforme representado na Figura 3 (GUIMARÃES et al., 2015). De acordo com Sobral et al. (2013) no Rio Grande do Sul a espécie é nativa e ocorre ao longo da Floresta Atlântica.

Na medicina popular suas folhas frescas em infusão são utilizadas como analgésicas, as raízes frescas como anti-inflamatórias e nos casos de doenças do fígado (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). As atividades biológicas descritas incluem efeito fungicida, inseticida, anti-inflamatório, larvicida e analgésico (PARMAR et al., 1997; MOREIRA et al., 2001; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; LAGO et al., 2004; MORAIS et al., 2007; PUHL et al., 2011).



Figura 5– A: exemplares da espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth no sub-bosque da floresta em Santa Maria, RS; B: detalhe das espigas; C: detalhe das folhas; D: entrenós do caule/ramos.



Figura 6 Distribuição geográfica de *Piper gaudichaudianum* Kunth no Brasil.

Legenda: Região Norte (verde); Nordeste (laranja); Sudeste (vermelho); Centro-Oeste (amarelo); Sul (azul).
Fonte: Guimarães et al., 2015.

Considerando que os óleos essenciais frequentemente apresentam eficiência no controle de doenças fúngicas por sua ação fungitóxica, que inibe o crescimento micelial e a germinação de esporos (PEREIRA et al., 2008), a sua utilização na indústria madeireira e na silvicultura, corresponde a um campo a ser melhor explorado no controle e prevenção de fungos. Com relação aos OE de espécies de *Piper*, a revisão bibliográfica mostrou um grande número de publicações que relatam sua atividade antifúngica. No entanto, foi encontrado apenas um relato sobre sua avaliação contra fungos apodrecedores da madeira (SOIDROU et al., 2013).

Em geral, os produtos de origem madeireira têm necessidade de tratamento preservante, uma vez que podem sofrer deterioração causada por diferentes agentes, entre eles os fungos (FREIRE et al., 2011). Os fungos que afetam diretamente o setor madeireiro são os que causam a destruição das células da madeira como os fungos de podridão-branca, que atacam facilmente a lignina (constituente responsável por manter unidas as células da madeira) e os fungos de podridão-parda, que atacam a celulose. Além disso, a podridão-parda provoca uma diminuição nas características mecânicas da madeira com mais rapidez que a podridão-branca (MORESCHI, 1980). Outros fungos de importância florestal são os que causam doenças em espécies arbóreas, principalmente em viveiros, provocando podridão radicular e do caule, tombamento de mudas, queima de folhas e cancro vascular (POLETO et al., 2006; GRIGOLETTI JÚNIOR, PARIS, AUER, 2006).

Os produtos preservantes da madeira atualmente empregados na indústria são de origem sintética e à base de metais como cobre, cromo, zinco, arsênio, boro e flúor, e de substâncias como creosoto e aminas (MACHADO et al., 2006). Muitos destes elementos são tóxicos aos manipuladores e ao meio ambiente, sendo que os produtos tradicionalmente utilizados na atualidade são o CCA (cromo, cromato e arsênio), pentaclorofenol e creosoto. Apesar de sua elevada toxicidade e de serem de difícil eliminação da madeira tratada, são os que apresentam preços mais competitivos em comparação com produtos considerados de menor toxidez como quat de cobre amoniacal (ACQ) e o cobre azole do tipo B (CA-B) (TARAKANADHA, MORRELL, RAO, 2002; BRAND et al., 2006). De acordo com Kartal et al. (2004a) alguns preservantes da madeira já foram proibidos ou limitados para alguns usos em muitos países da Europa. Desta maneira se busca tratar a madeira com menores custos, de forma eficiente e com menor risco à saúde humana, à fauna e à flora (MORESCHI, 1980). Nesse sentido, os Estados Unidos e Japão têm focado suas pesquisas no desenvolvimento de produtos alternativos que protejam a madeira de micro-organismos e insetos (KARTAL et al., 2004a). Tratando-se do controle de patógenos de raízes e

de parte aérea, o principal fungicida sistêmico utilizado atualmente é o Benomyl (LONDE et al., 2007). Segundo a EPA (2012), este fungicida pode causar inúmeros efeitos nocivos aos seres humanos como toxicidade hepática, câncer, má formação fetal, entre outros. Além do mais, a grande quantidade de fungicidas utilizados pode contaminar os lençóis freáticos, afetando diretamente a flora, fauna e a vida humana (SILVA, MELO, 1997)

Uma possibilidade aceitável e sustentável, do ponto de vista ecológico, é a utilização de biopesticidas para a preservação da madeira e prevenção/controlar de fitopatógenos. O descobrimento de moléculas de menor impacto ambiental é um dos principais objetivos das pesquisas nos dias atuais (MACHADO et al., 2006; ISMAN, MACHIAL, 2006; BENTO et al., 2014). Neste sentido, alguns estudos a partir de espécies vegetais têm se mostrado promissores no controle de fungos apodrecedores da madeira, como os extratos do cerne de *Milicia excelsa* (Welw.) C.C. Berg e de *Erythrophleum suaveolens* (Guill. & Perr.) Brenan (ONUORAH, 2000), com estilbenóides de pinhas de Gimnospermas (CELIMENE et al., 1999), compostos fenólicos e ácidos orgânicos da madeira de *Cryptomeria japonica* D. Don e de *Acacia mangium* Willd. (KARTAL et al., 2004b) e também com compostos fenólicos isolados de óleos essenciais (VODA et al., 2003). Do mesmo modo, extratos de alho (*Allium sativum* L.), casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyer) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) apresentaram atividade antifúngica promissora para os fungos fitopatogênicos: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Phomopsis* sp. e *Pyricularia oryzae* (VENTUROSOSO et al., 2011; SILVA et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o potencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth para a produção de óleo essencial e avaliar sua atividade fungitóxica.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de folhas frescas e secas de *Piper gaudichaudianum* pelo período de um ano;
- II. Verificar se há diminuição do rendimento ou alteração da composição química do óleo essencial através do processo de secagem;
- III. Analisar a composição química dos óleos essenciais obtidos nas quatro estações do ano, em um período de 12 meses;
- IV. Observar qual será a estação recomendada para a coleta, considerando o rendimento e composição química de óleo essencial desta espécie para a população estudada no município de Santa Maria, RS;
- V. Investigar a ação antifúngica do óleo essencial e do seu constituinte majoritário contra os fungos causadores da podridão da madeira (*Gloeophyllum trabeum* (Pers) Murrill e *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill, respectivamente), bem como frente os fungos fitopatogênicos *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Botryosphaeria rhodina* (Berkeley & Curtis) von Arx.

3 HIPÓTESES

- I. O óleo essencial de folhas de *P. gaudichaudianum* coletadas em Santa Maria, RS, apresenta um bom rendimento;
- II. A primavera e o verão são as estações do ano mais adequadas para realização da coleta de folhas, visando à extração do óleo essencial;
- III. O rendimento e a composição do óleo essencial sofrem variação conforme a estação de coleta;
- IV. O rendimento e a composição química do óleo essencial sofrem alterações após o processo de secagem do material vegetal;
- VI. O óleo essencial tem como componentes principais derivados de estrutura fenilpropanóide;
- VII. O óleo essencial apresenta atividade fungitóxica frente aos fungos causadores da podridão da madeira e fitopatogênicos de interesse neste estudo.

4 MANUSCRITOS CIENTÍFICOS

4.1 Manuscrito 1

SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth Submetido à **Ciência Florestal**.

EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE O RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper gaudichaudianum* KUNTH

EFFECT OF SEASONALITY ON THE ESSENTIAL OIL YIELD OF *Piper gaudichaudianum* KUNTH

RESUMO

Piper gaudichaudianum Kunth (Piperaceae) tem ampla distribuição pelo território brasileiro. Além de sua importância ecológica, é utilizada na medicina popular e muitas de suas atividades biológicas foram comprovadas. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da sazonalidade sobre o teor de óleo essencial (OE) em folhas de *Piper gaudichaudianum* e averiguar a possível influência do processo de secagem do material vegetal no rendimento deste extrativo. Deste modo, foram coletadas aleatoriamente folhas de indivíduos de uma população nativa de Santa Maria, RS, Brasil, ao longo de um ano. O OE foi extraído de folhas frescas e secas a temperatura ambiente pelo método de hidrodestilação. Quando verificada a presença de órgãos reprodutivos os mesmos foram extraídos, a fim de examinar a sua influência no rendimento do OE de folhas. Para determinação do teor de umidade (TU%), 20 g de folhas e 10 g de órgãos reprodutivos foram secados separadamente em estufa a 50°C até peso constante. O rendimento de OE de folhas (% m/m) foi calculado para o material fresco com base na massa seca, considerando o TU%, bem como para o material seco à temperatura ambiente. O maior rendimento foi observado na primavera, tanto para o OE de folhas (1,61±0,09%), quanto de órgãos reprodutivos (5,17%). Enquanto que o menor teor de OE em folhas ocorreu no verão (1,32±0,14%), a única estação onde não houve a presença de órgãos reprodutivos. No entanto, quando comparados os rendimentos estes não diferiram na análise, indicando ausência de variabilidade sazonal sobre o teor de OE de folhas desta população. Portanto a coleta deste órgão vegetal pode ser realizada em qualquer época do ano visando à obtenção deste extrativo. Uma vez que não foi verificada diminuição do teor de OE durante o processo de secagem à temperatura ambiente, esse processamento pós-colheita poderá ser adotado.

Palavras-chave: Pariparoba; produto florestal não madeireiro; produção de óleo essencial; processamento pós-colheita.

ABSTRACT

Piper gaudichaudianum Kunth (Piperaceae) is widely distributed throughout Brazil. In addition to its ecological importance, it is used in folk medicine and a great number of its biological activities have been already proved. Thus, the aim of this research was to investigate the effect of seasonality on the content of essential oil (EO) in leaves of *Piper gaudichaudianum* and ascertain the possible influence of the drying process of plant material in the yield of this extractive. Leaves were randomly collected from individuals of a native population in Santa Maria, RS, Brazil, along a year. The EO was extracted from fresh and dried leaves by hydrodistillation. When reproductive organs were observed, they were extracted in order to examine their influence on the yield of leaf EO. To determine the moisture content (MC%), 20 g of leaves and 10g of reproductive organs were dried separately in an oven at 50° C until constant weight. The yield of leaf EO (% w/ w) was calculated for the fresh material based on the dry weight considering the MC%, and for the dried material at room temperature. The highest yield was observed in the spring for EO from the leaves (1.61 ± 0.09%), and from the reproductive organs (5.17%), while lower yields of leaf EO occurred in the summer (1.32 ± 0.14%), the only season which showed no presence of the reproductive organs. However, yields did not differ statistically indicating no seasonal variability of the EO content of the leaves of this population. Therefore, the collection of this plant organ can be performed at any time of year in order to obtain this extractive. Since there was no decrease in the content of EO during the drying process at room temperature, this post-harvest processing can be adopted.

Keywords: Pariparoba; non-timber forest products; essential oil production, post-harvest processing.

INTRODUÇÃO

Os produtos florestais não madeireiros (PFNM) são utilizados na alimentação, produção de medicamentos, cosméticos, construção de moradias, entre outros, sendo fundamentais para a subsistência de muitas comunidades. De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), cerca de 80% da população de países em desenvolvimento usam os PFNM para suprir algumas de suas necessidades vitais (MACHADO, 2008). Adicionalmente, constituem uma oportunidade real para incrementar a renda familiar dos extrativistas (FIEDLER, SOARES, SILVA, 2008), além de tornar a floresta rentável e conseqüentemente valorizando-a (MACHADO, 2008). Entre os PFNM que vem recebendo grande destaque encontram-se os óleos essenciais (OE) (SANTOS et al., 2003), cujo mercado internacional é estimado em 31,9 bilhões de dólares para o ano de 2014 (GOVINDASAMY, ARUMUGAM, SIMON, 2013). No entanto, a participação brasileira ainda é baixa e resulta especialmente da comercialização de OE de frutos cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos de laranja, lima e bergamota (BIASI e DESCHAMPS, 2009; SPEZIALI, 2012).

Piper gaudichaudianum Kunth (Piperaceae), espécie conhecida popularmente por pariparoba ou jaborandi, é encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, Paraguai e Argentina (GUIMARÃES et al., 2014; GUIMARÃES e VALENTE, 2001). A importância do estudo dessa espécie reside no fato dela ser rústica, o que indica bom potencial para projetos de restauração ambiental, propiciando cobertura arbustiva em solos pobres (GUIMARÃES e VALENTE, 2001). O uso da espécie é muito diverso, as folhas frescas em infusão são utilizadas na medicina popular como analgésicas, enquanto que as raízes frescas são usadas como anti-inflamatórias e nos casos de doenças do fígado (DI STASI et al., 2002). As atividades biológicas descritas incluem: fungicida, larvicida, anti-inflamatória e analgésica (LAGO et al., 2004; MORAIS et al., 2007; DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; MOREIRA et al., 2001). Além do mais, o OE de inflorescências (espigas) possui uma importante função ecológica na atração de morcegos da família Phyllostomidae (MIKICH et al., 2003).

Muitos fatores exercem influência tanto no rendimento, quanto na variabilidade da composição química dos OE, como fatores ambientais, edáficos e climáticos, poluição atmosférica, bem como aqueles inerentes à própria planta, como ciclo vegetativo, idade e órgão vegetal. Sendo assim, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de estudos que afirmam as condições e épocas mais propícias para coleta de material vegetal, conduzindo a uma máxima produção e qualidade do extrativo (LIMA, KAPLAN, CRUZ, 2003; GOBBO-NETO e LOPES, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito da sazonalidade sobre o rendimento do OE de folhas de *Piper gaudichaudianum* coletadas em uma população de Santa Maria, RS, Brasil, buscando definir a melhor época de colheita do material vegetal em função da maior produção de OE. Ademais, determinar a influência do processo de secagem sobre os teores de OE, a fim de averiguar se é possível o uso deste processo pós-colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

A coleta de folhas de *Piper gaudichaudianum* foi realizada em uma população nativa, de indivíduos situados no sub-bosque de um remanescente florestal, em local úmido e com pouca luminosidade, localizado em um morro no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, nas imediações da BR-158, Km 318, sob as coordenadas 29°40'11.3" S e 53°46'15.8" O, com altitude em torno de 229 m. As coletas foram realizadas no período da manhã, entre 8h30min e 9h30min. A espécie foi identificada por Daniele Ferreira Monteiro, as exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Ciências Florestais (HDCF) na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e uma duplicata no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), sob registros 6.514 e 584.729, respectivamente. Para a avaliação da influência sazonal sobre o rendimento do OE, foram coletadas folhas de forma aleatória, de indivíduos de toda a população da área em estudo, duas vezes em cada estação, no período de janeiro a dezembro de 2013 (Tabela 1). Nas estações onde houve a presença de órgãos reprodutivos (drupas ou espigas), os mesmos também foram coletados para posterior extração. O termo utilizado em morfologia vegetal para a inflorescência desta espécie é

espiga, uma vez que se refere às flores sésseis (sem pedicelo) (GONÇALVES e LORENZI, 2011), enquanto que para o fruto é drupa (GUIMARÃES e VALENTE, 2001).

TABELA 1: Estações, datas das coletas e órgãos vegetais amostrados de uma população de *Piper gaudichaudianum* Kunth, em Santa Maria, RS, Brasil.

TABLE 1: Seasons, dates of collection and sampled vegetal organs of *Piper gaudichaudianum* Kunth, in Santa Maria, RS, Brazil.

Estações	Início e fim da estação	Data da coleta 1	Data da coleta 2	Órgão vegetal coletado
Verão	21/12-20/03	14 /01/2013	07/03/2013	Folhas
Outono	21/03-20/06	08/04/2013	10/06/2013	Folhas e inflorescências
Inverno	21/06-20/09	17/07/2013	06/09/2013	Folhas e inflorescências
Primavera	21/09-20/12	03/10/2013	04/12/2013	Folhas e frutos

Caracterização do local de coleta

Segundo Maciel Filho (1990), o solo de Santa Maria está assentado sobre litologias das Formações Santa Maria, Caturrita, Botucatu e Serra Geral. O solo da área de coleta possivelmente é do tipo Neossolo Litólico (STRECK et al., 2008).

O clima é classificado como mesotérmico e úmido e, conforme a classificação de Köppen, é definido como tipo fundamental Cfa, caracterizado como subtropical úmido com verões quentes, sem estação seca definida. A temperatura média anual é de 19,1°C e a precipitação pluviométrica mensal oscila entre 120,1 e 126,8 mm ao mês. A região está sujeita a geadas fracas e moderadas, o inverno é ameno, mas sujeito a ondas de frio provocadas pelo deslocamento frequente de anticiclones polares migratórios. A frequência média normal de geadas é de nove dias por ano, entre os meses de abril a outubro (HELDWEIN, BURIOL, STRECK, 2009).

Para o município de Santa Maria a vegetação é classificada como Floresta Estacional Decidual (IBGE, 1992). No local de coleta, de acordo com a nova proposta de Oliveira-Filho (2009), é classificada como Floresta Latifoliada Estacional Rupícola.

Determinação do teor de umidade (TU%)

Para a determinação do teor de umidade, após cada coleta foram separadas aproximadamente 20 g de folhas frescas para secagem em estufa a 50°C, até peso constante (aproximadamente 15 dias). O teor de umidade foi calculado através da fórmula: $\frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa úmida}} \times 100$. A determinação do TU% foi utilizada nos cálculos de rendimento de OE, mais especificamente os valores de massa das folhas frescas em relação à base úmida (MF BU) e à base seca (MF BS) do material vegetal. A massa foliar à base seca (MF BS) foi corrigida através da fórmula: $\text{MF BS} = \frac{(100 - \text{TU}) \times \text{MF BU}}{100}$, em que MF BU é a massa das folhas frescas usadas nas extrações de OE. Esta metodologia também foi aplicada às espigas, no entanto com redução da quantidade amostrada (10 g). Neste caso, a nomenclatura foi adaptada para: massa de órgãos reprodutivos frescos em relação à base úmida (MOR BU) e à base seca (MOR BS).

Extração do óleo essencial (OE)

Folhas e órgãos reprodutivos frescos, bem como folhas secas por 15 dias à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram fragmentados e submetidos separadamente à hidrodestilação para a extração do OE, em aparelho tipo Clevenger modificado, durante 3 horas. Neste método, o óleo destilado é retido em um tubo de vidro e a fase aquosa retorna automaticamente para o balão de destilação, sendo reutilizada (SARTOR, 2009). A extração de folhas foi realizada em triplicata, enquanto que no caso de órgãos reprodutivos, devido à pequena quantidade de material disponível, foi realizada apenas uma extração a cada

coleta. Como o OE se misturou ao hidrolato, este foi submetido à extração líquido-líquido em funil de separação, utilizando como solvente hexano previamente destilado (SILVA et al., 2009). Após a secagem da fração hexânica com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), o solvente foi evaporado em rotaevaporador a 30°C , para obtenção do OE. O teor de OE (% m/m) de folhas foi obtido a partir da massa de OE, determinada em balança analítica, em relação à massa foliar à base úmida (MF BU), massa foliar à base seca (MF BS) e massa foliar seca à temperatura ambiente (FS). Cálculo equivalente foi aplicado ao OE de órgãos reprodutivos, que foi obtido apenas de material fresco, fornecendo o rendimento em relação à base úmida (MOR BU) e à base seca (MOR BS). A densidade (g/mL) do OE foi calculada através da fórmula: $\frac{\text{massa de OE (g)}}{\text{volume de OE (mL)}}$. Os OE foram armazenados em frascos de vidro âmbar, vedados e conservados a -4°C .

Análise estatística

Os dados de rendimento de MF BU, MF BS e FS, não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Portanto, os dados de rendimento de primavera e verão foram transformados para logaritmo neperiano (\ln). Como no caso do outono e inverno não foi possível a transformação, os dados foram submetidos à estatística não paramétrica. Para verificação da normalidade e homogeneidade de variâncias, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados de rendimento de MF BU, MF BS e FS foram comparados dentro da estação e entre estações pela análise de variância (ANOVA) de uma via, com os testes Tukey, Mann-Whitney e teste- t , que são apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM). As análises foram realizadas no *software* SigmaPlot, versão 11.0, com $p < 0,05$. Para a definição de grupos, os dados de rendimento obtidos para os OE (quatro estações, duas coletas por estação, extração em triplicata, perfazendo um total de $n = 24$ para MF BU, MF BS e FS) foram submetidos à Análise Hierárquica de Cluster (AHC), com distância Euclidiana como medida de dissimilaridade e o método de ligação pela média UPGMA (GOTELLI; ELLISON, 2011) e obtendo o coeficiente de correlação cofenética (ccc) que indica que quanto mais próximo de (1,0) o método de agrupamento foi adequado (ROHLF, 1970), com o auxílio do *software* R, versão 2.15.2, com o pacote “*vegan*” (OKSANEN et al., 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento médio obtido para o OE de folhas frescas (MF BS) de *Piper gaudichaudianum* em um ano de coleta foi igual a $1,44 \pm 0,06\%$, enquanto que para folhas secas (FS) o rendimento médio anual correspondente foi de $1,31 \pm 0,06\%$. O OE extraído de folhas frescas (MF BS) não apresentou variabilidade sazonal significativa em relação ao rendimento ($p < 0,05$). Os dados obtidos para os rendimentos de MF BU diferem estatisticamente de MF BS e FS, em cada período sazonal (Figura 1). A média da densidade do OE de folhas frescas (MF BU) e FS foi de aproximadamente $1,08 \text{ g/mL}$ para ambas as amostras (Tabela 2). Este dado sugere que a composição química das FS possivelmente não sofreu alterações durante o processo de secagem. O dado de densidade do OE é relevante, pois é próximo ao da densidade da água (1 g/cm^3), o que dificulta a separação do OE e da água em duas fases durante o processo de extração. Por outro lado, a elevada densidade também pode ser uma vantagem, por exemplo, quando é necessário homogeneizar amostras de OE em meios aquosos como o ágar, no caso da avaliação do seu potencial antifúngico (SOIDROU et al., 2013; BURT, 2004).

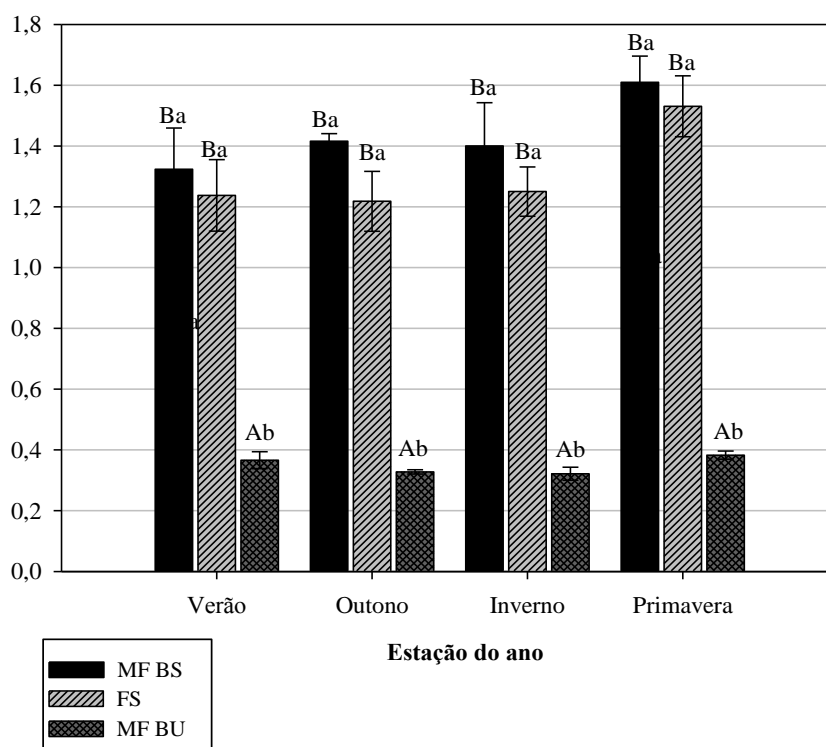


FIGURA 1: Rendimentos médios (%) e EPM dos óleos essenciais de folhas frescas à base seca (MF BS), à base úmida (MF BU) e de folhas secas (FS) de *Piper gaudichaudianum* Kunth, nas quatro estações do ano de 2013 (duas coletas por estação), em triplicata. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas de rendimento entre as estações e letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os rendimentos dentro da estação, pelos testes de Tukey, Mann-Whitney e teste-*t*, $p < 0,05$.

FIGURE 1: Average yields (%) and SEM of the essential oils from fresh leaves based on dry weight (MF BS), fresh weight (MF BU) and of dry leaves (FS) of *Piper gaudichaudianum* Kunth, in the four seasons of 2013 (two collections per season), in triplicate. Uppercase letters different indicate significant differences of yields between seasons and lowercase letters different indicate significant differences between yields in the same season, based on Tukey test, Mann-Whitney and test-*t*, $p < 0.05$.

Mesmo com ausência de significância estatística, o valor médio de rendimento na primavera para o OE de folhas frescas (MF BS) de *Piper gaudichaudianum* foi maior que nas demais estações, sendo de $1,61 \pm 0,09\%$, coincidindo com o valor máximo de rendimento de OE em frutos (MOR BS) de $5,01\%$ (Figura 2). O OE de órgãos reprodutivos foi extraído a fim de verificar a possível influência de sua presença sobre o rendimento do OE de folhas, uma vez que foi descrita a ocorrência de realocação de reservas na dependência do período vegetativo da planta (AMARAL et al., 2014). A presença de órgãos reprodutivos em três estações não alterou o rendimento do OE de folhas e apresentou crescente rendimento até o período máximo de floração e frutificação (Figura 2). Estes resultados estão de acordo com dados da literatura, uma vez que Rodig e Poser (1990) verificaram um aumento de cerca de 20% no rendimento de OE de folhas de *Piper gaudichaudianum* coletadas em setembro no estado do Rio Grande do Sul. Este aumento nos teores de constituintes voláteis pode estar relacionado ao aumento do metabolismo da planta, decorrente do florescimento da espécie nesta época do ano. Conforme Gobbo-Neto e Lopes (2007), o rendimento dos OE é mais susceptível ao ciclo vegetativo que às variações climáticas, o que pode explicar a tendência no aumento do rendimento desse extrativo em inflorescências e frutos, do outono em direção à primavera. Em contrapartida, o rendimento do OE de folhas no verão foi o menor observado nesse estudo ($1,32 \pm 0,14\%$),

período este em que a planta não se encontrava em estágio reprodutivo e/ ou a presença de inflorescências era pequena e estava em fase inicial de formação, não sendo possível sua coleta. Além disso, em um plantio da espécie *Piper aduncum* L. em Manaus (Brasil), o rendimento de OE foi menor na fase vegetativa (COSTA et al., 2008). O teor de umidade das folhas foi o menor no verão (73,59%) (Tabela 2), uma vez que se trata de um período mais seco, de temperaturas elevadas e baixa disponibilidade hídrica, o que segundo Bernier et al. (1993) é um dos fatores que interfere no processo de floração.

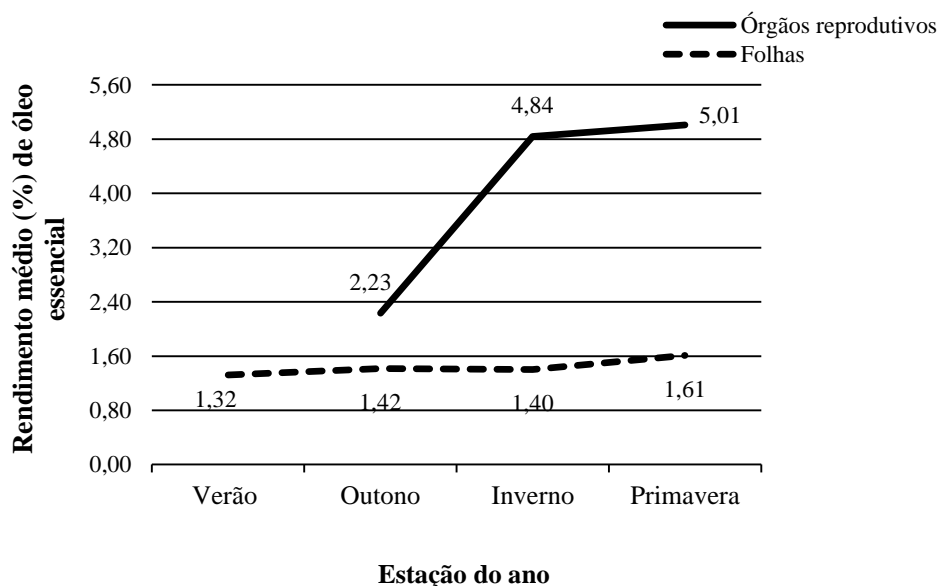


FIGURA 2: Representação gráfica do rendimento sazonal do óleo essencial de folhas frescas e órgãos reprodutivos (outono e inverno: inflorescências; primavera: frutos), ambos à base seca (MF BS e MOR BS, respectivamente) de *Piper gaudichaudianum*.

FIGURE 2: Graphical representation of seasonal yield of the fresh leaves essential oils and reproductive organs (autumn and winter: inflorescences; spring: fruits), both based on dry weight (MF BS and MOR, respectively) of *Piper gaudichaudianum*.

TABELA 2: Valores médios dos rendimentos (%) de OE, considerando massa fresca à base seca (MF BS), massa fresca à base úmida (MF BU) e folhas secas (FS) de seis amostras por estação, no ano de 2013 (duas coletas por estação, em triplicata), bem como densidade do OE (g/mL) de folhas MF BU e FS e teor de umidade (TU %). EPM: erro padrão da média.

TABLE 2: Average yields (%) of EO considering fresh weight on dry basis (MF BS), on fresh basis (MF BU) and of dry leaves (FS) of six samples by season in 2013 (two collections, in triplicate), as well as OE density (g/mL) of leaves MF BS and moisture content (% TU); SEM: mean standard error.

Observações	Estações				Média ± EPM
	Verão	Outono	Inverno	Primavera	
MF BS (m/m %)	1,32	1,42	1,40	1,61	1,44 ± 0,060
MF BU (m/m %)	0,37	0,33	0,32	0,38	0,35 ± 0,010
FS (m/m %)	1,24	1,22	1,25	1,53	1,31 ± 0,060
Densidade do OE MF BU(g/mL)	1,06	1,09	1,10	1,07	1,082 ± 0,008
Densidade do OE FS (g/mL)	1,07	1,11	1,09	1,03	1,086±0,010
TU (%)	73,59	76,75	75,77	76,03	75,90 ± 0,680

Foram encontrados dados referentes ao rendimento do OE para folhas de três espécies do gênero *Piper*, entre elas *Piper gaudichaudianum*. Em Atalanta, Santa Catarina (Brasil), as folhas apresentaram teores entre 0,24 a 0,46% (SANTOS, 2009), inferiores aos relatados nesse trabalho. Adicionalmente, Rodig e Poser (1990) observaram que em uma população de Sapiroanga (RS) o rendimento do OE de folhas foi de 0,30% para o mês de maio. Já Morais et al. (2007) verificaram em Rondônia (Brasil) o teor de 0,01%, para o OE de folhas.

O rendimento médio de OE (MF BS) foi comparado aos dados correspondentes de espécies do mesmo gênero. Desta maneira, os resultados aqui descritos são similares e intermediários aos teores de OE relatados para diferentes populações de *Piper aduncum* L. na região Amazônica (Brasil), que variaram de 1,2 a 3,3% (MAIA et al., 1998) e para quatro populações do Distrito Federal (Brasil), que foram de 0,66 a 1,30% (POTZERNHEIM et al., 2012). Entretanto, os rendimentos obtidos para o OE de folhas de *Piper gaudichaudianum* são superiores aos encontrados por Oliveira et al. (2013), em Montes Claros e Bocaiuva, para OE de plantas cultivadas e nativas em período de floração (0,3 a 0,7%) e ao de Mesquita et al. (2005), obtido para *Piper aduncum* do Parque Estadual de Rio Doce (0,7%), ambos no estado de Minas Gerais. Os valores de rendimento do OE obtidos nesse estudo também são superiores aos descritos para as espécies *Piper capense* L. f. (0,2%) em Kakamega, Quênia (MATASYOH et al., 2011), *Piper humaytanum* Yunck. (0,015%), *Piper permucronatum* Yunck. (0,02%) e *Piper hostmanianum* (Miq.) C. DC (0,015%) em Rondônia (MORAIS et al., 2007). Outras espécies apresentaram os rendimentos inferiores para o OE de folhas, como *Piper malacophyllum* (C. Presl) DC. (0,22 a 0,47%) e *Piper mikanianum* (Kunth) Steud. (0,66 a 0,84%) em Santa Catarina (SANTOS, 2009), *Piper amalago* L. (0,6 a 0,7 %), *Piper hispidum* Kunth (0,2 a 0,3%) e *Piper arboreum* Aubl. (0,3 a 1,2%) em Minas Gerais (MESQUITA et al., 2005). Já esses últimos autores descreveram teores de OE superiores aos encontrados no presente trabalho para as espécies *Piper. cernuum* Vell. (0,6 a 1,7%), *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. (2,0 %) e *Piper vicosanum* Yunck. (2,1 a 2,3%).

Salienta-se a importância da descrição dos fatores ambientais observados em cada local de coleta, pois pequenas modificações no ambiente podem ocasionar grandes alterações no rendimento do extrativo. Os indivíduos de *Piper gaudichaudianum* amostrados neste estudo estavam no sub-bosque da floresta, recebendo pouca luminosidade, sob um solo raso e rochoso. Segundo Maia et al. (1998), os indivíduos que ocorrem na Mata Atlântica são tolerantes à sombra, porém apresentam crescimento bem mais rápido em locais sem dossel da floresta. Este aspecto é particularmente relevante quando se pretende fazer a reprodução da espécie para obtenção de seu OE para uso comercial. Vários fatores exercem influência sobre o rendimento e composição química dos extrativos das plantas, entre eles a disponibilidade hídrica e nutricional, sazonalidade, altitude, poluição atmosférica, etc. Mesmo existindo um domínio genético, a expressão gênica pode sofrer modificações em consequência da interação de processos bioquímicos, evolutivos, fisiológicos e ecológicos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Os rendimentos obtidos de FS foram comparados com os de MF BS, observando-se que não houve diferença significativa entre ambos para cada estação do ano. Essa informação é confirmada pela análise hierárquica de Cluster, realizada com os dados de todos os rendimentos, sendo obtido um dendrograma com dois grupos: **A** (MF BU) e **B** (MF BS e FS) (Figura 3). A correlação cofenética da análise resultou em 0,96 indicando que o agrupamento foi adequado, portanto houve perda de massa por dessecação das folhas, porém não ocorreu a diminuição do teor de OE. Uma vez que os rendimentos MF BS e FS foram superiores ao MF BU, o processo de secagem à temperatura ambiente pode ser recomendado como operação preliminar à extração.

Em espécies produtoras de OE, estes podem ser produzidos e armazenados em estruturas secretoras internas (células parenquimáticas diferenciadas, bolsas lisígenas e canais oleíferos) ou externas (tricomas glandulares). Na família Piperaceae, os extrativos lipofílicos são encontrados em células parenquimáticas diferenciadas localizadas internamente (BIASI e DESCHAMPS, 2009), o que fornece uma provável explicação para o fato do teor de OE não ter sido afetado pela secagem. Estudos morfo-anatômicos realizados com folhas de *Piper gaudichaudianum* também indicam a presença de uma ou duas camadas subepidérmicas de natureza parenquimática (parênquima paliçádico) onde ocorrem os idioblastos oleíferos, localizados na face abaxial do limbo e no bordo (ALBIERO et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2008). Estes idioblastos secretores são células individualizadas de composição química distinta das células que as cercam; apresentam formato variável e são classificadas de acordo com as substâncias sintetizadas (CARDOSO, 2011). A presença de estruturas secretoras internas é o motivo pelo qual o OE contido nas

mesmas possui uma volatilidade diferenciada em comparação ao presente em estruturas secretoras externas, que dependendo do método de secagem, são intensamente afetados resultando em diminuição do teor de OE (VENSKUTONIS, 1997; HAMOROUNI SELLAMI et al., 2012).

É recomendável considerar também as demais vantagens que o processo de secagem oferece. Estudos prévios realizados com *Piper hispidinervum* C. DC. relataram uma maior concentração do OE em folhas, em torno de 98%, seguidas de ramos jovens. Essas apresentaram umidade entre 50 a 70%, que deve ser retirada antes da destilação do OE, de modo que não ocorram riscos de fermentação da biomassa, cujo efeito é prejudicial ao rendimento e a qualidade do OE (FIGUEIREDO et al., 2004). Estes autores citam a secagem à sombra com ventilação forçada como o melhor método. No entanto, os resultados do presente estudo indicam que a secagem à sombra, em temperatura ambiente também é um método adequado. Além do mais, não é necessário processar o material vegetal imediatamente pós-colheita, o que seria particularmente problemático no caso da extração de grandes quantidades de matéria prima, pois é possível fazer seu armazenamento após uma secagem apropriada.

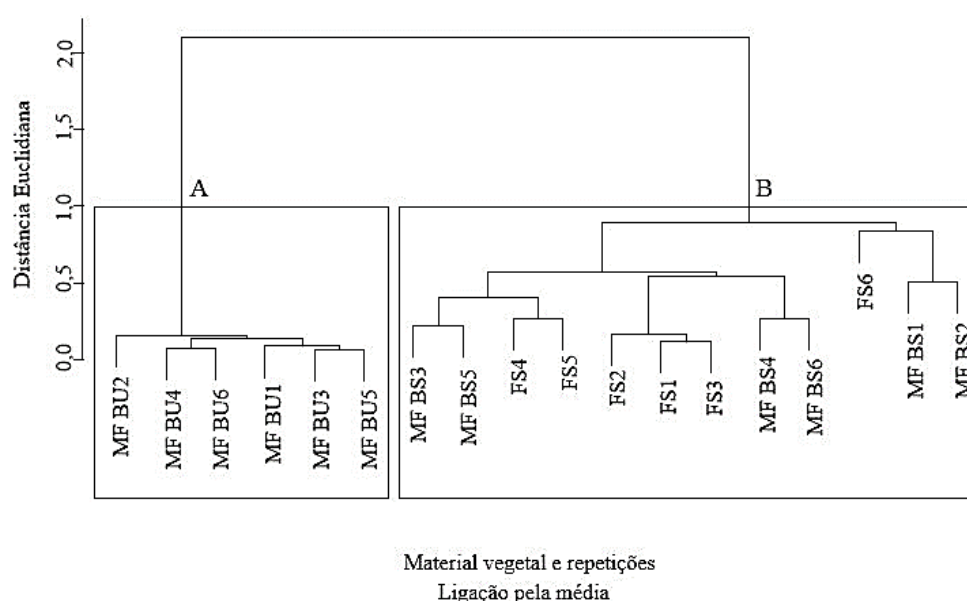


FIGURA 3: Dendrograma do rendimento (%) de todas as amostras do óleo essencial de folhas de *Piper gaudichaudianum*, considerando MF BU, MF BS e FS (duas coletas em quatro estações no ano de 2013, com extrações em triplicata), através do método de ligação pela média e com a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade.

FIGURE 3: Dendrogram of yield (%) of all samples of the essential oil of *Piper gaudichaudianum*, considering MF BU, MF BS and FS (two collections in the four seasons of 2013, and extractions in triplicate) through the method of average linkage and the Euclidean distance as a measure of dissimilarity.

Pesquisas envolvendo a composição química do OE de *Piper gaudichaudianum*, bem como a comparação entre diferentes métodos de secagem devem ser realizadas, a fim de se otimizar a obtenção deste extrativo. Não obstante, esta espécie pode ser considerada promissora, pois apresenta potencial para a produção de OE e, portanto, pode ser utilizada no enriquecimento de ambientes perturbados, também com possibilidade de se tornar uma opção adicional de renda.

CONCLUSÕES

Embora o melhor rendimento do OE de folhas de *Piper gaudichaudianum* tenha sido observado na primavera, período em que a planta encontrava-se no estágio de maior maturação da frutificação (setembro a dezembro), esse extrativo não apresentou variação sazonal do rendimento para a população estudada no município de Santa Maria, RS. Portanto, a coleta de folhas para a obtenção desse extrativo pode ser realizada em qualquer época do ano. Além disso, o material vegetal pode ser submetido ao processo de secagem à temperatura ambiente, sem comprometer o rendimento do extrativo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq pelas bolsas e pelo financiamento concedido, bem como ao Engenheiro Florestal Maurício Figueira pela colaboração nas coletas do material vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense Jornais Científicos**. v. 24, n. 4, p. 550-554. 2005.
- AMARAL, L. P. et al. Seasonal influence on the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Aceito para publicação em janeiro de 2014.
- BERNIER, G. et al. Physiological Signals That Induce Flowering. **The Plant Cell**. v. 5, p. 1147-1155. 1993.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas – do cultivo à produção de óleo essencial**. Ed. 1. Curitiba/PR, Ed. Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160p.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**. n. 94, p. 223-253. 2004.
- CARDOSO, P. R. **Estruturas secretoras em plantas**. 2011. Instituto de Botânica – Ibt. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Estágio de docência CAPES. 2011. 16 p.
- COSTA, I. O. V. L. et al. Produção de Biomassa (Folhas e Caules) e Rendimento de Óleo Essencial de *Piper aduncum* L., em Função de Épocas de Colheita, nas Condições de Manaus – AM. **Anais.. da III Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental**, p. 89, 2008.
- DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Ed. 2. São Paulo SP. Ed. UNESP. 2002. 604p.
- FIEDLER, N. C.; SOARES, T. S.; SILVA, G. F. Produtos Florestais Não Madeireiros: Importância e Manejo Sustentável da Floresta. **Revista Ciências Exatas e Naturais**. v. 10, n. 2, 2008.
- FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**. n. 23, p. 213-226. 2008.
- FIGUEIREDO, F. J. C. et al. **Secagem da biomassa aérea de pimenta longa sob condições de laboratório e de campo**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental – Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 32, p. 45. 2004.
- GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal –organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. Ed. 2. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2011. 512p.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Porto Alegre: Artmed. p. 447-448. 2011. 527p.
- GUIMARÃES, E. F. et al. Piperaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB012738>]. 2014. Acesso em: 18 de maio de 2014.

- GOVINDASAMY, R.; ARUMUGAM, S.; SIMON, J. E. An Assessment of the Essential Oil and Aromatic Plant Industry with a Focus on Africa. **African Natural Plant Products**, v. 2, cap. 18, p. 289–321, 2013.
- GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. **Piperáceas – Piper**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Santa Catarina. 2001. 103p.
- HAMROUNI SELLAMI, I. et al. Drying sage (*Salvia officinalis* L.) plants and its effects on content, chemical composition, and radical scavenging activity of the essential oil. **Food and Bioprocess Technology**. v. 5, p. 2978-2989, 2012.
- HELDWEIN, A. B.; BURIOL, G. A.; STRECK, N. A. O clima de Santa Maria. **Ciência & Ambiente**. n. 38, p. 43-58, 2009.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro. n. 1, 1992. 92p.
- LAGO, J. H. G. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. shaerospermum*. **Journal of Natural Products**. v.67, n. 11. p. 1783–1788. 2004.
- LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Revista Floresta e Ambiente**. v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.
- MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 13, p. 269-272. 1998.
- MACHADO, F. S. Manejo de Produtos Florestais Não Madeireiros: um manual com sugestões para o manejo participativo em comunidades da Amazônia. Rio Branco, Acre: PESACRE e CIFOR, p. 13-15, 2008.
- MACIEL FILHO, C. L. **Carta Geotécnica de Santa Maria**. Santa Maria: Imprensa Universitária. p. 24. 1990.
- MATASYOH, J. C. et al. Chemical composition and larvicidal activity of *Piper capense* essential oil against the malária vector, *Anopheles gambiae*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v. 14, p. 26-28. 2011.
- MESQUITA, J. M. O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 6-12, 2005.
- MIKICH, S. B. et al. Attraction of the fruit-eating bat *Carollia perspicillata* to *Piper gaudichaudianum* essential oil. **Journal of Chemical Ecology**. v. 29, n. 10, p. 2380-2383, 2003.
- MOREIRA, D. L. et al. Estudos fitoquímicos e farmacológico de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**. n. 82, p. 29–32. 2001.
- MORAIS, S. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 35, p. 670-675. 2007.
- OLIVEIRA, G. L. et al. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* L. from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.23, p.743-753. 2013.
- OLIVEIRA-FILHO, A. T. Classificação das Fitofisionomias da América do Sul-Cisandina Tropical e Subtropical: proposta de um novo sistema – prático e flexível – ou uma injeção a mais de caos? **Rodriguésia**. v. 2, n. 60, p. 237-258. 2009.
- OKSANEN, J. et al. **Community Ecology Package**. 2013.
- POTZERNHEIM, M. C. L. et al. Chemical characterization of essential oil constituents of four populations of *Piper aduncum* L. from Distrito Federal, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 42, p. 25-31. 2012.
- RODIG, L. R.; POSER, G. L. V. Constituintes químicos de espécies da família Piperaceae. **Acta Biologica Leopoldensia**. p. 57-64. 1990.
- ROHLF, F. J. Adaptative hierarquical clustering schemes. **Systematic Zoology**. v.19, n. 1. p. 58-82, 1970.
- R. DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. RL:<http://www.Rproject.org/>. 2012.
- SANTOS, T. G. **Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de três espécies do gênero Piper e de Baccharis semiserrata DC**. 2009. 117p. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

- SANTOS, A. J. et al. Produtos Não Madeireiros: conceituação, classificação, valoração e mercados. **Revista Floresta**. v. 33, n. 2, p. 215-224. 2003.
- SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009. 75p. Dissertação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- SILVA, R. S. et al. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**. v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.
- SOIDROU, S. H. et al. Fungicidal activity of four essential oils from *Piper capense*, *Piper borbonense* and *Vetiveria zizanoides* growing in Comoros against fungi decay wood. **The Journal of Essential Oil Research**. v. 25, n. 3, p. 216-223. 2013.
- SPEZIALI, M. G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do “cheiro”. **Química Nova**. v. 35, n. 4, p. 861-864. 2012.
- STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. Ed. 2. Porto Alegre: EMATER – RS – ASCAR. p. 86-88. 2008. 222p.
- VENSKUTONIS, P. R. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). **Food Chemistry**, v. 59, n. 2; p. 219-227, 1997.

4.2 Manuscrito 2

SCHINDLER, B.; FIGUEIRA, M.; HEINZMANN, B. M. Caracterização sazonal da composição química do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). A ser submetido.

Caracterização sazonal da composição química do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae)

Bianca Schindler^a, Maurício Figueira^b e Berta Maria Heinzmann^{a,c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

^bEngenheiro Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

^cDepartamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

***Correspondência:**

Prof.^a Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima n° 1000, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, Brasil, BR-97105-900. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com, Telefone: +55 55 3220 9674, Fax: +55 55 3220 8336.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a composição química do óleo essencial (OE) de folhas e órgãos reprodutivos de indivíduos de *Piper gaudichaudianum* de uma população nativa de Santa Maria, RS, Brasil. Folhas foram coletadas duas vezes em cada estação durante um ano, enquanto que, no caso de inflorescências e frutos, a coleta foi realizada apenas uma vez quando presentes (Jan-Dez / 2013). Os OE foram obtidos por hidrodestilação por 3h, separadamente a partir de folhas frescas e secas à temperatura ambiente, bem como de órgãos reprodutivos no estado fresco. As 20 amostras de OE foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC), em triplicata. Realizou-se uma análise de agrupamento hierárquico para observar uma possível formação de grupos químicos (GQ) e análise dos componentes principais (ACP) para verificar a coesão entre os grupos. O fenilpropanóide dilapiol foi o constituinte químico majoritário dos OE em todas as estações e órgãos vegetais estudados. As amostras de OE desta população foram divididas em dois GQ pela AHC e ACP evidenciando a variabilidade na composição química entre diferentes órgãos vegetais, no entanto não ocorreu variabilidade química decorrente da sazonalidade e das fenofases. Uma vez que a secagem das folhas não alterou a composição química dos OE, esse procedimento pós-colheita pode ser utilizado sem comprometer a qualidade do extrativo.

Palavras-chave: Pariparoba, extrativo vegetal, planta medicinal, processamento pós-colheita.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the chemical composition of the essential oil (EO) of leaves and reproductive organs of *Piper gaudichaudianum* individuals of a native population in Santa Maria, RS, Brazil. Leaves were collected twice per plant during the year, while in the case of inflorescences and fruits, the collection was performed only once when present (Jan-Dec / 2013). The EO were obtained by hydrodistillation for 3h separately from fresh and dried leaves at room temperature as well as from fresh reproductive organs. The 20 EO samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) in triplicate. A hierarchical cluster analysis was performed to observe a possible formation of chemical groups (CG) and principal components analysis to verify the cohesion between the groups. The phenylpropanoid dillapiol was the major chemical constituent of EO in all seasons and plant organs studied. The EO samples of this population were divided into two CG by PCA and HCA, showing the variation in chemical composition between different plant organs, however there was no chemical variability due to seasonal and phenological phases. Since drying of the leaves did not alter the chemical composition of EO, this post-harvest procedure can be used without compromising the quality of the extractive.

Keywords: Pariparoba, vegetable extraction, medicinal plant, post-harvest processing.

1 INTRODUÇÃO

As espécies da família Piperaceae são bastante comuns em florestas brasileiras e possuem importância comercial, medicinal e ecológica (PARMAR et al, 1997). Classificado nessa família, o gênero *Piper* é conhecido pela grande diversidade de constituintes químicos, entre os quais podemos citar monoterpenóides e sesquiterpenóides (CYSNE et al., 2005; MESQUITA et al., 2005). Também são encontrados derivados de alcalóides, flavonas, além de fenilpropanóides como miristicina, asaricina, dilapiol e safrol (PARMAR et al. 1997; SANTOS et al., 2001; ABREU et al., 2002).

Piper gaudichaudianum Kunth popularmente conhecido por pariparoba ou jaborandi, é encontrado em todas as regiões do Brasil, também no Paraguai e Argentina (GUIMARÃES et al., 2014; GUIMARÃES, VALENTE, 2001). A espécie apresenta metabólitos secundários bioativos descritos na literatura, como derivados de núcleo cromona e isômeros prenilados derivados do ácido benzóico obtidos do extrato etanólico de folhas, para o qual foi detectada atividade antimicrobiana frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida tropicalis* (PUHL et al., 2011). Além disso, o OE de folhas contendo como majoritários os sesquiterpenos α -humuleno (23,42%), β -cariofileno (15,64%), viridifloreno (8,08%), β -selineno (6,56%), seychelleno (4,89%) e δ -cadineno (4,43%) (MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010) apresentou atividade antifúngica contra *Candida neoformans* e *C. krusei*. Também para o OE de folhas, apresentando como constituintes majoritários viridiflorol (27,50%), aromadendreno (15,55%), β -selineno (10,50%) e selin-1-en-4- α -ol (8,48%) (MORAIS et al., 2007), foi descrita atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* L. ($IC_{50}=121 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Estudos relacionados com a caracterização e efeito da sazonalidade na composição química do OE não foram realizadas para *Piper gaudichaudianum* no RS até o presente momento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi o estudo da composição química dos OE de folhas frescas e secas, além de órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos) de *Piper gaudichaudianum* Kunth coletados aleatoriamente de indivíduos de uma população nativa no município de Santa Maria, ao longo das quatro estações em um ano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e local de coleta

Folhas e órgãos reprodutivos foram coletados aleatoriamente de indivíduos de uma população nativa de *P. gaudichaudianum* em um remanescente florestal no município de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. Os indivíduos se encontravam no sub-bosque da floresta, sob as coordenadas 29°40'11,3" S e 53°46'15,8" O, com altitude em torno de 229 m. A espécie foi identificada por Daniele Ferreira Monteiro, as exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Ciências Florestais (HDCF) na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e uma duplicata foi enviada ao Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), sob registros 6.514 e 584.729, respectivamente. As coletas foram realizadas no período da manhã, entre 8h30min e 9h30min, no período de janeiro a dezembro de 2013.

A vegetação para o município de Santa Maria é classificada como Floresta Estacional Decidual (IBGE, 1992). Para caracterização do local de coleta, optou-se pela nova proposta de Oliveira-Filho (2009), sendo classificada como Floresta Latifoliada Estacional Rupícola. O clima é classificado como mesotérmico e úmido, do tipo Cfa, caracterizado como subtropical úmido com verões quentes, sem estação seca definida. A temperatura média anual é de 19,1°C e a precipitação pluviométrica mensal encontra-se entre 120,1 mm e 126,8 mm. A região está sujeita a geadas fracas e moderadas, o inverno é ameno, mas sujeito a ondas de frio provocadas pelo deslocamento frequente de anticiclones polares migratórios (HELDWEIN, BURIOL, STRECK, 2009). Os dados meteorológicos foram obtidos do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia) para caracterizar o ano de estudo (Tabela 1). Segundo Maciel Filho (1990), o solo de Santa Maria está assentado sobre litologias das Formações Santa Maria, Caturrita, Botucatu e Serra Geral. O local de coleta possui o solo do tipo Neossolo Litólico (STRECK et al., 2008).

Para verificar a possível variabilidade sazonal na composição química do OE de folhas e órgãos reprodutivos dos indivíduos amostrados, foram realizadas coletas nas quatro estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), perfazendo um total de oito coletas. Também foi verificada a composição química do OE de folhas quando secas à temperatura ambiente durante 15 dias.

Desta forma, foram obtidas 20 amostras de OE, representadas pelas siglas: VeFF1, VeFF2, VeFS1, VeFS2, OuFF1, OuFF2, OuFS1, OuFS2, OuINF2, InFF1, InFF2, InFS1, InFS2, InINF2, PrFF1, PrFF2, PrFS1, PrFS2, PrFR1, PrFR2, correspondendo às estações (Ve: verão, Ou: outono, In: inverno e Pr: primavera), ao órgão vegetal (FF: folhas frescas; FS: folhas secas; INF: inflorescências e FR: frutos) e número de coleta (1 ou 2).

O termo utilizado na morfologia vegetal para a inflorescência desta espécie é espiga, que se refere às flores sésseis (sem pedicelo) (GONÇALVES, LORENZI, 2011) e para os frutos é drupa (GUIMARÃES, VALENTE, 2001).

Tabela 1–Dados meteorológicos do ano de 2013 para o município de Santa Maria, RS, Brasil.

Média mensal	Meses do ano e estações											
	Verão			Outono			Inverno			Primavera		
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Temp. mín. (°C)	18,2	19,1	16,4	14,4	11,0	9,5	8,7	8,1	12,7	14,2	17,5	19,7
Temp. máx. (°C)	30,3	29,9	26,6	26,4	21,4	18,9	20,0	19,3	23,1	26,2	28,7	32,1
Precip. (mm)	145,3	97,7	188,6	147,4	71,6	81,6	113,5	163,8	69,2	108,7	294,5	92,8
UR (%)	75,8	80,9	83,8	83,5	87,2	89,7	86,8	83,1	78,0	74,0	72,7	70,1

Legenda: Temp. mín (°C): temperatura mínima; Temp. máx. (°C): temperatura máxima; Precip. (mm): precipitação; UR (%): umidade relativa.

2.2 Obtenção do OE e análise da composição química

As folhas e órgãos reprodutivos frescos, bem como folhas secas por 15 dias à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram fragmentados e submetidos separadamente à hidrodestilação para a extração do OE, em aparelho tipo Clevenger modificado, durante 3 horas. Neste método, o óleo destilado é retido num tubo de vidro graduado e a fase aquosa retorna automaticamente para o balão de destilação, sendo reutilizada (SARTOR, 2009). A extração de folhas frescas e secas foi realizada em triplicata, enquanto que órgãos reprodutivos foram extraídos apenas uma vez a cada

coleta, devido à pequena quantidade de material disponível. Como o OE se misturou ao hidrolato, este foi submetido à extração líquido-líquido em funil de separação, utilizando como solvente hexano previamente destilado (SILVA et al., 2009). Após a secagem da fração hexânica com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), o solvente foi evaporado em rotaevaporador a 30°C , para obtenção do OE. Os OE obtidos foram armazenados em frascos de vidro âmbar, vedados e conservados a -4°C . Os vials para a análise da composição química foram preparados com 2 μL de OE e 1 mL de hexano grau pesticida.

A identificação dos constituintes do OE foi baseada em seus índices de retenção e espectro de massas, sendo realizadas através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em um sistema hifenado Agilent 7890A equipado com um detector seletivo de massas série 5975C. Parâmetros de análise: modo split (1:100, v/v); gás carreador: He (fluxo de 1 mL/min); coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard, 5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 μm); programa de temperatura do forno: 40°C (Ti) por 4 min, $40\text{-}320^\circ\text{C}$, $4^\circ\text{C}/\text{min}$; temperatura do injetor: 250°C ; temperatura da interface: 250°C ; energia de ionização: 70 eV; banco de dados: Nist, 2010. Os componentes dos OE foram identificados com base em comparações dos índices de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C32), injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, e com base nos espectros de massas obtidos de literatura relevante (ADAMS, 2009; NIST, 2010).

Os constituintes dos OE foram determinados quantitativamente através de um sistema Agilent 7890A de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC), em triplicata. Os parâmetros de análise equivalem aos citados anteriormente, com exceção dos seguintes: modo splitless; temperatura do injetor e do detector: 300°C .

2.3 Análise multivariada

Para investigar a possível formação de grupos químicos com os dados da composição química dos OE, foram utilizadas técnicas multivariadas: Análise de Agrupamento Hierárquico de Cluster (AHC) com a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade e o método de ligação pela média UPGMA (VALENTIN, 2000), obtendo-se o coeficiente de correlação cofenética (ccc)

que indica a adequabilidade do agrupamento formado através da proximidade de 1,0 (ROHLF, 1970). Também foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP), para verificar quais variáveis (constituintes) influenciaram na formação dos grupos (GOTELLI, ELLISON, 2011). A análise da matriz dos dados foi formada por 20 amostras (objetos) de OE e nove constituintes (descritores) com concentrações > 3,0% em pelo menos em uma amostra, uma vez que, a utilização de mais descritores gerou ruídos e não alterou os Componentes Principais (CP). Ambas as análises foram realizadas no programa estatístico R, versão 2.15.2, os pacotes utilizados nestas análises foram “*vegan*” (OKSANEN et al., 2013) e “*stats*” (R CORE TEAM, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise por CG-EM e CG-DIC, foram identificados e quantificados 24 constituintes nas 20 amostradas de OE, perfazendo 92,8-100% da composição química total (Tabela 2). O fenilpropanóide dilapiol é o constituinte predominante no OE de todas as amostras e estações do ano. A miristicina foi observada apenas em órgãos reprodutivos (6,2-11,9%). Em folhas frescas do verão e do inverno o dilapiol apresentou as maiores percentagens (68,8-69,2%). Nas inflorescências em desenvolvimento (inverno) e em frutos (primavera) as percentagens desse constituinte são as mais elevadas, com 96,8-99,7%, enquanto que no período inicial florescimento (outono) e final de amadurecimento dos frutos (primavera) os valores encontrados foram de 89,3 e 93,1%, respectivamente. Observa-se que há uma pequena variabilidade sazonal quantitativa deste constituinte no OE de órgãos reprodutivos, porém não sendo significativa ($p > 0,05$).

Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos compreendem 22,5-36,4% e os oxigenados 0,2-5,8%, sendo que esta última classe ocorreu apenas em uma amostra de inflorescências (outono) com 0,2%. Os hidrocarbonetos monoterpênicos foram identificados em quantidades traço apenas na primeira coleta de frutos (primavera) perfazendo 0,3%. Ressalta-se que os monoterpênoides oxigenados não foram identificados em nenhuma das amostras desta população.

Entre os sesquiterpenóides majoritários destacam-se o α e β -cariofileno, ishwarano, germacreno B, δ -cadineno, *E*-Nerolidol. Os constituintes copaeno, β -bourboneno e epóxido de humuleno II foram observados nas amostras de folhas frescas e secas das estações verão e outono,

em pequenas proporções. Além do mais, apenas nas folhas frescas e secas do verão ocorreram os constituintes β -copaeno, α -bulneseno, δ -cadinol e τ -cadinol (Tabela 2).

Os OE de folhas frescas e secas (Figura 1) e órgãos reprodutivos demonstraram um perfil químico diferente dos encontrados na literatura para essa espécie, em virtude da forte presença da classe de fenilpropanóides resultando em uma baixa concentração e diversidade dos demais constituintes.

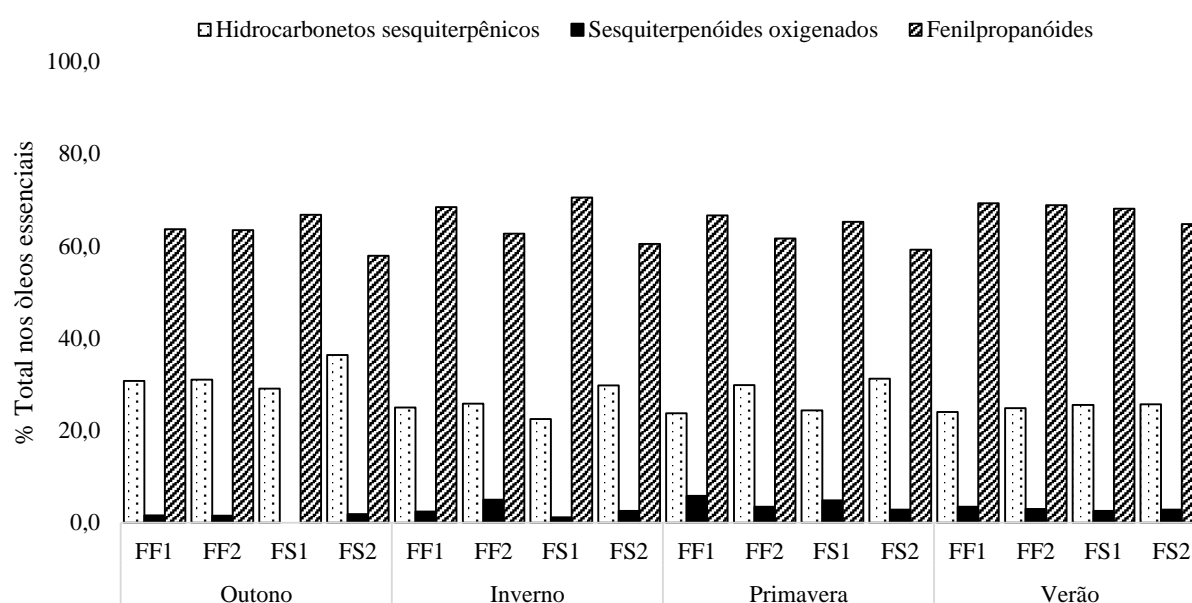


Figura 1 – Classes químicas detectadas nos óleos essenciais de folhas de *Piper gaudichaudianum* Kunth nas quatro estações (Outono, Inverno, Primavera, Verão) no ano de 2013.

Legenda – órgão vegetal (FF: folhas frescas; FS: folhas secas); número da coleta (1 ou 2).

Tabela 2 -Composição química dos OE de folhas e órgãos reprodutivos de *Piper gaudichaudianum* Kunth, nas quatro estações do ano de 2013. C: constituinte; * \geq constituintes incluídos na ACP; INF: inflorescências; FR: frutos; FF: folhas frescas; FS: folhas secas; coleta: número 1 ou 2; Exp.: experimental; Lit.: literatura.

Constituintes	Índice de Kovats		Percentagem %																				
			Outono					Inverno					Primavera					Verão					
	Exp.	Lit.	INF2	FF1	FF2	FS1	FS2	INF2	FF1	FF2	FS1	FS2	FR1	FR2	FF1	FF2	FS1	FS2	FF1	FF2	FS1	FS2	
C1	α -Pinenos	932	939	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	Sabineno	974	972	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	Copaeno	1376	1375	-	0,4	0,4	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	0,3	0,4
C4	β -Bourboneno	1385	1384	-	0,5	0,4	-	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,4	0,3	0,4
*C5	β Cariofileno	1420	1420	1,2	3,7	4,2	4,0	5,0	-	3,5	3,8	3,8	4,6	-	0,7	3,9	4,2	3,8	4,9	4,0	3,1	3,7	4,3
C6	β -Copaeno	1424	1432	-	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,4	0,4	-
*C7	Aromadendreno	1439	1439	-	0,4	2,5	2,4	3,5	-	2,6	-	2,4	1,6	-	-	-	2,0	1,5	-	0,2	1,7	2,0	2,1
*C8	α -Cariofileno	1455	1454	2,7	11,8	13,3	12,0	14,3	1,4	10,2	8,2	7,9	10,1	-	1,4	9,7	9,3	9,3	11,2	9,6	8,4	10,2	10,9
*C9	Ishwarano	1463	1466	0,4	3,9	4,3	3,3	1,4	-	2,5	4,1	2,8	3,7	-	0,7	5,0	4,2	3,8	6,4	1,3	3,7	1,9	1,9
C10	Germacreno D	1482	1482	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	α -Bulneseno	1487	1489	-	-	-	-	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	1,1	1,6	-
C12	α -Selineno	1487	1485	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	1,5	-	-	-	-
*C13	Germacreno B	1498	1500	2,5	6,9	4,7	5,8	5,9	1,8	6,1	6,9	5,0	7,4	-	2,0	5,1	6,1	5,9	5,4	4,4	4,4	1,2	4,2
*C14	δ -Cadineno	1508	1505	-	0,5	1,3	1,6	3,7	-	-	2,7	-	2,3	-	-	-	2,8	-	1,9	1,7	1,3	4,0	1,5
*C15	Miristicina	1523	1523	6,2	-	-	-	-	9,3	-	-	-	-	-	11,9	6,9	-	-	-	-	-	-	-
C16	Elemicina	1559	1558	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
*C17	<i>E</i> -Nerolidol	1565	1564	-	0,9	0,9	-	1,1	-	1,5	3,0	1,0	-	-	-	3,8	2,4	3,0	2,9	0,2	1,2	1,3	1,5
C18	Spatulenol	1579	1576	-	0,2	0,2	-	0,2	-	0,9	2,1	0,2	1,8	-	-	2,1	1,2	1,9	-	1,6	-	0,2	1,4
C19	Óxido de Cariofileno	1585	1583	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20	Epóxi de Humuleno II	1611	1608	-	0,6	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	0,7	0,5	-
*C21	Dilapiol	1626	1620	83,1	63,6	63,4	66,7	57,8	87,5	68,4	62,7	70,5	60,5	87,8	85,2	66,6	61,6	65,2	59,2	69,2	68,8	68,1	64,7
C22	δ -Cadinol	1643	1636	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	0,5	0,4	-
C23	T-Cadinol	1643	1648	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,6	0,2	-
C24	T-Muurolol	1657	1661	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total identificado				96,4	96,0	96,0	95,8	96,1	100	95,8	93,6	94,1	92,8	100	100	96,2	95,0	94,4	93,3	96,7	96,7	96,3	93,3

Dentre os principais constituintes majoritários verificados em alguns municípios do estado do RS para os OE de folhas e inflorescências de *P. gaudichaudianum* destacam-se α -humuleno (13,3-37,5%), β -cariofileno (10,4-19,3%), β -pineno (5,6-7%), *E*-nerolidol (5,32-22,4%), *E*-cariofileno (8,9%), α -humuleno (16,5%), biciclogermacreno (7,4%), β -selineno (3,7-15,7%), α -selineno (8,9-16,6%), allo-aromadendreno (7,7%), linalol (4,8%) (SILVA, PÉRES, SAFFI, 2006; PÉRES et al., 2009; ANDRADE et al., 1998). Já em um estudo sazonal no município de Atalanta (SC) os constituintes observados foram β -cariofileno (10,4-12,5%), α -cariofileno (8,2-10,4%), δ -selineno (5,4-6,9%), δ -cadineno (6,0-7,3%); *E*-nerolidol (3,0-7,2%), *Z*- β -guaieno (5,5-5,6%), δ -cadineno (6,4-7,3%) e valenceno (4,0-5,6%) (SANTOS, 2009). A composição química das folhas de *P. gaudichaudianum* encontrada neste estudo é semelhante àquelas descritas para as espécies *Piper permucronatum* Yunck. em Rondônia e *Piper aduncum* L. no Pará e Distrito Federal. Os teores de dilapiol constatados nestes locais variam de 54,7% e 31,5-97,3%, respectivamente (MORAIS et al., 2007; MAIA et al., 1998; ALMEIDA et al., 2009; POTZERNHEIM et al., 2012).

Esta diferença da composição química dos OE da população em estudo em comparação com os demais trabalhos realizados com o mesmo extrativo de *P. gaudichaudianum* no RS pode estar ocorrendo em virtude de fatores ambientais, genéticos e bióticos. Segundo Telascrea et al. (2007) a variabilidade química pode ser resultante da pressão de seleção do ambiente e/ou da ecologia, caracterizando um ajuste químico às condições ambientais prevalentes. Em um estudo realizado por Duarte et al. (2010a) com o OE de folhas de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. a variabilidade na composição química também pode ser observada. Por outro lado, variações químicas dos OE podem ocorrer por influência genética em conjunto com fatores ambientais, conforme reportado por Duarte et al. (2010b) para *Eugenia dysenterica* DC. Segundo os autores, a pressão evolutiva resultou em seleção de um fenótipo especializado que apresenta maior vigor, sendo mais bem adaptado às condições ambientais locais (ecótipos). Este fato foi observado para alguns indivíduos de *Thymus pulegoides* L., para os quais a estabilidade da composição química dos OE esteve associada às suas características pré-determinadas geneticamente (LOŽIENĚ, VENSKUTONIS, 2005). Adicionalmente, Dixon e Paiva (1995) apontam que os fenilpropanóides são respostas químicas ao estresse abiótico e biótico do local, como ataque de patógenos, lesões mecânicas, baixas temperaturas, deficiências nutricionais, entre outros. Assim, a quantidade de dilapiol presente no OE de folhas e órgãos reprodutivos sugere uma função de defesa para este constituinte, uma vez que Cledes (2009) verificou elevadas concentrações de safrol (fenilpropanóide) no OE de folhas de *Piper mikianium* (Kunth) Steudel em todas as estações do

ano, porém em folhas ilesas as percentagens foram levemente inferiores que em folhas lesionadas (72 e 76% respectivamente). Essa hipótese é reforçada pelas atividades biológicas descritas para o OE de folhas *Piper aduncum* L., como antifúngica e inseticida (BASTOS, ALBUQUERQUE 2004; SILVA et al., 2007; FAZOLIN et al., 2005). Segundo Maia et al. (1998) o OE de *P. aduncum* também possui o dilapiol como constituinte majoritário.

As diferenças na composição química dos OE das amostras analisadas (FF, FS, INF, FR) foram particularmente observadas nos resultados da Análise Hierárquica de Cluster (AHC) e na Análise de Componentes Principais (ACP) (Figura 2 e 3, respectivamente). As análises mostraram uma clara separação dos OE extraídos de diferentes órgãos vegetais em distintos grupos químicos (GQ), como pode ser observado para os órgãos reprodutivos (GQ I) e folhas frescas e secas (GQ II). O GQ I é formado pelas amostras de inflorescências coletadas no inverno e outono, bem como pelos frutos coletados na primavera. O GQ II é composto por todas as amostras de folhas, independente da estação de coleta e do estado (fresco ou seco). A correlação cofenética da AHC foi de 0,95, indicando que o grau de ajuste do agrupamento está adequado. A localização das estruturas de estocagem no interior da folha em espécies de *Piper* (ALBIERO et al., 2005) é uma provável explicação para o fato do processo de secagem não ter alterado significativamente a composição química de folhas, o que pode ser verificado na AHC, pois o OE de folhas secas foi classificado no mesmo GQ do OE de folhas frescas (Fig. 2).

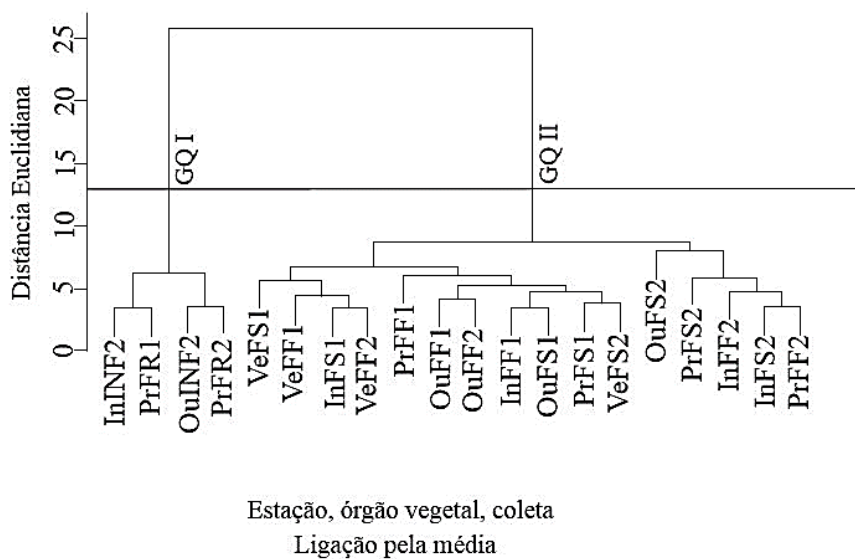


Figura 2 –Dendrograma com a Análise Hierárquica de Cluster da composição química de todas as amostras de OE de folhas e órgãos reprodutivos de *Piper gaudichaudianum* Kunth (duas coletas nas quatro estações do ano de 2013), através do método de ligação pela média e com a distância Euclidiana como medida de dissimilaridade, mostrando a divisão em dois grupos químicos (GQ I e II).

Legenda – Ordem das siglas: estação (In: Inverno; Pr: primavera; Ou: outono; Ve: verão), órgão vegetal (INF: inflorescências; FR: frutos; FS: folhas secas; FF: folhas frescas), coleta (número 1 ou 2).

A ACP gerou nove componentes principais (CP), destas, duas explicam 95% da variância acumulada dos dados de composição química dos OE de folhas frescas, secas e órgãos reprodutivos (dados não mostrados). Os resultados obtidos nesta análise estão de acordo com os obtidos na AHC, uma vez que o número de componentes principais representativas na ACP é similar ao número de grupos químicos formados na AHC (Figura 3). Os resultados obtidos a partir da AHC e ACP indicam variabilidade química dos OE entre os órgãos de *P. gaudichaudianum* estudados. No entanto, apenas pequenas diferenças químicas foram observadas entre o OE de folhas (frescas e secas) e dos órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos), visto que a CP 2 é de 2,45%.

De acordo com a ACP (Figura 3) os constituintes miristicina e dilapiol estão relacionados com as amostras de OE de órgãos reprodutivos. Embora o dilapiol seja o constituinte predominante em todas as amostras de OE deste estudo, não está direcionado às amostras de OE de folhas frescas e secas, possivelmente devido ao fato dos órgãos reprodutivos apresentarem baixa diversidade de

constituintes em sua composição. Desta maneira, a composição química dos OE de folhas frescas e secas, forma o GQ com maior número e variabilidade de constituintes.

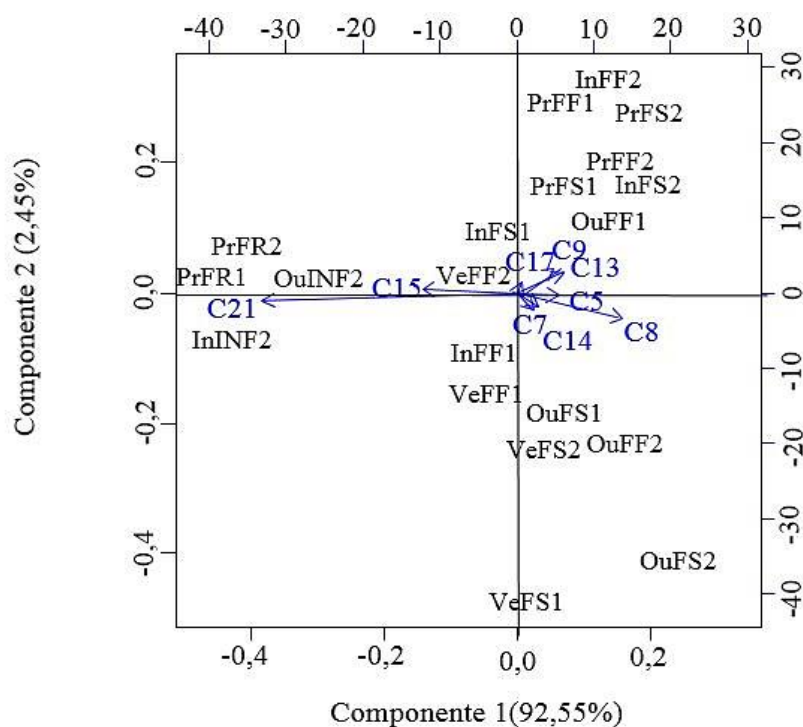


Figura 3 - Biplot da Análise de Componentes Principais (ACP), baseada na composição química de 20 amostras de óleos essenciais obtidos a partir de folhas (frescas e secas) e órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos) de *Piper gaudichaudianum* Kunth, nas quatro estações do ano de 2013.

Legenda - Ordem das siglas: **Objetos** - estação (Ou: outono, In: inverno, Pr: primavera, Ve: verão), órgão vegetal (INF: inflorescências; FR: frutos; FS: folhas secas; FF: folhas frescas), coleta (número 1 ou 2); **Descritores** - constituintes: C5: β -cariofileno; C7: aromadendreno; C8: α -cariofileno; C9: ishwarano; C13: germacreno B; C14: δ -cadineno; C15: miristicina, C17: *E*-nerolidol e C21: dilapiol).

Os grupos químicos formados pelas análises multivariadas AHC e ACP neste estudo foram independentes do período de coleta e das fenofases, indicando ausência de variabilidade sazonal na composição química dos OE de folhas (frescas e secas) e órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos) de *P. gaudichaudianum*. Esta estabilidade na composição química dos OE ao longo das estações do ano, também foi relatada por Randrianalijaona et al. (2005) para a espécie *Lantana camara* L. em Madagascar, onde as estações são bem distintas e extremas. Para *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata* também não foi observada variabilidade na composição dos OE de

folhas em decorrência a sazonalidade, mas sim em consequência da fisiologia/fenologia da planta, uma vez que foi detectada uma composição química diferenciada no período de floração (STEFANELLO et al. 2010). Diferenças entre a composição química do OE de folhas e órgãos reprodutivos são esperadas, uma vez que o aroma emitido pelas inflorescências está associado à atração de polinizadores específicos, agindo ainda de maneira a proteger os órgãos de reprodução contra possíveis inimigos (CSEKE, KAUFMAN, KIRAKOSYAN, 2007; DUDAREVA et al., 2004). De acordo com Mikich et al. (2003) os morcegos frugívoros utilizam o olfato como principal sentido para a localização de frutos maduros, como é o caso de *Carollia perspicillata*, que se alimenta dos frutos de diversas espécie do gênero *Piper*. Esses estudos anteriores indicam uma possível explicação para a detecção da miristicina, de odor picante e almiscarado, apenas nos órgãos reprodutivos, sugerindo a função de atrair polinizadores e dispersores. Quanto a esse aspecto, também merece destaque o fato de que essa substância apresentou uma concentração mais elevada nas estações em que as inflorescências estavam em transição para a frutificação (9,3-11,9%). De acordo com Cseke et al. (2007) as vias metabólicas e os genes que regulam a síntese de enzimas para a biossíntese de constituintes odoríferos são principalmente as que produzem terpenóides voláteis, fenilpropanóides, ou derivados voláteis de ácidos graxos.

A composição química dos OE pode sofrer alterações por inúmeros fatores, que podem estar relacionados com a fisiologia da planta, ciclo reprodutivo ou vegetativo, defesa ou atração de polinizadores, método de extração e técnica de amostragem, poluição ambiental, entre outros (BAYDAR et al., 2004; GOBBO-NETO, LOPES, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008). Pesquisas relacionadas à ecologia e à fenologia de *P. gaudichaudianum*, bem como a comparação entre diferentes horários de coleta do material vegetal para extração, deverão ser realizadas a fim de verificar se a composição química do EO irá permanecer invariável, fato que ocorreu para esta população nos meses do ano observado.

4 CONCLUSÃO

Os OE de *Piper gaudichaudianum* não apresentaram variabilidade sazonal da composição química para a população analisada no município de Santa Maria, RS, tendo sido detectadas apenas diferenças entre os órgãos vegetais estudados. O dilapiol, detectado neste extrativo como majoritário, não havia sido descrito para a espécie em estudo, sendo este um constituinte de

interesse, em virtude das atividades biológicas já descritas. A composição química dos OE de folhas não sofreu alterações durante o processo de secagem. Desta forma, o OE de folhas de *Piper gaudichaudianum* apresenta características promissoras como a estabilidade na composição química independente da estação, sendo possível a coleta de material vegetal em qualquer época do ano. As folhas também podem ser submetidas à secagem antes da extração, já que esse processamento pós-colheita não comprometeu a qualidade do extrativo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq pela bolsa e pelo financiamento concedido, respectivamente.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2009.

ABREU, A. M. et al. *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil – a new source of safrole. **Journal Essential Oil Research**, v. 14, p. 361-363, 2002.

ALBIERO, A. L. M. et al. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense Jornais Científicos**. v. 24, n. 4, p. 550-554, 2005.

ALMEIDA, R. R. P. et al. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1427-1434, 2009.

ANDRADE, E. H. A. et al. Essential oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C.DC. Reserch note. **Journal Essential Oil Reserch**, v. 10, p. 465-467. 1998.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 5, p. 169-172. 2004.

CLEMES, S. M. **Efeito da sazonalidade e herbivoria sobre a produção de metabólitos secundários voláteis em *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel**. 2009. 38p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2009.

CYSNE, J. B. et al. Leaf essential oils of four *Piper* species from the state of Ceará - Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n. 6B, p. 1378-1381, 2005.

CSEKE, L. J.; KAUFMAN, P. B.; KIRAKOSYAN, A. The biology of essential oils in the pollination of flowers. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1317-1336, 2007.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUARTE, A. R. et al. H. Environmental influence on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1672-1680, 2010a.

DUARTE, A. R. et al. genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1459-1467, 2010b.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

FAZOLIN, M. et al. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 485-489, 2005.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226. 2008.

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

GONÇALVES, E. G; LORENZI, H. **Morfologia vegetal – organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. Ed. 2, São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2011. 512p.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de estatística em ecologia**. Porto Alegre: Artmed. p. 447-448. 2011. 527p.

GUIMARÃES, E. F. et al. Piperaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: [<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB012738>]. 2014. Acesso em: 18 de maio de 2014.

GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. **Piperáceas – Piper**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Santa Catarina. 2001. 103p.

HELDWEIN, A. B.; BURIOL, G. A.; STRECK, N. A. O clima de Santa Maria. **Ciência & Ambiente**. n. 38, p. 43-58, 2009.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro. n. 1, 1992. 92p.

LOŽIENĖ, K.; VENSKUTONIS, P. R. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 517-525, 2005.

MACIEL FILHO, C. L. **Carta Geotécnica de Santa Maria**. Santa Maria: Imprensa Universitária. p. 24. 1990.

MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 13, p. 269-272. 1998.

MESQUITA, J. M. O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 6-12, 2005.

MIKICH, S. B. et al. Attraction of the fruit-eating bat *Carollia perspicillata* to *Piper gaudichaudianum* essential oil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 10, p. 2379-2383, 2003.

MORANDIM-GIANNETTI, A. A. et al. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810-1814. 2010.

MORAIS, S. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 670-675. 2007.

NIST, **National Institute of Standards and Technology**. NIST/EPA/NIH mass spectral library & search/analysis programs NIST 02 update. Hoboken, USA: John Wiley & Sons; 2010.

OKSANEN, J. et al. **Community Ecology Package**. R Core Team. 2013.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. Classificação das fitofisionomias da América do Sul-Cisandina Tropical e Subtropical: proposta de um novo sistema – prático e flexível – ou uma injeção a mais de caos? **Rodriguésia**. v. 2, n. 60, p. 237-258. 2009.

PARMAR, V. S. et al. Review article number 122: Phytochemistry of genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46. n. 4. p. 597-673. 1997.

PÉRES, V. F. et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2389–2395, 2009.

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

PUHL M. C. M. N. et al. Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules**; v. 16, p. 9925-9938, 2011.

RANDRIANALJAONA, J. A. et al. 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.

ROHLF, F. J. Adaptative hierarquical clustering schemes. **Systematic Zoology**. v.19, n. 1. p. 58-82, 1970.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. RL: <http://www.Rproject.org/>. 2012.

SANTOS, P. R. D. et al. Essential oil of 10 Piperaceae species from the brazilian atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 547-551, 2001.

SANTOS, T. G. **Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Piper* e de *Baccharis semiserrata* DC.** 2009. 117p. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor.** 2009. 75p. Dissertação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SILVA, P. P.; PÉRES, V. F.; SAFFI, J. Extração e caracterização do óleo essencial das inflorescências de *Piper gaudichaudianum* Kunth **Revista de Iniciação Científica da Ulbra**, v. 1, n. 1, p. 25-30, 2006.

SILVA, R. S. et al. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**. v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.

SILVA, W. C. et al. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

STEFANELLO, M. E. A. et al. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtectata*, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 82-86, 2010.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. Ed. 2. Porto Alegre: EMATER – RS – ASCAR. p. 86-88. 2008. 222p.

TELASCREA M. et al. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 222-232, 2007.

VALENTIN, J. L. **Ecologia numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000, 114p.

4.3 Manuscrito 3

SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; MACIEL, C. G.; BIANCHINI, N. H.; MUNIZ, M. F. B.; GOUVEIA, F.; HEINZMANN, B. M. Ação antifúngica do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth contra fungos fitopatogênicos e apodrecedores da madeira. A ser submetido.

Ação antifúngica do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth contra fungos fitopatogênicos e apodrecedores da madeira

Bianca Schindler^a, Daniela Thomas da Silva^a, Caciara Gonzatto Maciel^a, Nádia Helena Bianchini^b, Marlove Fátima Brião Muniz^c, Fernando Nunes Gouveia^d e Berta Maria Heinzmann^{a,e*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

^bCurso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

^cDepartamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

^dDepartamento de Produtos Florestais, Universidade Federal de Brasília, Brasília, DF, BR-70910-900, Brasil

^eDepartamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

***Correspondência:**

Prof.^a Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial, Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima n° 1000, Bairro Camobi, Santa Maria – RS, Brasil, BR-97105-900. E-mail: berta.heinzmann@gmail.com, Phone:+55 55 3220 9674, Fax: +55 55 3220 8336.

RESUMO

O presente estudo descreve a atividade fungitóxica dos óleos essenciais (OE) de folhas (F) e de órgãos reprodutivos (OR) de *Piper gaudichaudianum* Kunth sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium moniliforme* e *Botryosphaeria rhodina*, bem como frente aos fungos causadores da podridão da madeira *Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum*. Visando explicar o efeito observado, foi analisada a composição química dos OE e seu constituinte majoritário foi isolado, tendo sua atividade fungitóxica avaliada frente aos mesmos fungos. As F e OR coletados no decorrer de um ano foram extraídos por hidrodestilação. Os OE obtidos de F e OR foram reunidos separadamente originando pools, que foram utilizados nos ensaios. O constituinte majoritário foi isolado por cromatografia em coluna e foi identificado por métodos espectroscópicos como dilapiol. A avaliação da atividade fungitóxica *in vitro* foi realizada pelo método de diluição em meio BSA (batata-sacarose-ágar) suplementado com os OE de F e OR nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e de 225,5 e 451,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de dilapiol. As amostras foram diluídas em etanol (1:1) e foram testadas em quatro repetições (n=4). A atividade fungitóxica observada para ambos os OE foi dependente da concentração e variou conforme o órgão vegetal extraído e espécie fúngica ensaiada. A atividade do dilapiol não diferiu das atividades detectadas para os OE para uma mesma espécie fúngica. Os OE, além do dilapiol, continham diferentes percentuais de sesquiterpenóides e para ambas as amostras foram detectados germacreno B e α -cariofileno. O OE dos OR foi o único que apresentou miristicina em sua composição. A atividade fungitóxica detectada para os OE de *P. gaudichaudianum* se deve ao seu constituinte majoritário, dilapiol, e tanto os OEs quanto o dilapiol podem ser considerados promissores agentes antifúngicos.

Palavras-chave: Piperaceae, Pariparoba, fenilpropanóide, fungicida.

ABSTRACT

This study describes the fungitoxic activity of essential oils (EO) of leaves (L) and reproductive organs (RO) of *Piper gaudichaudianum* Kunth on pathogenic fungi *Fusarium moniliforme* and *Botryosphaeria rhodina* and against the wood decay fungi *Pycnoporus sanguineus* and *Gloeophyllum trabeum*. In order to explain the observed effect, the chemical composition of EO was analyzed, their major constituent was isolated, and its fungitoxicity evaluated against the same fungi. The L and RO collected during one year were extracted by hydrodistillation. The EO obtained from L and ROs were gathered separately giving the pools used in the tests. The major compound was isolated by column chromatography and was identified by spectroscopic methods as dilapiolle. The assessment of the *in vitro* fungitoxic activity was performed by the dilution method in PSA medium (potato-sucrose-agar) supplemented with the EO of L and RO at concentrations of 0.25; 0.5 and 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 225.5 and 451.2 dilapiolle $\mu\text{g}/\text{mL}$. Samples diluted in ethanol (1: 1) were tested in four replicates ($n = 4$). The fungitoxic activity observed for both EO was concentration dependent and varied according to the extracted vegetable organ and tested fungal species. The activity of dilapiolle did not differ from the activities detected for the EO to the same fungal species. EO, in addition to dilapiolle, containing different percentages of sesquiterpenoids and for both samples germacrene B and α -caryophyllene were detected. The EO of RO was the only one with myristicin in its composition. The fungitoxic activity detected for the EO of *P. gaudichaudianum* is due to its major constituent, dilapiolle, and both EO as the dilapiolle can be considered promising antifungal agents.

Keywords: Piperaceae, Pariparoba, phenylpropanoid, fungicide.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos de origem madeireira são renováveis e considerados uma reserva de carbono na natureza. O seu beneficiamento consome menos energia que outros materiais utilizados na construção civil (PFEIL, PFEIL, 2003). Entretanto, um produto de origem natural composto de celulose e hemicelulose acaba se tornando vulnerável à biodeterioração por organismos xilófagos (SCHULTZ, NICHOLAS, 2002). Dentre estes, destacam-se os fungos apodrecedores pertencentes a classes dos basidiomicetos, responsáveis pela podridão parda e branca, que possuem características enzimáticas próprias quanto à decomposição de alguns constituintes da madeira (ALMEIDA et al., 2012).

Desta forma, se faz necessária a utilização de tratamentos preservantes para conservar as propriedades estéticas e mecânicas da madeira (ROCHA, 2001). Os preservantes utilizados para esta finalidade atualmente são de origem sintética, à base de metais como cromo, boro, arsênio, creosoto entre outros. Estes produtos são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde dos manipuladores e por isso sofrem restrições de uso em diversos países (MACHADO et al., 2006; KARTAL et al.; 2004; SCHULTZ, NICHOLAS, 2002; HSU, CHANG, CHANG, 2007).

Outro fato relevante no setor florestal é o ataque de fungos fitopatogênicos que causam doenças em espécies arbóreas, tanto em viveiros quanto em campo, o que torna necessário o tratamento de sementes e mudas com fungicidas. Porém este tipo de tratamento pode eliminar além destes patógenos, os demais micro-organismos que colonizam o solo e que são essenciais ao desenvolvimento destas espécies. Estes fitopatógenos causam apodrecimento de raízes e/ou base do caule, queima das folhas, tombamento de mudas e cancro vascular, consequentemente ocasionando a diminuição do valor comercial da madeira ou até mesmo a perda dos indivíduos (BUENO, AMBRÓSIO, SOUZA, 2007; GRIGOLETTI JÚNIOR, PARIS, AUER, 2006; REES, 1988; SILVA, MELO, 1997). Além disso, a grande quantidade de fungicidas sintéticos utilizados pode contaminar os lençóis freáticos, afetando diretamente a flora, fauna e a vida humana (SILVA, MELO, 1997)

Deste modo, os extrativos vegetais surgem como uma alternativa ambientalmente segura, de menor toxicidade e persistência nos ecossistemas que os conservantes tradicionais (ISMAN, MACHIAL, 2006; BENTO et al., 2014). Neste sentido, pesquisas envolvendo a busca por novas substâncias antifúngicas provenientes do metabolismo secundário vegetal estão aumentando.

Entre elas encontram-se os óleos essenciais (OE) e seus constituintes isolados, que estão entre as classes de produtos naturais mais promissoras para o controle de pragas e doenças (MAREI, ABDEL RASOUL, ABDELGALEIL, 2012).

O gênero *Piper* (Piperaceae) abrange 700 espécies, muitas de importância medicinal e industrial (PARMAR et al., 1997; GUIMARÃES, MONTEIRO, 2006). *Piper gaudichaudianum* Kunth, conhecida popularmente como Pariparoba ou Jaborandi, ocorre no Brasil, Argentina e Paraguai, sendo nativa no Rio Grande do Sul (GUIMARÃES, VALENTE, 2001; SOBRAL et al., 2013). As atividades biológicas já descritas para essa espécie incluem efeito inseticida, larvicida, anti-inflamatório e analgésico (PARMAR et al., 1997; LAGO et al., 2004; MORAIS et al., 2007; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; MOREIRA et al., 2001). Embora o efeito fungicida já tenha sido descrito para *P. gaudichaudianum* (MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010; PUHL et al., 2011), até o momento seu OE não havia sido testado contra fungos apodrecedores da madeira e fitopatogênicos.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade fungitóxica dos OE de *Piper gaudichaudianum* Kunth contra fungos fitopatogênicos (*Fusarium moniliforme*; *Botryosphaeria rhodina*) e causadores da podridão da madeira (*Pycnoporus sanguineus*; *Gloeophyllum trabeum*), correlacionando o efeito observado com as características químicas de cada OE e verificando a ação do constituinte majoritário isolado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Folhas e órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos) de indivíduos de *Piper gaudichaudianum* foram coletados em uma população nativa no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, entre Janeiro a Dezembro de 2013 (29°40'11,3" S e 53°46'15,8" O, altitude aproximada de 229 m). A espécie foi identificada por Daniele Ferreira Monteiro, as exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Ciências Florestais (HDCF) na Universidade

Federal de Santa Maria (UFSM) e uma duplicata foi enviada ao Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), sob registros 6.514 e 584.729, respectivamente.

2.2 Extração do EO e análise da composição química

Os OE de folhas e órgãos reprodutivos foram obtidos conforme descrito no manuscrito 2. Resumidamente, folhas e órgãos reprodutivos foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado durante três horas (SARTOR, 2009). Os OE foram separados do hidrolato por extração líquido-líquido utilizando hexano (SILVA et al., 2009). Após secagem sob sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), os OEs foram armazenados a -4°C em frascos de vidro âmbar, até a análise química, o fracionamento e ensaios biológicos. Os rendimentos de OE foram calculados por % (m / m).

A identificação dos constituintes dos OE foi baseada em seus índices de retenção e espectro de massas, sendo realizadas através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e CG com detector por ionização em chama, de acordo com os parâmetros descritos no manuscrito 2.

2.3 Isolamento

Uma amostra de OE de folhas foi fracionada em coluna cromatográfica (CC). A primeira CC foi realizada com 2,0 g de OE (62,5 x 4,5cm) contendo 200,20 g de gel de sílica 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) e eluindo-se com hexano-acetato de etila 95:5 (v/v) em $1,4\text{ mL min}^{-1}$. Frações de 25 mL foram recolhidas e estas foram reunidas em 9 frações principais (Fr. 1-9), com base no perfil em cromatografia em camada delgada (CCD) As análises sobre CCD foram realizadas em cromatoplasmas de gel de sílica gel 60 F₂₅₄ e as substâncias foram detectadas com vanilina ácido sulfúrico – UV a 365nm. Na segunda CC a fração 3 (500 mg) da primeira CC foi purificada sobre 46,65 g de gel de sílica 1 60 (19 x 1,9 cm) e eluição com hexano-acetona 99:1 (v/v) a $0,9\text{ mL/min}$. Frações de 20 mL, após reunião de acordo com o perfil cromatográfico sobre CCD, resultaram em

7 frações principais (Fr. 1-7) onde as frações 3 e 4 corresponderam a uma substância isolada com graus de pureza de 97 e 100%, respectivamente. A substância foi identificada como dilapiol (365,5 mg), através de CG-EM, CG-DIC, Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de ^1H e ^{13}C - e comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2009; ALMEIDA et al., 2009; NIST, 2010). Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker HPX-400 FT RMN a 400 MHz para ^1H e a 100 MHz para o de ^{13}C , usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno, em clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. Os espectros estão ANEXOS.

2.4 Atividade fungitóxica

2.4.1 Micro-organismos

As espécies fúngica *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril e *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries) Murril., responsáveis pela podridão-branca e parda da madeira, foram fornecidas pelo Laboratório de Produtos Florestais da Universidade Federal de Brasília (UnB). As demais espécies fitopatogênicas foram cedidas pelo Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM): *Fusarium moniliforme* Sheldon e *Botryosphaeria rhodina* (Berkeley & Curtis) von Arx.

2.4.2 Ensaio fungitóxico

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi (UFSM) em duas fases. A primeira fase avaliou o efeito do pool do OE de folhas (F) e de órgãos reprodutivos (OR) frente às quatro espécies de fungos, em duplicata. Os pools de OE foram obtidos de F e OR conforme descrito no manuscrito 2. Os inóculos dos fungos foram cultivados em Ágar-Batata-Sacarose (BSA) por 15 dias a $25\pm 4^\circ\text{C}$. Posteriormente, discos de 15 mm contendo o micélio foram transferidos para o centro das placas de Petri de 90 mm, previamente esterilizadas contendo

BSA, suplementado com o OE previamente diluído em etanol (1:1), sendo avaliadas as concentrações finais de 0,25; 0,50 e 1,0 µL/mL. Visando contornar o problema de contaminação bacteriana, nas culturas de *F. moniliforme* o meio necessitou ser suplementado com 0,04 mg/mL de sulfato de estreptomicina. No caso desta espécie fúngica, o diâmetro dos discos foi excepcionalmente de 8 mm, devido a dificuldade em reproduzir as colônias.

A avaliação dos experimentos iniciou-se após 24 horas, através de medições do diâmetro da colônia (média de duas medidas diametralmente opostas) realizadas a cada dois dias até a colônia fúngica atingir $\frac{3}{4}$ do diâmetro da placa testemunha. A partir desses dados foram calculados o índice de crescimento micelial: $ICM = [(C1/N1) + (C2/N2) + \dots + (Cn/Nn)]$, onde C1, C2, Cn = crescimento micelial do fungo na 1ª, 2ª e última avaliação; N1, N2, Nn = número de dias após a inoculação, fórmula adaptada por Oliveira (1992) e o Índice Antifúngico (IA%) através da fórmula $(1 - De / Dt) \times 100$, onde De e Dt correspondem ao crescimento micelial experimental e da testemunha absoluta, respectivamente (CHANG et al., 1999, 2000).

A segunda fase analisou a atividade do constituinte isolado numa concentração proporcional a que se obteve o Índice Antifúngico (IA%) mais efetivo para ambas as amostras de OE em cada fungo. A concentração foi corrigida pela densidade do OE (1,03 g/mL) e pela pureza do dilapiol (97,0 %) antes da suplementação ao meio de cultura BSA. Desta forma, para os fungos *F. moniliforme* e *B. rhodina* foram testados 225,5 µg/mL de dilapiol. Enquanto que para *G. trabeum* e *P. sanguineus* a concentração correspondente foi de 451,2 µg/mL. Os resultados de ICM e IA% foram calculados como descrito anteriormente.

Em todos os experimentos foram preparadas placas testemunhas com o meio BSA sem adição de solvente (testemunha absoluta) e com etanol (controle negativo) na concentração mais elevada usada para diluir os OE e o dilapiol, com a finalidade de verificar o eventual efeito deste nos tratamentos. Para os fungos *G. trabeum*, *P. sanguineus* e *B. rhodina* o controle positivo utilizado foi o fungicida comercial Propiconazole Nortox® 10 µL/mL (HSU, CHANG, CHANG, 2007) e para o fungo *F. moniliforme* foi utilizada Nistatina 10 µL/mL (FRATERNALE et al., 2011). As placas foram mantidas em câmara incubadora BOD com fotoperíodo de 12h e a 25±4°C e cada tratamento foi realizado com quatro repetições (n=4).

2.5 Análise estatística

Para verificação da normalidade e homogeneidade de variâncias, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Todos os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média ($n=4$). Os dados foram comparados dentro de cada tratamento (OE de F e OR) e entre os tratamentos (OE de F, OR, Dilapiol e controle positivo) para o mesmo fungo. Em alguns casos a estatística foi realizada de forma não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney. Para os dados paramétricos foram realizados teste- t e a análise de variância (ANOVA) de uma via, com o teste de Tukey. As análises foram realizadas no *software* Sigma Plot, versão 11.0, com significância $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise por CG-EM e CG-DIC, foram identificados e quantificados 17 constituintes nas três amostras de OE, perfazendo 97,08-100% da composição química total (Tabela 1). A análise química confirmou os resultados do manuscrito 2, e revelou como constituinte majoritário de ambas as amostras o fenilpropanóide dilapiol (70,51-87,48%). Os OE dos dois órgãos vegetais também apresentaram sesquiterpenóides como constituintes minoritários em diferentes percentagens, destacando-se entre eles o germacreno B e o α -cariofileno. No entanto, a miristicina foi um constituinte verificado apenas no pool de órgãos reprodutivos. O fracionamento do OE de F conduziu ao isolamento do dilapiol, o qual foi identificado através ^1H , ^{13}C -RMN, juntamente com o seu espectro de massas em comparação com os dados da literatura (ALMEIDA et al. 2009; ADAMS, 2009; NIST 2010).

Tabela 1 – Composição química dos óleos essenciais obtidos de folhas (pool F) e órgãos reprodutivos (pool OR) de *Piper gaudichaudianum* Kunth

Constituinte	% composição		IK cal	IK tab
	pool F	pool OR		
Copaeno	0,08		1371	1370 ^N
β-Bourboneno	0,08		1380	1379 ^N
β-Cariofileno	1,62		1414	1420 ^N
β-Copaeno	0,10		1424	1428 ^N
Aromadendreno	0,57		1434	1440 ^N
α-Cariofileno	4,49	1,35	1449	1447 ^N
Ishwarano	1,82		1458	1466 ^A
Germacreno D	0,19		1476	1479 ^N
α-Selineno	0,39		1481	1485 ^N
Germacreno B	2,54	1,82	1492	1500 ^A
δ-Cadineno	0,32		1519	1515 ^N
Miristicina		9,33	1523	1523 ^N
Elemicina	0,13		1553	1554 ^N
<i>E</i> -Nerolidol			1564	1564 ^N
Espatulenol			1579	1579 ^N
Óxido de cariofileno	0,38		1605	1601 ^N
Dilapiol	84,32	87,48	1626	1620 ^A
Total identificado	97,08	100,00		
Rendimento médio (% m/m)	1,44	3,34		

Legenda: IK calc: Índice de retenção de Kovats calculado; IK ref: Índice de retenção de Kovats referenciado; A: Adams, 2009 e N: Nist, 2010.

Dentre os fungos avaliados, *Botryosphaeria rhodina* foi o que apresentou crescimento mais rápido *in vitro*, onde o máximo de desenvolvimento micelial na testemunha (placa de Petri de 90 mm) foi atingido em cerca de três dias (Tabela 2). A caracterização fisiológica de *B. rhodina* corrobora com o descrito por Pereira et al. (2006), com colônias do fungo apresentando crescimento vigoroso, micélio aéreo, coloração branca quando novas e escuras quando mais

velhas, cobrindo toda a superfície da placa entre 48h e 72h (Figura 1A). Por outro lado, considerando-se os fungos apodrecedores da madeira, observou-se que *Pycnoporus sanguineus* teve o crescimento mais acelerado que o de *Gloeophyllum trabeum* (Tabela 2), o que também foi observado em um estudo de Alves et al. (2006). Com relação a essas espécies, Eaton e Hale (1993) mencionaram que *G. trabeum* apresenta um crescimento com períodos de repouso, o que pode explicar seu desenvolvimento micelial mais lento detectado neste estudo (Tabela 2). Já *P. sanguineus* apresentou hifas de coloração branca quando novas e vermelho-alaranjadas quando velhas (Figura 1B). De acordo com Smânia et al. (1998) esta coloração se deve a pigmentos, como a cinabarina. *G. trabeum* também apresentou coloração branca no início se tornado levemente amarelada com o passar dos dias (Figura 1C). O crescimento micelial de *Fusarium moniliforme* no sétimo dia (Tabela 2) e suas características fisiológicas são análogas às reportadas por Silveira e Menezes (2006), que verificaram o crescimento de 77,2 mm e colônias de coloração inicialmente branca, tornando-se violeta escuras quando mais velhas (Figura 1D).

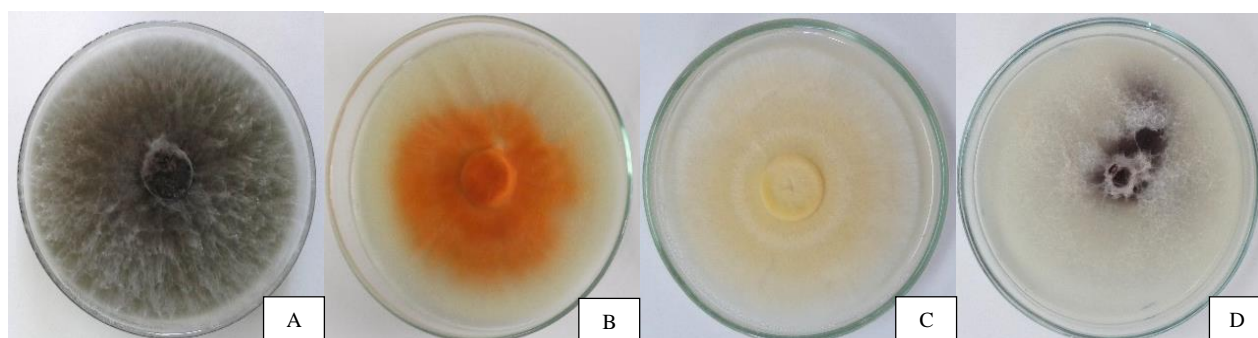


Figura 1 -Colônias fúngicas das testemunhas absolutas dos fungos: *Botryosphaeria rhodina* (A); *Pycnoporus sanguineus* (B); *Gloeophyllum trabeum* (C) e *Fusarium moniliforme* (D).

Tabela 2 – Valores médios de crescimento micelial (mm) nos diferentes dias de avaliação e valor médio de Índice de Crescimento Micelial (ICM) para as testemunhas absolutas de cada fungo.

Espécies fúngicas	1º dia	2º dia	3º dia	5º dia	7º dia	ICM
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	32,37	80,72	89,75	-	-	65,53
<i>Fusarium moniliforme</i>	0	-	33,07	57,03	78,88	33,70
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0	-	49,48	83,56	89,75	43,62
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0	-	36,42	64,72	79,67	36,46

Os testes fungitóxicos realizados com *F. moniliforme* demonstraram que a concentração de 0,25 µL/mL (C1) foi a menos eficaz no caso do OE de OR, porém a comparação com o OE de F indicou que não houve diferença significativa $p > 0,05$ entre concentrações e órgãos vegetais extraídos. O constituinte isolado, dilapiol, foi o que teve maior IA (81,27%). Ressalta-se que o controle positivo (nistatina), testado em concentração equivalente à C3 (0,01 mL/mL), não foi efetivo quando comparado com a menor concentração de qualquer dos OE, indicando que os OE utilizados são promissores ao controle deste fitopatógeno (Figura 2A). Evidencia-se que a inibição de *F. moniliforme* foi proporcional à concentração de dilapiol nos OE testados. Resultados semelhantes foram reportados por Zacaroni et al. (2009) para o OE de folhas de *Piper hispidinervum* C. DC. Com 89% de safrol frente à espécie de *Fusarium oxysporium* com 100% de inibição na concentração de 1 mg/mL.

Nos testes contra o fungo da podridão-branca *P. sanguineus*, as concentrações do OE de OR não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), sendo a menor C1 já efetiva. Já para o OE de F, a concentração mais eficaz foi de 1,0 µL/mL (C3). Quando comparados os dois OE, diferença significativa foi detectada apenas nas concentrações C1. O dilapiol diferiu apenas da C1 do OE de F e não apresentou diferença significativa das demais concentrações dos OE, inclusive do propiconazole (Figura 2B). Efeitos semelhantes ocorreram para o fungo da podridão-parda (*G. trabeum*), a única diferença foi observada nas concentrações C1 para ambos os OE, que não diferiram entre si, mas sim do restante dos tratamentos (Figura 2C).

Estes resultados corroboram com os dados da literatura, uma vez que evidenciam o dilapiol como o constituinte responsável pela inibição do crescimento micelial de *P. sanguineus* e *G. trabeum*. Diferentes autores relatam bioatividades de constituintes químicos que apresentam estrutura fenólica ou anel aromático. Com relação à atividade antifúngica, alguns estudos

verificaram eficiência no controle de fungos da podridão-branca e parda da madeira com os constituintes de OE como cinamaldeído, eugenol, timol, carvacrol, *E*-anetol e safrol (VODA et al., 2003; WANG, CHEN, CHANG, 2005; HSU, CHANG, CHANG, 2007; YEN, CHANG, 2008, BOULOGNE et al., 2012).

Na avaliação da atividade antifúngica contra a espécie *B. rhodina*, o OE de OR não teve diferença significativa nas três concentrações avaliadas, apresentando um IA que variou de 68 a 77%. Já para o OE de F, o IA apresentou valores entre 73-78%, sendo que a C1 apenas diferiu da concentração de 1,0 µL/mL (C3). Considerando ambos os OE e todas as concentrações, apenas C2 de OR e C3 de F ($p < 0,05$) diferiram das demais. O constituinte isolado foi mais eficaz que os OE inibindo o crescimento micelial em 86,22%, e diferiu também do propiconazole, que teve inibição de 100% (Figura 2D). A maior atividade observada pelo dilapiol em relação aos OE sugere que pelo menos um dos constituintes minoritários dos OE exerceu um efeito antagonista (EFFERTH, KOCH, 2011). A total inibição de *B. rhodina* foi verificada por Faria et al. (2006) com o OE de partes aéreas de *Ocimum gratissimum* L. do quimiotipo eugenol. No entanto, os resultados obtidos pelos últimos autores não puderam ser comparados com os resultados deste trabalho, uma vez que foi utilizada metodologia distinta (RÍOS, RECIO, 2005). Considerando o rápido desenvolvimento dessa espécie fúngica, os resultados dos tratamentos com os OE e o constituinte isolado de *P. gaudichaudianum* tiveram uma atividade considerável.

De maneira geral, observou-se um efeito concentração-resposta no que se refere à inibição do crescimento micelial. O etanol não produziu qualquer efeito fungitóxico na concentração mais elevada utilizada para diluir os OE e o constituinte isolado.

Dentre as espécies fúngicas avaliadas, os fungos apodrecedores da madeira foram os mais sensíveis aos OE (Figura 2). Para *G. trabeum* foi observado que as duas concentrações mais elevadas de ambos os OE e o dilapiol não diferiram do controle positivo propiconazole. No entanto, a susceptibilidade de *P. sanguineus* foi ainda maior frente ao OE de OR, pois nenhuma das concentrações testadas diferiu do propiconazole; o mesmo ocorreu com C2 e C3 do OE de F e com o dilapiol. No caso de *F. moliniforme*, chama a atenção a maior inibição do crescimento micelial frente ao dilapiol, em comparação com o controle positivo nistatina. Ao contrário, *B. rhodina* mostrou maior susceptibilidade ao propiconazole ($p < 0,05$).

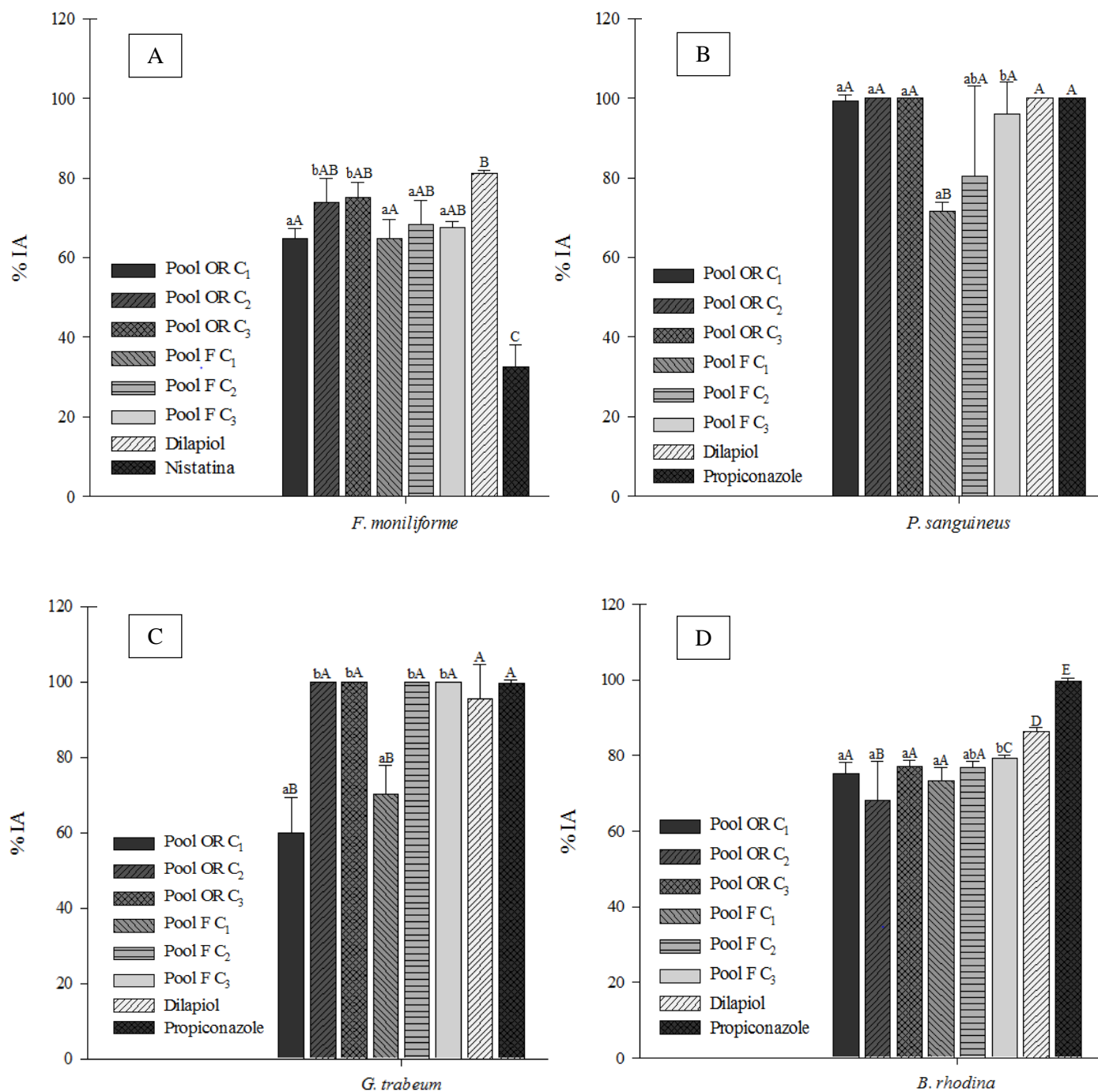


Figura 2 – Índice Antifúngico médio (IA%) e desvio padrão da média (DPM) para os óleos essenciais (OE) de órgãos reprodutivos (OR) e folhas (F) nas concentrações C1, C2 e C3 equivalentes a 0,25; 0,50 e 1,0 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. Diferentes letras minúsculas indicam diferença significativa para o tratamento com o OE de mesmo órgão vegetal e diferentes letras maiúsculas indicam diferença significativa entre todos os tratamentos pelos testes de Tukey, Mann-Whitney e teste-*t*, $p < 0,05$.

Legenda: Constituinte isolado (dilapiol) e controles positivos (propiconazole e nistatina), contra os fungos: A - *Fusarium moniliforme*; B - *Pycnoporus sanguineus*; C - *Gloeophyllum trabeum* e D - *Botryosphaeria rhodina*.

O efeito fungitóxico observado nesse estudo era esperado, uma vez que, dos constituintes do metabolismo secundário vegetal com atividade antifúngica descrita, a maioria apresenta estrutura fenólica (47%) ou terpenóide (29%) (BOULOGNE et al., 2012). Soma-se a isto o fato do dilapiol ser o componente majoritário do OE de *Piper aduncum* L, para o qual existem diferentes relatos de atividade antifúngica (BASTOS, 1997; BASTOS, ALBUQUERQUE, 2004; SILVA, BASTOS, 2007; ALMEIDA et al., 2009). Outros dados relevantes que corroboram com os resultados aqui descritos, são os efeitos antifúngicos relatados para OE de outras espécies do gênero *Piper* (NASCIMENTO et al., 2008; PINEDA et al., 2012; SOIDROU et al., 2013). Além disso, foram isolados e identificados fenilpropanóides em extratos brutos e em OE de plantas da família Piperaceae, tendo encontrado substâncias como safrol, miristicina, eugenol, dilapiol e apiol. Esses constituintes apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes, acaricidas e efeitos citotóxicos bem conhecidos (PARMAR et al., 1997; SANTOS et al., 2010; FERRAZ et al., 2010).

Diante da atividade fungitóxica dos OE para estas espécies de fungos é importante salientar a necessidade de desenvolver pesquisas relacionadas aos mecanismos de ação, que ainda não estão bem elucidados. Muitas hipóteses de possíveis mecanismos de ação para a inibição/morte celular dos fungos são relatadas, incluindo alterações morfológicas das hifas, inibição da esporulação, redução do diâmetro e espessura da parede celular das hifas, o que possivelmente está relacionado com a interferência dos constituintes dos OE nas reações enzimáticas de síntese da parede celular e permeabilidade da membrana. Desta maneira, os constituintes dos OE podem ocasionar a ruptura e extravasamento dos componentes intracelulares, além da supressão respiratória do micélio (CAVANAGHA, 2007). Por outro lado, a atividade antioxidante de constituintes de estrutura fenólica também pode contribuir para um efeito fungitóxico de extrativos vegetais, a exemplo do estudo de Bento et al. (2014), que observaram estresse oxidativo nos fungos *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* quando expostos aos extratos de folhas de duas espécies de *Casearia*. Entretanto, os autores reforçam que outros mecanismos devem ser investigados para melhor compreensão da atividade inibitória de extratos vegetais, para que se possa desenvolver produtos ambientalmente mais seguros para o controle de fungos apodrecedores da madeira. Estudos de mecanismo de ação também devem ser associados com pesquisas sobre etapas subsequentes e fundamentais para o desenvolvimento de um agente antifúngico, como testes de impregnação dos extratos vegetais na madeira e os efeitos destes quando expostos às condições de campo.

4 CONCLUSÃO

O efeito fungitóxico apresentado pelos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* variou segundo a espécie fúngica, a concentração testada e o órgão vegetal do qual o extrativo foi obtido. A atividade fungitóxica observada contra os fungos apodrecedores da madeira e fitopatogênicos se deve ao dilapiol, constituinte majoritário de ambas as amostras de óleo essencial. Os resultados indicam que tanto os OE brutos quanto o dilapiol são promissores agentes antifúngicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES) e ao CNPQ pelas bolsas concedidas. Aos funcionários Maria Nevis Deconto Weber e Fernando Saccol Gnocato pelo auxílio e empréstimo de materiais do Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi (UFSM).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2009.

ALMEIDA, N. A. et al. Biodeterioração de produtos à base da madeira de cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roem. var. *australis*). **Cerne**, v. 18, n.1, p. 17-26, 2012.

ALMEIDA, R. R. P. et al. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p. 1427-1434, 2009.

ALVES, M. V. S; COSTA, A. F; ESPIG, D. S; VALE, A. T. Resistência natural de seis espécies de madeiras da região amazônica a fungos apodrecedores em ensaios de laboratório. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006.

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

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BENTO, T. S. et al. Growth inhibition and antioxidative response of wood decay fungi exposed to plant extracts of *Casearia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 79-86, 2014.

BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325-347, 2012.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Produção e avaliação da sobrevivência de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 47-55, 2007.

CAVANAGHA, H. M. A. Antifungal activity of the volatile phase of essential oils: A brief review. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1297-1302, 2007.

CHANG, S. T et al. Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforschung**, v. 54, n. 3, p. 241-245, 2000.

CHANG, S. T. et al. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforschung**, v. 53, n. 5, p. 487-490, 1999.

DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Ed. 2. São Paulo SP. Ed. UNESP. 2002. 604p.

EATON, R.A.; HALE, M. D. C. **Wood: decay, pests and protection**. London: Chapman & Hall, 1993. 546p.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-targettherapeutic concept of phytotherapy. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 122-132, 2011.

FARIA, T. J. et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

FERRAZ, A. B. F. et al. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, p. 243-248, 2010.

FRATERNALE, D. et al. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal furanosesquiterpenoids isolated from *Commiphora erythraea* (Ehrenb.) Engl. resin. **Fitoterapia**, v. 82, p. 654-661, 2011.

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; PARIS, C.; AUER, C. G. Fusariose em mudas de *Pinus taeda*. **Boletim de Pesquisas Florestais**, Colombo, n. 52, p. 157-162, 2006.

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

GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. **Piperáceas – Piper. Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Santa Catarina. 2001, 104p.

HSU, F. L.; CHANG, H. T.; CHANG, S. T. Evaluation of antifungal properties of octyl gallate and its synergy with cinnamaldehyde. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 734-738, 2007.

ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Advances in Phytomedicine**, v. 3, chapter 2; p. 29–44, 2006.

KARTAL, S. N. et al. Preliminary evaluation of fungicidal and termiticidal activities of filtrates from biomass slurry fuel production. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 41-47, 2004.

LAGO, J. H. G. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. shaerospermum*. **Journal of Natural Products**. v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004.

MACHADO, G. O. et al. Preservante natural de madeira para uso na construção civil: óleo de Neem. **Minerva**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2006.

MAREI, G. I. K., ABDEL RASOUL, M. A., ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 56-61, 2012.

MORANDIM-GIANNETTI, A. A. et al. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810-1814. 2010.

MORAIS, S. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 35, p. 670-675, 2007.

MOREIRA, D. L. et al. Estudos fitoquímicos e farmacológico de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 82, p. 29–32. 2001.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 503-508, 2008.

NIST. **National Institute of Standards and Technology**. NIST/EPA/NIH mass spectral library & search/analysis programs NIST 02 update. Hoboken, USA: John Wiley & Sons; 2010.

OLIVEIRA, J. A. Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativa* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.). **Ciência e Prática**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 1992.

PARMAR, V. S. et al. Review article number 122: Phytochemistry of genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 572-578, 2006.

PFEIL, W.; PFEIL, M. **Estruturas de madeira**. Ed. 6. Editora LTC, Rio de Janeiro, 2003, 224p.

PINEDA, M. R. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 507-515, 2012.

PUHL, M. C. M. N. et al. Antimicrobial Activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and Its Synergism with Different Antibiotics. **Molecules**; v. 16, p. 9925-9938, 2011.

REES, A. A. Infection of *Pinus caribaea* seed by *Lasiodiplodia theobromae*. **Transactions of the British Mycological Society**. v. 90, n. 2, p. 321-324, 1988.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 80-84, 2005.

ROCHA, M. P. **Biodegradação e preservação da madeira**. Fupef - série didática, Curitiba, n. 01/01, 2001, 94p.

SANTOS, M. S. et al. Análise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de *Piper amalago*, *P. mikanianum*, e *P. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, p. 65-71, 2010.

SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. 2009. 75p. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SILVEIRA, M. C. V.; MENEZES, M. Estudo comparativo de algumas espécies relacionadas a *Fusarium moniliforme*, através de características morfológicas e fisiológicas. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 3, p. 247-262, 2006.

SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JR., A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 317-320, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37141998000400017&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 de Janeiro 2015.

SCHULTZ, T. P.; NICHOLAS, D. D. Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. **Phytochemistry**, v. 61, n. 5, p. 555-560, 2002.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. Degradação de fungicidas benzimidazóis. In: ITAMAR SOARES DE MELO; JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO. (Org.). **Microbiologia ambiental**. Ed. 1. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, v. 1, cap. 6; p. 141-165, 1997.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosus*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143-145. 2007.

SILVA, R. S. et al. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre: RiMa Novo Ambiente. Ed. 2, 2013, 357p.

SOIDROU, S. H. et al. Fungicidal activity of four essential oils from *Piper capense*, *Piper borbonense* and *Vetiveria zizanoides* growing in Comoros against fungi decay wood. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 3, p. 216-223, 2013.

VODA, K. et al. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniphora puteana*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 51-59, 2003.

WANG, S. Y.; CHEN, P. F.; CHANG, S. T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 813–818, 2005.

YEN, T. B.; CHANG, S. T. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 232–236, 2008.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.

5 DISCUSSÃO GERAL

Desde os primórdios, o homem observou a potencialidade das plantas, e este fato tem acompanhado a sua evolução. As primeiras civilizações percebem rapidamente a existência de “grupos” de plantas de acordo com suas utilidades, como alimentícias, como repelentes, com maior ou menor toxicidade e para cura de enfermidades, entre outros (CUNHA, ROQUE, 2005). No Brasil, os índios utilizavam as plantas medicinais e a chegada dos europeus com os escravos africanos contribuiu com novas plantas e modos de uso (LORENZI, MATOS, 2008).

Uma planta útil devido aos produtos de seu metabolismo secundário pode ser definida como qualquer vegetal que produza, em quantidade considerável, substâncias biologicamente ativas. Neste sentido, há alguns problemas quanto à veracidade e segurança da utilização de plantas para diferentes finalidades, e um destes se inicia na correta identificação da espécie (MENTZ, BORDIGNON, 1999; CASTRO et al., 2004). Tratando-se da família Piperaceae, suas espécies são de complexa identificação botânica, uma vez que as inflorescências do tipo espiga são semelhantes entre si (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). Deste modo, a identificação da espécie em estudo foi problemática, não só pelo aspecto anteriormente citado, mas também por informações contraditórias observadas na literatura. Por um lado, Guimarães e Valente (2001) mencionaram a ocorrência de *P. gaudichaudianum* para o Rio Grande do Sul (RS), porém uma revisão realizada por Ruschel e Waechter (2004) sobre o gênero *Piper* no RS, excluiu a ocorrência da espécie *P. gaudichaudianum* da flora do estado. Ademais, Sobral et al. (2006) se referiram à espécie *Piper aduncum* L. como sinônimo de *P. gaudichaudiaunum*, porém na segunda edição do livro, de 2013, os autores citam *P. gaudichaudianum* e não mencionam *P. aduncum*. Entretanto, *P. gaudichaudianum* e *P. aduncum* ocorrem no RS, de acordo com a base de dados virtual da Flora do Brasil. Inicialmente a espécie em estudo foi determinada como *P. aduncum*, em virtude, dessas referências botânicas e a semelhança da composição química observada para o óleo essencial (OE) de folhas descrita no manuscrito 2 com os resultados de alguns trabalhos sobre *P. aduncum* (MAIA et al., 1998; MORAIS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009; POTZERNHEIM et al., 2012). Não obstante, em contato pessoal com o prof. Dr. Jorge Luiz Waechter, este aconselhou encaminhar uma exsicata para um especialista da família Piperaceae. Deste modo, a pesquisadora do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Daniele Ferreira Monteiro identificou a espécie em questão como *Piper gaudichaudianum* Kunth Neste caso, a base de conhecimento apenas literária levaria à

identificação errônea da espécie. Por isso, ressalta-se a importância da determinação da espécie vegetal que está sendo objeto de pesquisa por especialista do táxon sempre que necessário, pois a correta identificação é a segurança da qualidade da informação gerada pelo estudo.

Como mencionado anteriormente, há outros fatores que interferem na qualidade dos extrativos vegetais, entre eles aspectos relacionados ao material vegetal como plantio, colheita, secagem, armazenamento e beneficiamento (CASTRO et al., 2004). Outro fator que influencia a qualidade do extrativo é o método de extração (BELTRAME et al., 2010). Nesse trabalho foi utilizada a hidrodestilação, por ser simples, barato e eficiente para a obtenção de OE em escala laboratorial (SARTOR, 2009). Neste contexto, quando o objetivo é a produção de OE, um conjunto de fatores deve ser considerado, pois estes influenciam na presença, rendimento e composição química dos OE nas plantas. Alguns destes aspectos que podem afetar as características dos OE são os de origem genética e inerentes à planta, como estágio de desenvolvimento, idade, órgão vegetal, tipo de estrutura secretora, ocorrência de injúrias mecânicas ou químicas; e ambientais como a temperatura, disponibilidade hídrica e nutricional, poluição, estação do ano, intensidade de radiação solar e altitude (CASTRO et al., 2004; GOBBO-NETO, LOPES, 2007; FIGUEIREDO et al., 2008). Possíveis reflexos da influência destes fatores foram observados neste estudo, sendo descritos nos manuscritos 1 e 2, onde os rendimentos e as composições químicas dos OE foram distintos daqueles reportados na literatura para *P. gaudichaudianum* (ANDRADE et al., 1998; SILVA et al., 2006; MORAIS et al., 2007; PÉRES et al., 2009; SANTOS, 2009). Porém os OE dos indivíduos amostrados da população de *P. gaudichaudianum* em Santa Maria, não sofreram efeito da sazonalidade e da mudança das fenofases.

A predominância do fenilpropanóide dilapiol, constituinte majoritário do OE de folhas de *P. gaudichaudianum*, não se modificou na presença de órgãos reprodutivos (inflorescências e frutos) nas estações outono, inverno e primavera. Da mesma forma, a ocorrência de órgãos reprodutivos não alterou o rendimento do OE de folhas (manuscrito 1). Por outro lado, a presença de miristicina foi a única diferença na composição química dos OE detectada, entre os órgãos vegetais estudados, ou seja, folhas e órgãos reprodutivos (manuscrito 2). Além de fatores genéticos, ambientais e bióticos poderem influenciar a variabilidade observada (DIXON, PAIVA, 1995; LOŽIENĖ, VENSKUTONIS, 2005; TELASCREA et al., 2007; CLEMES, 2009; DUARTE et al., 2010a, 2010b), outros fatores podem interferir com a produção de OE. Com relação a isso, Vilela (2014) relatou a atuação do fator geográfico na variabilidade dos OE entre populações distantes, o que foi atribuído à impossibilidade de ocorrer o fluxo gênico. A variação de

constituintes químicos em populações de plantas está interligada fortemente com a importância ecológica, sendo este fato relevante para a compreensão da história evolutiva, onde se possa verificar como estes afetam as interações intraespecíficas e interespecíficas (POSER, MENTZ, 1999; BRENES-ARGUEDAS, COLEY, KURSAR, 2008).

A quantidade de terpenóides observada na composição química dos OE de *P. gaudichaudianum* não ultrapassou a faixa de 38%. A variação desta classe de constituintes depende sobretudo de fatores genéticos (KLEINE; MÜLLER, 2011). No entanto, Curado et al. (2006) fornecem evidências de que os terpenóides também são fortemente controlados pelas condições ambientais extremas. Portanto, o perfil químico descrito para população em estudo, pode ser explicada pela combinação dos fatores mencionados, uma vez que, houve altos níveis de fenilpropanóides quando comparados aos de terpenóides, e estes diferem dos dados da literatura para a espécie.

A partir do conhecimento dos fatores que podem influenciar nos constituintes ativos das plantas, pode-se obter uma matéria-prima de melhor qualidade (REIS, MARIOT, STEENBOCK, 1999). Em ambientes naturais, a obtenção da matéria-prima está integrada com o processo exploratório, relacionado à manutenção da estrutura genética da população da espécie sob manejo, onde deve ocorrer de forma que garanta a sustentabilidade do ecossistema com diversidade. No entanto, pelas técnicas de cultivo a espécie selecionada deve atender ao objetivo de aumentar a produção de biomassa, sem comprometer o seu valor, visto que condições diferentes das naturais podem levar à produção e armazenamento de metabólitos secundários que não eram almejados anteriormente (REIS, MARIOT, STEENBOCK, 1999; CASTRO et al., 2004).

A espécie *P. gaudichaudianum* apresenta potencial para produção de OE, em virtude de ter apresentado bom rendimento, composição química promissora, sem variabilidade significativa no ano observado (manuscritos 1 e 2). De maneira geral, possivelmente a obtenção do material vegetal poderá ser tanto de forma extrativista, quanto cultivada, pois se trata de uma espécie rústica indicada para projetos de restauração ambiental, que propicia cobertura arbustiva em solos pobres (GUIMARÃES, VALENTE, 2001). Além disso, ao longo das coletas de folhas dos indivíduos de *P. gaudichaudianum* neste estudo, foi constatada uma capacidade de refolhação de cerca de dois ou três meses.

Adicionalmente, quando cultivada a sua utilização poderá se intensificar, pois pode ser implantada em solos menos férteis, onde plantas mais exigentes não se desenvolvem. Porém, estas práticas silviculturais deverão ser verificadas em estudos posteriores para aferir a qualidade e

quantidade do extrativo vegetal resultante, visto que, alguns trabalhos relatam a mudança ou diminuição dos constituintes químicos e rendimentos de extrativos de plantas que foram cultivadas em ambientes diferentes de sua origem natural (LAKUŠIĆ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; PIRBALOUTI, HASHEMI, GHAHFAROKHI, 2013).

A busca por substâncias antifúngicas obtidas a partir de fontes naturais é crescente, onde os biopesticidas derivados de OE se destacam por possuírem muitas características vantajosas sobre os sintéticos, como rápida volatilidade, biodegradação, baixa à moderada toxicidade e alta seletividade, demonstrando menor risco ao ambiente e à saúde humana e animal (MENEZES, 2005; ISMAN, MACHIAL, 2006; BOULOGNE et al., 2012). Os resultados obtidos no manuscrito 3, que relata a atividade fungitóxica para os OE de *P. gaudichaudianum* são especialmente promissores devido às baixas concentrações efetivas, detectadas tanto para os óleos brutos quanto para o dilapiol, que já demonstrou atividade fungicida, larvicida e inseticida (ALMEIDA et al., 2009). Pesquisas apontam a família Piperaceae como um grupo de espécies que possui substâncias com propriedades fungicidas (BASTOS, 1997; PARMAR et al., 1997; BASTOS, ALBUQUERQUE, 2004; SILVA, BASTOS, 2007; NASCIMENTO et al., 2008; ZACARONI et al., 2009; MORANDIM-GIANNETTI et al., 2010; PUHL et al., 2011; PINEDA et al., 2012; SOIDROU et al., 2013). Porém, este é o primeiro relato desta atividade para os OE de *P. gaudichaudianum* e para seu constituinte majoritário contra os fungos *Fusarium moniliforme*, *Botryosphaeria rhodina*, *Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum*.

Um parâmetro importante a ser considerado para definir a aplicabilidade do dilapiol é a toxicidade, que determina sua margem de segurança. Estudos realizados com o OE de *P. aduncum*, que também possui altos teores deste constituinte (88,9%), evidenciaram efeitos tóxicos mínimos sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos (SOUSA et al., 2008). Além disso, a regulamentação de produtos naturais, como OE e constituintes isolados, deve ser aprovada por órgãos de controle e registro em cada país aos quais forem destinados (SACCARO JR., 2011).

De maneira geral, o desenvolvimento de produtos antifúngicos que possam ser usados na preservação da madeira e para prevenir e controlar doenças em plantas a partir de uma espécie nativa como *P. gaudichaudianum*, estaria valorizando a biodiversidade brasileira e impulsionando o desenvolvimento da indústria genuinamente nacional. Este produto eventualmente gerado também poderia ser exportado, gerando divisas para o país. A demanda por matéria-prima se tornaria uma fonte de renda alternativa para os produtores rurais, principalmente para os que se enquadram na agricultura familiar, considerando-se que são estes agricultores os proprietários da

maioria dos remanescentes florestais hoje existentes. A utilização desta espécie, que se encontra no sub-bosque da floresta, como matéria-prima resultaria em efeito benéfico pela geração de renda e proteção ambiental, uma vez que seria um estímulo para o uso sustentável das florestas. Importante também é a observação de práticas de manejo adequadas, que não interferem na própria população e nem no restante da comunidade vegetal.

6 CONCLUSÕES

- O rendimento do óleo essencial de folhas frescas (base úmida) e secas (base seca) não apresentou variabilidade sazonal no período avaliado;
- A secagem do material vegetal à temperatura ambiente durante 15 dias não diminuiu os teores e não alterou consideravelmente a composição química dos óleos essenciais de folhas de *P. gaudichaudianum*, sendo um aspecto positivo, uma vez que este processamento poderá ser utilizado pós-colheita, sem danos a qualidade do extrativo vegetal;
- A composição química dos óleos essenciais (OE) de folhas, inflorescências e frutos de *P. gaudichaudianum*, nas quatro estações observadas no ano de 2013, apresentaram como constituinte majoritário o dilapiol, além de sesquiterpenóides em pequenas quantidades. Já as inflorescências e frutos foram os únicos órgãos vegetais que forneceram OE contendo o fenilpropanóide miristicina;
- Os dados de rendimento e composição química dos óleos essenciais de folhas permitem indicar qualquer época do ano para a coleta do material vegetal. Porém no período em que a espécie estiver no auge da fase reprodutiva (outono e primavera) é possível obter dois tipos de extrativos vegetais, de folhas e inflorescências ou frutos;
- Os óleos essenciais de folhas e órgãos reprodutivos tiveram ação fungitóxica frente aos fungos utilizados neste estudo nas concentrações de 0,25-1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Mais especificamente, a bioatividade foi evidenciada contra *Botryosphaeria rhodina* e *Fusarium moniliforme* a partir da concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e para *Pycnoporus sanguineus* e *Gloeophyllum trabeum* em 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e concentrações superiores;
- O constituinte majoritário isolado, dilapiol, demonstrou ser a substância responsável pela ação fungitóxica, em virtude de sua ação ser semelhante à dos óleos essenciais quando testado isoladamente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. R. P. et al. chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6. p. 1427 – 1434. 2009.

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; SANTO, A. S.; MAIA, J. G. Essential oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C.DC. Reserch note. **Journal Essential Oil Reserch**, v. 10, p. 465-467, 1998.

APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

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

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555-557, 2004.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BELTRAME, J. M. et al. Estudo de obtenção de óleos essenciais e fatores de influência em sua composição. EXP – Ciência para o Desenvolvimento Sustentável. **Anais.. II ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**. Universidade Federal do Paraná UTFPR – Campus de Toledo. 2010.

BENTO, T. S. et al. Growth inhibition and antioxidative response of wood decay fungi exposed to plant extracts of *Casearia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 79-86, 2014.

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.

BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 4, p. 325-347, 2012.

BRAND, M. A.; ANZALDO, J.; MORESCHI, J. C. Novos produtos para o tratamento preservante da madeira: “Perspectivas da pesquisa e utilização”. **Floresta**, v. 36, n. 1, p. 129-138. 2006.

BRENES-ARGUEDAS, T.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Divergence and diversity in the defensive ecology of *Inga* at two Neotropical sites. **Journal of Ecology**, v. 96, p. 127-135, 2008.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: ACRIBIA, 1991. 594p.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais – Metabólitos secundários**. Ed. 2. Suprema: Viçosa. 2004, 113p.

CELIMENE, C.; JESSI, A. M.; LESLIE, F.; YOUNG, R. A. Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. **Holzforschung**, v. 53, n. 5, p. 491-497, 1999.

CLEMES, S. M. **Efeito da sazonalidade e herbivoria sobre a produção de metabólitos secundários voláteis em *Piper mikianium* (Kunth) Steudel**. 2009. 38p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Regional de Blumenau. Blumenau, 2009.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O. R. **A farmacognosia nos estudos farmacêuticos**. In: CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 4-215.

CURADO, M. A. et al. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 21, p. 2363-2369, 2006.

DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Ed. 2. São Paulo SP. Ed. UNESP. 2002. 604p.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUARTE, A. R. et al. Environmental influence on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 9, p. 1672-1680, 2010a.

DUARTE, A. R. et al. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1459-1467, 2010b.

EPA. Environmental Protection Agency. **Benomyl RED Facts**. 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/benomyl_fs.htm>>. Acesso em: 02 de dezembro de 2014.

FIEDLER, N. C.; SOARES, T. S.; SILVA, G. F. Produtos florestais não madeireiros: importância e manejo sustentável da floresta. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 10, n. 2, p. 264-278, 2008.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 213-226. 2008.

FREIRE, A. P. F. et al. Utilização do óleo-resina de copaíba (*Copaifera paupera*) no tratamento preservativo da espécie sumaúma (*Ceiba pentandra*). **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 7, n. 13, p. 19-31, 2011.

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

GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; PARIS, C.; AUER, C. G. Fusariose em mudas de *Pinus taeda*. **Boletim de Pesquisas Florestais**, n. 52, p. 157-162, 2006.

GUIMARÃES E. F.; VALENTE, M. C. Piperáceas – *Piper*. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Santa Catarina. 2001, 104p.

GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M.; MONTEIRO, D.; MEDEIROS, E. S.; QUEIROZ, G. A. **Piperaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12780>>. Acesso em: 02 de Janeiro de 2015.

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.

HENRIQUES, A. T.; SIMÕES-PIRES, C. A.; APEL, M. A. **Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas**. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Ed. 1. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2007. p. 209–235.

ISMAN, M. B.; MACHIAL, C. M. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. **Advances in Phytomedicine**, v. 3, p. 29–44, 2006.

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

KARTAL, S. N. et al. Effects of inorganic ions on leachability of wood preserving *N,N*-hydroxynaphthalimide (NHA). **Forest Product Journal**, v. 54, n. 1, p. 80-84. 2004a.

KARTAL, S. N. et al. Preliminary evaluation of fungicidal and termiticidal activities of filtrates from biomass slurry fuel production. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 41-47, 2004b.

KLEINE, S.; MÜLLER, C. Intraspecific plant chemical diversity and its relation to herbivory, **Ecologia**, v. 166, p.:175-186, 2011.

LAGO, J. H. G. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. shaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783–1788, 2004.

LAKUŠIĆ, B. et al. Environmental and seasonal impacts on the chemical composition of *Satureja horvatii* Šilić (Lamiaceae) essential oils. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 483-493, 2011.

LONDE, L. N. et al. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em Meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Communication - Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 94-100, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Ed. 2. Nova Odessa: São Paulo - Instituto Plantarum. 2008, 544p.

LOŽIENĖ, K.; VENSKUTONIS, P. R. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 517-525, 2005.

MACHADO, F. S. **Manejo de Produtos Florestais Não Madeireiros: um manual com sugestões para o manejo participativo em comunidades da Amazônia**. Rio Branco, Acre: PESACRE e CIFOR, p. 13-15, 2008.

MACHADO, G. O. et al. Preservante natural de madeira para uso na construção civil: óleo de Neem. **Minerva**, v. 3, n.1, p.1-8, 2006.

MAIA, J. G. S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 269-272, 1998.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: Seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. **Embrapa Agrobiologia**, 2005, 58p.

MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L. **Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais**. 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. Ed. 5. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre, 1999.

McCHESNEY, J. D. **Biological and chemical diversity and the search for new pharmaceuticals and other bioactive natural products**. In Human medicinal agents from plants. KINGHORN, A. D.; ALANDRIN, M. F. American Chemical Society. Symposium Series, v. 534. cap. 4. p. 38-47, 1993.

MORANDIM-GIANNETTI, A. A. et al. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1810-1814. 2010.

MORAIS, S. M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 670-675. 2007.

MOREIRA, D. L. et al. Estudos fitoquímicos e farmacológico de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 82, p. 29-32. 2001.

MORESCHI, J.C. **Biodegradação da Madeira**. Curitiba: UFPR, 1980, 38p.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween[®] 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 503-508. 2008.

OLIVEIRA, G. L. et al. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* L. from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 743-753, 2013.

ONUORAH, E. O. The wood preservative potentials of heartwood extracts of *Milicia excelsa* and *Erythrophleum suaveolens*. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 171-173. 2000.

PARMAR, V. S. et al. Review article number 122: Phytochemistry of genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 4, n.10, p. 1287-1296. 2008.

PÉRES, V. F. et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2389–2395, 2009.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

PINEDA, M. R. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. against phytopathogenic fungi. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, n. 4, p. 507-515, 2012.

PIRBALOUTI, A. G.; HASHEMI, M.; GHAFHAROKHI, F. T. Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 43-48, 2013.

POLETTI, I. et al. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquarí, RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-10. 2006.

POSER, G. L. V.; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação.** 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. Ed. 5. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre, 1999.

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

PUHL, M. C. M. N. et al. Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. **Molecules**; v. 16, p. 9925-9938, 2011.

RAVEN, H. P.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal.** Ed. 5, cap. 12, 1996, 738p.

RUSCHEL, D.; WAECHTER, J. L. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 2, n. 2, p. 103-129, 2004.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. **Diversidade e domesticação de plantas medicinais.** 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. Ed. 5. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre, 1999.

SANTOS, T. G. **Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Piper* e de *Baccharis semiserrata* DC.** 2009. 117p. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.

SACCARO JR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v.14, n.1, p. 229-244, 2011.

SARTOR, R. B. **Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste de vapor.** 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. **Degradação de fungicidas benzimidazóis**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). *Microbiologia ambiental*. Ed. 1. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, v. 1, cap. 6; p. 141-165, 1997.

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**, v. 32, n. 2, p. 143-145. 2007.

SILVA, J. L. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o crescimento *in vitro* de fitopatógenos. **Revista Verde**, v.7, n.1, p. 80 – 86, 2012.

SILVA, P. P.; PÉRES, V. F.; SAFFI, J. Extração e caracterização do óleo essencial das inflorescências de *Piper gaudichaudianum* Kunth **Revista de Iniciação Científica da Ulbra**, v. 1, n. 1, p. 25-30, 2006.

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*. Ed. 5. Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre, 1999.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre: RiMa Novo Ambiente. Ed. 1, 2006, 331p.

SOBRAL, M. et al. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre: RiMa Novo Ambiente. Ed. 2, 2013, 357p.

SOIDROU, S. H. et al. Fungicidal activity of four essential oils from *Piper capense*, *Piper borbonense* and *Vetiveria zizanioides* growing in Comoros against fungi decay wood. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 3, p. 216-223, 2013.

SOUSA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 217-221, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática – guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas ativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Ed. 3, Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2012, 768p.

TARAKANADHA, B.; MORRELL, J. J.; RAO, K. S. Impacts of wood preservatives (CCA, CCB, CDDC, ACZA, ACQ and ACC) on the settlement and growth of fouling organisms. 2002. Disponível em: <<www.ccaresearch.org/ccaconference/post/pdf/tarakanadha.pdf>>. Acessado em: 8 Abril 2013.

TELASCREA M. et al. Essential oil from leaves of *Cryptocarya mandioccana* Meisner (Lauraceae): Composition and intraspecific chemical variability. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 222-232, 2007.

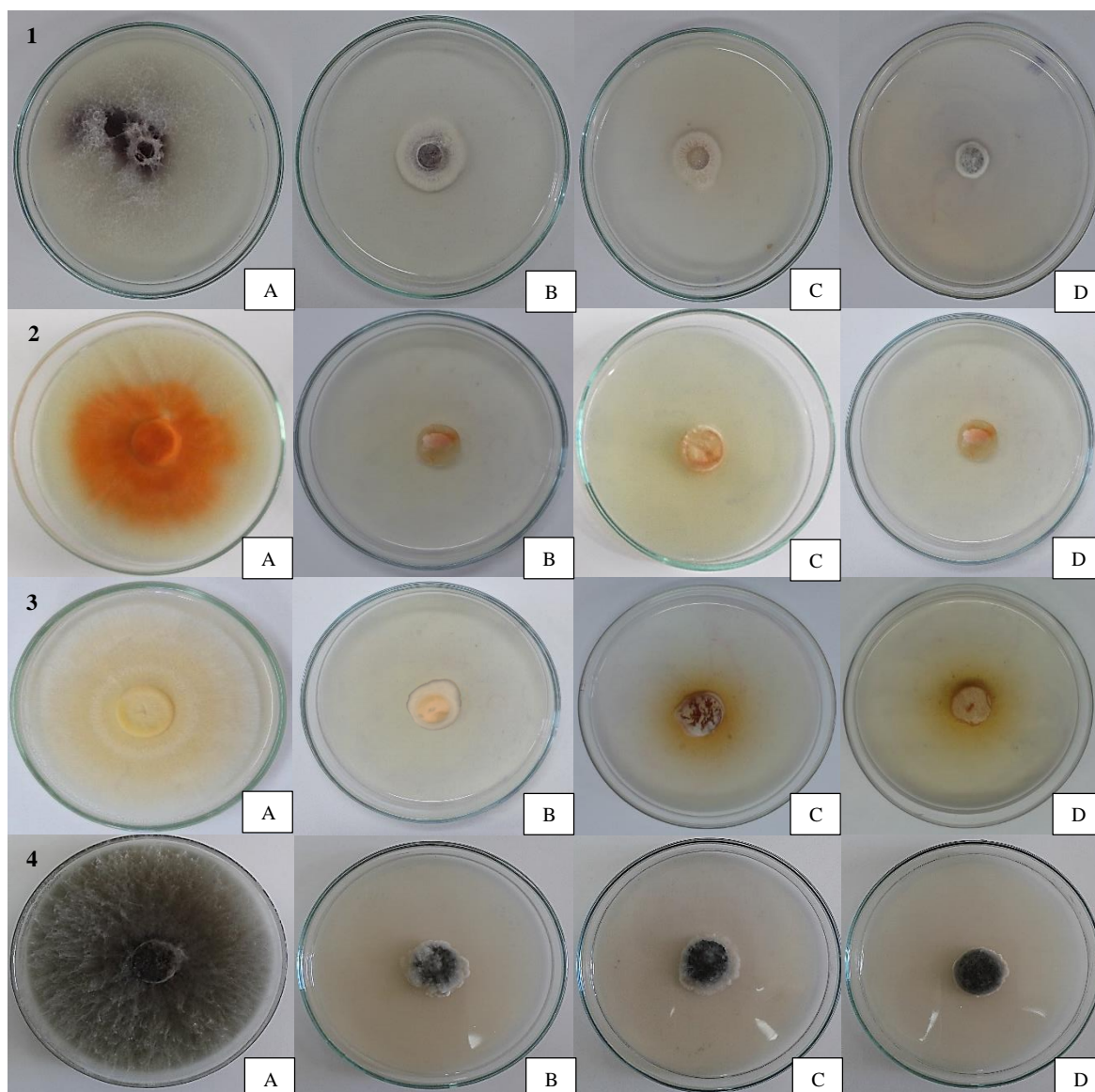
VENTUROSOSO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011

VILELA, E. C. Influência ambiental, espacial e genética na composição química dos óleos essenciais de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). 2014. 97p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014.

VODA, K.; BOJANA, B.; VRTAČNIK, M.; POHLEVEN, F. Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 51-59.2003.

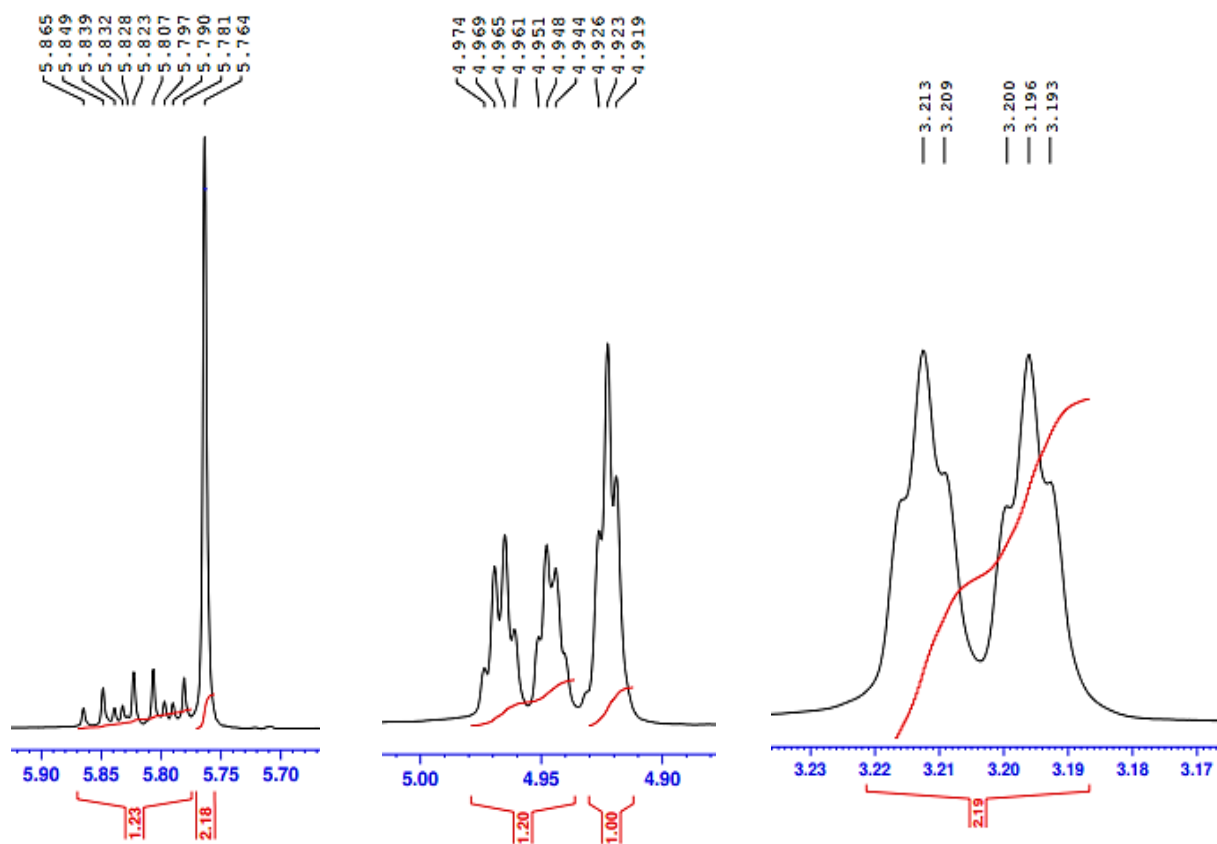
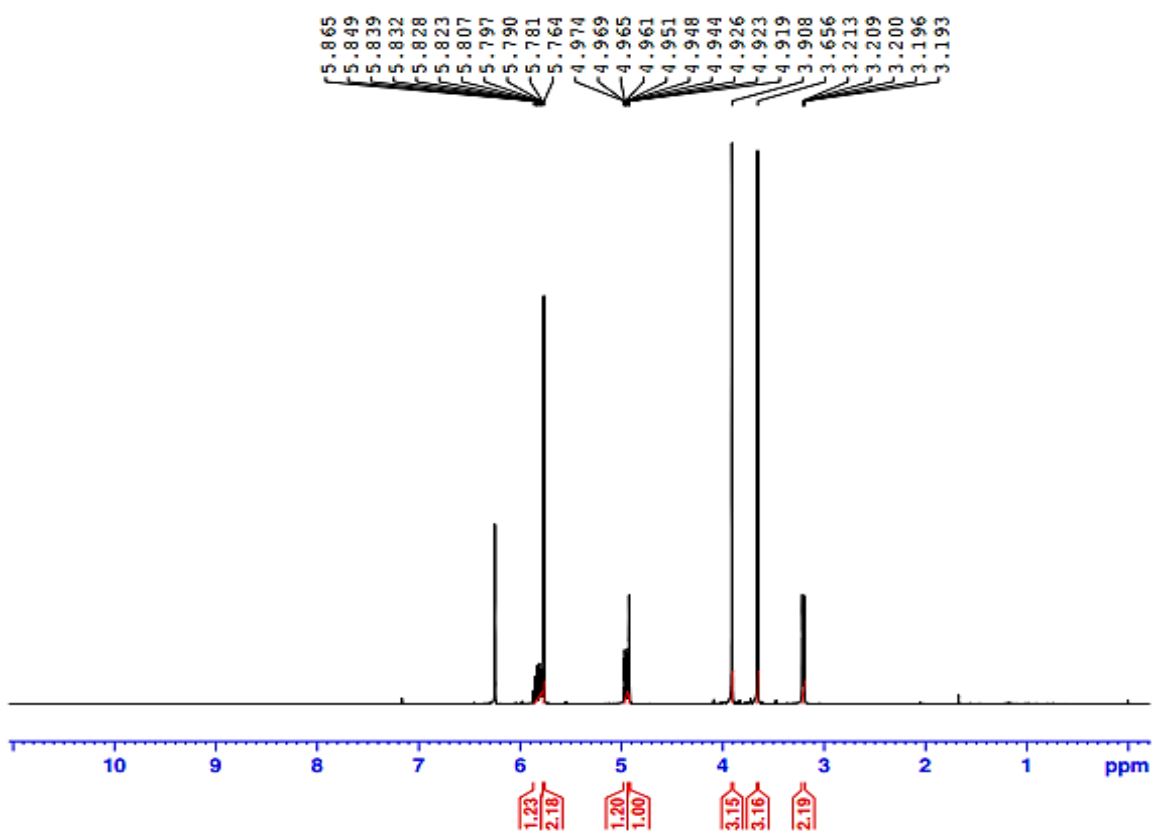
ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**. v.39, n.1, p. 193-197. 2009.

ANEXOS

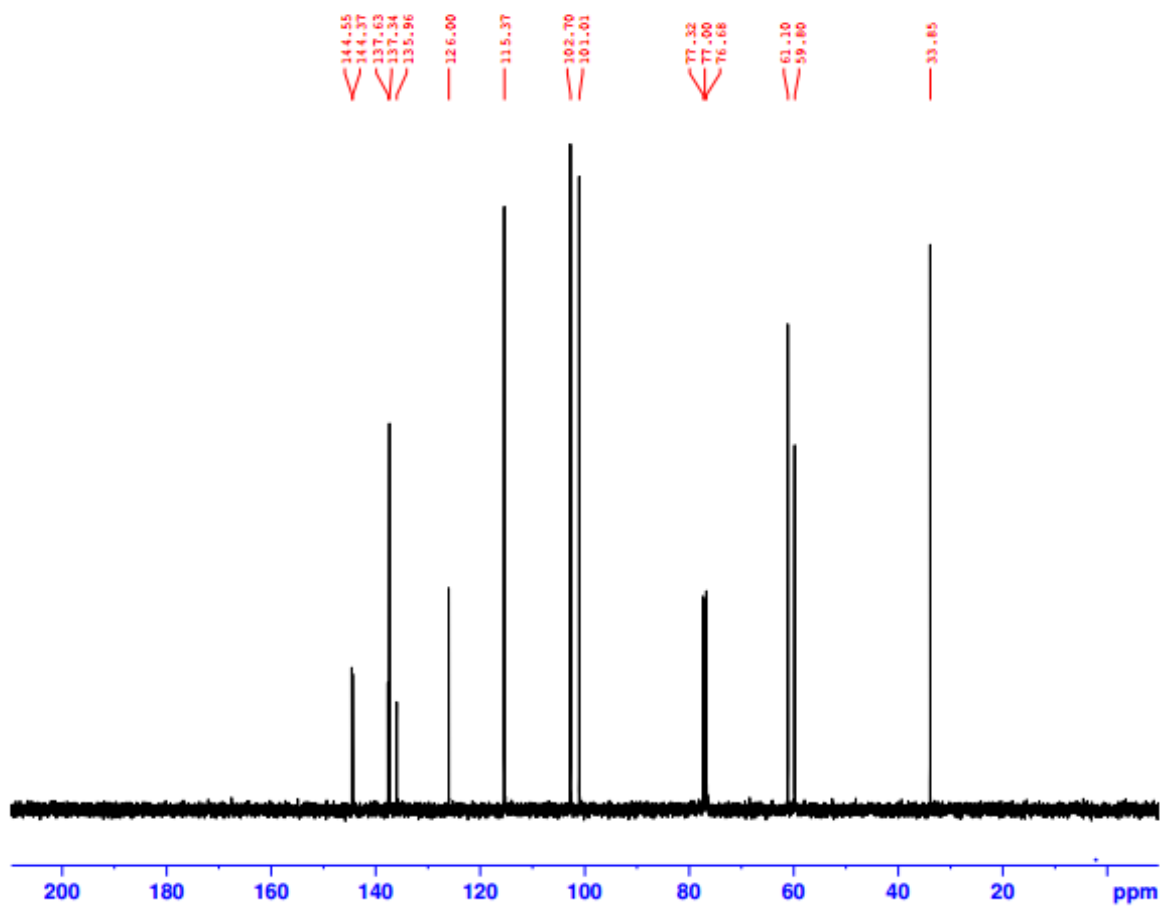


ANEXO 1 - Atividade fungitóxica dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* Kunth contra as quatro espécies fúngicas.

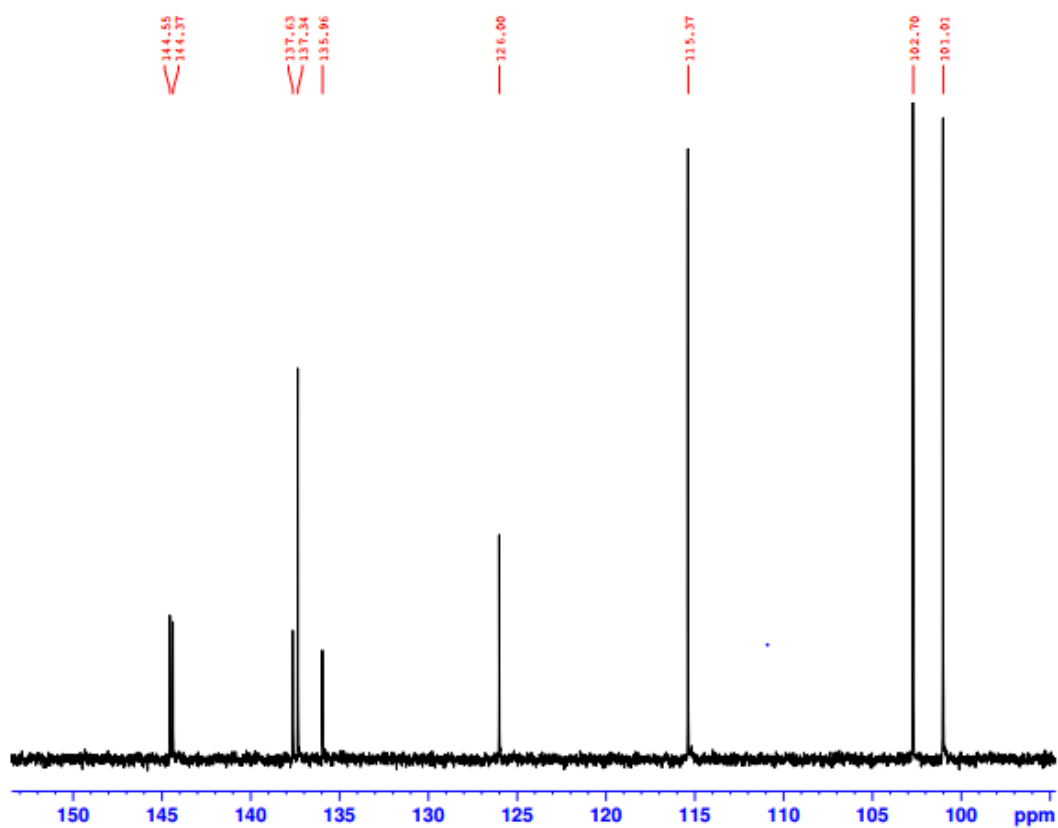
Legenda: **Linha 1** – *Fusarium moniliforme*; **Linha 2** – *Pycnoporus sanguineus*; **Linha 3** – *Gloeophyllum trabeum*; **Linha 4** – *Botryosphaeria rhodina*; **A** – testemunhas absolutas; **B** - concentração do óleo essencial do pool de órgãos reprodutivos (0,25µL/mL); **C** - concentração do óleo essencial do pool de folhas (0,25µL/mL); **1D** e **4D** – concentração de dilapiol (225,5 µg/mL); **2D** e **3D**- concentração de dilapiol (451,2µg/mL).



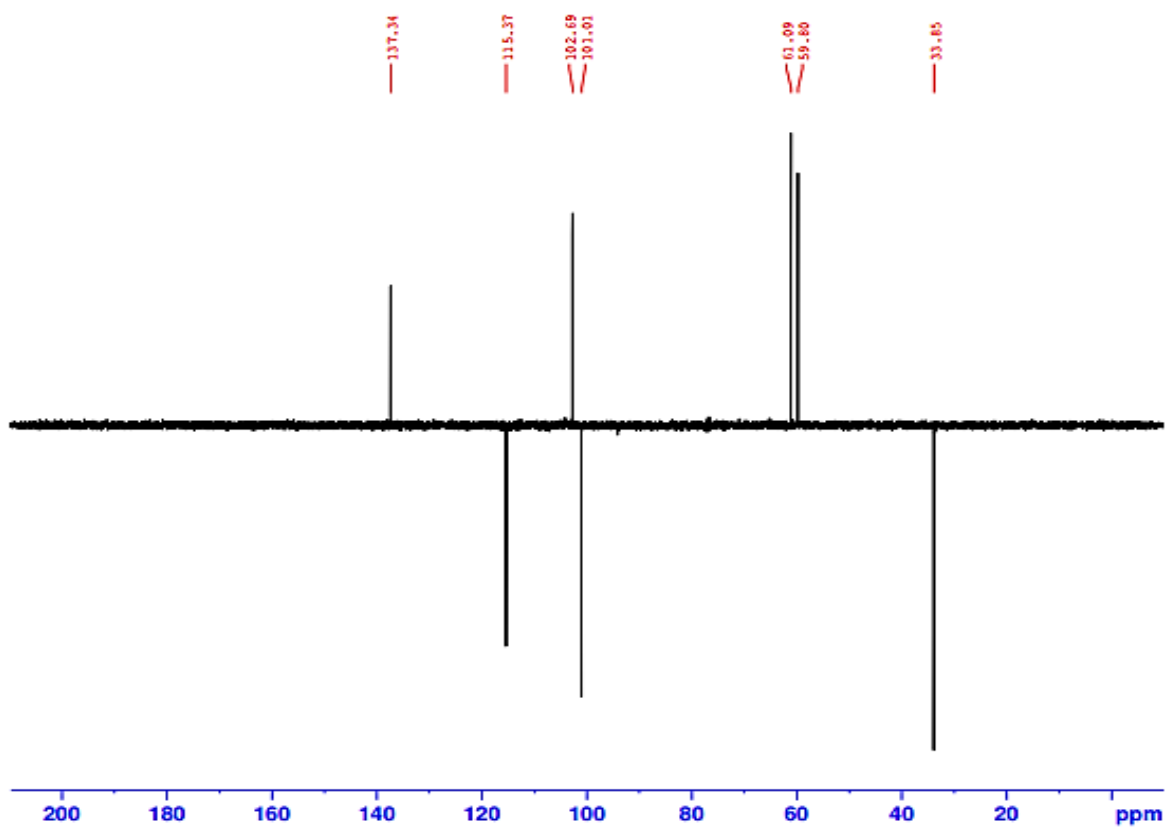
ANEXO 2 – Espectro ^1H -NMR do dilapiol (400 MHz, CDCl_3).



ANEXO 3 - Espectro de RMN ^{13}C do dilapiol (100 MHz, CDCl_3).



ANEXO 4 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C do dilapiol (100 MHz, CDCl_3).



ANEXO 5 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT do dilapiol (100 MHz, CDCl_3).