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

Jésica Tres

RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth E ATIVIDADE FUNGITÓXICA in vitro

#### Jésica Tres

## RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE RAÍZES DE

Piper gaudichaudianum Kunth E ATIVIDADE FUNGITÓXICA in vitro

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal.** 

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzman

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

Tres, Jésica
RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth E ATIVIDADE
FUNGITÓXICA in vitro / Jésica Tres.- 2017.
83 p.; 30 cm

Orientadora: Berta Maria Heinzman Coorientadora: Marlove Fátima Brião Muniz Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2017

1. Piperaceae 2. Óleo essencial 3. Raízes 4. Derivado do ácido benzoico 5. Fungitóxico I. Heinzman, Berta Maria II. Brião Muniz, Marlove Fátima III. Título.

#### Jésica Tres

## RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL NAS RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth E ATIVIDADE FUNGITÓXICA in vitro

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal** 

Aprovado em 20 de fevereiro de 2017:

Berta Maria Heinzman, Dra. (UFSM)

(Presidente/Orientadora)

Igor Poletto, Dr. (UNIPAMPA)

Cristiane Pedrazzi, Dra (UFSM)

Santa Maria, RS 2017

#### **AGRADECIMENTOS**

- Á quem é à base de tudo, meus pais, Antonio e Dilva, e aos meus irmãos Rafael e
   André Luis, e ao meu sobrinho Davi Lucas, vocês são muito especiais para mim.
  - A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, por acreditarem nesse trabalho, viabilizando o processo.
- A professora Dra Berta M. Heinzmann, por ter me acompanhado nessa jornada, com atenção, paciência, estimulando sempre a busca do mais e melhor, ensinando qual o caminho certo a seguir, nesse período do mestrado. Nunca esquecerei esse aprendizado constante.
- À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro fundamental para a realização da pesquisa.
- A professora Dra Marlove Fátima Brião Muniz, minha coorientadora, por ter acreditado e viabilizado o trabalho no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi.
- Aos meus colegas do Laboratório de Extrativos Vegetais, LABEVE, pelo carinho, atenção, amizade, constante aprendizado e auxílio na realização de todas as atividades da dissertação.

E a todas as pessoas que de uma forma ou outra ajudaram a garantir que esse trabalho chegasse ao final de mais uma etapa.

Muito Obrigada!

#### RESUMO

### RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth E ATIVIDADE FUNGITÓXICA in vitro

AUTORA: JÉSICA TRES ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMAN

Esse trabalho teve por objetivo quantificar o rendimento e analisar a composição química do óleo essencial de raízes de Piper gaudichaudianum Kunth em uma população de Santa Maria, RS, Brasil, bem como, verificar a possível influência da sazonalidade sobre esses parâmetros. Em um ensaio experimental foi verificada a atividade fungitóxica in vitro do óleo essencial, bem como, de seu componente majoritário para os fungos apodrecedores da madeira, Trametes versicolor e Gooeophyllum trabeum. O material vegetal foi coletado nas quatro estações do ano e o óleo essencial foi extraído de raízes frescas por hidrodestilação, utilizando aparelho de Clevenger por 3 horas. O rendimento do óleo essencial foi determinado em percentagem, considerando-se a massa do material vegetal extraído (% m m<sup>-1</sup>). Sua composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-ÉM), e cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC). Para a definição de grupos químicos foram considerados os constituintes presentes no extrativo em percentagens > 1%, utilizando-se a Análise Hierárquica de Cluster (AHC) e Análise de Componentes Principais (ACP). O componente majoritário foi isolado por cromatografía em coluna e foi identificado com o auxílio dos métodos espectroscópicos. A atividade fungitóxica foi avaliada pelo método de diluição em meio BDA (batata-dextrose-ágar). Inicialmente, o óleo essencial e a substância majoritária foram diluídos em etanol (1:1), seguido de adição das soluções ao meio, nas concentrações finais de 0,0 (testemunha), 0,25; 0,5 e 1,0 μL/mL, e 1,0 μL/mL no caso do constituinte majoritário. O propiconazole foi utilizado como controle positivo (1,0 µL/mL). Os valores médios de rendimento dos óleos essenciais não diferiram entre as estações, oscilando entre 0,07% e 0,09%. A caracterização química do extrativo possibilitou a identificação do constituinte majoritário como o 4-(3 hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila, um derivado de ácido benzoico que apresentou teores médios variando entre 62,55% e 70,23%. A análise multivariada permitiu detectar diferenças na composição do óleo essencial das estações primavera e verão para outono e inverno. A atividade fungitóxica do óleo essencial foi dependente de concentração e variou conforme a espécie fúngica testada. A atividade do constituinte majoritário não diferiu daquela do óleo essencial e do controle positivo para T. versicolor, mas foi inferior à apresentada pelo óleo essencial e propiconazole no caso de G. trabeum. Tanto o óleo essencial quanto seu componente majoritário apresentam potencial fungitóxico nas concentrações máximas avaliadas, 0,5 e 1,0 µL/mL.

**Palavras-chave:** Piperaceae. 4-(3-hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila. Extrativos. Derivado do ácido benzoico. Controle de fungos.

#### **ABSTRACT**

## YIELD AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF ROOTS OF Piper gaudichaudianum Kunth AND in vitro FUNGITOXIC ACTIVITY

AUTHOR: JÉSICA TRES ADVISOR: BERTA MARIA HEINZMANN

The objective of this work was to quantify the yield and to analyze the chemical composition of the essential oil of roots of Piper gaudichaudianum Kunth in a population of Santa Maria, RS, Brazil, as well as to verify the possible influence of the seasonality on these parameters. In an experimental assay, the in vitro fungitoxic activity of the essential oil as well as of its major component was verified, against the wood rotting fungi Trametes versicolor and Gooeophyllum trabeum. The plant material was collected in the four seasons of ayear and the essential oil was extracted from fresh roots by hydrodistillation using Clevenger apparatus for 3 hours. The yield of the essential oil was determined as percentage, considering the mass of the extracted plant material (% m m<sup>-1</sup>). Its chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). For the definition of chemical groups, the constituents present in the extractive in percentages > 1% were considered, using Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA). The major component was isolated by column chromatography and was identified with the aid of spectroscopic methods. The fungitoxic activity was evaluated by dilution in PDA (potato-dextrose-agar) medium. Initially the essential oil and its major substance were diluted in ethanol (1: 1), followed by addition of the solutions to the medium, at the final concentrations of 0.0 (negative control), 0.25; 0.5 and 1.0 µL/mL, and 1.0 µL/ mL in the case of the major constituent. Propiconazole was used as a positive control (1.0 µL/mL). The average yield values of the essential oils did not differ between seasons, ranging from 0.07% to 0.09%. The chemical characterization of extractives allowed to identify the major constituent as 4-(3-hydroxy-3methyl-butenyl)-methylbenzoate, a benzoic acid derivative with average values ranging from 62.55% to 70.23%. The multivariate analysis allowed to detect differences in the essential oil composition of the seasons spring and summer to autumn and winter. The fungitoxic activity of the essential oil was concentration dependent and varied according to the fungal species tested. The activity of the major constituent did not differ from that of the essential oil and the positive control for T. versicolor, but was lower than that of essential oil and propiconazole in the case of G. trabeum. Both the essential oil and its major component have fungitoxic potential at the maximum concentrations evaluated, 0.5 e 1.0 μL/mL..

**Keywords:** Piperaceae. Methyl 4- (3-hydroxy-3-methyl-butenyl) benzoate. Extractives. Derivative of benzoic acid. Fungus control.

### **LISTA DE TABELAS**

ARTIGO 1	23
Tabela 1 -	Valores médios de rendimentos (% m m <sup>-1</sup> ) do óleo essencial de raízes de <i>Piper gaudichaudianum</i> obtidas em quatro estações de um ano32
Tabela 2 -	Composição química dos óleos essenciais de raízes de <i>Piper gaudichaudianum</i> obtidas em quatro estações de um ano35
ARTIGO 2	45
Tabela 1 -	Composição química dos pools de óleo essencial de raízes de <i>Piper gaudichaudianum</i> , utilizados para avaliação da atividade fungitóxica <i>in vitro</i> frente às espécies <i>Trametes versicolor</i> (pool RTv) e <i>Gloeophyllum trabeum</i> (pool RGt)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1	23
Figura 1 -	Estrutura química do 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila, constituinte majoritário do óleo essencial de raízes de <i>Piper gaudichaudianum</i> (Fórmula desenhada no programa BKChem)33
Figura 2 -	Representação das variáveis (A) e dos casos (B) nos gráficos dos componentes principais 1 e 2, considerando os 15 constituintes majoritários detectados em concentrações >1% nas quatro amostras de óleo essencial, obtidas a partir de raízes de <i>P. gaudichaudianum</i> em quatro estações do ano
Figura 3 -	Dendrograma obtido através da Análise Hierárquica de Cluster (AHC) das composições químicas de quatro amostras de óleo essencial de raízes de <i>P. gaudichaudianum</i> , obtidas em quatro estações do ano39
ARTIGO 2	45
Figura 1 -	Estrutura química do 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila, constituinte majoritário do óleo essencial de raízes de <i>Piper gaudichaudianum</i> (Fórmula desenhada no programa BKChem)55
Figura 2 -	Índice Antifúngico médio (IA %) e desvio padrão da média para dois pools de óleos essenciais de raízes de <i>Piper gaudichaudianum</i> contra (A) <i>Trametes versicolor</i> e (B) <i>Gloeophyllum trabeum</i>

#### LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise da Variância

BDA - Batata-Dextrose-Ágar

AHC - Análise Hierárquica de Cluster

ACP - Análise de Componentes Principais

CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CG-DIC - Cromatografia Gasosa acoplada detecção por Ionização em Chama

HMBBM - 4-(3-hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila

IA – Índice Antifúngico

OE - Óleo Essencial

PFNM - Produtos Florestais Não Madeireiros

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

## SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO10	J
1.1	INTRODUÇÃO10	C
1.2	REFERENCIAL TEÓRICO12	2
1.3	PROPOSIÇÃO1	7
1.4	MATERIAIS E MÉTODOS18	3
2	ARTIGOS CIENTÍFICOS2	3
2.1	ARTIGO 1 - Efeito da sazonalidade sobre o rendimento e composição química do óleo essencial de raízes de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth23	3
2.2	ARTIGO 2 - Propriedades fungitóxicas <i>in vitro</i> do óleo essencial de raízes de Piper gaudichaudianum kunth4	5
3	DISCUSSÃO GERAL64	4
4	CONCLUSÕES GERAIS70	J
	REFERÊNCIAS7	1
	APÊNDICES77	7
	APÊNDICE A - DETALHES ILUSTRATIVOS DA ESPÉCIE  Piper gaudichaudianum Kunth	3
	APÊNCICE B - DISTRIBUIÇÃO FITOGEOGRÁFICA DE  Piper gaudichaudianum Kunth NO BRASIL79	9
	APÊNDICE C - ESPECTRO <sup>1</sup> H-RMN DO DERIVADO DO ÁCIDO BENZOICO 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (400 MHz)80	C
	APÊNDICE D - AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (400 MHz)8 <sup>-</sup> APÊNDICE E - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO	1
	4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (100 MHz)82 APÊNDICE F - ESPECTRO DO RMN <sup>13</sup> C-DEPT DO	
	4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (100 MHz)83	3

### 1 APRESENTAÇÃO

## 1.1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade representa a riqueza e variedade no mundo natural e é considerada extremamente importante para diversas áreas, principalmente na pesquisa. No Brasil existe grande diversidade de plantas nativas e o setor florestal, que tem passado por muitas transformações, torna-se uma ferramenta importante e necessária para que ocorra a valorização da biodiversidade (RODRIGUEZ, 1998; TRES, REIS, SCHLINDWEIN, 2011). Dessa riqueza nativa podem ser retirados tanto benefícios presentes como futuros, desde que sua utilização seja racional e amparada pela lei. Constatando-se que uma planta é um ser vivo, a mesma deve receber a devida importância, já que ela cumpre sua função biológica (FIEDLER, SOARES, SILVA, 2008) e podem ser gerados vários produtos a partir delas.

Todas as partes das plantas podem ser utilizadas pela crescente indústria tecnológica florestal: raízes, fuste, folhas, flores, frutos e sementes. Desde que corretamente analisados e manejados, diferentes órgãos vegetais de uma dada espécie podem contribuir de forma significativa para o aumento do valor agregado dos seus produtos finais, elevando tanto sua quantidade como a qualidade (CARVALHO, SOARES, VALVERDE, 2005; CASTELO et al., 2010; FISCHER, 2009; VARUGHESE et al., 2016).

Em vista disso, pesquisas com espécies florestais nativas são fundamentais para o aprimoramento dos conhecimentos. Para tanto, uma das áreas da Engenharia Florestal que procura contribuir significativamente com a sociedade através da descoberta de novos constituintes passíveis de serem utilizados para diferentes fins, é o estudo de extrativos vegetais. Dentro desses, encontram-se classificados os óleos essenciais (OE), que são misturas de componentes voláteis, odoríferos e líquidos obtidos de plantas (SANTOS et al., 2003).

Os óleos essenciais são Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNM) que tem sua utilização amparada pela lei, de acordo com a Instrução Normativa nº 112, de 21 de agosto de 2006. Nessa norma o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), no capitulo I – Documento de Origem Florestal – DOF, no seu artigo 2, conceitua óleos essenciais. Sua definição aparece no subitem I n, como sendo "produtos florestais que se encontram no seu estado bruto ou *in natura*".

Nesse sentido, a utilização dos óleos essenciais pode contribuir com a área florestal, agrícola, alimentícia, farmacêutica, industrial e medicinal. Ademais, apresentam funções ecológicas importantes, pois atuam na proteção das plantas, através de sua ação como antifúngicos, inseticidas, antibacterianos, antivirais, bem como contra a ação de herbívoros, além de atrair a fauna e polinizadores, favorecendo a dispersão do pólen e das sementes. Para economia contribuem de diferentes formas, uma vez que são responsáveis pela geração de divisas que resultam de seu emprego devido às diversas funções biológicas, como na conservação dos alimentos, na obtenção de produtos de higiene e limpeza e em perfumaria (BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009; ESTRELA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008).

Alguns fatores podem influenciar no rendimento e na composição química dos óleos essenciais, dentre eles podem ser citados os inerentes a própria planta como aspectos genéticos e o órgão vegetal em análise, bem como os fatores climáticos, edáficos, sazonais, nutricionais, umidade, métodos de extração, estação e horário de coleta, entre outros (BERNUCI et al., 2016; PÉRES et al., 2009; SARTOR, 2009). Vários tipos de componentes são extraídos e podem ser identificados nos OEs, sendo os constituintes de maior concentração, chamados de componentes principais ou majoritários e os constituintes de menor concentração, de componentes traço.

Os constituintes extraídos dos óleos essenciais são de baixo peso molecular e determinados geneticamente, podem variar de acordo com o método de extração e as condições ambientais, qualificam-se como misturas variáveis de substâncias, constituindo-se principalmente de terpenoides e fenilpropanoides. De acordo com o número de carbonos de seu esqueleto básico, os terpenoides são classificados em monoterpenoides (C10) e sesquiterpenoides (C15), ainda que os diterpenoides (C20) também possam ser encontrados. Assim, além desses, em OEs também podem ocorrer uma variedade de outros grupos químicos (SIMÕES, SPITZER, 2007).

As classes dos metabólitos secundários presentes nos óleos essenciais constituem as suas características organolépticas, como odor, sabor e cor, além das principais atividades biológicas dos OEs, que são fundamentais para as mais diversas aplicações. Sempre haverá a necessidade de encontrar novos produtos e esses devem atender às exigências do mercado, por isso pesquisas com espécies nativas que possam gerar essências, como é o caso de *Piper gaudichaudianum* 

Kunth. pode contribuir de forma significativa para a conservação da espécie, através da descoberta do seu potencial para o desenvolvimento de novos produtos.

As folhas de *Piper gaudichaudianum* Kunth, arbusto nativo de regiões tropicais, quentes e úmidas, já foram analisadas quanto sua composição química sazonal e atividade biológica contra fungos de interesse florestal. Além disso, as folhas de outras espécies de *Piper* demonstraram ser importantes quanto às suas atividades antifúngicas, inseticidas, alopáticas e bactericidas. Ademais, em diversas abordagens literárias, há a utilização de raízes de espécies do gênero *Piper*, explicando o porquê da análise com abrangência de um maior número de espécies do gênero com o conhecimento de sua caracterização, permitido a utilização do arbusto em estudos posteriores.

Outros fatores de relevância podem ser citados para *Piper gaudichaudianum* Kunth que, sendo uma espécie nativa, é alvo de constante estudo por pertencer a uma família com representantes produtores de óleo essencial. Além disso, algumas espécies do gênero apresentam importância quanto a sua utilização na área alimentícia, como condimento, no caso da pimenta-do-reino *Piper nigrum* L., bem como espécies do gênero *Piper* em paisagismo e na descoberta de novos produtos na área farmacêutica como é o caso de *Piper methysticum* utilizado como fitoterápico ansiolítico.

#### 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

O óleo essencial em plantas é encontrado com maior frequência em representantes das famílias de angiospermas dicotiledôneas: Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras. Embora sua ocorrência seja menos frequente em monocotiledôneas, também ocorrem em representantes de algumas famílias, como por exemplo, em *Poaceae* (BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009; SIMÕES, SPITZER, 2007).

Uma das famílias que constituem a ordem Piperales com importância na produção de OE, é a Piperaceae, sendo um grupo distinto de Magnolídeas (APG III, 2009). Pantropicalmente distribuídas é composta por 10 gêneros com aproximadamente 2.500 espécies. O gênero *Piper* L., apresenta também ampla distribuição pantropical, é um dos maiores gêneros, inclui mais de 1.000 espécies (GUIMARÃES, MONTEIRO, 2006; PARMAR et al., 1997).

A família Piperaceae no Brasil está representada por, aproximadamente, 463 táxons distribuídos em quatro gêneros (*Piper* L., *Manekia* Trel., *Peperomia* Ruiz & Pav. e *Ottonia* Spreng.), principalmente distribuídos nas florestas Amazônica e Atlântica. No Rio Grande do Sul foram relatados três gêneros da família: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav. e *Manekia* Trel. (GUIMARÃES et al., 2017), sendo os dois primeiros gêneros os de maior riqueza em espécies e entre os maiores das angiospermas (FRODIN, 2004).

A família Piperaceae possui espécies arbustivas eretas ou escandentes, ervas terrestres, rupícolas ou epífitas; os ramos possuem nós proeminentes e as folhas são pecioladas ou subsésseis; as inflorescências apresentam espigas ou racemos, solitárias ou dispostas em panículas ou umbelas de espigas; as flores diminutas são aperiantadas, protegidas por brácteas florais de diferentes formas, peltadas ou não, 1-10 estames, 1-5 estigmas e frutos do tipo drupa pequenos (YUNCKER, 1972). As espécies classificadas nessa família são sempre odoríferas, porque naturalmente apresentam células produtoras de OE (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

Os gêneros, *Piper* e *Peperomia*, destacam-se na família Piperaceae, pelo seu elevado valor econômico e importância medicinal. Na economia, as Piperaceaes são importantes para nos mercados mundiais de especiarias e, entre suas espécies, a pimenta-do-reino *Piper nigrum* L., é a espécie que mais se destaca, sendo utilizada mundialmente como condimento; esses dois gêneros mais representativos na família possuem também grande variedade de plantas ornamentais, cultivadas e comercializadas por sua beleza cênica, principalmente devido à exuberância de suas folhagens. Na medicina popular são utilizadas principalmente espécies do gênero *Piper* (GUIMARÃES, MONTEIRO, 2006; LORENZI, MATOS, 2008; PARMAR et al., 1997).

Nas espécies de *Piper*, além do óleo essencial, são encontradas diferentes classes de substâncias do metabolismo vegetal secundário, como polifenóis, alcaloides, neolignanas, lignanas, flavonoides fenilpropanoides e isobutilamidas (PARMAR et al., 1997, 1998). A partir disso, a utilização de espécies do gênero *Piper* em pesquisas, possibilita a desenvolvimento de novos produtos para a área farmacêutica, como é o caso de *Piper methysticum* utilizado como fitoterápico, ansiolítico (ANVISA, 2017). Os exemplares de *Piper* destacam-se nessa família

igualmente por apresentarem várias de suas funções biológicas já descritas (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; ESTRELA et al., 2006).

No Brasil, 291 espécies são classificadas no gênero Piper L., das quais 184 são endêmicas (GUIMARÃES et al., 2017). A espécie alvo desse estudo, Piper gaudichaudianum Kunth, pertence ao gênero Piper L., e é conhecida popularmente como pariparoba ou jaborandi. É um arbusto de 1-3 metros de altura, e apresenta caule provido de entrenós, variando entre 4-6 cm. O caule tem córtex com endoderme com estrias de Caspary e cilindro central com bainha esclerenquimática perimedular e feixes vasculares na região medular. As folhas são curto-pecioladas, as lâminas são assimétricas-agudas na base, diferindo um lado em relação ao outro em cerca de 4,5 cm, com ápice acuminado, membranáceas, um pouco ásperas. As folhas são hipoestomáticas e dorsiventrais, com estruturas secretoras no pecíolo, nervura central e mesofilo. As inflorescências são sésseis, dispostas sempre em espigas, sendo levemente curvadas e sustentadas por um pedúnculo piloso, que supera em mais de duas vezes o tamanho do pecíolo, chegando a alcançar 8 cm de comprimento (ALBIERO et al., 2005; GUIMARÃES, VALENTE, 2001). Até o momento, não foram relatados estudos sobre a descrição anatômica das raízes de P. gaudichaudianum. As características botânicas da folha, inflorescência, entrenós e raízes estão representadas no (APÊNDICE A).

Piper gaudichaudianum é uma espécie que apresenta ampla distribuição no território brasileiro e, além de ser encontrada no Brasil, também ocorre no Paraguai, Argentina e Uruguai (BRUSSA, 2016; GUIMARÃES et al., 2017; GUIMARÃES, VALENTE, 2001; SOBRAL et al., 2013). A espécie é encontrada nos Biomas da Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, com distribuição geográfica Norte (Pará); Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão e Pernambuco); Centro-Oeste (Distrito Federal, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso); Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo); e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina). Assim, nesses estados, sua ocorrência é relatada em Áreas Antrópicas, Cerrado (lato sensu), Floresta Ciliar ou Galeria, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial) e Restinga (GUIMARÃES et al., 2017). A distribuição fitogeográfica de *Piper gaudichaudianum* Kunth no Brasil está representada no (APÊNDICE B).

No Rio Grande do Sul, a espécie é classificada como nativa e sua ocorrência é descrita em toda a extensão do Bioma Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2013),

participando da composição da vegetação no interior e bordas de Floresta Ombrófila Mista e Floresta Ombrófila Densa (BARDELLI et al., 2008; BOEGER et al., 2006).

Com base em relatos sobre a utilização da espécie *P. gaudichaudianum*, Di stasi, Hiruma-lima, 2002 descrevem que, na medicina popular, as raízes frescas são empregadas como anti-inflamatórias, no tratamento de doenças do fígado e suas folhas frescas em infusão são utilizadas como analgésicas. Com relação às atividades biológicas avaliadas para raízes, são descritos efeitos larvicidas e antimicrobianos (NASCIMENTO et al., 2013; ROCHA et al., 2016). Para folhas, foram descritas atividades fungicida, inseticida, anti-inflamatória, larvicida e analgésica (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; MORAIS et al., 2007; MOREIRA et al., 2001; PARMAR et al., 1997; PUHL et al., 2011).

Entre as atividades biológicas mais importantes descritas para os extrativos vegetais, estão aquelas que resultam em vantagens ecológicas para a espécie produtora (SANTOS, 2007). Algumas plantas apresentam boa resistência natural contra organismos de biodegradação, característica inerente ao vegetal e, devido a isso, inúmeras pesquisas acerca do desenvolvimento de produtos alternativos, em detrimento aos preservantes sintéticos para madeira, estão sendo realizadas utilizando os extrativos de plantas (CELOTO et al., 2008).

Os fungos e insetos formam os grupos mais relevantes de organismos xilófagos que causam degradação biológica na madeira e são responsáveis por grandes perdas em vários tipos de produtos florestais (MENDES, ALVES, 1988). Os fungos apodrecedores, quando atacam a madeira, causam sua degradação, sendo responsáveis pela perda de resistência mecânica do material. Dentre esses, os fungos da podridão-branca decompõem tanto a celulose quanto hemiceluloses e lignina. Já os fungos da podridão parda degradam a celulose e hemicelulose, transformando-as em substâncias solúveis facilmente assimiladas e digeridas (MENDES, ALVES, 1988; MORESCHI, 1980).

O tratamento preservante para os produtos de origem madeireira é necessário, principalmente quando a madeira sofre deterioração causada por diferentes agentes microbianos, como os fungos. Os conservantes atualmente empregados na indústria são de origem sintética (MACHADO et al., 2006). A maior parte dos elementos químicos presentes nesses preservantes é prejudicial para os manipuladores, bem como ao meio ambiente, sendo o creosoto, o pentaclorofenol e o CCA (cromo, cromato e arsênio) os produtos mais utilizados tradicionalmente. A

utilização indiscriminada desses produtos deve ser evitada e, com o uso dos biopesticidas, busca-se uma forma de tratar a madeira com eficiência, baixos custos e com menor risco à saúde humana, à fauna e à flora (EL-WAKEIL, 2013; ISMAN, 2006; YOON, CHA, KIM, 2013).

Os biopesticidas são produtos químicos que ocorrem naturalmente, constituídos de substâncias biodegradáveis, extraídas de plantas, que possuem uma variedade de componentes químicos, contrapondo com os conservantes químicos sintéticos que apresentam normalmente um ingrediente ativo em sua composição (EL-WAKEIL, 2013). Os biopesticidas são então utilizados para a proteção de madeiras e controle dos fitopatógenos, por serem constituídos de moléculas naturais, sendo considerados de menor impacto ambiental para serem utilizados como preservantes (EL-WAKEIL, 2013; YOON, CHA, KIM, 2013). Alguns estudos têm demonstrado a eficiência do óleo essencial de espécies do gênero *Piper* sobre o controle de doenças fúngicas em plantas. Analisando o OE de *Piper aduncum*, Bastos (1997) mostrou seu efeito fungicida frente à germinação de basidiosporos e crescimento micelial de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, entre outros fitopatógenos. A atividade antifúngica de OEs de folhas das espécies *Piper dilatatum, Piper callosum* e *Piper marginatum* var. *anisatum* foi comprovada com eficiência sobre *Crinipellis perniciosa* (SILVA, BASTOS, 2007).

Em revisão bibliográfica acerca dos OEs para a espécie *P. gaudichaudianum* foram encontradas publicações sobre sua atividade antifúngica, com relação aos fungos apodrecedores de madeira, Soidrou et al. (2013) e Schindler (2015) avaliaram o efeito do OE de suas partes aéreas. Estudos sobre o rendimento e composição química dos OE de folhas e órgãos reprodutivos nas diferentes estações do ano foram realizados recentemente (SCHNDLER et al., 2017a, b). No entanto, não foram relatadas pesquisas sobre o rendimento, composição química e funções biológicas dos OEs de raízes dessa espécie.

### 1.3 PROPOSIÇÃO

#### 1.3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial das raízes de *Piper gaudichaudianum* Kunth na produção de óleo essencial e sua atividade fungitóxica *in vitro*.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o rendimento e a composição química do óleo essencial de raízes frescas de uma população de *Piper gaudichaudianum*, nas quatro estações do ano;
- Analisar o efeito da sazonalidade sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de raízes frescas de *Piper gaudichaudianum* no período de 12 meses;
- III. Qualificar a estação do ano ideal para coleta de raízes da espécie estudada, observando rendimento e composição química do óleo essencial.
- IV. Investigar a ação antifúngica in vitro do óleo essencial e do seu componente majoritário contra os fungos apodrecedores da madeira causadores da podridãobranca, Trametes versicolor (L. ex Fr.), e podridão-parda, Gloeophyllum trabeum (Persoon ex Fries).

#### 1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1.4.1 Material vegetal

A coleta do material vegetal ocorreu em uma população de *Piper gaudichaudianum* Kunth situada no sub-bosque de um remanescente florestal, localizado em um morro no município de Santa Maria (coordenadas 29° 40 11.3" S e 53° 46' 15.88" O; altitude de 229 m), Rio Grande do Sul, Brasil. Raízes da espécie foram coletadas ao acaso, uma vez em cada estação de um ano, no período da tarde, entre agosto de 2015 e abril de 2016. Foram retirados do solo: 6 indivíduos na primeira coleta, 12 exemplares na segunda e terceira coletas e 16 exemplares na quarta coleta. As partes aéreas dos arbustos permaneceram no remanescente florestal. Após a coleta, as raízes foram lavadas e permaneceram 12 horas em temperatura ambiente para posterior extração do óleo essencial. Uma exsicata da espécie foi incorporada ao 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 os registros 6.514 e 584.729, respectivamente.

#### 1.4.2 Obtenção do óleo essencial

Raízes frescas, coletadas em cada uma das estações, foram fragmentadas com o auxílio de tesouras de poda e o óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, utilizando aparelho Clevenger por um período de 3 h (SARTOR, 2009), em triplicata. A mistura do OE com o hidrolato foi submetida à extração líquido-líquido com hexano previamente destilado em funil de separação (SILVA et al., 2009). Em seguida, foi feita a secagem da fração hexânica com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e evaporação do solvente para obtenção do OE. O extrativo foi transferido para uma proveta graduada e sua massa foi verificada, sendo adotada a determinação do rendimento em % m m<sup>-1</sup> considerando base fresca. As amostras foram transferidas para frascos de vidro âmbar e armazenadas à -4 °C até a análise química.

#### 1.4.3 Análise da composição química do óleo essencial

A detecção e a identificação dos constituintes químicos dos OEs foram realizadas por um aparelho de cromatografia gasosa Agilent 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent 5975C (CG-EM). Para o procedimento, uma alíquota de 2 µL de EO foi diluída em 1 mL de hexano (grau HPLC). Parâmetros da análise: coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (Hewlett Packard, 5% de fenil, 95% de metilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura de filme: 0,25 mm); energia de ionização: 70 eV. Divisão de fluxo: 1: 100; programa de temperatura: 40 °C durante 4 min; 40-320 °C a 4 °C min<sup>-1</sup>; Gás carreador: Hélio, com taxa de fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>; Temperaturas configuradas para injetor e detector: 250 °C. A identificação dos constituintes ocorreu por comparação dos seus índices de retenção, determinados por uma curva de calibração de n-alcanos injetados sob as mesmas condições cromatográficas das amostras, e dos padrões de fragmentação de massas com os mencionados na literatura (NIST, 2010; ADAMS, 2009).

Os componentes químicos dos OEs foram quantificados por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG/DIC) num equipamento Agilent 7890A, com injeção em triplicata. Os parâmetros das análises corresponderam aos descritos anteriormente, com exceção dos seguintes: injeção com divisão de fluxo de 1:50 e temperaturas do injetor e detector a 300 °C. A determinação da percentagem dos componentes químicos ocorreu com base na normalização de área dos picos.

#### 1.4.4 Fracionamento do óleo essencial

Um *pool* de amostras do OE de raízes de de *P. gaudichaudianum* foi submetido ao fracionamento através de cromatografia em coluna (CC). A primeira CC foi realizada com 1,28 g de OE (15,0 x 4,0 cm) contendo gel de sílica 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) na proporção de 1:100. Os sistemas eluentes utilizados foram hexano (frações 1-41); e hexano: acetato de etila em gradiente, conforme especificado a seguir: 99:1 (v/v) (frações 42-63); 98:2 (v/v), (frações 64-73); 97:3 (v/v), (frações 74-83); e 96:4 (v/v), 95:5 (v/v) e 94:6 (v/v) (frações 87-111). Foram coletadas frações de 25 mL, que foram analisadas por cromatografia sobre camada delgada (CCD) e agrupadas conforme seu perfil cromatográfico. Para as análises sobre CCD, foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> e as

substâncias foram detectadas com vanilina-ácido sulfúrico – UV 365 nm. Na segunda CC, a fração 1 (582 mg) da primeira CC foi purificada sobre 58 g de gel de sílica 60 (19 x 1,9 cm) e eluição com hexano-acetona 95:5 (v/v). Foram coletadas frações de 15 mL, que foram analisadas por CCD conforme descrito anteriormente. Das quatro frações principais obtidas, as frações 1 e 2 corresponderam à sustância majoritária isolada com grau de pureza de 99%. A substância isolada foi identificada por Espectrometria de Massas de Alta Resolução e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) protônica <sup>1</sup>H e de carbono <sup>13</sup>C.

4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila: EM de alta resolução do íon molecular:  $C_{13}H_{15}O_3$ ; 219,1056 (massa molecular encontrada); 219,1015 (massa molecular calculada). RMN-<sup>1</sup>H (ppm): 6,53 (d, 1H); 6,39 (s, 1H); 5,48 (d, 1H); 5,06 (d, 1H); 4,34 (d, 1H), 2,58 (s, 3H); 0,16 (s, 9H). RMN-<sup>13</sup>C (ppm): 166,34; 156,75; 130,64; 130,57; 127,66; 122,16; 121,26; 120,20; 115,71; 76,91; 51,30; 27,87; 27,87.

# 1.4.5 Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial e da substância isolada

As espécies fúngicas *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) e *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries), foram fornecidas pelo Laboratório de Produtos Florestais da Universidade Federal de Brasília.

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, visando detectar a inibição do crescimento micelial dos fungos, a atividade antifúngica, iniciou com a avaliação do efeito de dois *pools* do OE de raízes de *P. gaudichaudianum* frente às duas espécies de fungos. Os inóculos dos fungos foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 15 dias em estufa incubadora para B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, discos miceliais de 11 mm de diâmetro foram transferidos para o centro das placas de petri esterilizadas contendo BDA e o OE previamente diluído em etanol (1:1). Para a diluição do OE, as concentrações a serem testadas já diluídas em etanol foram transferidas para um frasco contendo o meio BDA fundente. O conteúdo foi homogeneizado lentamente e transferido para as placas de petri. O extrativo foi avaliado nas concentrações de 0,25 (R2), 0,50 (R3) e 1,0 µL mL<sup>-1</sup> (R4). Também foram considerados uma testemunha absoluta, um controle negativo contendo etanol (R1), e um controle positivo (R6), utilizando o

fungicida comercial propiconazole na concentração de 1,0 μL mL<sup>-1</sup>. O constituinte majoritário do extrativo foi avaliado em concentração proporcional à sua porcentagem nos OE utilizados anteriormente (R5). Dessa forma, para *T. versicolor* foi verificado seu efeito da concentração de 0,491 μL mL<sup>-1</sup>, enquanto que para G. *trabeum* essa foi de 0,659 μL mL<sup>-1</sup>. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições. Para evitar contaminação bacteriana nas culturas fúngicas, acrescentouse ao meio 0,04 mg mL<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomocina.

Após a implementação dos ensaios, as placas foram incubadas em B.O.D. nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas anteriormente.

A avaliação foi realizada no sétimo dia após o início do experimento, através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), até as colônias fúngicas dos controles testemunha atingirem o crescimento completo do diâmetro da placa. A partir desses dados foi calculado o índice antifúngico (IA%) para cada tratamento, obtido através da fórmula (1- De / Dt) x100, onde De e Dt correspondem ao crescimento micelial experimental e da testemunha absoluta, respectivamente (CHANG et al., 1999, 2000).

#### 1.4.6 Análise estatística

Para os dados de rendimento foram verificados os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, através dos testes de Shapiro-Wilk (W) e Bartlett, respectivamente. Os resultados foram comparados entre estações através da análise de variância (ANOVA), utilizando dados de uma coleta por estação, em triplicata. Foram utilizados o teste-t e o teste de Tukey a 5% de probabilidade, com resultados apresentados pela média ± erro padrão da média (EPM). As análises foram realizadas no software Assistat 7.7 Beta.

A definição de grupos químicos presentes nas amostras de OEs foi realizada por Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Cluster (AHC), examinando-se as porcentagens relativas dos 15 constituintes mais abundantes (> 1%). Para a AHC, um dendrograma horizontal foi obtido pelo método de Ward, com base nas distâncias Euclidianas como medida de dissimilaridade entre as amostras. A fim de determinar os constituintes que influenciaram a formação dos grupos, a ACP foi considerada (MARDIA, KENT, BIBBY, 1994). Cada

amostra de OE foi considerada um "caso" e cada constituinte uma "variável". As análises foram realizadas através do software STATISTICA 7.4.

Para os dados de IA% de cada fungo foram verificados a normalidade de distribuição e homogeneidade de variâncias, no entanto, como os dados não atenderam aos pressupostos, optou-se por uma estatística não paramétrica através de análise de variâncias de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de médias de Mann Whitney (p<0,05). Todos os resultados foram expressos em média e ± desvio padrão da média (n=5). As análises foram realizadas através do software Assistat 7.7 Beta

### **2 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### 2.1 ARTIGO 1

TRES, J.; OLIVEIRA, B. S.; PINHEIRO, C. G.; AMARAL, A. C. F.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento e composição química do óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum* Kunth. A ser submetido.

# EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE O RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth

Jésica Tres<sup>a</sup>, Bruno da Silva Oliveira<sup>b</sup>, Carlos Garrido Pinheiro<sup>a</sup>, Ana Cláudia Fernandes Amaral <sup>c</sup>; Berta Maria Heinzmann<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

<sup>b</sup>Curso de Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

<sup>c</sup>Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos, Manguinhos, Rio de Janeiro, BR-21041-250, RJ - Brasil

<sup>a,d</sup>Departamento de Farmácia Industrial. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

#### \*Correspondência

Prof.<sup>a</sup> Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial. Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima, nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria - RS, Brasil, BR-97105-900. E-mail: <a href="mailto:berta.heinzmann@gmail.com">berta.heinzmann@gmail.com</a>, Phone: +55 55 3220 8336

#### RESUMO

# EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE O RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth

AUTORA: Jésica Tres ORIENTADORA: Berta Maria Heinzman

A família Piperaceae apresenta espécies de porte geralmente herbáceo ou arbustivo e são sempre odoríferas, devido à presença de células produtoras de óleo essencial (OE). O gênero Piper L. é um dos mais representativos dessa família em nosso país e, dentre as espécies que ocorrem na região central do Rio Grande do Sul, destacase Piper gaudichaudianum Kunth. O objetivo deste trabalho foi quantificar o rendimento e determinar a composição química de OE das raízes de P. gaudichaudianum e verificar o efeito da sazonalidade sobre esses parâmetros. Foram coletadas aleatoriamente raízes de indivíduos de uma população nativa de Santa Maria, RS, Brasil, nas quatro estações de um ano. Após a lavagem o material vegetal, este foi fracionado e o óleo essencial juntamente com hidrolato foram obtidos por hidrodestilação por 3 horas, utilizando o aparelho de Clevenger, em triplicata. Após extração da mistura constituída por OE e hidrolato com hexano e evaporação do solvente, o OE teve seu rendimento determinado e expresso em porcentagem (% m m<sup>-1</sup>), considerando base fresca. A análise da composição química do OE foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), e quantitativamente, em triplicata, por cromatografia com detector de ionização de chama (CG-DIC). O constituinte majoritário foi isolado por coluna e teve sua estrutura analisada por cromatografia em espectroscópicos. Para a definição de grupos químicos considerando os constituintes majoritários do extrativo, foram utilizadas a Análise Hierárquica de Cluster (AHC) e Análise de Componentes Principais (ACP). Os valores médios de rendimento do OE não diferiram entre as estações, oscilando entre 0,07% e 0,09%. A caracterização química do OE detectou como constituinte majoritário o 4-(3 hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila, um derivado de ácido benzoico que apresentou teores médios variando entre 62.55% e 70.23%. A AHC dividiu as amostras em dois grupos principais, demonstrando que houve influência sazonal sobre a composição química. Todavia, o constituinte majoritário não foi considerado uma variável decisiva para a formação dos agrupamentos.

**Palavras-chave:** Piperaceae. Raízes. 4-(3-hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila. Rendimento. Composição química.

#### **ABSTRACT**

## EFFECT OF SEASONALITY ON ITS YIELD AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF ROOTS OF Piper gaudichaudianum Kunth

AUTHOR: JÉSICA TRES ADIVISOR: BERTA MARIA HEINZMAN

The family Piperaceae presents usually species of herbaceous or shrubby size and are always odoriferous, due to the presence of cells producing essential oil (EO). The genus Piper L. is one of the most representative of this family in our country and. among the species that occur in the central region of Rio Grande do Sul, Piper gaudichaudianum Kunth. stands out. The objective of this work was to quantify the yield, to determine the chemical composition of roots EO of P. gaudichaudianum and to verify the effect of seasonality on these parameters. Roots of individuals from a native population of Santa Maria, RS, Brazil, were collected randomly in the four seasons of one year. After washing, the vegetable material was fractionated and the oil obtained by hydrodistillation for 3 hours using the Clevenger apparatus in triplicate. The EO yield expressed in percentage (% m m<sup>-1</sup>), considering fresh basis. Chemical composition analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and quantitatively, in triplicate, by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). The major constituent was isolated by column chromatography and had its structure analyzed by spectroscopic methods. For the definition of chemical groups considering the main constituents of the extractives, the Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA) were used. The mean values of EO yield did not differ between seasons, ranging from 0.07% to 0.09%. The chemical characterization of EO detected as the main constituent 4-(3-hydroxy-3-methyl-butenyl)-methyl benzoate, a benzoic acid derivative that presented average levels ranging from 62.55% to 70.23%. The HCA divided the samples into two main groups, demonstrating that there was a seasonal influence on the chemical composition. However, the major constituent was not considered a decisive variable for the formation of groups.

Keywords: Piperaceae. Roots. 4-(3-hydroxy-3-methyl-butenyl)-methyl benzoate. Yield. Chemical composition.

## 1 INTRODUÇÃO

Os materiais biológicos de origem vegetal não-lenhosa, incluindo folhas, cascas, raízes, flores, frutos, óleos essenciais (OEs), resinas, entre outros, consistem nos produtos florestais não madeireiros (PFNM). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), milhões de famílias em todo o mundo dependem fortemente dos PFNM para subsistência e / ou renda, o que garante melhoria na qualidade da vida das famílias extrativistas (BALZON, SILVA, SANTOS, 2004). Além disso, os PFNM são utilizados para suprir as necessidades de saúde e nutrição de cerca de 80% da população do mundo em desenvolvimento. Também salienta-se sua contribuição ambiental, incluindo a conservação da diversidade biológica (FIEDLER, SOARES, SILVA, 2008).

Dentre os PFNM encontrados em diferentes biomas, os óleos essenciais vêm recebendo grande destaque (CASTELO et al., 2010). O estudo crescente dessa classe de extrativos vegetais está ligado à preocupação cada vez maior com a sustentabilidade e valorização da biodiversidade. O incremento das pesquisas nessa área também está relacionado às várias atividades biológicas descritas para os OEs, que permitem o desenvolvimento de distintas aplicações técnicas, uma vez que o uso de produtos sintéticos para diferentes finalidades têm resultado na ocorrência de efeitos tóxicos e residuais (ISMAN, 2000). No entanto, embora a diversidade brasileira seja muito rica em espécies produtoras de OEs, a participação do país na produção e comercialização desses PFNM ainda é baixa, sendo que os principais óleos exportados são os de espécies de *Citrus*, principalmente laranja e limão, subprodutos da indústria de sucos (WOLFFENBÜTTEL et al., 2015).

A família Piperaceae apresenta espécies com aspecto geralmente herbáceo ou arbustivo e são sempre odoríferas, devido à presença células produtoras de óleo essencial (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). A família inclui gêneros caracterizados por apresentar espécies com potencial para produção de OEs, dentre eles, encontra-se *Piper* L., (NASCIMENTO et al., 2013; PACHECO et al., 2016; PIMENTEL et al., 2012; ROCHA et al., 2016; TRINDADE et al., 2010), o qual abrange mais de 1000 representantes de distribuição pantropical (PARMAR et al., 1997). *Piper gaudichaudianum* Kunth é conhecida popularmente como pariparoba ou jaborandi e apresenta ampla distribuição no território brasileiro, sendo encontrada nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, Paraguai, Argentina e

Uruguai (BRUSSA, 2016; GUIMARÃES et al., 2017; GUIMARÃES, VALENTE, 2001; SOBRAL, 2013). Na medicina popular, suas raízes são empregadas em preparações com atividades anti-inflamatórias e contra doenças do fígado e suas folhas frescas em infusão são utilizadas como analgésicas (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). Com relação às atividades biológicas avaliadas para folhas de *P. gaudichaudianum*, são descritos efeitos fungicida, inseticida, anti-inflamatório, larvicida e analgésico (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; MORAIS et al., 2007; MOREIRA et al., 2001; PARMAR et al., 1997; PUHL et al., 2011; SCHINDLER, 2015).

Certas características de um óleo essencial como rendimento e composição química, podem ser influenciadas por muitos fatores, entre eles destacam-se os aspectos ambientais, tanto os edafoclimáticos e poluição atmosférica, quanto os inerentes à própria planta, como a genética, ciclo vegetativo, idade e órgão vegetal, entre outros. Em consequência, evidencia-se a necessidade de encontrar as condições e épocas do ano ideais para coleta de diferentes materiais vegetais, proporcionando um aumento na quantidade e qualidade do extrativo (BERNUCI et al., 2016; GOBBO-NETO, LOPES, 2007; PÉRES et al., 2009).

Recentemente, foram avaliados rendimento e composição química de OEs obtidos de folhas e órgãos reprodutivos de uma população de *P. gaudichaudianum* em Santa Maria, RS, Brasil (SCHINDLER et al., 2017a, b). No entanto, embora a literatura apresente estudos relatando a presença de OEs em raízes de outras espécies de *Piper* (HU et al., 1996; LUZ et al., 2016; MOTA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; PACHECO et al., 2016; PIMENTEL et al., 2012; ROCHA et al., 2016; TRINDADE et al., 2010; VARUGHESE et al., 2016), até o momento não existem estudos sobre OEs em órgãos subterrâneos de *P. gaudichaudianum*. Considerando esse aspecto, o presente trabalho teve como objetivo quantificar o rendimento e a composição química de OE de raízes frescas de *P. gaudichaudianum* e verificar o efeito da sazonalidade sobre esses parâmetros, a fim de verificar o potencial desse órgão vegetal para a produção do extrativo e visando definir a melhor época de coleta do material vegetal.

#### **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 2.1 MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal ocorreu em uma população de *Piper gaudichaudianum* Kunth situada no sub-bosque de um remanescente florestal, localizado em um morro no município de Santa Maria (coordenadas 29° 40' 11.3" S e 53° 46' 15.88" O; altitude de 229 m), Rio Grande do Sul, Brasil. Raízes da espécie foram coletadas ao acaso, uma vez em cada estação de um ano, no período da tarde, entre agosto de 2015 e abril de 2016. Foram retirados do solo: 6 indivíduos na primeira coleta, 12 exemplares na segunda e terceira coletas e 16 exemplares na quarta coleta. As partes aéreas dos arbustos permaneceram no remanescente florestal. Após a coleta, as raízes foram lavadas e permaneceram 12 horas em temperatura ambiente para posterior extração do óleo essencial. Uma exsicata da espécie foi incorporada ao 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 os registros 6.514 e 584.729, respectivamente.

## 2.2 CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DO LOCAL DA COLETA

De acordo com Streck et al. (2008), a classe de solo predominante na área de coleta é o Neossolo Litólico, sendo sua classe textural classificada como franco arenosa (SOARES et al., 2015).

O clima é considerado do tipo mesotérmico brando e úmido e, segundo a classificação de Köppen, o clima de Santa Maria é definido como Cfa, o qual é caracterizado como subtropical úmido com verões quentes, sem estação seca definida. Temperatura média anual é de 19°C e pluviosidade média anual é de 1733 mm. As geadas tem tendência a ser fracas e moderadas na região, e ocorrem nos meses de abril a outubro, com maior intensidade em junho e julho, permanecendo com período livre de geadas de novembro a março (STRECK et al., 2011).

Santa Maria situa-se numa zona de transição entre o Planalto Meridional Brasileiro e a Depressão Central do Rio Grande do Sul. De acordo com IBGE (2012), a vegetação da região de coleta no município de Santa Maria é descrita fitogeograficamente como um ecótono da Floresta Estacional Decidual.

## 2.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Raízes frescas, coletadas em cada uma das estações, foram fragmentadas com o auxílio de tesouras de poda e o óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, utilizando aparelho Clevenger por um período de 3 h (SARTOR, 2009), em triplicata. A mistura do OE com o hidrolato foi submetida à extração líquido-líquido com hexano previamente destilado em funil de separação (SILVA et al., 2009). Em seguida, foi feita a secagem da fração hexânica com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e evaporação do solvente para obtenção do OE. O extrativo foi transferido para uma proveta graduada e sua massa foi verificada, sendo adotada a determinação do rendimento em % m m<sup>-1</sup> considerando base fresca. As amostras foram transferidas para frascos de vidro âmbar e armazenadas à -4 °C até a análise química.

### 2.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A detecção e a identificação dos constituintes químicos dos OEs foram realizadas por um aparelho de cromatografia gasosa Agilent 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent 5975C (CG-EM). Para o procedimento, uma alíquota de 2 μL de EO foi diluída em 1 mL de hexano (grau HPLC). Parâmetros da análise: coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (Hewlett Packard, 5% de fenil, 95% de metilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura de filme: 0,25 mm); energia de ionização: 70 eV. Divisão de fluxo: 1: 100; programa de temperatura: 40 °C durante 4 min; 40-320 °C a 4 °C min<sup>-1</sup>; Gás carreador: Hélio, com taxa de fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>; Temperaturas configuradas para injetor e detector: 250 °C. A identificação dos constituintes ocorreu por comparação dos seus índices de retenção, determinados por uma curva de calibração de n-alcanos injetados sob as mesmas condições cromatográficas das amostras, e dos padrões de fragmentação de massas com os mencionados na literatura (NIST, 2010; ADAMS, 2009).

Os componentes químicos dos OEs foram quantificados por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (CG/DIC) num equipamento Agilent 7890A, com injeção em triplicata. Os parâmetros das análises corresponderam aos descritos anteriormente, com exceção dos seguintes: injeção com divisão de fluxo de 1:50 e temperaturas do injetor e detector a 300 °C. A determinação da

percentagem dos componentes químicos ocorreu com base na normalização de área dos picos.

#### 2.5 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

Um pool de amostras do OE de raízes de de P. gaudichaudianum foi submetido ao fracionamento através de cromatografia em coluna (CC). A primeira CC foi realizada com 1,28 g de OE (15,0 x 4,0 cm) contendo gel de sílica 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) na proporção de 1:100. Os sistemas eluentes utilizados foram hexano (frações 1-41); e hexano: acetato de etila em gradiente, conforme especificado a seguir: 99:1 (v/v) (frações 42-63); 98:2 (v/v), (frações 64-73); 97:3 (v/v), (frações 74-83); e 96:4 (v/v), 95:5 (v/v) e 94:6 (v/v) (frações 87-111). Foram coletadas frações de 25 mL, que foram analisadas por cromatografia sobre camada delgada (CCD) e agrupadas conforme seu perfil cromatográfico. Para as análises sobre CCD, foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> e as substâncias foram detectadas com vanilina-ácido sulfúrico – UV 365 nm. Na segunda CC, a fração 1 (582 mg) da primeira CC foi purificada sobre 58 g de gel de sílica 60 (19 x 1,9 cm) e eluição com hexano-acetona 95:5 (v/v). Foram coletadas frações de 15 mL, que foram analisadas por CCD conforme descrito anteriormente. Das quatro frações principais obtidas, as frações 1 e 2 corresponderam à sustância majoritária isolada com grau de pureza de 99%. A substância isolada foi identificada por Espectrometria de Massas de Alta Resolução e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) protônica <sup>1</sup>H e de carbono <sup>13</sup>C.

4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila: EM de alta resolução do íon molecular:  $C_{13}H_{15}O_3$ ; 219,1056 (massa molecular encontrada); 219,1015 (massa molecular calculada). RMN-<sup>1</sup>H (ppm): 6,53 (d, 1H); 6,39 (s, 1H); 5,48 (d, 1H); 5,06 (d, 1H); 4,34 (d, 1H), 2,58 (s, 3H); 0,16 (s, 9H). RMN-<sup>13</sup>C (ppm): 166,34; 156,75; 130,64; 130,57; 127,66; 122,16; 121,26; 120,20; 115,71; 76,91; 51,30; 27,87; 27,87.

#### 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados de rendimento foram verificados os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, através dos testes de Shapiro-Wilk (W) e Bartlett, respectivamente. Os resultados foram comparados entre estações através da análise de variância (ANOVA), utilizando dados de uma coleta por estação, em triplicata. Foram utilizados o teste-t e o teste de Tukey a 5% de probabilidade, com resultados apresentados pela média ± erro padrão da média (EPM). As análises foram realizadas no software Assistat 7.7 Beta.

A definição de grupos químicos presentes nas amostras de OEs foi realizada por Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise Hierárquica de Cluster (AHC), examinando-se as porcentagens relativas dos 15 constituintes mais abundantes (> 1%). Para a AHC, um dendrograma horizontal foi obtido pelo método de Ward, com base nas distâncias Euclidianas como medida de dissimilaridade entre as amostras. A fim de determinar os constituintes que influenciaram a formação dos grupos, a ACP foi considerada (MARDIA et al., 1994). Cada amostra de OE foi considerada um "caso" e cada constituinte uma "variável". As análises foram realizadas através do software STATISTICA 7.4.

#### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os rendimentos médios (% m m<sup>-1</sup>) encontrados para o OE das raízes de *P. gaudichaudianum* não demonstraram diferença significativa entre as quatro estações avaliadas (Tabela 1). A baixa produção de OE obtida no presente estudo não é uma surpresa, uma vez que raízes de espécies do mesmo gênero apresentaram baixos teores de OE, quando esse é considerado em base fresca. Raízes de *Piper longum* L. apresentaram rendimento de OE de 0,054%, enquanto que *Piper amalago* L. demonstrou uma produção de OE de 0,02% (MOTA et al., 2013; VARUGHESE et al., 2016). Em estudo realizado com o extrativo obtido do mesmo órgão vegetal de *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC., Nascimento et al. (2013) detectaram um rendimento 0,77%.

Tabela 1 - Valores médios de rendimentos (% m m<sup>-1</sup>) do óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum* obtidas em quatro estações de um ano.

	Inverno	Primavera	Verão	Outono
Rendimento	0,09±0,050	0,08±0,044	0,09±0,054	0,07±0,039

Resultados são expressos na forma de médias (n=3) e EPM: Erro Padrão da Média. Teste de Tukey (p<0,05).

Em trabalho realizado na mesma população do presente estudo, Schindler et al. (2017a) relataram um rendimento médio elevado para folhas e órgãos reprodutivos da espécie. Entretanto, o baixo rendimento de um determinado órgão vegetal em OE pode ter diferentes explicações e nem sempre indica baixo conteúdo desse extrativo. Dentre as razões para o baixo rendimento do OE obtido nas raízes de *P. gaudichaudianum*, pode ser considerada a baixa volatilidade de seu componente majoritário, identificado como 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila, que apresenta grupos polares na molécula (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química do 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila, constituinte majoritário do óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum* (Fórmula desenhada no programa BKChem).

Fonte: (KOSATA, 2009)

Outro aspecto a ser considerado é o elevado grau de compactação das raízes, que dificulta a extração de óleo essencial. Para a extração de OE de raízes de *P. longum*, Varughese et al. (2016) cortaram o material vegetal em pequenos pedaços visando garantir rendimento máximo, no entanto, esse atingiu apenas 0,054%. Portanto, para a otimização de rendimentos, outros métodos de extração deverão ser testados. Também se faz necessário avaliar a produção de OE após a secagem e moagem do material vegetal, bem como verificar o rendimento considerando base seca, aspectos já descritos na literatura para outras espécies de *Piper* (ARAMBEWELA, KUMARATUNGA, DIAS, 2005; HU et al., 1996; PACHECO et al., 2016; PIMENTEL et al., 2012). Para a escolha do processamento pós-colheita, deve-se considerar que a submissão do material vegetal ao calor pode provocar a perda de constituintes altamente voláteis. No entanto, no caso das raízes de *P. gaudichaudianum* essa perda não deve ser significativa, uma vez que o componente majoritário tem baixa volatilidade.

As análises CG-DIC /CG-EM do OE, juntamente com as análises do componente majoritário por espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear (RMN), permitiram a identificação de 20 constituintes nas amostras de OE, com percentuais totais de caracterização variando de 80,53% a 88,43% das composições químicas (Tabela 2). O componente majoritário do OE de P. gaudichaudianum encontrado em todas as estações foi o 4-(3-hidroxi-3-metilbutenil)-benzoato de metila (HMBBM). Análises estruturais feitas até o momento indicam para esse composto uma estrutura até agora inédita. No entanto, para confirmar a estrutura proposta, análises bidimensionais de Ressonância Magnética Nuclear (1H-1H- e 1H-13C-RMN) estão sendo realizadas em colaboração com a FIOCRUZ. Em buscas na literatura, foi verificada a descrição de uma substância (Pseudocydonia semelhante como constituinte de uma planta chinesa sinensis) (MIHARA et al., 1987).

Embora o derivado de ácido benzoico HMBBM ainda não tenha sido descrito para o gênero, representantes da referida classe química já foram detectados em folhas e inflorescências de *Piper* (CABANILLAS et al., 2012; FLORES et al., 2008, 2009; JEFFREY et al., 2014; PARRA et al., 2013; RAPADO et al., 2014; REGIANE et al., 2015). Adicionalmente, alguns derivados relatados para as espécies deste gênero apresentam bioatividades descritas na literatura, como antiparasitária (FLORES et al., 2008, 2009), inibidora da herbivoria (JEFFREY et al., 2014), antibacteriana (REGIANE et al., 2015) e fungitóxica (LAGO et al., 2004).

Destaca-se também a presença do fenilpropanoide dilapiol na composição química do extrativo, com percentuais oscilando entre 5,21% e 17,69%. Considerando as classes químicas detectadas, a classe dos derivados de ácido benzoico sobressaiu-se com os teores mais elevados, devido à presença de HMBBM, representando no mínimo 62,55% do OE em todas as análises. A segunda classe química mais abundante foi a dos fenilpropanoides, demonstrando percentuais de 5,21 a 17,86% dos OEs, em razão da presença do dilapiol, que aparece como principal representante dessa classe, juntamente com a miristicina. Salienta-se que uma grande variabilidade na composição química do OE de *P. gaudichaudianum* entre os diferentes indivíduos amostrados foi detectada no verão, sendo que, para os principais componentes, foram observadas variações de 46,33 a 79,37% (HMBBM) e 6,02 a 31,68% (dilapiol).

Tabela 2 - Composição química dos óleos essenciais de raízes de *Piper gaudichaudianum* obtidos em quatro estações de um ano.

IR	IR	Constituinte	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Classes
	Literatura <sup>a, b</sup>						
931	931	α-Pineno	0,24	-	0,06	-	НМ
946	946	Canfeno	0,25	-	0,78	1,44	НМ
981	982	ß-Pineno	-	-	0,11	0,18	НМ
1002	1007	α-	-	-	0,04	0,85	НМ
		Felandereno					
1026	1026	Limoneno	1,48	-	0,84	1,33	HM
1028	1028	Eucaliptol	0,51	-	0,1	0,12	MO
1035	1035	E-Ocimeno	-	-	-	0,08	MH
1047	1047	Z-Ocimeno	0,11	-	0,16	0,64	MH
1098	1098	Linalol	0,78	-	0,09	-	MO
1337	1337	δ-Elemeno	0,29	-	-	-	HS
1376	1376	Copaeno	0,73	-	0,53	0,61	HS
1420	1420	ß-Humuleno	2,54	0,32	0,74	0,91	HS
1429	1429	β-Cubebeno	-	-	0,09	0,08	HS
1454	1454	α-Humuleno	2,3	1,59	2,34	2,14	HS
1470	1466	Iswarona	3,73	-	-	-	SO
1522	1522	Miristicina	-	0,21	0,17	0,18	FP
1562	1560	Nerolidol	1,25	-	-	-	SO
1624	1620	Dilapiol	5,21	13,17	17,69	9,04	FP
1645	1645	δ-Cadinol	0,64	0,69	0,36	0,27	SO
1672		HMBBM	62,55	64,38	62,76	71,49	DAB
	Total		83,17	80,53	87,27	88,43	

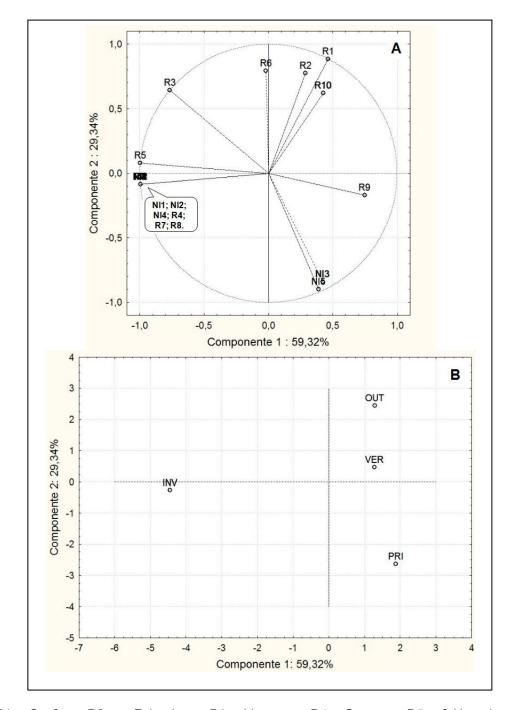
IR= Índice de retenção; <sup>a</sup>ADAMS, 2009; <sup>b</sup>NIST, 2010; HMBBM= 4-(3 hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila; HM= hidrocarbonetos monoterpênicos; MO= monoterpenoides oxigenados; HS= hidrocarbonetos sesquiterpênicos; SO= sesquiterpenoides oxigenados; FP= fenilpropanoides; DAB= Derivado de ácido benzoico.

O dilapiol foi o componente majoritário na análise das folhas desta mesma população de *P. gaudichaudianum*, (SCHINDLER et al., 2017b) confirmando que esse fenilpropanoide é produzido e/ ou translocado, tanto em folhas como em raízes. No mesmo estudo, os autores verificaram a presença de α-pineno,

copaeno, miristicina e iswarona, constituintes também detectados em raízes da espécie. Diferenças nas composições químicas de OEs obtidos de raízes e demais órgãos vegetais de mesma espécie são comuns em espécies do gênero *Piper*, como foi relatado para *P. aduncum*, *P. amalago*, *P. betle*, *P. caldense*, *P. klotzschianum*, *P. longum*, *P. nigrum e P. truncatum* (ARAMBEWELA, KUMARATUNGA, DIAS, 2005; LUZ et al., 2016; MOTA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2013; PACHECO et al., 2016; ROCHA et al., 2016; TRINDADE et al., 2010; VARUGHESE et al., 2016).

A classe química dos fenilpropanoides também foi detectada em estudos realizados com OE de raízes de P. aduncum (PACHECO et al., 2016), P. klotzschianum (NASCIMENTO et al., 2013), P. nigrum (LUZ et al., 2016) e P. taiwanense (CHEN et al., 2013, 2014). No entanto, o dilapiol, segunda substância mais abundante no extrativo estudado no presente trabalho, foi identificada apenas em raízes de P. aduncum até o momento. Para a última espécie citada, foram encontrados teores oscilando entre 4,61% e 5,93% para o dilapiol, dependendo das condições luminosas proporcionadas. Segundo dados da literatura, fenilpropanoides biossintetizados por raízes de representantes de Piper apresentam diferentes bioatividades. como antibacteriana contra Mycobacterium tuberculosis antiplaquetária de substâncias extraídas de P. taiwanense (CHEN et al., 2013, 2014).

Figura 2: Representação das variáveis (A) e dos casos (B) nos gráficos dos componentes principais 1 e 2, considerando os 15 constituintes majoritários detectados em concentrações >1% nas quatro amostras de óleo essencial, obtidas a partir de raízes de *P. gaudichaudianum* em quatro estações do ano.



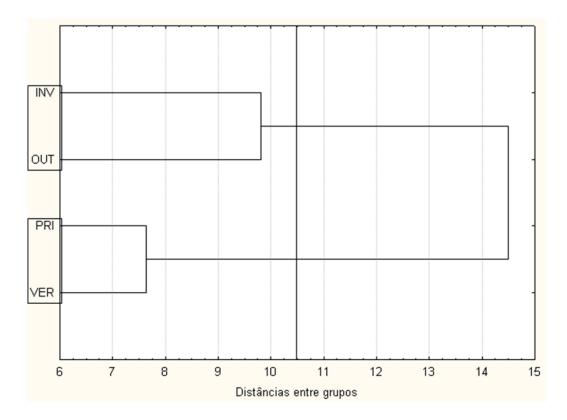
Legenda: R1 = Canfeno; R2 =  $\alpha$ -Felandreno; R3 = Limoneno; R4 = Copaeno; R5 =  $\beta$ -Humuleno; R6 =  $\alpha$ -Humuleno; R7 = Iswarona; R8 = Nerolidol; R9 = Dilapiol; R10=4-(3 hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila (HMBBM); NI= não identificado

Com relação à análise multivariada, a ACP demonstrou três componentes principais com autovalores superiores a 1%, explicando 100% da variância total. O primeiro componente representa 59,31% da variância, destacando-se nele os

constituintes limoneno (R3), copaeno (R4), β-humuleno (R5), NI1, iswarona (R7), NI2, nerolidol (R8), dilapiol (R9) e NI4. O segundo componente explica 29,33% da variância, sendo caracterizado por canfeno (R1), α-felandreno (R2), α-humuleno (R6), NI3 e NI5. Através da análise, foi possível constatar que o constituinte majoritário HMBBM (R10) não contribui para a explicação dos dois componentes principais (Figura 2). O terceiro componente corresponde a 11,34% da variância total e não pode ser representado por nenhum dos constituintes químicos. Através da análise das Figuras 2A e B, é possível visualizar que as variáveis canfeno (R1), α-felandreno (R2) e HMBBM (R10) estão relacionadas ao outono (OUT), enquanto que primavera (PRI) demonstra maior correlação com NI3 e NI5. A amostra obtida no inverno (INV) está relacionada aos constituintes NI1, NI2, NI4, copaeno (R4), iswarona (R7) e nerolidol (R8). Já o fenilpropanoide dilapiol demonstra estar mais associado ao verão.

A AHC promoveu a divisão das amostras em dois grupos químicos (Figura 3), resultado que pode estar relacionado à presença de dilapiol. O primeiro agrupamento apresenta os casos de inverno (INV) e outono (OUT), estações onde esse constituinte apresentou teores médios de 5,21% e 9,05%, respectivamente. O segundo grupo é caracterizado pelas estações primavera (PRI) e verão (VER), casos em que o fenilpropanoide demonstrou percentuais médios de 13,17% e 17,69%, respectivamente. Uma série de fatores, além da sazonalidade, pode afetar o comportamento de produtos do metabolismo secundário, como o estágio de desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude, radiação ultravioleta, entre outros (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Figura 3 - Dendrograma obtido através da Análise Hierárquica de Cluster (AHC) das composições químicas de quatro amostras de óleo essencial de raízes de *P.gaudichaudianum*, obtidas em quatro estações do ano.



Legenda: INV= Amostra de inverno; OUT= Amostra de outono; PRI= Amostra de primavera; VER= Amostra de verão.

Através dos resultados obtidos no presente estudo, é possível considerar que não houve diferenças nos rendimentos de OE de raízes de *P. gaudichaudianum* obtidas nos quatro períodos de coleta. As análises por ACP e AHC indicam uma influência sazonal na caracterização química do extrativo, entretanto, o constituinte majoritário HMBBM não foi considerado um fator preponderante para a divisão em agrupamentos. Sendo assim, todas as estações do ano podem ser consideradas equivalentes para coleta de raízes de *P. gaudichaudianum*, com a finalidade de extração de seu OE.

No entanto, futuros estudos devem ser realizados visando detectar as possíveis bioatividades para o OE de raízes de *P. gaudichaudianum*, uma vez que relatos da literatura sugerem que extrativos obtidos desse órgão vegetal em representantes do gênero podem apresentar atividades de interesse para a geração de diferentes produtos. Como exemplos podem ser citados a atividade larvicida descrita para o extrativo obtido de raízes de *P. klotzschianum* (NASCIMENTO et al.,

2013) e a atividade antimicrobiana, apresentada pelo OE de *P. caldense* (ROCHA et al., 2016).

Ainda, caso o OE de raízes de *P. gaudichaudianum* apresente bioatividades promissoras, também devem ser feitos estudos visando otimizar a obtenção desse extrativo. Algumas alternativas que poderiam ser testadas são a extração de raízes após a secagem e moagem, bem como a utilização de enzimas que degradem os componentes dos tecidos de sustentação, promovendo assim uma maior liberação do extrativo e, como consequência, um aumento no seu rendimento (BABY, RANGANATHAN, 2016).

### 4 CONCLUSÃO

O componente majoritário, identificado nas raízes de *P, gaudichaudianum* é o derivado do ácido benzoico 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila.

Os rendimentos médios encontrados para o OE de raízes frescas de *Piper gaudichaudianum* Kunth não demonstram diferença significativa no período avaliado.

Na população estudada é detectada influência sazonal na composição química, porém, o componente majoritário é encontrado em todas as estações. Sendo assim, todo o período avaliado é sugerido para coleta de raízes da espécie avaliada, para obtenção do óleo essencial.

# **5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography**: Mass Spectrometry. 4 ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2009, 804 p.

ARAMBEWELA, L.; KUMARATUNGA, K. G. A.; DIAS, K. Studies on *Piper betle* of Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 33, p. 133-139, 2005.

BABY, K. C.; RANGANATHAN, T. V. Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton.) volatile oil. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 200-206, 2016.

BALZON, D. R.; SILVA, J. C. G. L.; SANTOS, A. J. Aspectos mercadológicos de produtos florestais não madeireiros – análise retrospectiva. **Floresta**, v. 34, n. 3, p. 363 – 37, 2004.

- BERNUCI, K. Z. et al. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, v. 12, p. 1-12, 2016.
- BRUSSA, C. A. *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae), primer registro para la flora del Uruguay. **Agrociência Uruguay**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2016.
- CABANILLAS, B. J. et al. Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. **Planta Medica**, v. 78, p. 914-918, 2012.
- CASTELO. A. V. M. et al. Rendimento e análises espectroscópicas (rmn¹h,¹³c; iv) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. **Cerne**, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.
- CHEN, S. et al. Three new phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their inhibitory activities on platelet aggregation and *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 792-799, 2014.
- CHEN, S. et al. Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. **Phytochemistry**, v. 93, p. 203-209, 2013.
- DI STASI L. C.; HIRUMA-LIMA C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo, SP: Ed. UNESP. 2002. 604 p.
- 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. 263-278, 2008.
- FLORES, N. et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, p. 621-627, 2009.
- FLORES, N. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1538-1543, 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.
- 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/jabot/floradobrasil/FB12780 Acesso em: 30 de janeiro de 2017.
- GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. Piperáceas *Piper.* Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Santa Catarina. 2001, 104 p.
- HU, S. L. et al. Pharmacognostical studies on the roots of *Piper nigum* L. III: Determination of essential oil and piperine. **Acta Horticulturae**, n. 426, p.179-182, 1996.

- IBGE, **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv63011.pdf. Acesso em: 23 de janeiro de 2017.
- ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.
- JEFFREY, C. S. et al. Antiherbivore prenylated benzoic acid derivatives from *Piper kelleyi*. **Journal of natural products**, v. 77, p. 148-153, 2014.
- KOSATA, B. BKCHEM, Software livre. 2009. Disponível em: bkcham.zirael.org. Acesso em: 24 de agosto de 2015.
- LAGO, J. H. G. et al. Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, 2004.
- LUZ, S. F. M. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the essential oil composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.). **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 9, p. 10-17, 2016.
- MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**, pp. 213-244, pp. 360-384, 1994.
- MIHARA, S. et al. Volatile components of Chinese quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 35, p. 532-537, 1987.
- 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 fitoquimicos e farmacológicos de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 82, p. 29-32. 2001.
- MOTA, J. S. et al. Identification of the Volatile Compounds of Leaf, Flower, Root and Stem Oils of *Piper amalago* (Piperaceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, p. 11-16, 2013.
- NASCIMENTO, J. C. et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). **Pest Management Science**, v. 69, p. 1267-1271, 2013.
- NIST. National Institute of Standards and Technology. **NIST/EPA/NIH mass spectral library & search/analysis programs,** NIST update. John Wiley & Sons, Hoboken, USA, 2010.
- PACHECO, F. V. et al. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251-257, 2016.

- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PARRA, J. E. et al. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 590-592, 2013.
- 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.
- PIMENTEL, F. A. et al. Influência da secagem sobre o rendimento e composição química dos compostos voláteis das raízes de *Piper piscatorum* Trel. & Yunck. (Piperaceae). **Quimica Nova**, v. 35, p. 715-718, 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.
- RAPADO, L. N. et al. A benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as schistosomiasis vector controls. **Molecules**, v. 19, p. 5205-5218, 2014.
- REGIANE, B. L. et al. A new benzoic acid derivative from *Piper diospyrifolium* and its anti-Mycobacterium tuberculosis activity. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 18-23, 2015.
- ROCHA, D. S. et al. Potential antimicrobial and chemical composition of essential oils from *Piper caldense* tissues. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 60, n. 3, p. 148-151, 2016.
- SARTOR, R. B. Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste de vapor. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- SCHINDLER, B. **Óleo essencial de** *Piper gaudichaudianum* Kunth: rendimento, composição química e atividade fungitóxica *in vitro*. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2015.
- SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de *Piper gaudihaudianum* Kunth. **Ciência Florestal** (UFSM. Aceito), 2017.
- SCHINDLER, B.; HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: seasonal characterization of the essential oil chemical composition of leaves and reproductive organs. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (aceito) 2017.
- SILVA, R. S. et al. Óleo essencial do limão no ensino da cromatografia de 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. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2013. 357 p.

SOARES, J. C. W. et al. Relação solo/paisagem e sua variação temporal em uma estação experimental de silvicultura. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 2, p. 477-489, 2015.

STRECK, N. A. et al. Temperatura mínima de relva em Santa Maria, RS: climatologia, variabilidade interanual e tendência histórica. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p. 696-706, 2011.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2. ed. revisada e ampliada. Porto Alegre: Emater/RS, 2008. 222 p.

TRINDADE, A. P. F. et al. Essential oil from organs of *Piper truncatum* Vell. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 200-202, 2010.

VARUGHESE, T. et al. Chemical Composition of the essential oils from stem, root, fruit and leaf of *Piper longum* Linn. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, p. 52-58, 2016.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. et al. Chemical components of *Citrus* essential oils from Brazil. **Natural Products Journal**. v. 5, p. 14-27, 2015.

# 2.2 ARTIGO 2

TRES, J.; PINHEIRO, C. G.; OLIVEIRA, B. S.; GOUVEIA, F.; MUNIZ, M. F. B.; HEINZMANN, B. M. Propriedades fungitóxicas *in vitro* do óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum* Kunth. A ser submetido.

# PROPRIEDADES FUNGITÓXICAS in vitro DO ÓLEO ESSENCIAL DE RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth

Jésica Tres<sup>a</sup>, Carlos Garrido Pinheiro<sup>a</sup>, Bruno da Silva Oliveira<sup>b</sup>, Fernando Gouveia<sup>c</sup>, Marlove Fatima Brião Muniz<sup>d</sup>, Berta Maria Heinzmann<sup>e</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

<sup>b</sup>Curso de Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Produtos Florestais. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

<sup>a,d</sup>Departamento de Defesa Fitossanitária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

<sup>a,f</sup>Departamento de Farmácia Industrial. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, BR-97105-900, Brasil

#### \*Correspondência

Prof.<sup>a</sup> Dra. Berta Maria Heinzmann. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial. Prédio 26, Campus Universitário, Avenida Roraima, nº 1000, Bairro Camobi, Santa Maria - RS, Brasil, BR-97105-900. E-mail: <a href="mailto:berta.heinzmann@gmail.com">berta.heinzmann@gmail.com</a>, Phone: +55 55 3220 8336

#### RESUMO

# PROPRIEDADES FUNGITÓXICAS in vitro DO ÓLEO ESSENCIAL DE RAÍZES DE Piper gaudichaudianum Kunth

AUTORA: Jésica Tres ORIENTADORA: Berta Maria Heinzman

Este trabalho descreve a atividade fungitóxica in vitro do óleo essencial (OE) de raízes de Piper gaudichaudianum e de seu componente majoritário contra os fungos apodrecedores da madeira Trametes versicolor e Gloeophyllum trabeum. Raízes de P. gaudichaudianum foram coletadas ao acaso em uma população nativa em Santa Maria, RS, Brasil. O OE juntamente com o hidrolato foram extraídos a partir do material vegetal fresco e fragmentado utilizando hidrodestilação, por um período de 3 horas. Após extração da mistura constituída por OE e hidrolato com hexano e evaporação do solvente, o extrativo obtido foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e cromatografia com detector de ionização de chama. O constituinte majoritário, 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila, foi isolado por cromatografia em coluna. A atividade fungitóxica foi avaliada pelo método de diluição em BDA (batata-dextrose-ágar). O extrativo e a substância majoritária foram inicialmente diluídos em etanol (1:1), seguido de adição das soluções em meio de cultura. O OE foi avaliado nas concentrações de 0,25; 0,5 e 1.0 µL/mL, enquanto que 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila foi testado em quantidade correspondente à sua porcentagem em 1 µL/mL do OE. O propiconazole (1,0 µL/mL) foi utilizado como controle positivo. Discos miceliais das duas espécies fúngicas foram transferidos para placas de petri contendo meio BDA com os tratamentos. As placas foram armazenadas em B. O. D. com temperatura de 25°C (±1) e fotoperíodo ajustado para 12/12 h (escuro/luz), onde permaneceram até o encerramento das avaliações. A atividade fungitóxica do OE foi dependente de concentração e variou conforme a espécie fúngica testada. A atividade do constituinte majoritário não diferiu daquela do OE e do controle positivo para T. versicolor, mas foi inferior à apresentada pelo OE e propiconazole no caso de G. trabeum. Ambos os pools de OE quanto seu componente majoritário apresentam potencial fungitóxico nas concentrações máximas avaliadas.

**Palavras chave:** Pariparoba. Fungos apodrecedores da madeira. Fungicida botânico. Piperaceae.

#### **ABSTRACT**

# in vitro FUNGITOXIC PROPERTIES OF ROOTS ESSENTIAL OIL OF Piper gaudichaudianum Kunth

AUTHOR: JÉSICA TRES ADIVISOR: BERTA MARIA HEINZMAN

This work describes the in vitro fungitoxic activity of roots essential oil (EO) of Piper gaudichaudianum and its major component against the wood rotting fungi Trametes versicolor and Gloeophyllum trabeum. Roots of P. gaudichaudianum were randomly collected in a native population in Santa Maria, RS, Brazil. The EO and hydrolate were extracted from the fresh and fragmented plant material usingby hydrodistillation for 3 hours. The extractive obtained was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry and gas chromatography with flame ionization detector. The major constituent was isolated by column chromatography and identified by spectroscopic methods as 4-(3-hydroxy-3-methyl-1-butenyl)-methylbenzoate. The fungitoxic activity was evaluated by the method of dilution in PDA (potato-dextroseagar). Initially, extractive and its major compound were diluted in ethanol (1:1), followed by addition of solutions in culture medium. The EO was evaluated at concentrations of 0.25; 0.5 and 1.0 µL mL<sup>-1</sup>, whereas 4-(3-hydroxy-3-methyl-1butenvl)-methylbenzoate was tested in an amount corresponding to its percentage in 1 μL mL<sup>-1</sup> EO. Propiconazole (1.0 μL mL<sup>-1</sup>) was used as a positive control.Mycelial discs of the two fungal species were transferred to petri dishes containing PDA medium with the treatments. The plates were stored in B.O.D. with a temperature of 25 (±1) °C and photoperiod adjusted to 12/12 h (dark / light), where they remained until the closure of the evaluations. The fungitoxic activity of EO was concentration dependent and varied according to the fungal species tested. The activity of the major constituent did not differ from that of EO and the positive control for T. versicolor, but was lower than that presented by EO and propiconazole in the case of G. trabeum. Both EO pools and its major component have fungitoxic potential at the maximum concentrations evaluated.

Key words: Pariparoba. Wood decaying fungi. Botanical fungicide. Piperaceae.

# 1 INTRODUÇÃO

Algumas plantas apresentam boa resistência natural contra organismos de biodegradação, em decorrência da produção de extrativos e, entre estes, encontram-se os óleos essenciais (OE) de plantas aromáticas (SBEGHEN, 2001; SANTOS et al., 2003). Essa resistência natural tem motivado a realização de inúmeras pesquisas acerca do desenvolvimento de produtos alternativos que possam substituir os preservantes sintéticos para madeira (CELOTO et al., 2008).

Os fungos e os insetos formam os grupos mais relevantes de organismos xilófagos, responsáveis por grandes perdas de vários tipos de produtos florestais (MENDES, ALVES, 1988). Os fungos apodrecedores podem causar degradação da madeira, sendo responsáveis pela perda de resistência do material. Dentre esses, os fungos da podridão-branca decompõem tanto a celulose quanto hemiceluloses e lignina. Já os fungos da podridão-parda degradam a celulose e hemicelulose, transformando-as em substâncias solúveis facilmente assimiláveis e digeríveis (MENDES, ALVES, 1988; MORESCHI, 1980).

O tratamento preservante para os produtos de origem madeireira é necessário, principalmente quando a madeira sofre deterioração causada por diferentes agentes microbianos, como os fungos. Os conservantes atualmente empregados na indústria são de origem sintética (MACHADO et al., 2006).

A vulnerabilidade natural da madeira frente a agentes microbianos leva à necessidade de tratamento preservante de seus produtos. Na indústria os conservantes atualmente empregados são de origem sintética à base de metais, como cobre, zinco, arsênio, boro e flúor, e de compostos como creosoto e aminas (MACHADO et al., 2006), que são prejudiciais aos manipuladores e ao meio ambiente.

A eficiência dos OE no controle das doenças, principalmente as fúngicas por seu efeito fungitóxico, resulta da inibição da germinação dos esporos e/ ou do crescimento micelial e de suas propriedades fungicidas, decorrentes do efeito deletério para esporos e micélio (CHAUSSÊ et al., 2011; PEREIRA et al., 2008; SOUZA JUNIOR, SALES, MARTINS, 2009). Portanto, a possibilidade de sua utilização para o controle e prevenção do ataque de fungos que causam prejuízos ao setor madeireiro deve ser uma meta melhor explorada.

Uma das espécies vegetais nativas do bioma Mata Atlântica com potencial para a produção de OE é *Piper gaudichaudianum* Kunth, conhecida popularmente como pariparoba ou jaborandi (ALBIERO et al., 2005; DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002). Com relação às atividades biológicas avaliadas para suas folhas, são descritos efeitos fungicida, inseticida, anti-inflamatório, larvicida e analgésico (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002; MORAIS et al., 2007; MOREIRA et al., 2001; PARMAR et al., 1997; PUHL et al., 2011). Os OEs extraídos de partes aéreas de *P. gaudichaudianum* apresentaram atividade antifúngica contra fungos apodrecedores da madeira (SCHINDLER et al., 2015; SOIDROU et al., 2013). No entanto, não foram encontrados relatos descrevendo a avaliação das atividades biológicas dos extrativos obtidos de suas raízes. Considerando os aspectos expostos, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade fungitóxica do OE de raízes de *P. gaudichaudianum* e de seu constituinte majoritário contra os fungos apodrecedores da madeira *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) e *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries).

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Raízes de *Piper gaudichaudianum* Kunth foram coletadas de uma população nativa, situada em sub-bosque de um remanescente florestal no município de Santa Maria (coordenadas 29° 40 11.3" S e 53° 46' 15.88" O; altitude de 229 m), Rio Grande do Sul, Brasil. Os exemplares foram coletados ao acaso, uma vez em cada estação de um ano, no período da tarde, entre agosto de 2015 e abril de 2016. Foram retirados do solo: 6 indivíduos na primeira coleta, 12 exemplares na segunda e terceira coleta, respectivamente e 16 espécies na quarta coleta. As partes aéreas dos arbustos permaneceram no remanescente florestal. Após a coleta, as raízes foram lavadas e permaneceram 12 horas em temperatura ambiente para posterior extração do óleo essencial. Uma exsicata da espécie foi incorporada ao 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 os registros 6.514 e 584.729, respectivamente.

# 2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O OE de raízes frescas de *P. gaudichaudianum* foi obtido juntamente com o hidrolato, pelo método de hidrodestilação através de um aparelho Clevenger por um período de 3 h (SARTOR, 2009). O procedimento foi realizado em triplicata e a mistura de OE com o hidrolato foi submetida à extração líquido-líquido em funil de separação, utilizando como solvente o hexano previamente destilado (SILVA et al., 2009). Após foi feita a secagem da fração hexânica com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e evaporação do solvente para obtenção do OE.

# 2.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

A detecção e identificação dos constituintes químicos dos OE foram realizadas por um aparelho de cromatografia gasosa Agilent 7890A acoplado a um detector de massas 5975C. Parâmetros da análise: injeção em modo split (1:100, v/v), gás carreador He (1 mL/min.); coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard, 5% de fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm); programa de temperatura: 40°C por 4 min, 40-320 °C, 4 °C/min; temperatura do injetor e da interface: 250 °C; energia de ionização: 70 eV; Banco de dados: NIST, 2010. Os componentes dos OE foram identificados por comparação dos seus índices de retenção, determinados por uma curva de calibração de uma série homóloga de n-alcanos injetados sob as mesmas condições cromatográficas das amostras, e dos padrões de fragmentação de massas descritos na literatura (NIST, 2010; ADAMS, 2009).

Os componentes dos OE foram quantificados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (CG/DIC) num equipamento Agilent 7890A, com injeção em triplicata. Os parâmetros utilizados para as análises foram: modo split 1:50; programa de temperatura: 40 °C durante 4 min; 40-320 °C a 4 °C min<sup>-1</sup>; Hélio como gás carreador, com taxa de fluxo de 1 ml min<sup>-1</sup>; Temperaturas determinadas para injetor e detector: 300 °C. A percentagem dos componentes químicos foi baseada na normalização de área dos picos.

O espectro de massas de alta resolução do íon molecular do constituinte majoritário foi obtido em um espectrômetro de Massas de Alta Resolução Brucker Compact Q Tof. Para os espectros de RMN, a substância foi dissolvida em

clorofórmio deuterado e analisada em espectrômetro Brucker HPX-400 FT RMN, a 400 MHz para <sup>1</sup>H e a 100 MHz para <sup>13</sup>C, com tetrametilsilano como padrão interno. Os respectivos espectros estão em (APÊNDICES C, D, E, F).

#### 2.4 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

Um pool de amostras do OE de raízes de de P. gaudichaudianum foi submetido ao fracionamento através de cromatografia em coluna (CC). A primeira CC foi realizada com 1,28 g de OE (15,0 x 4,0 cm) contendo gel de sílica 60 (Macherey-Nagel, 70-230 mesh) na proporção de 1:100. Os sistemas eluentes utilizados foram hexano (frações 1-41); e hexano: acetato de etila em gradiente, conforme especificado a seguir: 99:1 (v/v) (frações 42-63); 98:2 (v/v), (frações 64-73); 97:3 (v/v), (frações 74-83); e 96:4 (v/v), 95:5 (v/v) e 94:6 (v/v) (frações 87-x). Foram coletadas frações de 25 mL, que foram analisadas por cromatografia sobre camada delgada (CCD) e agrupadas conforme seu perfil cromatográfico. Para as análises sobre CCD, foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> e as substâncias foram detectadas com vanilina ácido sulfúrico - UV a 365 nm. Na segunda CC, a fração 1 (582 mg) da primeira CC foi purificada sobre 58 g de gel de sílica 60 (19 x 1,9 cm) e eluição com hexano-acetona 95:5 (v/v). Foram coletadas frações de 15 mL, que foram analisadas por CCD conforme descrito anteriormente. Das quatro frações principais obtidas, as frações 1 e 2 corresponderam à sustância majoritária isolada com grau de pureza de 99%, identificada como 4-(3-hidroxi-3metil-1-butenil)-benzoato de metila.

# 2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL E DA SUBSTÂNCIA ISOLADA

As espécies fúngicas *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) e *Gloeophyllum trabeum* (Persoon ex Fries), foram fornecidas pelo Laboratório de Produtos Florestais da Universidade Federal de Brasília.

Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi, visando detectar a inibição do crescimento micelial dos fungos, a atividade antifúngica, iniciou com a avaliação do efeito de dois *pools* do OE de raízes de *P. gaudichaudianum* frente às duas espécies de fungos. Os inóculos dos fungos foram

cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 15 dias em estufa incubadora para B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio) com temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, discos miceliais de 11 mm de diâmetro foram transferidos para o centro das placas de petri esterilizadas contendo BDA e o OE previamente diluído em etanol (1:1). Para a diluição do OE, as concentrações a serem testadas já diluídas em etanol foram transferidas para um frasco contendo o meio BDA fundente. O conteúdo foi homogeneizado lentamente e transferido para as placas de petri. O extrativo foi avaliado nas concentrações de 0,25 (R2), 0,50 (R3) e 1.0 µL mL<sup>-1</sup> (R4). Também foram considerados uma testemunha absoluta, um controle negativo contendo etanol (R1), e um controle positivo (R6), utilizando o fungicida comercial propiconazole na concentração de 1,0 µL mL<sup>-1</sup>. O constituinte majoritário do extrativo foi avaliado em concentração proporcional à sua porcentagem nos OE utilizados anteriormente (R5). Dessa forma, para *T. versicolor* foi verificado seu efeito da concentração de 0,491 µL mL<sup>-1</sup>, enquanto que para G. trabeum essa foi de 0,659 µL mL<sup>-1</sup>. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições. Para evitar contaminação bacteriana nas culturas fúngicas, acrescentouse ao meio 0,04 mg mL<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomocina.

Após a implementação dos ensaios, as placas foram incubadas em B.O.D. nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas anteriormente.

A avaliação foi realizada no sétimo dia após o início do experimento, através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), até as colônias fúngicas dos controles testemunha atingirem o crescimento completo do diâmetro da placa. A partir desses dados foi calculado o índice antifúngico (IA%) para cada tratamento, obtido através da fórmula (1- De / Dt) x100, onde De e Dt correspondem ao crescimento micelial experimental e da testemunha absoluta, respectivamente (CHANG et al., 1999, 2000).

### 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados de IA% de cada fungo foram verificados a normalidade de distribuição e homogeneidade de variâncias, no entanto, como os dados não atenderam aos pressupostos, optou-se por uma estatística não paramétrica através de análise de variâncias de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de médias de Mann

Whitney (p<0,05). Todos os resultados foram expressos em média e ± desvio padrão da média (n=5). As análises foram realizadas através do software Assistat 7.7 Beta.

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise por CG-EM e CG-DIC, juntamente do a análise por RMN do constituinte majoritário, permitiu a identificação e quantificação de 13 constituintes nas duas amostras OE, totalizando 85,99% a 86,34% da composição química total dos extrativos avaliados contra *T. versicolor* (pool RTv) e *G. trabeum* (poolRGt), respectivamente (Tabela 1). O componente majoritário do OE, identificado como um derivado do ácido benzoico foi detectado em percentagens que variaram de 49,09% - 65,85%. Dos constituintes relatados, também destaca-se o fenilpropanoide dilapiol como o segundo mais abundante, representando 29,30% e 14,31% das amostras pool RTv e poolRGt, respectivamente. Essa substância já foi descrita anteriormente em raízes de *Piper aduncum* L, representando de 13,00% a 18,36% da composição química do OE (PACHECO et al., 2016).

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que as maiores diferenças entre as composições químicas dos dois *pools* de OE utilizados nos ensaios são os teores do componente majoritário e do dilapiol. Considerando o somatório das percentagens desses dois constituintes nas duas amostras avaliadas, é possível notar valores semelhantes (78,39% para o *pool* RTv, e 80,16% no caso de RGt), o que indica que sua biossíntese pode derivar dos mesmos precursores (DEY, HARBORNE, 1997). Salienta-se que as diferenças nas porcentagens dos dois componentes majoritários podem ser explicadas devido a grande variabilidade química entre indivíduos detectada na estação do verão (ver artigo 1).

O fracionamento do OE em estudo conduziu ao isolamento do constituinte majoritário 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (Figura 1). Até o momento, um derivado semelhante havia sido isolado apenas de uma planta chinesa, *Pseudocydonia sinensis* (Thouin) C.K. Schneid. (MIHARA et al., 1987). No entanto, informações acerca de suas atividades biológicas não foram encontradas. Até então, a literatura não apresenta relatos de ocorrência desse derivado de ácido benzoico em *Piper*, entretanto, representantes dessa classe química já foram detectados em folhas e inflorescências de algumas espécies deste gênero (CABANILLAS et al., 2012; FLORES et al., 2008, 2009; JEFFREY et al., 2014;

PARRA et al., 2013; RAPADO et al., 2014; REGIANE et al., 2015). Os derivados dessa classe anteriormente obtidos representaram atividades antiparasitária, inibidora de herbivoria, antimicrobiana e fungitóxica (FLORES et al., 2008, 2009; JEFFREY et al., 2014; LAGO et al., 2004; REGIANE et al., 2015).

Figura 1: Estrutura química do 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil) -benzoato de metila, constituinte majoritário do óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum* (Fórmula desenhada com o auxílio do programa BKChem)

Fonte: (KOSATA, 2009).

Tabela 1 – Composição química dos *pools* de óleo essencial de raízes de *Piper gaudichaudianum*, utilizados para avaliação da atividade fungitóxica *in vitro* frente às espécies *Trametes versicolor* (*pool* RTv) e *Gloeophyllum trabeum* (*pool* RGt).

	% comp			
Constituinte	pool RTv	pool RGt	IK cal	IK tab
Canfeno	1,22	0,47	946	946 <sup>N</sup>
ß-Pineno	0,24	-	987	982 <sup>N</sup>
α-Felandereno	-	0,33	1004	1007 <sup>N</sup>
Limoneno	1,52	0,87	1027	1026 <sup>N</sup>
Z-Ocimeno	0,34	-	1048	1047 <sup>N</sup>
Copaeno	0,73	0,66	1377	1376 <sup>N</sup>
β-Humuleno	0,69	0,83	1421	1420 <sup>N</sup>
β-Cubebeno	0,20	0,20	1430	1429 <sup>N</sup>
α-Humuleno	2,00	2,36	1456	1454 <sup>N</sup>
Miristicina	0,16	0,41	1522	1522 <sup>N</sup>
Dilapiol	29,30	14,31	1625	1620 <sup>A</sup>
δ-Cadinol	0,50	0,52	1648	1645 <sup>N</sup>
4-(3-hidroxi-3-metil-1- butenil)-benzoato de metila	49,09	65,85	1673	-
Total identificado	85,99	86,34		

Legenda: IK cal: índice de retenção de Kovats calculado; IK tab: índice de retenção de Kovats tabelado (NIST, 2010<sup>N</sup>; ADAMS, 2009<sup>A</sup>)

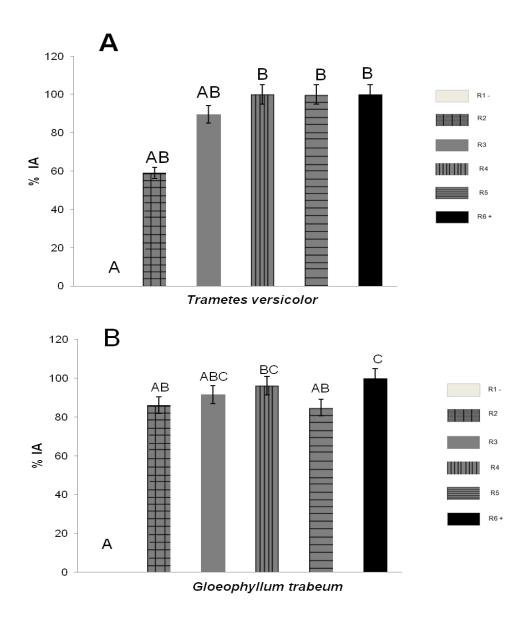
Dentre os fungos apodrecedores da madeira avaliados, *Trametes versicolor* foi o que apresentou o crescimento mais rápido *in vitro*, onde o máximo de crescimento micelial na testemunha foi atingido em cerca de cinco dias. Já no caso de *Gloeophyllum trabeum*, foi observado um crescimento mais lento, com o completo preenchimento da placa no décimo dia, o que corrobora com o descrito por Medeiros, et al. (2016).

Os testes antifúngicos realizados com o fungo de podridão-branca *T. versicolor* demonstraram que o OE, na maior concentração (R4), apresentou um IA% de 100%. A substância isolada (R5), em concentração proporcional a sua presença no extrativo, também apresentou 100% de inibição do crescimento micelial, resultados esses, comparáveis com o desempenho do propiconazole (R6) (Figura

2). A equivalência do efeito fungitóxico do OE na maior concentração e do constituinte majoritário frente a *T. versicolor* indica que, possivelmente, esse último seja a única substância fungitóxica do OE. Os tratamentos R2 e R3, com o OE nas concentrações de 0,25, e 0,50 μL mL<sup>-1</sup> respectivamente, apresentaram os valores de inibição de 59,04% - 89,59%, não diferindo significativamente dos demais tratamentos avaliados.

Os testes fungitóxicos realizados com o fungo de podridão parda G. trabeum demonstraram que as duas maiores concentrações de OE (R3 e R4) não diferiram estatisticamente do resultado apresentado pelo fungicida comercial (R6), apresentando inibições de crescimento de (R3-91,57%) (R4-96,13%) e (R6-100%). Entretanto, o constituinte majoritário isolado (R5) apresentou efeito antifúngico inferior ao do propiconazole (R6), indicando que a substância isolada contribui para o efeito fungitóxico do OE, mas não é o único componente ativo. Outro constituinte que deve estar contribuindo com o efeito observado para o OE frente a G. trabeum é o dilapiol, que representa 14,31% de sua composição química. Esse fenilpropanoide é o constituinte majoritário do OE de partes aéreas de P. gaudichaudianum, tendo sido isolado e identificado no mesmo por Schindler (2015). A mesma autora avaliou o efeito fungitóxico do dilapiol (451,2 µg/mL) frente a este fungo apodrecedor da madeira usando metodologia equivalente, e detectou atividade semelhante ao do propiconazole. Fenilpropanoides já foram relatados em OE de raízes de Piper e demonstraram atividades larvicida, antibacteriana frente a Mycobacterium tuberculosise antiplaquetária (CHEN et al., 2013, 2014; HEMATPOOR et al., 2016; LUZ et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2013; PACHECO et al., 2016). Ademais, o tratamento R2 (OE a 0,25 µL mL<sup>-1</sup>) apresentou percentual de inibição de 86,19%, não diferindo do controle negativo (R1), das duas maiores concentrações de OE (R3 e R4) e do 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (R5).

Figura 2 - Índice Antifúngico médio (IA %) e desvio padrão da média para dois *pools* de óleos essenciais de raízes de *Piper gaudichaudianum* contra (A) *Trametes versicolor* e (B) *Gloeophyllum trabeum*.



R1= controle negativo; R2= óleo essencial a 0,25  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>; R3= óleo essencial a 0,50  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>; R4= óleo essencial a 1,00  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>; R5= substância isolada a 1,00  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>; R6= propiconazole a 1,00  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>. Diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas pelo teste de Mann Whitney (p < 0,05).

A literatura apresenta apenas um relato de efeito antimicrobiano de OE obtido de raízes do gênero *Piper*. Rocha et al. (2016) relataram a ação antibacteriana do OE de *Piper caldense* C. DC. frente a cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Na comparação com os OE de outros órgãos vegetais desta mesma espécie (folhas e talos), o OE de raízes apresentou os maiores halos de inibição para quatro das cinco

cepas susceptíveis aos extrativos, e também as menores CIM (Concentrações Inibitórias Mínimas) para três destas cepas. Não foram encontradas informações que evidenciem o efeito antifúngico de OE de raízes de espécies do gênero. Todavia, estudo realizado com raízes de *Piper dilatatum* Rich. demonstrou que a espécie produz constituintes com atividade antifúngica (SANTOS et al., 2013), sugerindo o potencial do gênero para desenvolvimento de produtos com tal atividade.

Para os OE de folhas e órgãos reprodutivos da espécie vegetal em estudo, Schindler (2015) avaliou o efeito fungitóxico frente a dois fungos de podridão da madeira, *Pycnoporus sauguineus* (L.: Fr.) Murr. e *G. trabeum*, utilizando metodologia equivalente à descrita nesse trabalho. A autora também descreve uma maior susceptibilidade do fungo de podridão-branca frente aos extrativos. Em relação aos resultados obtidos por Schindler (2015) para o fungo *G. trabeum*, as duas maiores concentrações de OE (0,5 e 1,0 μg/mL) de órgãos reprodutivos e folhas não diferiram do controle positivo (propiconazole) e do constituinte isolado dilapiol, indicando um potencial fungitóxico maior para OEs obtidos de partes aéreas, em comparação aos resultados relatados no presente estudo.

No entanto, novos estudos são sugeridos a fim de avaliar a associação dos componentes majoritários de folhas, órgãos reprodutivos e raízes, numa tentativa de potencializar os efeitos fungitóxicos observados. Também são necessários estudos adicionais visando testar a atividade antifúngica de raízes contra outros microorganismos causadores de perdas no setor florestal, a exemplo dos fungos que provocam podridão nas raízes e tombamento de mudas.

#### 4 CONCLUSÃO

O OE de raízes de *Piper gaudichaudianum* e seu constituinte majoritário apresentam efeito fungitóxico *in vitro* frente aos fungos de podridão da madeira *Trametes versicolor* e *Gloeophyllum trabeum*, sendo que, no caso do OE, o efeito fungitóxico foi dependente de concentração. Dentre as espécies fúngicas utilizadas no estudo, o fungo causador da podridão-branca *T. versicolor* demonstra maior susceptibilidade à ação antifúngica das amostras testadas.

## **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois, 2009. 804 p.
- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 4, p. 550-554, 2005.
- CABANILLAS, B. J. et al. Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. **Planta Medica**, v. 78, p. 914-918, 2012.
- CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.
- 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.
- CHAUSSÊ, T. C. C. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre a vassoura de bruxa do cacaueiro. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 492-496. 2011.
- CHEN, S. et al. Three new phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their inhibitory activities on platelet aggregation and *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 792-799, 2014.
- CHEN, S. et al. Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. **Phytochemistry**, v. 93, p. 203-209, 2013.
- DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds) **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press. 1997.
- DI STASI L. C.; HIRUMA-LIMA C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo, SP: Ed. UNESP. 2002. 604 p.
- FLORES, N. et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, p. 621-627, 2009.
- FLORES, N. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1538-1543, 2008.

- HEMATPOOR, A. et al. Inhibition and larvicidal activity of phenylpropanoids from *Piper sarmentosum* on acetylcholinesterase against mosquito vectors and their binding mode of interaction. **PloS One**, v. 11, p.1-27, 2016.
- JEFFREY, C. S. et al. Antiherbivore prenylated benzoic acid derivatives from *Piper kelleyi*. **Journal of natural products**, v. 77, p. 148-153, 2014.
- KOSATA, B. BKChem, Software livre. 2009. Disponível em bkcham.zirael.org. Acesso em: 24 de agosto de 2015.
- LAGO, J. H. G. et al. Benzoic acid derivatives from *Piper* Species and their fungitoxic activity against *Cladosporiumcladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, 2004.
- LUZ, S. F. M. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the essential oil composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.). **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 9, p. 10-17, 2016.
- 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.
- MEDEIROS, F. C. M. DE et al. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, p. 87-93, 2016.
- MENDES, A. S.; ALVES, M. V. S. **Degradação da Madeira e sua Preservação.** Ministério da Agricultura Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Departamento de Pesquisa. Laboratório de Produtos Florestais. Brasília, 1988. 57 p.
- MIHARA, S. et al. Volatile components of Chinese Quince (*Pseudocydonia sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 532-537, 1987.
- 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 fitoquimicos e farmacológicos de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 82, p. 29-32. 2001.
- MORESCHI, J. C. **Biodegradação da Madeira.** Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal. Curitiba. 1980. 38 p.
- NASCIMENTO, J. C. et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). **Pest Management Science**, v. 69, p. 1267-1271, 2013.
- NIST.**NIST/EPA/NIH mass spectral library & search/analysis programs**. NIST 02 update. J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2010.

- PACHECO, F. V. et al. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251-257, 2016.
- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PARRA, J. E. et al. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper* cf. *cumanense* Kunth (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 590-592, 2013.
- 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.
- 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.
- RAPADO, L. N. et al. A benzoic acid derivative and flavokawains from *Piper* species as schistosomiasis vector controls. **Molecules**, v. 19, p. 5205-5218, 2014.
- REGIANE, B. L. et al. A new benzoic acid derivative from *Piper diospyrifolium* and its anti-Mycobacterium tuberculosis activity. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 18-23, 2015.
- ROCHA, D. S. et al. Potential antimicrobial and chemical composition of essential oils from *Piper caldense* tissues. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 60, n. 3, p. 148-151, 2016.
- SANTOS, R. A. et al. Antifungal constituents from the roots of *Piper dilatatum* Rich. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1-5, 2013.
- 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 uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste de vapor. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- SBEGHEN, A. C. **Potencialidades de utilização de óleos essenciais de plantas aromáticas para controle de** *Cryptotermes brevis*. 2001. 80 f. Dissertação (Mestrado) Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2001.
- SCHINDLER, B. Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth: rendimento, composição química e atividade fungitóxica *in vitro*. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2015.
- SILVA, R. S. et al. Óleo essencial do limão no ensino da cromatografia de camada delgada. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.

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

SOUZA JUNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 77-83, 2009.

#### **3 DISCUSSÃO GERAL**

A utilização das plantas é tão antiga quanto o aparecimento da espécie humana na terra. As primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham, em suas essências, substâncias ativas as quais, ao serem utilizados no combate às doenças, revelaram empiricamente seu poder curativo (CLEMES, ZENI, KRETZSCHMAR, 2008). A partir desse conhecimento popular ocorreu a evolução da utilização das plantas, com os novos conhecimentos que as pesquisas acadêmicas evidenciaram sobre as espécies vegetais e suas propriedades (SIMÕES et al., 1998). Além da cura das enfermidades, os recursos vegetais são importantes para diversas finalidades e o ser humano busca na natureza esses recursos para melhorar a sua própria condição de vida. A utilização das plantas como alimento sempre existiu e a esta se incorporou a busca de matéria-prima para confecção de roupas e ferramentas, além do combustível para o fogo (LORENZI, MATOS, 2008).

Nesse contexto, a biodiversidade encontrada na natureza é considerada uma fonte extremamente importante de recursos para diversas áreas como: florestal, agrícola, alimentícia, farmacêutica, industrial e medicinal. No caso da geração de novos produtos úteis aos homens e aos animais à base desses recursos, o interesse principal recai sobre os extrativos vegetais, caracterizados por moléculas de baixa massa molecular, que são geralmente produtos do metabolismo vegetal secundário. Entre eles são encontradas as substâncias biologicamente ativas presentes nos óleos essenciais. Esses componentes voláteis atuam principalmente na defesa do vegetal contra a herbivoria de pragas em culturas; atração de polinizadores e a fauna; e defesa dos vegetais contra o ataque de microrganismos (CABRAL et al., 2016; LIMA et al., 2009; STEFANELLO et al., 2006). Além dessas funções ecológicas, são importantes economicamente, por apresentarem funções biológicas na conservação de alimentos e por seus aromas. Dessa forma, o conhecimento dos constituintes químicos das plantas é importante para definir possíveis utilidades.

O Brasil é considerado um país rico em exemplares da família Piperaceae, cujos óleos essenciais de folhas apresentam diversas atividades biológicas (ALHARBI et al., 2017; LIMA et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013; SILVA, BASTOS, 2007). Com relação às funções biológicas avaliadas para raízes, como já mencionado, são descritos efeitos larvicidas e antimicrobianos. Isso salienta o

potencial dos estudos acadêmicos que tratam da avaliação de atividades biológicas para extrativos de raízes de Piperaceae, a fim de ampliar a gama de possíveis utilizações práticas dessas espécies nativas.

Uma espécie dessa família, *Piper gaudichaudianum* Kunth, destaca-se como promissora para produção de óleo essencial com diversas bioatividades. Entretanto, não existiam pesquisas sobre atividades biológicas de raízes, sua composição química e rendimento em extrativos, o que incentivou a pesquisa para avaliar esses parâmetros com relação aos OEs.

Os inúmeros organismos fitopatogênicos (agentes causais) perturbam as plantas e podem causar, através das doenças, grandes danos às culturas e plantas de um modo geral. Os pesticidas, na maioria dos casos, são constituídos de substâncias químicas, utilizadas para matar ou retardar o crescimento de pragas que danifiquem ou interfiram no crescimento de espécies alvo, desejadas pelos seres humanos. Por outro lado, produtos que contenham ingredientes derivados de vegetais e que sejam utilizados no combate a organismos fitopatogênicos são considerados biopesticidas (EL-WAKEIL, 2013). Nesse contexto, salienta-se que os extrativos vegetais são um dos principais tipos de produtos botânicos retirados e produzidos comercialmente para o controle de pragas (EL-WAKEIL, 2013; ISMAN, 2006).

Os fungos são considerados como os principais causadores de danos às culturas em todo o mundo. A madeira pode sofrer deterioração causada por diferentes agentes microbianos, como os fungos, pois é inerente ao próprio material a vulnerabilidade natural e, em vista disso, há necessidade de tratamento preservante para os produtos de origem madeireira. Surge então, em decorrência da produção de metabólitos secundários por algumas plantas, uma boa resistência natural contra organismos de biodegradação. Devido a isso inúmeras pesquisas acerca do desenvolvimento de produtos alternativos em detrimento aos preservantes sintéticos para madeira estão sendo realizadas, utilizando extrativos de plantas (CELOTO et al., 2008).

Piper gaudichaudianum Kunth destaca-se por apresentar produção de OE em suas folhas, com diferentes constituintes majoritários em sua composição e com bioatividades já comprovadas (MORAIS et al., 2007; MOREIRA et al., 2001; PUHL et al., 2011). Entretanto, esse trabalho relata pela primeira vez dados de rendimento e composição química para extrativos de raízes dessa espécie, mas especificamente

para o OE. Também foram realizados testes visando analisar o potencial antifúngico do OE e de seu constituinte majoritário, o derivado do ácido benzoico 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila. Desta forma, buscou-se descobrir novas finalidades para esse produto botânico, considerando também que folhas coletadas da mesma população e avaliadas por Schindler, et al. (2015) mostraram potencial para o controle de fungos apodrecedores da madeira.

Os resultados obtidos no manuscrito 2 sugerem a possibilidade do óleo essencial e a substância majoritária desse extrativo serem utilizadas futuramente como substâncias ativas de um fungicida botânico para o controle de *T. versicolor*. No entanto, para tal ideia ser consolidada, são necessárias novas pesquisas envolvendo a produção de mudas de *P. gaudichaudianum*; a otimização da obtenção desse extrativo utilizando estratégias modernas de extração; e/ ou a verificação da possibilidade da obtenção do OE através de processos biotecnológicos, assim como a descrição anatômica das raízes de *P. gaudichaudianum*, entre outros.

Outro fator a ser a ser avaliado para que o OE venha ser utilizado como biopesticida, além de conhecer o seu potencial, é descobrir qual o período mais adequado para sua colheita, uma vez que a sazonalidade é um dos fatores que exercem influência sobre as características dos extrativos voláteis, além do plantio, secagem, armazenamento e beneficiamento (MELO, RADÜNZ, MELO, 2004; STREMEL, GRANDI, STREMEL, 2016). Além disso, o método de extração também exerce influência na qualidade e rendimento do extrativo (COSTA et al., 2006). Nesse trabalho foi utilizada a hidrodestilação, para obtenção do OE em escala laboratorial. Quando a meta for a produção de OE, uma série de fatores deverá ser considerada, pois esses interferem na presença, rendimento e composição química do OE nos vegetais. Aspectos de origem genética e os inerentes a planta, como período vegetativo e órgão vegetal podem afetar as características do OE. O rendimento e composição química também podem sofrer influência de fatores ambientais e edáficos (BERNUCI et al., 2016; GLOBBO-NETO, LOPES, 2007; PÉRES et al., 2009).

Algumas dessas possíveis influências são relatadas no manuscrito 1, onde os rendimentos do OE de raízes dos exemplares amostrados, para a população de *P. gaudichaudianum* em Santa Maria, não apresentaram diferença significativa nos quatro períodos de coleta. Além disso, observou-se uma influência sazonal na

composição química, através das análises por ACP e AHC, verificando-se que o constituinte majoritário não foi prioritário na formação dos agrupamentos. Sendo assim, para obtenção de OE, sugere-se que a coleta pode ocorrer em todas as estações.

Diferentes órgãos vegetais selecionados a partir de uma determinada planta para extração de OE podem exibir um perfil químico exclusivo (CROCKETT, 2010). Este fato foi verificado por uma pesquisa realizada por Kakhky et al. (2013), na qual os constituintes principais do OE das folhas e flores de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) foram α- e β-pineno e α- e β-selineno, enquanto o constituinte majoritário extraído de caule e raízes foi o germacreno D. Comportamento semelhante ficou evidenciado para a população de *P. gaudichaudianum* alvo desse trabalho. Schindler et al., (2017 a e b), avaliaram rendimento e composição química dos OEs de folhas e órgãos reprodutivos e o componente majoritário foi o fenilpropanoide dilapiol (SCHINDLER et al., 2017 b), enquanto que, para raízes dessa mesma população, o constituinte majoritário foi derivado do ácido benzoico 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila.

Os óleos essenciais de raízes obtidos de exemplares de outras espécies do gênero *Piper*, como mencionado anteriormente, apresentaram variabilidade em seu rendimento e composição química principal (ARAMBEWELA, KUMARATUNGA, DIAS, 2005; HU et al., 1996; LUZ et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2013; PACHECO et al., 2016; PIMENTEL et al., 2012; ROCHA et al., 2016; TRINDADE et al., 2010; VARUGHESE et al., 2016). Portanto, esses resultados consolidam mais uma vez a informação de que a composição química majoritária e o rendimento apresentam variabilidade entre as espécies, para o gênero em destaque.

Inúmeras pesquisas são necessárias para avaliar as implicações da variabilidade fitoquímica multidimensional (em nível de subespécie, população, planta, tecido e mesmo nível celular), para assim dimensionar a importância que a constituição química do óleo essencial tem sobre a formação dos vegetais, adicionalmente devem ser investidos esforços no desenvolvimento de programas de melhoramento genético direcionado para espécies com potencial para biossintetizar componentes medicinais e economicamente valiosos (CROCKETT, 2010). Salientase que existe até o momento a descrição de produtos comercializados que utilizam o arbusto *Piper methysticum*, nativo das Ilhas do Pacífico, na área farmacêutica como fitoterápico ansiolítico. Por outro lado, no Brasil existem muitas espécies de *Piper* 

que não foram analisadas, com potencial para a geração de produtos comerciais, como é o caso de *P. gaudichaudianum*.

Entretanto deve-se observar que houve baixo rendimento do extrativo volátil na espécie alvo e para o órgão vegetal utilizado nesse estudo, para isso devem ser consideradas algumas estratégias descritas para otimizar o processo de extração e assim aumentar o rendimento em OE. Um dos aspectos a serem considerados é o método de obtenção do extrativo. Para isso, técnicas promissoras de extração podem ser utilizadas para atingir esse objetivo, que englobam desde a secagem e fragmentação do material vegetal e posterior hidrodestilação (SANTANA et al., 2014), bem como processos de extração com solvente orgânico em aparelho de Soxhlet (COSTA et al., 2006; MACIEL, PINTO, VEIGA JR, 2002;). O último método de extração citado possibilitou a obtenção de um rendimento médio de extrativo de 12%, a partir de raízes de *Vetiveria zizanioidesi* utilizando como solvente o etanol, resultado superior as outras técnicas utilizadas (COSTA et al., 2006).

Por outro lado, o pré-tratamento enzimático pode colaborar com a obtenção de resultados satisfatórios, como foi descrito para sementes de *Elettaria cardamomum*. Neste caso, um preparado comercial contendo uma mistura de enzimas aumentou em 16% a produção de óleo essencial, em comparação ao controle, sem afetar as características físico-químicas do óleo. Assim, o pré-tratamento enzimático pode ser utilizado para a obtenção de extrativos voláteis com a melhoria da qualidade e rendimento. Esse estudo também mostrou que as enzimas agem na estrutura da da parede da célula da planta, expondo assim as glândulas produtoras desse extrativo, colaborando para aumentar a permeabilidade no momento da destilação, o que resulta em um rendimento mais elevado de óleo essencial (BABY, RANGANATHAN, 2016).

Adicionalmente, técnicas ultrassônicas também podem ser utilizadas como estratégia para ampliar rendimento de OE, independente do órgão vegetal a ser extraído, utilizando diferentes solventes para a extração (TOMA et al., 2001). Além disso, podem ser testadas para raízes de *P. gaudichaudianum* técnicas de processamento de produtos naturais evitam ou minimizam os danos ao meio ambiente e que são consideradas como tecnologias limpas (COSTA et al., 2006). Como ex. pode ser citada a extração por CO<sub>2</sub> supercrítico, que recupera aromas naturais de vários tipos de um modo eficiente, e não somente o óleo volátil. Além disso, esse método é considerado não poluente, por utilizar o dióxido de carbono

(MAUL, WASICHY, BACCHI, 1996). A literatura relata que um aumento do rendimento de OE foi verificado para raízes secas em temperatura ambiente de vetiver, *V. zizanioidesi*, quando a extração ocorreu por fluído supercrítico. No último caso, o rendimento médio foi de 2,4%, enquanto que para a hidrodestilação foi de 1,4%.

Salienta-se a importância de testar outros procedimentos de extração do óleo essencial para raízes de *P. gaudichaudianum*, uma vez que o mesmo apresentou bioatividades promissoras frente a fungos apodrecedores da madeira. Além disso, surge a possibilidade da descoberta de outras aplicações, que poderão ser avaliadas caso o rendimento do OE consiga ser otimizado.

# **4 CONCLUSÕES GERAIS**

- Os rendimentos médios encontrados para o OE de raízes frescas de *Piper* gaudichaudianum Kunth não demonstram diferença significativa entre as quatro estações.
- A composição química do óleo essencial da espécie vegetal em estudo indicou influência sazonal, tendo sido detectadas variações das estações primavera e verão para outono e inverno. O derivado do ácido benzóico 4-(3hidroxi-3-metil-butenil)-benzoato de metila foi o componente majoritário encontrado em todo o período avaliado.
- Os resultados referentes à composição química e rendimento permitem sugerir qualquer época do ano para a coleta de raízes frescas visando à produção de OE de *P. gaudichaudianum*.
- Os OEs de raízes frescas apresentam ação fungitóxica *in vitro* frente aos fungos apodrecedores da madeira *Trametes versicolor* e *Gloeophyllum trabeum*, sendo a bioatividade evidenciada nas concentrações de 0,25 a 1,0 µL mL<sup>-1</sup>. O fungo causador da podridão-branca *T. versicolor* mostrou maior susceptibilidade à ação antifúngica das amostras testadas.
- O constituinte majoritário isolado, 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila demonstrou ser a substância responsável pela ação fungitóxica para o fungo *T. versicolor*, em virtude de sua ação ser semelhante à dos óleos essenciais quando testado isoladamente. No caso de *G. trabeum*, o constituinte majoritário parece ser o maior responsável pela atividade detectada, atuando em associação com outros componentes do OE.

#### **REFERÊNCIAS**

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois, 2009. 804 p.
- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 4, p. 550-554, 2005.
- ALHARBI, N. S. et al. Effects of *Piper cubeba* L. essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an AFM and TEM study. **Journal Molecular Recognition**, v. 30, p. 1-8, 2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <a href="https://www.anvisa.gov.br">www.anvisa.gov.br</a>. Acesso em: 23 março de 2017.
- 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.
- ARAMBEWELA, L.; KUMARATUNGA, K. G. A.; DIAS, K. Studies on *Piper betle* of Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 33, p. 133-139, 2005.
- BABY, K. C.; RANGANATHAN, T. V. Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton.) volatile oil. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 200-206, 2016.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa e* outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 441-443, 1997.
- BARDELLI, K. C. et al. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 553-561, 2008.
- BERNUCI, K. Z. et al. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, v. 12, p. 1-12, 2016.
- 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.
- BOEGER, M. R. T. et al. Estrutura foliar de seis espécies do sub-bosque de um remanescente de Floresta Ombrófila Mista. **Hoehnea**, v. 33, n. 4, p. 521-531, 2006.
- BRUSSA, C. A. *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae), primer registro para la flora del Uruguay. **Agrociência Uruguay**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2016.

- CABRAL, T. C. et al. Uso de óleo volátil de *Piper amalago* L. na atração de morcegos frugívoros. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 3, p. 949-955, 2016.
- CARVALHO, R. M. M. A.; SOARES, T. S.; VALVERDE, S. R. Caracterização do setor florestal: uma abordagem comparativa com outros setores da economia. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 1, p. 105-118, 2005.
- CASTELO, A. V. M. et al. Rendimento e análises espectroscópicas (rmn¹h,¹³c; iv) da composição química dos óleos essenciais de quatro plantas do cerrado. **Revista Cerne**, v. 16, n. 4, p. 573-584, 2010.
- CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 1-5, 2008.
- 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.
- CLEMES, S. de M.; ZENI, A. L. B.; KRETZSCHMAR, M. Avaliação química de folhas de plantas medicinais nativas utilizadas no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí (PNSI). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 1, p. 10-12, 2008.
- COSTA, T. S. et al. Avaliação da extração de óleo essencial de Vetiver (*Vetiveria zizanioides*) com CO<sub>2</sub> Supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4, p. 100-103, 2006.
- CROCKETT, S. L. Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). **Natural Product Communications**, v. 5, n. 9, p. 1493-1506, 2010.
- DI STASI L. C.; HIRUMA-LIMA C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo, SP: Ed. UNESP. 2002. 604 p.
- ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 217-222, 2006.
- EL-WAKEIL, N. E. Botanical pesticides and their mode of action. **Gesunde Pflanzen**, v. 65, p. 125-149, 2013.
- 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. 263-278, 2008.
- FISCHER, A. O fomento na indústria de base florestal. **Informe GEPEC**. v. 13, n. 2, p. 6-19, 2009.

- FRODIN, D. G. History and concepts of big plant genera. **Taxon**, v. 53, n. 3, p. 753-776, 2004.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.
- 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/jabot/floradobrasil/FB12780 Acesso em: 30 de janeiro de 2017.
- GUIMARÄES, E. F.; Monteiro, D. Piperaceae da Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, p. 567-587, 2006.
- GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. Piperáceas *Piper.* Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Santa Catarina. 2001, 104 p.
- HU, S. L. et al. Pharmacognostical studies on the roots of *Piper nigum* L. III: Determination of essential oil and piperine. **Acta Horticulturae**, n. 426, p.179-182, 1996.
- ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v.51, p. 45-66, 2006.
- KAKHKY, A. M. et al. Chemical composition of the essential oils from flowers, leaves, stems and roots of *Hypericum perforatum* L. from Iran. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 11, n. 5, p. 548-552, 2008.
- LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (*Lepidoptera*: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 377-382, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 544p
- LUZ, S. F. M. et al. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the essential oil composition and antioxidant activity of black pepper (*Piper nigrum* L.). **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 9, p. 10-17, 2016.
- 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.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MARDIA, K. V.; KENT, J. T.; BIBBY, J. M. **Multivariate analysis**, pp. 213-244, pp. 360-384, 1994

- MAUL, A. A.; WASICHY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 185-200, 1996.
- MELO, E. C.; RADÜNZ, L. L.; MELO, R. C. A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais Revisão. **Engenharia na Agricultura**, v. 12, n. 4, p. 307-315, 2004.
- MENDES, A. S.; ALVES, M. V. S. **Degradação da Madeira e sua Preservação.** Ministério da Agricultura Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Departamento de Pesquisa. Laboratório de Produtos Florestais. Brasília, 1988. 57 p.
- 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 fitoquimicos e farmacológicos de *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 82, p. 29-32. 2001.
- MORESCHI, J. C. **Biodegradação da Madeira.** Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal. Curitiba, 1980. 38 p.
- NASCIMENTO, J. C. et al. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). **Pest Management Science**, v. 69, p. 1267-1271, 2013.
- NIST.**NIST/EPA/NIH** mass spectral library & search/analysis programs. NIST 02 update. J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2010.
- PACHECO, F. V. et al. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251-257, 2016.
- PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PARMAR, V. S. Polyphenols and alkaloids from piper species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1069-1078, 1998.
- 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.
- PIMENTEL, F. A. et al. Influência da secagem sobre o rendimento e composição química dos compostos voláteis das raízes de *Piper piscatorum* Trel. & Yunck. (Piperaceae). **Quimica Nova**, v. 35, p. 715-718, 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.
- ROCHA, D. S. et al. Potential antimicrobial and chemical composition of essential oils from *Piper caldense* tissues. **Journal of Mexican Chemical Society**, v. 60, n. 3, p. 148-151, 2016.
- RODRIGUEZ, L. C. E. Monitoramento de florestas plantadas no Brasil: indicadores sociais e econômicos. 31. ed. São Paulo: ESALQ/USP, 1998. 12 v. p. 23-32 (SÉRIE TÉCNICA IPEF).
- SANTANA, A. C. M. et al. Rupture of glandular trichomes in *Ocimum gratissimum* leaves influences the content of essential oil during the drying method. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 24, p. 524-530, 2014.
- SANTOS, A. J. et al. Produtos não madeireiros: conceituação, classificação, valoração e mercados. **Revista floresta**, v. 33, n.2, p. 215-224, 2003.
- SANTOS, S. I. Biossíntese dos metabólitos vegetais secundários. 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**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRGS/UFSC, 2007. 1102 p.
- SARTOR, R. B. Modelagem, simulação e otimização de uma unidade industrial de extração de óleos essenciais por arraste de vapor. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- SCHINDLER, B. Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth: rendimento, composição química e atividade fungitóxica *in vitro*. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2015.
- SCHINDLER, B.; SILVA, D. T.; HEINZMANN, B. M. Efeito da sazonalidade sobre o rendimento do óleo essencial de *Piper gaudihaudianum* Kunth. **Ciência Florestal** (UFSM. Aceito), 2017.
- SCHINDLER, B.; HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: seasonal characterization of the essential oil chemical composition of leaves and reproductive organs. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (aceito) 2017.
- SILVA, R. S. et al. Óleo essencial do limão no ensino da cromatografia de camada delgada. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2234-2237, 2009.
- SILVA, D. M. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32 n. 2, p. 143-145, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. 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**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2007. 1102 p.

SIMÕES, et al. **Plantas na medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5 ed. Porto Alegre: Ed Universidade/UFRGS, 1998. 173p.

SOBRAL, M. et al. Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2013. 357 p.

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. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 3, p. 216-223, 2013.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (Less) Cabr. ssp *floccosa* Cabr. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 999-1002, 2006.

STREMEL, E. P.; GRANDI, A. M.; STREMEL, D. P. Cultivo de plantas medicinais na agricultura familiar: um estudo de caso. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 9-24, 2016.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 2, p. 137-142, 2001.

TRES, D. R.; REIS, A.; SCHLINDWEIN, S. L. A construção de cenários da relação homem-natureza sob uma perspectiva sistêmica para o estudo da paisagem em fazendas produtoras de madeira no planalto norte catarinense. **Ambiente & Sociedade**, v.14, n.1, p. 151-173, 2011.

TRINDADE, A. P. F. et al. Essential oil from organs of *Piper truncatum* Vell. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 200-202, 2010.

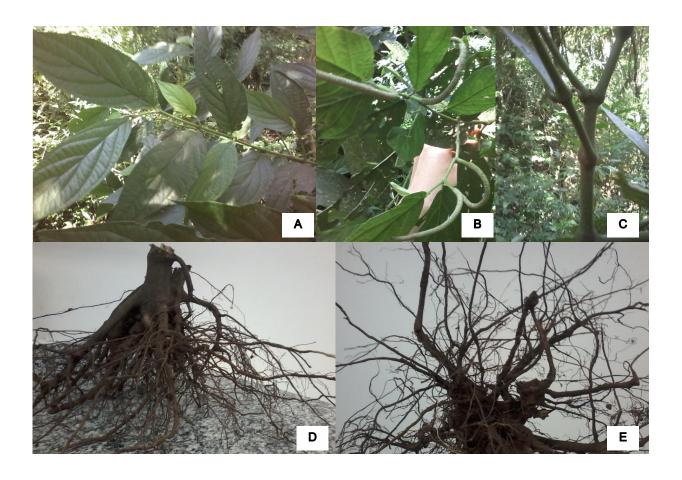
VARUGHESE, T. et al. Chemical Composition of the essential oils from stem, root, fruit and leaf of *Piper longum* Linn. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 19, p. 52-58, 2016.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil. *Piper*, Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, v. 2, p. 19-366, 1972.

YOON, MI-YOUNG.; CHA, B.; KIM, JIN-CHEOL. Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. **Plant Pathology Journal**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2013.

### **APÊNDICES**

# APÊNDICE A DETALHES ILUSTRATIVOS DA ESPÉCIE Piper gaudichaudianum Kunth



Legenda - A: detalhe das folhas da espécie *Piper gaudichaudianum* Kunth; B: inflorescências; C: entrenós do caule/ramos; D: detalhe frontal e superior da raiz, após o processo de lavagem; E: detalhe da parte inferior da raiz, coletada no sub-bosque da floresta em Santa Maria, RS.

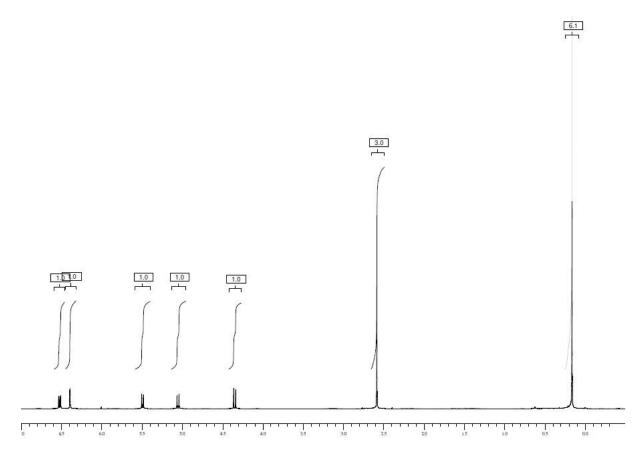
**APÊNCICE B** DISTRIBUIÇÃO FITOGEOGRÁFICA DE Piper gaudichaudianum Kunth NO BRASIL



Legenda: Regiões Sul (azul); Norte (verde); Nordeste (laranja); Centro-oeste (amarelo); Sudeste

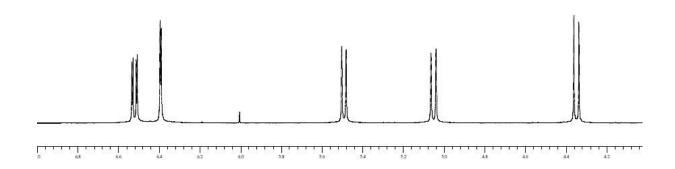
(vermelho); Fonte: Guimarães et al., 2017

APÊNDICE C
ESPECTRO <sup>1</sup>H-RMN DO DERIVADO DO ÁCIDO BENZOICO 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (400 MHz)

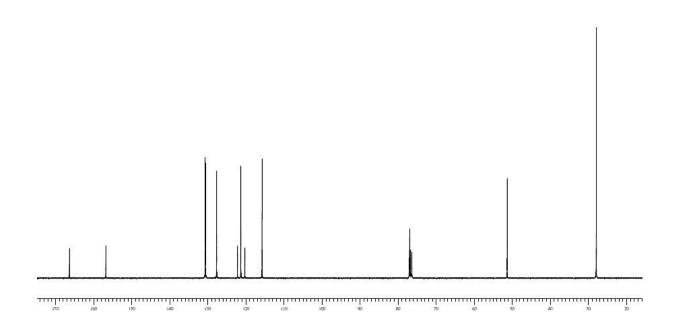


APÊNDICE D

AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DO 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)benzoato de metila (400 MHz)



APÊNDICE E
ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup>C DO 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (100 MHz)



#### **APÊNDICE F**

## ESPECTRO DO RMN <sup>13</sup>C-DEPT DO 4-(3-hidroxi-3-metil-1-butenil)-benzoato de metila (100 MHz)

