FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

VARIABILIDADE QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *Piper obliquum* Ruiz & Pav. DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA CUNIÃ, PORTO VELHO-RO

JUSSARA ROJAS E SILVA AIZZO

Porto Velho
2013

JUSSARA ROJAS E SILVA AIZZO

Variabilidade Química do Óleo Essencial da *Piper obliquum* Ruiz & Pav. da Estação Ecológica Cuniã, Porto Velho-RO

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Fundação Universidade Federal de Rondônia, Área de concentração em ambiente, Saúde e Sustentabilidade para obtenção de Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.
Área específica: Química de Produtos Naturais.

Orientadora: Prof. Drª. Mariangela Soares de Azevedo

Porto Velho

2013

JUSSARA ROJAS E SILVA AIZZO

Variabilidade Química do Óleo Essencial da *Piper obliquum* Ruiz & Pav. da Estação Ecológica Cuniã, Porto Velho-RO

Porto Velho, 19 de dezembro de 2013.

Resultado: _____

Banca Examinadora

_____

Drª. Mariangela Soares de Azevedo (UNIR) – Orientadora.

_____

Dr. Angelo Gilberto Manzatto (UNIR) – Membro da banca.

_____

Drª. Hilda Paes Gonçalves – Membro da banca.

_____

Dr.Wanderley Rodrigues Bastos (UNIR) – Suplente.

Ao meu esposo
Clodoaldo José Aizzo.

Por seu auxílio
em vários momentos
dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me proporcionou estar em contato com a diversidade de plantas da nossa região amazônica, por ter colocado em meu caminho pessoas que contribuíram com a minha formação, não apenas intelectual, mas, como pessoa que valoriza, ama e respeita a natureza, tão complexa e misteriosa.

Em especial ao meu esposo Clodoaldo José Aizzo, que se mostrou desprendido e apaixonado por este projeto (e por mim...) mais do que eu esperava, com uma participação essencial para a execução deste trabalho.

A minha família, que mesmo nas horas de dificuldade se mantém unida em seus sonhos e em suas realidades, que desta forma me faz fortalecer nos momentos de fraqueza e desânimo. Aos meus pais Ernani Gonçalves da Silva e Joana Manoela Rojas, por todas as oportunidades que me concederam. Aos meus irmãos: Enio, que me apoiou desde a inscrição do projeto do Mestrado, ao auxílio em campo, como fotógrafo. Ao Eleasar, Jacqueline, Janice pelo apoio moral, que me faz forte para a busca da realização dos meus objetivos. A Raniele pelas descontrações. Aos meus sobrinhos Eleoran, Jeiél, Víctor Gabriel e Julia Gabriely pelos momentos de brincadeiras e inocência. À Ana Vitória, que veio para confirmar que fiquei para "titia coruja" e a Bibi minha eterna princesa.

A Day, pelo auxílio desde a construção do projeto de mestrado, pelas discussões dos artigos para a seleção do PGDRA, e a Vivi e demais colegas pela amizade compartilhada. Não posso deixar de prestar meus agradecimentos à pesquisadora Adeilza Felipe Sampaio, por ter me apresentado *Piper obliquum*, além de todo apoio em campo. A Drª Rubiani de Cássia Pagotto por ter me introduzido no "mundo das piperáceas". Ao professor Dr. Angelo Gilberto Manzatto, por todo auxílio fornecido no decorrer deste trabalho.

A minha orientadora e companheira desta jornada Drª Mariangela Soares de Azevedo, pela oportunidade da realização deste projeto, pela amizade, atenção e transmissão de conhecimento. Ao Dr.prof. Adair Roberto Soares dos Santos por intermediar na identificação dos compostos químicos e ao Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, Dalila Venzke e Juliana Bastos pelas análises do óleo essencial. Ao Herbário Rondoniensis e ao Herbário do Instituto Jardim Botânico do Rio do Janeiro, representado pelo professor Ms.Narcísio Costa Bigio e pela especialista Dr. Elsie Franklin Guimarães, respectivamente, pela identificação botânica. A todos do LABFITO: Hilda, Carol, Valéria, Rafa, Carla, Betânia, Ziza e Chico, por todos os momentos compartilhados.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Rondônia, principalmente a Dona Izabel e os docentes do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, que ampliaram minha visão na pesquisa. Aos colegas de turma, que contribuíram para a minha formação acadêmica. A banca, que aceitou contribuir com suas sugestões e oferecer uma oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Ao PPBio, CNPQ e a Capes pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o sucesso desta pesquisa. Agradeço de ...

RESUMO

A sazonalidade é um dos fatores que influenciam no metabolismo secundário das plantas, afetando assim a composição dos óleos essenciais. Há poucos estudos de variabilidade química sazonal para a região tropical. Um dos grupos mais promissores para estudos fitoquímicos são pertencentes a família Piperaceae, tanto pela sua importância ecológica, como econômica. A espécie *Piper obliquum* Ruiz & Pav., é classificada dentro do gênero Piper, que possui cerca de 500 espécies. Esta espécie é denominada pelos índios Yanomani de Papiu como *xama=hanaki*. Há poucos estudos fitoquímicos da espécie, as pesquisas sobre óleo essencial é de espécimes do Panamá, Costa Rica e Equador. Para verificar a variabilidade química do óleo essencial desta piperácea, presente na área de estudo da Estação Ecológica Cuniã, Porto Velho, Rondônia, foi realizada a análise do óleo essencial em cinco períodos durante um ano, abrangendo os meses de outubro, novembro de 2011 e fevereiro, maio e agosto de 2012. A extração do óleo essencial foi realizada por meio da hidrodestilação e análise do material foi através de cromatografia a gás associada à espectrometria de massas. Foram identificadas 43 substâncias. Todos os componentes determinados nas quatro primeiras coletas são da classe dos terpenos, e o último período analisado apresentou um fenilpropanóide. Os três compostos com maior teor foram α -pineno, canfeno e β-pineno. Foram realizadas análises de agrupamento hierárquico, os resultados apresentaram a formação de grupos distintos para os óleos obtidos nos meses de outubro, novembro e agosto para os períodos de fevereiro e maio. O período compreendido entre fevereiro e maio foi o de maior concentração dos três componentes majoritários; o limoneno, que apresentou de médio a alto teor, exibiu menor concentração nestes períodos. A coleta do mês de agosto foi a que apresentou maior quantidade de substâncias. Espécimes coletados no Panamá, Costa Rica e Equador divergem em relação aos constituintes do óleo essencial de *P. obliquum* coletada na ESEC-Cuniã (MUNDINA et al, 1998; MAYER et al, 2008; GUERRINI et al, 2009). Através da Análise de Correspondência Múltipla (ACM) e Análise de Componentes Principais (ACP) verificou-se que alguns constituintes não apresentaram variações significativas, porém muitas substâncias demonstraram correlação positiva em concernente ao período coletado. A maioria dos compostos apresentou baixa composição independente do período coletado. A variação química observada dos espécimes obtidos nos diferentes meses corrobora com a influência do ambiente na variação dos componentes do metabolismo secundário dos vegetais.

Palavras-chaves: Piperaceae, *Piper obliquum*, variação sazonal, óleo essencial, terpenos.

ABSTRACT

The seasonality is one of the factors influencing the secondary metabolism of plants, thus affecting the composition of the essential oils. There are few studies of chemical seasonal variability for the tropical region. One of the most promising groups to phytochemical studies are belonging to the Piperaceae family, both for its ecological importance as economic. The species *Piper obliquum* Ruiz & Pav., Is classified within the genus Piper, which has about 500 species. This species is named for the Yanomami Indians of Papiu as *shaman* = *Hanaki*. There are few phytochemical studies of the species, research on essential oil is of specimens from Panama, Costa Rica and Ecuador. To check the chemical variability of the essential oil of this piperácea present in the study area, Porto Velho, Rondônia Estação Ecologica Cuniã, the analysis of the essential oil was performed in five periods in a year , covering the months of October, November 2011 and February, May and August 2012. The essential oil extraction was performed by hydrodistillation and the material was analyzed by chromatography linked to mass spectrometry gas. Were identified 43 compounds. All components determined in the first four collections are the class of terpenes, and the last reporting period presented a phenylpropanoid. The three compounds with higher levels were α-pinene, β-pinene and camphene. Hierarchical clustering analyzes were performed, the results showed the formation of distinct groups for the oils obtained in the months of October, November and August for the periods of February and May. The period between February and May was the highest concentration of the three major components; limonene, which showed medium to high levels, showed lower concentrations in these periods. The collection of August showed the highest amount of substances. Specimens collected in Panama, Costa Rica and Ecuador differ in relation to the constituents of the essential oil of *P. obliquum* collected in ESEC - Cuniã (MUNDINA et al, 1998; MAYER et al, 2008; GUERRINI et al, 2009) Through the Multiple Correspondence Analysis (MCA) and Principal Component Analysis (PCA) showed that some components does not change significantly, but many substances showed positive correlation concerning the period collected . Most of the compounds showed low regardless of the period composition collected. The chemical variation observed in specimens obtained in different months corroborates the influence of the environment on the variation of the components of the secondary metabolism of plants.

Keywords: Piperaceae, *Piper obliquum*, seasonal variation, essential oil, terpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1: Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários nas plantas e suas inter-relações com o metabolismo primário.....16

Desenho 1: Desenho esquemático de estruturas armazenadoras dos óleos essenciais: bolsas secretoras, tricomas e células parenquimáticas.....18

Desenho 2: Principais fatores de influência nos metabólitos secundários em plantas.....20

Mapa 1: Distribuição geográfica do gênero *Piper*. Números estimados para a diversidade do grupo.....22

Foto 1: *Piper obliquum* localizada na ESEC-Cuniã.....24

Mapa 2: Estação Ecológica do Cuniã. Em destaque área de estudo (PPBio) e ponto de amostragem (círculo vermelho).....28

Foto 2: Instrumentos utilizados na extração do óleo essencial de *P. obliquum*.....29

Gráfico 1: Porcentagem de substâncias considerando a classe química.....36

Gráfico 2: Concentração dos compostos considerando a classe química.....36

Gráfico 3: Concentração dos compostos considerando a classe química.....37

Gráfico 4: Concentração dos compostos considerando a classe química.....37

Gráfico 5: Concentração dos compostos considerando a classe química.....38

Gráfico 6: Concentração dos compostos considerando a classe química.....38

Dendograma 1: Resultado da classificação por (CAH).....43

Gráfico 7: Análise Classificatória e de Componentes Principais para os componentes característicos do óleo volátil foliar de *P. obliquum* em função do período coletado. Significados das abreviaturas no Apêndice A.....46

Gráfico 8: Resultado gerado através da ACM, com dados de substâncias.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Transformação de categorias qualitativas para quantitativas (VALENTIN, 2000)..31
Tabela 2: Composição química do óleo essencial da *P. obliquum*: Monoterpenos.....33
Tabela 3: Composição química do óleo essencial da *P. obliquum*: Sesquiterpenos.....34
Tabela 4: Composição química do óleo essencial da *P. obliquum*: Fenilpropanóide.....34
Tabela 5: Composição química do óleo essencial de *P. obliquum*: substâncias em comum....42
Tabela 6: Resultado da matriz de proximidade (distância de Bray e Curtis), aplicada para as 5 unidades amostrais de *P.obliquum* usando dados de teor das substâncias.....44
Tabela 7: Estatística descritiva, aplicada para as 5 unidades amostrais de *P.obliquum* usando dados de teor das substâncias.....44
Tabela 8: Resultados da Análise de componentes principais (ACP) com os autovalores e variância explicadas para os 3 primeiros eixos.....46
Tabela 9: Resultado da ACP para as cargas fatoriais das três componentes.....47

LISTA DE SIGLAS

ACM- Análise de Correspondência Múltipla.

ACP- Análise de Componentes Principais.

CAH- Análise Hierárquica de Agrupamento.

CG- Cromatografia Gasosa.

CG-MS- Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa.

ESEC-Cuniã- Estação Ecológica Cuniã.

FLONA- Floresta Nacional.

CICJ- Gestão Integrada Cuniã-Jacundá.

IR- Índice de Retenção.

LABFITO- Laboratório de Fitoquímica.

PELD- Pesquisa Ecológica de Longa Duração.

PPBIO- Programa de Pesquisa em Biodiversidade.

RB- Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

RESEX-Cuniã- Reserva Extrativista Cuniã.

RON- Herbário Rondoniensis.

TR- Tempo de Retenção.

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE A-Dados da Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.....60

APÊNDICE B - Estruturas Químicas do Óleo Essencial.....61

APÊNDICE-C- Cromatogramas do óleo essencial de *P.obliquum* analisado por CG e CG-MS.....63

APÊNDICE D- Variação dos compostos do Óleo Essencial de *P.obliquum* segundo a classe de substâncias.....67

APÊNDICE E- Variação da Composição Química do Óleo Essencial de *P.obliquum*.....68

APÊNDICE F- Fotos da ESEC-Cuniã em alguns períodos de coleta.....69

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....16
1.1 Metabólitos Secundários.....16
1.2 Considerações sobre o Gênero *Piper* L. e *Piper obliquum* Ruiz & Pav......22
2 OBJETIVOS.....26
2.1 Objetivo geral.....26
2.2 Objetivos Específicos.....26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....27
3.1 Área de Estudo e Amostragem.....28
3.2 Extração e Análise do Óleo Essencial.....29
3.3 Análises dos Dados.....30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....32
4.1 Perfil Aromático do Óleo Essencial de *P.obliquum* Ruiz & Pav......32
4.2 Relação entre Amostra, Concentração e Substância.....42
5 CONCLUSÃO.....51
REFERÊNCIAS.....52
APÊNDICE.....59

INTRODUÇÃO

A espécie *Piper obliquum* Ruiz & Pavon é um dos componentes da floresta amazônica, esta possui cerca de sessenta mil espécies com 10 mil com princípios ativos (BRASIL, 2008). A grande diversidade vegetal estimulou uma busca por plantas aromáticas que pudessem contribuir para conservação e o desenvolvimento regional. A análise de 12 famílias de plantas aromáticas da região Amazônica, realizada por Maia & Andrade (2009), demonstrou que a Piperaceae é a família mais promissora por ser rica em substâncias de valor comercial.

Os óleos vegetais por serem ricos em substâncias ativas são matéria prima medicinal e cosmética da indústria fitoquímica, contribuindo desta forma com a renda de várias comunidades da região amazônica, porém as espécies ricas em óleos essenciais são exploradas sem consideração das características ambientais e biológicas. Os resultados obtidos dos estudos com plantas podem representar o uso seguro e sustentável das riquezas naturais (YUNCKER, 1972).

A compreensão de aspectos biológicos e ecológicos dos espécimes florestais tropicais é necessária, pois a maior parte dos estudos está focada em espécies de interesse comercial de países de clima temperado. O conhecimento da influência de fatores ambientais na variação das substâncias químicas dos óleos essenciais é um dos aspectos biológicos necessários para a exploração comercial sustentável (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Os estudos fitoquímicos sobre uma determinada planta pode indicar os metabólitos secundários interessantes da espécie (FALKENBERG et al, 2004). As substâncias provenientes do metabolismo secundário presentes no óleo essencial da espécie *P. obliquum* Ruiz & Pav., foi alvo de três pesquisas sendo no Panamá (MUNDINA et al, 1998), Costa Rica (MAYER et al, 2008) e Equador (GUERRINI et al, 2009), os compostos majoritários foram divergentes e nenhum dos espécimes pesquisados tiveram a sua avaliação sazonal.

A pesquisa de plantas coletadas em ambientes naturais, com pouco impacto humano, como a Estação Ecológica Cuniã (ESEC-CUNIÃ), abrangendo diversos períodos do ano é importante para se conhecer a dinâmica natural da espécie, além de contribuir com alternativas econômicas, para as populações carentes, auxiliando na construção de um modelo de ocupação sustentável.

O estudo da espécie *P. obliquum*, provém da oportunidade de esclarecer que a exploração responsável é possível, pela valorização dos recursos disponíveis e a extração de

óleo essencial das folhas pode ser uma das opções de renda para as populações rurais, quando executada de forma coerente, pois é utilizada parte renovável do vegetal.

A análise química dos compostos presentes no óleo essencial de *P. obliquum* coletada em Rondônia, demonstra as substâncias de interesse comercial e o melhor período de coleta, para espécimes que estejam localizados em ambientes com características semelhantes ao do presente estudo, além de corroborar com a necessidade da conservação de espécimes florestais.

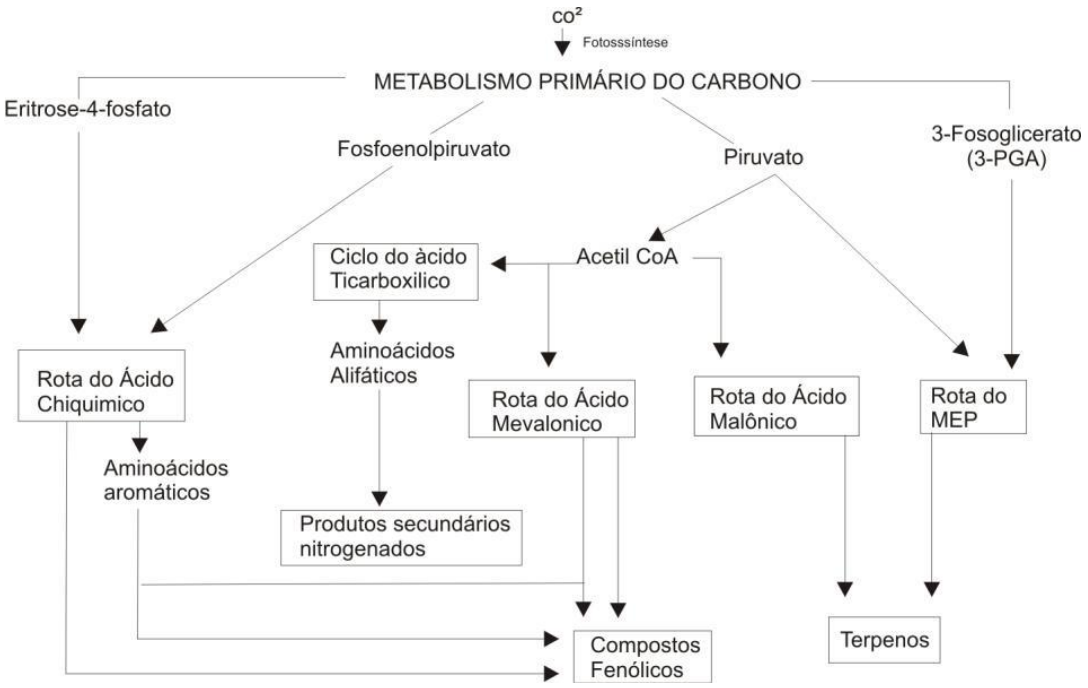
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Metabólitos Secundários

Nas atividades essenciais dos seres vivos, como nascimento, crescimento, reprodução, envelhecimento e morte, estão envolvidas complexas reações químicas designadas metabolismo. Enzimas específicas são responsáveis em direcionar estas reações a cada processo, estabelecendo assim, as rotas metabólicas. Os produtos químicos constituídos, degradados ou alterados nestes processos são os metabólitos (SANTOS, 2004; BRAZ Filho, 2010).

Os metabólitos são divididos em duas classes: primários, responsáveis por processos indispensáveis à vida, consequentemente, moléculas comuns no reino vegetal, como os açúcares simples, os aminoácidos, as proteínas e os ácidos nucleicos; e secundários (esquema 1) estes proporcionam vantagens não relacionadas totalmente à subsistência primordial do organismo, como os compostos orgânicos: alcaloides e terpenos, que possuem uma distribuição restrita nas partes da planta e específicas de espécies relacionadas (SANTOS, 2004; RAVEN et al, 2007; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Esquema 1: Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários nas plantas e suas inter-relações com o metabolismo primário.



Fonte: TAIZ & ZEIGER, 2009.

Os metabólitos secundários permitem maior plasticidade às plantas em resposta às condições do meio em que estão inseridas. Possuindo assim, diversas funções: como sinais químicos de interação do vegetal para defesa contra herbívoros, patógenos ou competidores; proteção contra a radiação solar; contribuição para a dispersão de pólen e sementes (RAVEN et al, 2007; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os elementos bioativos das plantas são produtos finais ou intermediários da rota metabólica, sintetizados através das substâncias do metabolismo primário (LARCHER, 2000). Mudanças na produção destes podem influenciar na variação da produção dos metabólitos secundários, pois não há um limite definido entre reações químicas do primeiro e do segundo (SANTOS, 2004).

As duas principais classes de compostos vegetais secundários são: os compostos nitrogenados e os terpenóides (RAVEN et AL, 2007). Estas substâncias são provenientes do metabolismo da glicose através de dois mediadores, o primeiro intermediário forma os aminoácidos aromáticos através da rota do ácido chiquímico. Já o segundo, segue três rotas distintas: via ciclo do ácido cítrico, através da condensação do acetato ou via mevalonato (SANTOS, 2004; ANDRADE et al, 2009; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os terpenóides representam a classe de metabólitos mais diversificada, com mais de 22.000 substâncias estudadas (RAVEN et al, 2007) sua denominação provém do alemão terpentin (terebentina), por ter sido primeiramente isolada desta resina (VIZZOTO et al, 2010).

Entre as diversas funções dos terpenos para os vegetais, estão as de antioxidante natural (GRASSMANN et al, 2002), pigmentos fotossintéticos, hormônios, componentes estruturais de membranas e transportadoras de elétrons (RAVEN et al, 2007).

O hidrocarboneto isopreno caracteriza o terpenóide primitivo que dá origem aos demais deste grupo pela junção de outras unidades, ele é formado por cinco átomos de carbono, dois deste composto forma um monoterpeno, três um sesquiterpeno e quatro um diterpeno (RAVEN et al, 2007).

A síntese dos monoterpenos ocorre através da polimerização do mevalonato, que é transformado a isopentil-pirofosfato e seu isômero dimetilalil-pirofosfato; já os sesquiterpenos são formados através da ligação das moléculas que formaram o monoterpeno- a trans-geranil-pirofosfato- e o isopentil-pirofosfato (SANTOS, 2004).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por terpenos, representado pelos monoterpenos e sesquiterpenos (COSTA, 1994; SANTOS et al, 2004; FACCHETTI & CADOPPI, 2005), mas, outras classes de metabólitos também estão presentes, como os

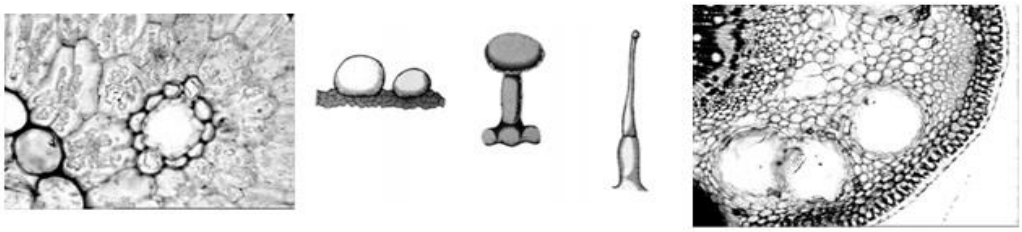
ésteres de ácidos graxos, fenilpropanonas, alcoóis aldeídos, hidrocarbonetos alifáticos. Eles estão localizados em diversas partes das plantas, como em frutos, sementes, flores, folhas, galhos (SANTOS et al, 2004).

Os fenilpropanóides são métabólitos provenientes do metabolismo dos aminoácidos e atuam principalmente como componentes de defesa das plantas e na alelopatia (LARCHER, 2000), além de atuar na fotoproteção (HARMER et al, 2000).

A volatilidade é a característica que diferencia os óleos essenciais dos óleos fixos, que são compostos lipídicos, provenientes em sua maior parte de sementes. Além de evaporar com facilidade, a maioria dos compostos voláteis possui um aroma agradável, sabor ácido e/ou picante e coloração variável dependente de seus constituintes (SIMÕES & SPITIZER, 2004).

Os óleos essenciais são armazenados em diversas estruturas, como em tricomas ou pelos glandulares, células do parênquima, canais secretores ou em bolsas secretoras lisígenas ou esquizolisígenas (desenho 1) (SIMÕES & SPITIZER, 2004).

Desenho 1: Desenho esquemático de estruturas armazenadoras dos óleos essenciais: bolsas secretoras, tricomas e células parenquimáticas.



Fonte: http://sbfgnosia.org.br/Ensino/drogas_aromaticas.html

O óleo essencial dos vegetais pode ser obtido através de várias técnicas mas, a escolha dependerá do material vegetal utilizado, se for fruto poderá ser extraído através da prensagem (SIMÕES & SPITIZER, 2004). Além desta metodologia, outras também podem ser empregadas, como hidrodestilação, arraste a vapor d'água, "enfleurage", extração por solventes apolares, CO^2 supercrítico (MORAIS, 2009[2]).

Os óleos voláteis atuam na atração de animais polinizadores e dispersores de sementes, também, no mutualismo e proteção contra insetos herbívoros (RAVEN et al, 2007). Esta interação das plantas através das substâncias do metabolismo secundário é denominada quimismo (MORAIS[2], 2009). São vários fatores que influenciam na composição química das plantas, tanto fatores genéticos, como abióticos - temperatura, intensidade de luz, efeito sazonal - e edáficos (MORAIS, 2009[1]).

Em períodos de elevados índices de radiação solar os metabólitos secundários apresentam quantidades expressivas, pois as reações de biossíntese necessitam de esqueletos carbônicos produzidos por processos fotossintéticos (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A temperatura, luz e água são fatores variáveis no tempo e em diferentes locais, tais condições poderiam limitar a existência dos organismos se eles não tivessem a capacidade de se adaptarem. Tais adaptações podem acontecer em nível da comunidade, ou de espécies com ampla distribuição geográfica. Em espécies, essas alterações poderão resultar em raças genéticas, denominadas ecótipo, que podem apresentar ou não mudanças morfológicas, (ODUM, 1971).

As alterações dos organismos provocadas por ações externas são coordenadas pelo relógio biológico, que é regido por genes que também atuam na expressão de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários como o isopreno. Nas plantas pode ocorrer à indução de genes fotossintetizantes e produção de pigmentos protetores (síntese de fenilpropanóides), ao amanhecer, modificando assim sua composição química (HARMER et al, 2000).

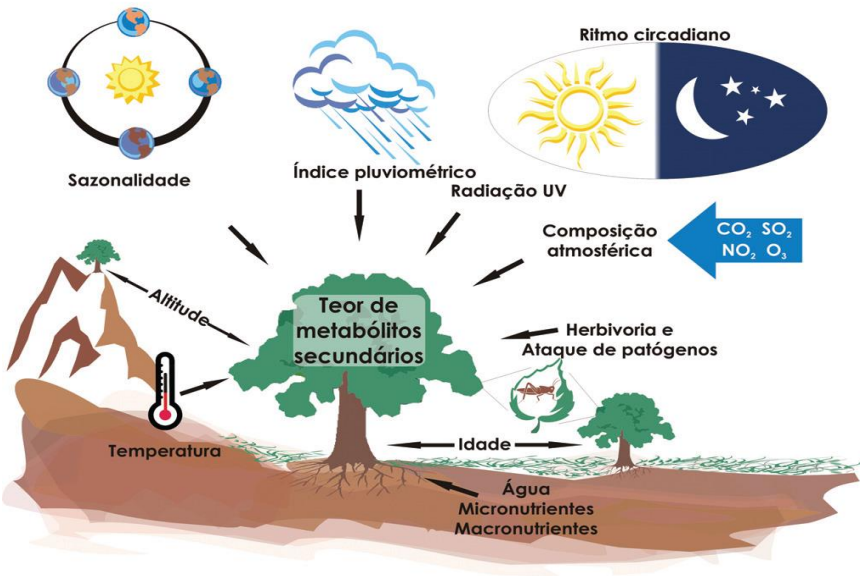
A divergência na composição química de espécimes botânicos aromáticos, estabelecidas por adaptações, ao longo de gerações é denominada quimiotipo (ANVISA, 2005). Fatores que estão relacionados a estas diferenças entre as substâncias provenientes do metabolismo secundário são estudadas há muito tempo, porém, estas pesquisas utilizam espécies de regiões temperadas e de alto valor comercial, sendo negligenciados os indivíduos silvestres tropicais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

As alterações das substâncias presentes nos vegetais são provenientes dos estímulos ambientais químicos, físicos ou biológicos (desenho 2) (MELO, 2010). As diferentes condições que cada organismo suporta, variabilidade de expressão genética e estágios de vida são uns dos fatores responsáveis pela divergência na composição do óleo essencial das espécies (MORAIS, 2009[1]).

É necessária a diminuição dos efeitos dos fatores que influenciam a variação das substâncias para a obtenção de fitofármacos de qualidade, por meio da determinação do quimiotipo utilizado e planejamento do cultivo (LIMA et al, 2003).

Outro fator relevante para as indústrias não só farmacêutica, mas, cosmética ou alimentícia, são espécies que possuam substâncias com potencial terapêutico, cosmético, flavorizante e antioxidante em quantidades significativas, para assim poder ser utilizado como matéria prima (PLETSCBI, 1998).

Desenho 2: Principais fatores de influência nos metabólitos secundários em plantas.



Fonte: Gobbo-Neto & Lopes, 2007.

A influência no quantitativo e na composição química pode estar relacionada a metodologia de extração, técnicas e condições de cultivo, além de outros aspectos ecológicos e ambientais, como, tipo de tecido vegetal e período de colheita (FRANÇA, 2004; FACCHETTI & CADOPPI, 2005).

Outros elementos, como a frequência de coleta dos espécimes, o tipo e tempo de secagem, também alteram a constituição e o teor dos constituintes do óleo essencial (BERGO et al, 2005; MACHADO et al, 2013). A maioria das espécies concentra uma maior quantidade de substâncias ativas no seu tecido em determinadas períodos, e esta variação pode ocorrer tanto no período de um dia como épocas do ano (REIS et al, 2004).

Andrade et al (2011) analisou o óleo essencial de doze espécimes de *Piper dilatatum*, provenientes da região amazônica, coletadas durante a estação chuvosa e as classes de substância mais evidentes foram sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados.

Na análise hierárquica de agrupamento, os óleos de *P. dilatatum* foram divididos em sete grupos, que apresentaram como componentes principais: (E)-cariofileno, α-cadinol e Germacreno D (grupo1); espatulenol, biciclogermacreno e (Z)-b-ocimeno (grupo 2) ; espatulenol, Germacreno D e (E)-nerolidol (grupo 3); Germacreno D, limoneno, α-felandreno, biciclogermacreno (grupo 4); b-elemeno, Germacreno D e b-pineno (grupo 5); curzerene, p-cimeno e α-eudesmol (grupo 6); e (Z)-a-bisaboleno, curzerene e Germacreno D (grupo 7) (ANDRADE et al, 2011).

Na avaliação sazonal dos compostos do óleo essencial da espécie *Eugenia neonitida*, verificou-se uma variação do α-pineno, a sua maior concentração foi no mês de fevereiro e a menor em novembro, sendo que no mês de agosto tal substância não foi identificada (DEFAVERI, 2011).

A espécie *Siparuna guianensis* apresentou variação do rendimento da composição do óleo essencial das folhas, em consequência do estágio fenológico e variações climáticas (VALENTINI et al, 2010).

Gazim et al (2013), verificou grande variação nos compostos do óleo essencial de *Tetradenia riparia* e afirmou que elementos sazonais podem ser os responsáveis pela oscilações destas substâncias.

Algumas espécies demonstram não possuir muita influência de fatores sazonais nos seus componentes, como a espécie *Hyptis marrubioides*, que apesar de demonstrar uma maior produção de metabólitos no verão (abril/maio) não apresentou variação significativa entre as substâncias (BOTREL et al, 2010).

Amaral (2008) ao analisar a variação sazonal das substâncias de três espécimes de *Piper solmsianum*, não encontrou oscilação significativa para um espécime e para os outros dois as concentrações de apiol e dilapiol foram maiores no verão.

Gonçalves (2012) ao realizar a análise do óleo essencial de *P. carniconectivum*, verificou que os constituintes majoritários, β-pineno (26,7%), α-pineno (16,9%) e óxido de cariofileno (11,1%) divergiram das respostas obtidas por Facundo et al (2006), para os mesmos espécimes, que teve como constituintes principais o óxido cariofileno (21,3%) e α-pineno (19%).

Potzernheim et al (2006) fez a análise do óleo essencial de três espécies de piperáceas coletadas no Cerrado e comparou os resultados encontrados com um estudo realizado com as mesmas espécies provenientes da Mata Atlântica. Os produtos mostraram grande variação nos componentes químicos de uma região para outra, tais efeitos foram ocasionados por fatores ambientais ou genéticos.

A variação no óleo essencial de *P. aduncum* demonstrou que enquanto as folhas na sombra aumentam os fenilpropanóides e diminuem os sesquiterpenos, o comportamento do óleo das raízes nessas condições é inverso. O teor e a produção do óleo das folhas não mostraram diferenças significativas, mas das raízes aumenta a produção em plantas no sol (FERREIRA, 2011).

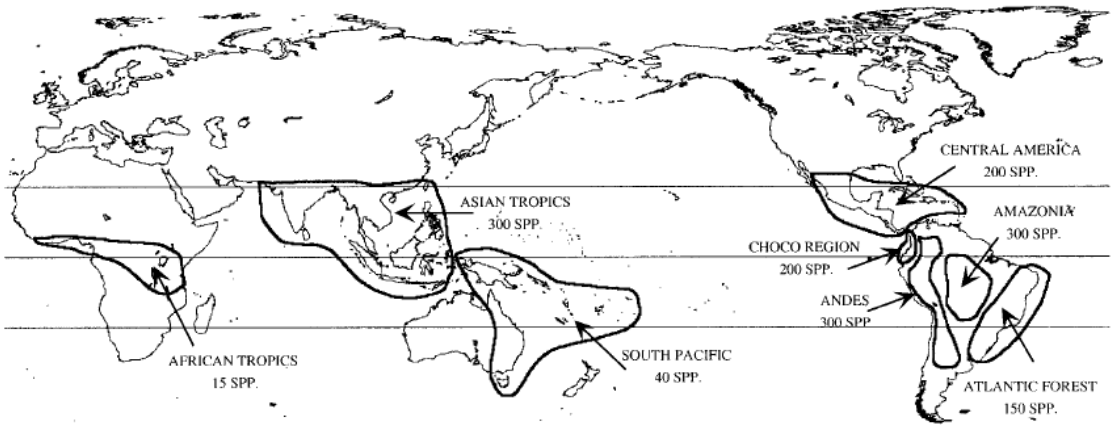
Para obtenção de um produto de qualidade é imprescindível coletar o material no período em que este apresentar melhores atributos almejados. Portanto, deve ser considerado a parte da planta e o estágio fenológico (REIS et al, 2004).

1.2 Considerações sobre o Gênero *Piper* L. e *Piper obliquum* Ruiz & Pav.

As espécies do gênero *Piper* L. são uma das mais estudadas, na região da Amazônia Legal, quanto aos constituintes dos óleos essenciais (ANDRADE et al, 2009). Este táxon está entre os mais abundantes do planeta, sendo considerado entre os dez maiores da região Neotropical das Magnoliidae, representando o maior grupo da família Piperaceae (mapa 1) (JARAMILLO & MANOS, 2001).

As piperáceas podem ser encontradas, tanto em florestas primárias sob a sombra do dossel, como em áreas perturbadas onde existem cortes em faixas, pela queda das árvores ou remoção por silvicultores. Este grupo também é comum no sub-bosque de florestas de várzea, em lugares úmidos ou quentes (GREIG, 2004; TEBBS, 1989).

Mapa 1: Distribuição geográfica do gênero *Piper*. Números estimados para a diversidade do grupo.



Fonte: JARAMILLO & MANOS, 2001.

O Brasil está representado por 285 espécies de *Piper*, destas 192 são endêmicas. Na região Norte há o registro de ocorrência de 166 espécies (GUIMARÃES et al, 2013), destas 42 espécies estão presentes em Rondônia (AIZZO, 2011). A distribuição das piperáceas por diversos ambientes possui relevância na regeneração de matas secundárias, por sustentarem

nesses ambientes diferentes tipos de insetos que são vetores de pólen de diversas plantas (GREIG, 2004).

Estudos com *P. gaudichaudianum* demonstrou que a atração de animais polinizadores e dispersores de sementes estão relacionados com a alta atividade atrativa das substâncias presentes no óleo essencial. Esta piperácea possui poder de atração (80,7%) sobre os morcegos frugívoros *Carollia perspicillata* (TEIXEIRA, 2003; RAVEN et al, 2007; UIEDA et al, 2007).

A relevância do gênero *Piper* não se restringe aos aspectos ecológicos, mas também etnobotânico. A *P.obliquum* é uma das que se destaca por sua importância na medicina tradicional (VALADEAU et al, 2010; BDMTM, 2013) e pela riqueza em metabólitos secundários (MUNDINA et al, 1998; MAYER et al, 2008; GUERRINI et al, 2009).

O grupo etnico peruano Yanesha faz uso da decocção de folhas de *P. obliquum* para o banho de crianças a fim de fortificá-las (VALADEAU et al, 2010). Os indígenas mexicanos a utilizam contra hemorragia causada por ensolação e também como condimento (BDMTM, 2013).

Há várias nominações populares para *P. obliquum*, no Equador ela é conhecida como *Anis del Oriente* (GUERRINI et al, 2009), no Brasil como xama=hanaki pelos índios Yanomani de Papiu (FERREIRA, 2009*)*, o grupo etnico peruano Yanesha a denomina como *Corarnopan – Huomencpar* (VALADEAU et al, 2010) e os indígenas mexicanos a nomeiam como *hierba santa* (BDMTM, 2013).

A primeira identificação botânica da espécie foi publicada pelos pesquisadores Hippolyto Ruiz e Joseph Pavon (1797), na Flora Peruvianarum et Chilensis, com uma descrição botânica bem concisa.

Yuncker (1972) descreveu os espécimes brasileiros como um arbusto nodoso simples ou ramificado com cerca de dois a cinco metros de altura, com caule glabro e folhas amplamente elíptico-ovaladas, com ápice curto-agudo, e base inequilatera cordada, com 14-26 cm de largura e 25-39 cm de comprimento, presente de sete a nove nervuras de cada lado, sendo duas ou três mais curtas que descem no lobo inferior, o pecíolo possui cerca de cinco cm de comprimento. Espiga com cinco mm de espessura e 30-50 cm de comprimento,composta por flores organizadas anularmente em subespiral e pedúnculo de três a quatro cm de comprimento.

A espécie *P. obliquum* Ruiz & Pav está presente em ambientes úmidos e distribuída na encosta do Pacifico, Costa Rica e Ocidente do Panamá, entre 500 e 2.000 metros de altitude (BURGER, 1971) e também nos seguintes países na América do Sul: Bolívia, Brasil,

Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana e Peru; na América Central: Belize, Guatemala, Honduras e Nicarágua; na América do Norte: México (COLIN, 2012).

No Brasil *P. obliquum* está presente na região Norte: no Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Tocantins; no Nordeste: na Bahia; no Centro-oeste: no Mato-Grosso; e no Sudeste: no Rio de Janeiro e São Paulo (GUIMARÃES et al, 2013).

Embora essa espécie tenha ampla distribuição geográfica há poucas pesquisas, e apenas três destes trabalhos referem-se à composição do óleo essencial, estes demonstraram divergência nos compostos majoritários, sendo β-cariofileno (27,6%) a substância principal de *P.obliquum* coletada no Panamá (MUNDINA et al 1998), α-pineno (20,67%) para espécimes obtidos na Costa Rica (MAYER et al, 2008) e safrol (45,8%) nos espécimes do Equador (GUERRINE et al, 2009).

Oliveira (2012) ao analisar extratos das folhas da *P. obliquum*, coletada na ESEC-Cuniã (foto 1) através da análise "in vitro" pela técnica de DPPH (MENSOR et al, 2001) apresentou um alto valor antioxidante. Porém, Martão (dados não publicados) testou o óleo essencial dos mesmos espécimes e estes não demonstraram ação antioxidante significativa, corroborando com os estudos de Guerrini et al (2009).

Foto 1: *Piper obliquum* localizada na ESEC-Cuniã.

Aizzo, C.J., 2012.

Oliveira (2012) realizou o teste de classe de substância para o extrato etanólico e suas frações e verificou que *P. obliquum* possui esteroides, flavonoides, saponinas, fenóis e taninos.

Não há trabalhos publicados com *P. obliquum* proveniente da Amazônia Legal. Esta espécie é utilizada por algumas comunidades, portanto, faz-se necessário a caracterização química dos espécimes brasileiros a fim de subsidiar futuras pesquisas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar avaliação da composição do óleo essencial da *Piper obliquum* Ruiz & Pav. com a finalidade de identificar a variação da classe de substâncias produzidas ao longo do ciclo sazonal.

2.2 Objetivos Específicos

-Identificar os componentes químicos do óleo essencial de *P. obliquum;*

-Avaliar a correlação entre a variação das substâncias do óleo essencial de *P. obliquum* e os períodos de coleta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de Estudo e Amostragem

As coletas dos espécimes de *Piper obliquum* Ruiz & Pav. foram obtidas na área de estudo que faz parte da Estação Ecológica do Cuniã (ESEC Cuniã), esta unidade de conservação foi criada pelo Decreto Federal de 27 de setembro de 2011. Ela é um componente da gestão integrada das unidades de conservação federais de Rondônia: Gestão Integrada Cuniã-Jacundá (GICJ), constituída pela ESEC Cuniã, Reserva Extrativista do Lago Cuniã (Resex Cuniã) e Floresta Nacional de Jacundá (FLONA Jacundá) (PPBIO, 2012[1]).

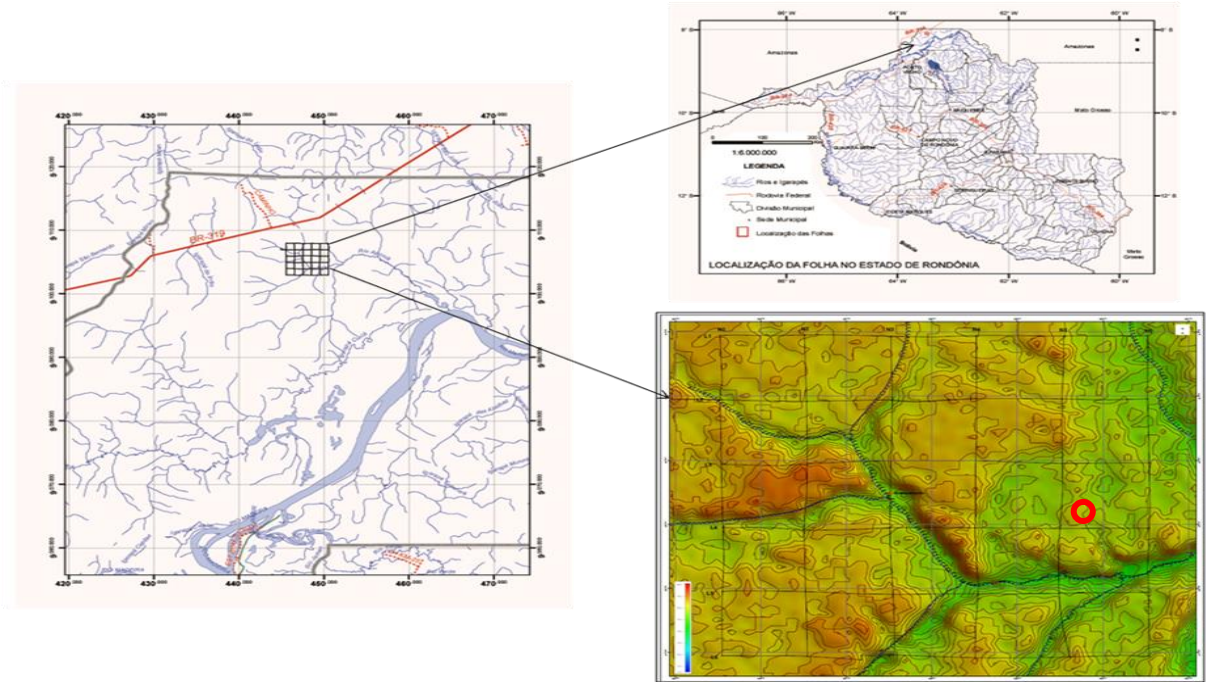
A ESEC Cuniã está localizada ao norte do Estado de Rondônia, no município de Porto Velho, abrangendo uma área de 125.849,23 hectares, dividida em duas áreas adjuntas a Resex Cuniã: área I e área II. O acesso pode ser realizado por via fluvial ou por terra firme (PPBIO, 2012[2]).

A área do presente estudo está localizada ao lado oeste da unidade com acesso pela BR 319, a 120 km da capital rondoniense, sentido Porto Velho (RO) – Humaitá (AM).

A área de amostragem na ESEC Cuniã faz parte de um ponto amostral de uma grade completa de um sítio de pesquisas ecológicas de longa duração (PELD) - (25 km²), sendo distribuída de forma que permite inventários rápidos, com um desenho formado de trilhas e parcelas, sendo que cada grupo desta compõem um sítio de pesquisa (MAGNUSSON, et. al., 2005) (Figura 6). Os espécimes coletados neste sítio de amostragem estão localizados na linha LO4 3550, com as seguintes coordenadas geográficas: S08º05`49,435 “W 063º27`44.696”, representado pelo círculo em vermelho no mapa 2.

Para a coleta dos espécimes foi anotado o número e metragem do piquete onde se encontrava a população. O material botânico para a extração do substrato foi coletado e condicionado em saco plástico preto, e transportados posteriormente em uma caixa de isopor com gelo seco até o Laboratório de Fitoquímica (LABFITO) da Universidade Federal de Rondônia.

Mapa 2: Estação Ecológica do Cuniã. Em destaque área de estudo (PPBio) e ponto de amostragem (círculo vermelho).



Fonte: (PPBIO, 2012[2]).

As folhas foram coletadas nos meses de outubro e novembro de 2011, fevereiro, maio e agosto de 2012. O material testemunho foi obtido por Aizzo, J.R.S. 133, em fevereiro de 2012 e depositado no Herbário Rondoniensis (RON) sob o nº RON 4696. A exsicata foi herborizada segundo a metodologia de Martins-da-Silva (2002).

Foi enviada uma duplicata do espécime para o herbário (RB) do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, a fim de identificação botânica pela especialista da família Piperaceae, Dr. Elsie Franklin Guimarães.

3.2 Extração e Análise do Óleo Essencial

A extração do óleo essencial de *Piper obliquum*, foi realizada seguindo o método de hidrodestilação, utilizando o extrator de Clevenger (foto 2), onde foram cortadas as estruturas vegetais e em seguida colocadas em um balão de fundo redondo, tendo sido acrescentado água até a metade do balão. O sistema de destilação foi montado, aquecendo-se a aproximadamente 100 ^{o}C para obtenção do óleo essencial, que foi recolhido em recipiente de vidro, previamente pesado e etiquetado com uma identificação (FRANCO, 2005).

O óleo essencial obtido foi mantido em vidro de cor âmbar, no *freezer*, até o envio para a identificação das substâncias químicas presentes em *P.obliquum*.

Foto 2: Instrumentos utilizados na extração do óleo essencial de *P. obliquum.*

Aizzo, JRS, 2012.

A análise fitoquímica do óleo essencial de *P. obliquum* foi realizada através da cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (CG-MS) (DEGANI et al, 1998).

Para a análise no CG foi utilizado o aparelho da marca SHIMADZU CG-14B, equipado com coluna LM-5 (30m x 0,25mm x 0,3µm). O programa de temperatura utilizada para a coluna foi: 40 °C (8min.) de 150 °C até 2 °C/min, seguida por um aumento de 10 °C/ min até 280 °C (15min.) . A temperatura do injetor foi de 250 °C e do detector FID 310 °C, o gás de suporte foi o He (1 mL/min) O volume de injeção foi de 0,2 mL dos óleos dividido na proporção de 1:40.

A análise por GC-MS foram realizadas em Agilent Technologies da série 5975 MSD (70 e V) aparelho equipado com uma coluna DB - 5 (30 m x 0,25 milímetros × 0,25 mm). As condições da experiência foram os seguintes: gás transportador: He (1 mL/min), temperatura programada da coluna semelhante ao descrito acima para a análise de CG, a temperatura do injetor foi de 260 °C e do detector 280 °C. O volume de amostra injetada foi de 1 mL dividido em uma proporção de 1:10.

Os constituintes do óleo essencial da *P. obliquum* foram identificados por comparação dos seus espectros de massa e calculados índice de retenção linear (IR) com os dados descritos na literatura (ADAMS, 1995). Os índices de retenção foram calculados através da co-injeção de uma mistura de *n*-alcanos de série (C8 - C19) e através da equação

descrita por Van Den Dool & Kratz (1963). As concentrações dos constituintes dos óleos foram calculadas utilizando as áreas dos picos individuais para cada substância.

3.3 Análises dos Dados

Os dados obtidos da identificação do óleo essencial das cinco amostras foram digitados em planilhas do Excel e a partir destas foram construídos dois arquivos de dados, o primeiro com as substâncias e suas respectivas porcentagens em ordem numérica crescente do tempo de retenção e índice de retenção, o segundo organizado em forma de matriz (composição *versus* período).

Foram realizados gráficos no Excel, com os dados de todos os períodos analisados, selecionados segundo a classe química a que pertencem às substâncias.

A interpretação dos dados foi realizada através de técnicas de análises multivariadas. Para detectar a variabilidade de cada substância nos diferentes períodos foi utilizado a Análise de Agrupamento Hierárquica (CAH), empregando o conceito de distância: medida de dissimilaridade (distância de Bray & Curtis).

Foi utilizada a técnica hierárquica de agrupamento aglomerativa (UPGMA) com a intenção de classificar as amostras em diversas etapas de forma hierárquica, a fim de verificar o grau de dissimilaridade entre as substâncias do óleo essencial de cada coleta. Esta técnica resulta em uma árvore de classificação, onde os constituintes de um grupo tornam-se elementos do grupo superior (VALENTIN, 2000).

Com a finalidade de identificar variação entre as substâncias nos períodos amostrados foram realizadas abordagens complementares, como sugerido por Valentin (2000), utilizando dados qualitativos de ordenação das porcentagens de cada componente do óleo essencial em cada amostra, considerando as seguintes categorias e seus valores (Tabela 1).

Tabela1: Transformação de categorias qualitativas para quantitativas

Categoria	Concentração	Valor
Baixíssimo	0,0 – 0,99	1
Baixo	1,0 – 3,00	2
Médio	3,1 – 5,00	3
Alto	Acima de 5,1	4

(VALENTIN, 2000).

Foi utilizada a Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Correspondência Múltipla (ACM) com o auxílio do software XLSTAT 7.5 (ADDINSOFT, 2004), a fim de compreender o comportamento das variáveis (substâncias; concentração; período de coleta).

As transformações dos dados foram realizadas para a ACM, que tem a finalidade de verificar a relação entre mais do que duas variáveis nominais e representá-las em poucas dimensões, permitindo assim a construção de gráficos e uma melhor divisão entre as categorias (PESTANA & GAGEIRO, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil Aromático do Óleo Essencial de *P.obliquum* Ruiz & Pav.

O óleo essencial das folhas de *Piper obliquum* Ruiz & Pav., apresentou 43 substâncias. Todos os compostos identificados nos meses de outubro, novembro, fevereiro e maio são da classe dos terpenos, substâncias produzidas através das vias mais importantes do metabolismo secundário, ácido mevalônico e isopentenilpirofosfato (LARCHER, 2000). Este grupo de compostos é responsável pela atividade alelopática do óleo essencial de *P. hispidinervum* e *Pogostemon heyneanus* sobre plantas daninhas (SOUZA Filho, 2009).

A amostra do mês de agosto apresentou terpenos e um fenilpropanóide. Neste período o óleo essencial foi sintetizado por dupla origem biossintética. A alternativa desta rota revela indícios de que *P.obliquum* passou por estresse, provavelmente, relacionado à temperatura e/ou regime hídrico. Os vegetais afetados por condições desfavoráveis precisam de opções de ganho de energia sobressalente para a conservação das funções vitais, portanto, caminhos metabólicos especiais são essenciais na regulação do meio interno (LARCHER, 2000). Nesta situação as plantas podem necessitar do redirecionamento da rota metabólica (MORAIS, 2009²).

Os fenilpropanóides são provenientes do metabolismo dos aminoácidos e seguem a rota bioquímica do ácido chiquímico (LARCHER, 2000), que pode ser ativada através da indução de genes relacionados à fotossíntese e produção de pigmentos fotoprotetores (HARMER et al, 2000).

Em comparação as espécies ricas em terpenos poucas piperáceas possuem os fenilpropanóides como constituintes majoritários. A *P. divaricatum* é uma das exceções em relação à alta concentração desta classe de substância, pois, há uma variação de 16,9 a 82,5% de metil-eugenol em sua composição (ANDRADE et al, 2009).

Os óleos essenciais, geralmente são constituídos por terpenos, classe de substâncias consideradas como antioxidantes naturais (GRASSMANN et al, 2002). Grupo de compostos com ampla distribuição no gênero *Piper* da Amazônia Legal (MAIA et al, 1987; ANDRADE et al, 2009) e em outros locais do Brasil, como demonstra o estudo realizado por Potzernheim et al, (2006) na região serrana de Brasília, em que *P. dilatatum* (81%), *P. hispidum* (84,5%) e *P. arboreum* sbsp. *arboreum* (68,7%) demonstraram possuir terpenos como compostos predominantes.

Em outras regiões do mundo espécies nativas, da mesma forma, apresentam um elevado teor de terpenóides, como as piperáceas da África, *P. guineense* que possui 27,2% de β-pineno e 20% de (E)-β-farnesene, nos frutos e folhas, respectivamente, e *P. capense* com 66% de β-pineno e 20,4% de α-pineno em suas folhas; 46,8% de β-pineno, 17,4% de sabineno e 14,4% de α-pineno em seus frutos (ZOLLO et al,1998).

Espécies de piperáceas coletadas em São Tomé e Princípe possuem terpenos como constituintes principais dos óleos essenciais, para *P. capense*: β-pineno (32,5%) e β-cariofileno (12,6%); *P. nigrum* o limoneno (18,8%), β-cariofileno (15,4%), sabineno (16,5%) e β-pineno (10,7%); e *P. umbellatum* o β-pineno (26,8%), α-pineno (17,6%) e (E)-nerolidol (12,4%) (MARTINS, 1998).

As espécies não possuem obrigatoriamente uma classe de substâncias. Vegetais ricos em terpenos podem também possuir amidas (SANTOS, 2004; DYER et al, 2004). O óleo essencial das folhas da espécie *P. guineense* possui compostos majoritários tanto da classe dos terpenos (β-pineno: 27,2%), como fenólico (miristicina: 25.4%) (ZOLLO et al, 1998).

A análise do óleo essencial de *P. obliquum*, evidenciou a presença de monoterpenos (oxigenados e hidrocarbonetos) (Tabela 2), sesquiterpenos (oxigenados e hidrocarbonetos – Tabela 3) e fenilpropanóide (Tabela 4).

Tabela 2: Composição química do óleo essencial da *P. obliquum*: Monoterpenos

Compostos MH (Nºestr.)	**Período de Coleta**				
	Out.	**Nov.**	**Fev.**	**Maio**	**Ago.**
tricicleno (**1**)	0,85	0,95	1,4	1,02	2,7
α- pineno (**2**)	28,3	26,6	37,1	37,7	23,8
canfeno (**3**)	19,6	20,2	23,5	22,6	17,1
β-pineno (**4**)	17,1	16,4	17,5	17,5	12,5
mirceno (**5**)	3,4	3,3	3,2	3,7	3,4
limoneno (**6**)	4,8	5,7	3,9	4,0	4,3
terpinoleno (**7**)	0,09	0,4	0,12	0,07	0,1
Compostos MO (Nº estr.)	**Out.**	**Nov.**	**Fev.**	**Maio**	**Ago.**
óxido de α-pineno (**8**)	0,09	0,61	0,1	0,052	0,2
linalol (**9**)	0,04	0,05	-	-	-
α-canfolenal (**10**)	0,08	0,49	0,08	0,051	-
trans-pinocarveol (**11**)	0,36	0,55	0,25	0,32	0,2
isoborneol (**12**)	0,06	0,22	0,07	0,03	0,4
terpinen-4-ol (**13**)	-	0,04	-	-	0,2
α-terpineol (**14**)	0,12	0,32	-	-	0,5
acetato de bornil (**15**)	0,7	0,05	0,4	0,3	0,7
1,8-cineol (**37**)	-	-	-	-	0,4

MH = monoterpenos hidrocarbonetos; MO = monoterpenos oxigenados; nº estr. = número da estrutura no Apêndice B; Out. = outubro; Nov. = novembro; Fev. = fevereiro; Ago. = agosto. Cores em destaque por concentração: preto = baixíssima; azul = baixa; verde = média; vermelho = alta.

Tabela 3: Composição química do óleo essencial da *P. obliquum*: Sesquiterpenos

Compostos SH (Nºestr.)	**Período de Coleta**				
	Out.	**Nov.**	**Fev.**	**Maio**	**Ago.**
α-cubebeno (**16**)	0,12	0,16	0,05	0,06	0,1
α-copaeno (**17**)	0,17	0,07	0,11	0,1	0,5
β-elemeno (**18**)	1,66	2,3	0,6	0,8	2,3
α-gurjuneno (**19**)	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4
(E)-cariofileno (**20**)	2,8	2,9	1,7	1,9	-
β –gurjuneno (**21**)	0,34	0,34	0,17	1,9	0,3
γ-elemeno (**22**)	0,3	0,4	0,11	0,16	1,1
α-humuleno (**23**)	0,58	0,7	0,33	0,36	0,8
allo-aromandreno (**24**)	0,5	0,18	0,68	0,35	0,5
γ-muuroleno (**25**)	0,3	0,16	0,04	0,18	0,7
germacreno-D (**26**)	0,78	0,77	0,41	0,58	0,8
viridifloreno (**27**)	1,03	0,93	0,42	0,83	1,1
epi-cubedol (**28**)	0,7	1,3	0,2	0,24	1,7
α-muuroleno (**29**)	0,6	0,7	0,2	0,62	0,4
germacreno A (**30**)	0,93	0,42	0,2	0,62	1,6
γ-cadineno (**31**)	1,46	1,27	0,5	0,7	0,4
δ –cadineno (**32**)	1,9	1,4	1,7	1,16	1,0
germacreno B (**33**)	0,54	0,46	0,47	0,3	1,0
β-bourboneno (**38**)	-	-	-	-	0,3
α-calacoreno (**40**)	-	-	-	-	0,8
Compostos SO (Nºestr.)	**Out.**	**Nov.**	**Fev.**	**Maio**	**Ago.**
óxido de cariofileno (**34**)	0,98	0,64	0,2	0,13	1,6
α-cadinol (**36**)	0,75	0,75	-	-	2,3
carotol (**35**)	0,26	0,26	-	-	0,8
elemol (**41**)	-	-	-	-	0,4
(E)-nerolidol (**42**)	0,7	0,55	0,02	0,3	0,4
espatulenol (**43**)	-	-	-	-	1.0

SH = sesquiterpenos hidrocarbonetos; SO = sesquiterpenos oxigenados; nº estr. = número da estrutura no Apêndice B; Out. = outubro; Nov. = novembro; Fev. = fevereiro; Ago. = agosto. Cores em destaque por concentração: preto = baixíssima; azul = baixa.

Tabela 4: Composição química do óleo essencial da *P. obliquum*: Fenilpropanóide

Composto Fe (Nºestr.)	**Período de Coleta**				
	Out.	**Nov.**	**Fev.**	**Maio**	**Ago.**
metil eugenol (**39**)	-	-	-	-	2,3

Fe = fenilpropanóide ; nº estr. = número da estrutura no Apêndice B; Out. = outubro; Nov. = novembro; Fev. = fevereiro; Ago. = agosto. Cores em destaque por concentração: azul = baixa.

Os dados cromatográficos do óleo essencial de *P. obliquum* encontram-se no Apêndice A, as estruturas químicas no Apêndice B e os cromatogramas estão no Apêndice C.

A plasticidade metabólica é uma das alternativas que os vegetais utilizam frente às condições diferenciadas do ambiente em um mesmo local (LARCHER, 2000). Dill (2009) ao

realizar um levantamento bibliográfico das substâncias dos óleos essenciais de piperáceas brasileiras, constatou que quanto mais tropical for o clima, maior a incidência de sesquiterpenos e fenilpropanóides na composição, e quanto mais quente e seco, maior o índice de monoterpenos.

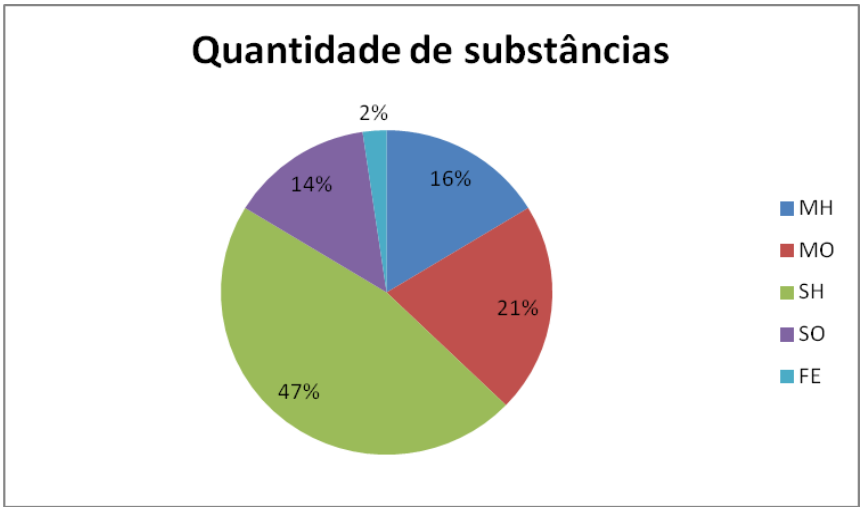
O óleo essencial de *P. obliquum* apresentou quantidades crescentes da concentração dos compostos identificados (92,61%; 93,2%; 95,93%; 99,11%, respectivamente) até o período de maio, no mês de agosto ocorreu um decréscimo (92%), sendo o de menor determinação dos constituintes. A coleta de espécimes de *P. hispidinervum* realizados mais próximos do final do período chuvoso (março e abril) favorece o rendimento do óleo essencial (BERGO et al, 2005).

Alguns estudos demonstram um modelo de variação das concentrações de substâncias, semelhante ao do presente estudo com uma maior produção de metabólitos no verão (BOTREL et al, 2010), mas, outros relatos da literatura são divergentes, pois tais estudos reportam o período seco como o de maior composição do óleo essencial (GAZIM, 2013; VALENTINI et al, 2010).

Taiz e Zeiger (2009), explica que altos índices de radiação solar são necessários para o aumento na produção dos metabólitos secundários, pois as reações biossintéticas necessitam de esqueletos carbônicos, que são sintetizados através de processos fotossintéticos e de compostos energéticos que atuam na regulação destas reações.

Em todas as análises, os cinco compostos majoritários encontrados são monoterpenos (Apêndice D) com 73,20%, 72.20%, 85,20%, 85,50% e 61,10% do óleo essencial, respectivamente (Gráficos 2; 3; 4; 5 e 6), portanto, esta é a classe de substância marcadora da composição dos compostos voláteis de *P. obliquum.* Os sesquiterpenos hidrocarbonetos foi a classe de substâncias mais expressiva com vinte compostos, seguido dos monoterpenos: oxigenados (9 = 21%) e hidrocarbonetos (7 = 16%), sesquiterpenos oxigenados (6 = 14%) e fenilpropanóides (1= 2%). A classe de substâncias que se destaca são os sesquiterpenos hidrocarbonetos (47%) (Gráfico1).

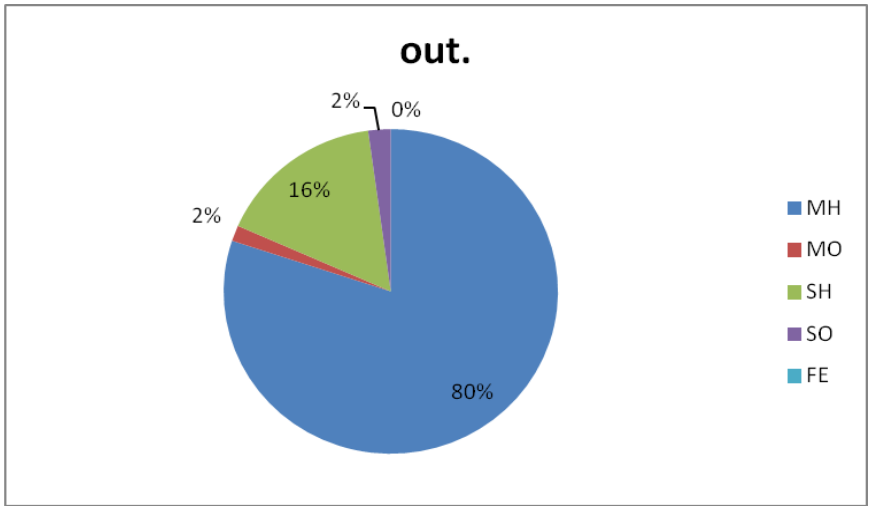
Gráfico 1: Porcentagem de substâncias considerando a classe química.



MH = monoterpenos hidrocarbonetos; MO = monoterpenos oxigenados; SH = sesquiterpenos hidrocarbonetos; SO = sesquiterpenos oxigenados; FE = fenilpropanóide.

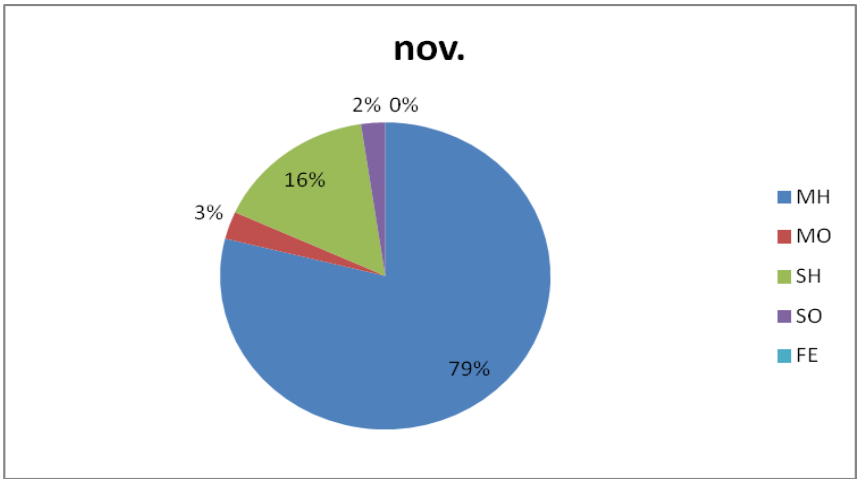
A variação dos compostos em relação a classe de substâncias de outubro e novembro difere um pouco entre os monoterpenos (oxigenados 2-3%; hidrocarbonetos 79-80%, respectivamente), mas, semelhante para os sesquiterpenos (hidrocarbonetos 16%, oxigenados 2%), este resultado sugere que as influências tanto abiótica como biótica na composição do óleo essencial de *P.obliquum* não divergiram entre estes períodos (Gráfico 2 e 3).

Gráfico 2: Concentração dos compostos considerando a classe química.



MH=monoterpenos hidrocarbonetos; MO= monoterpenos oxigenados; SH=sesquiterpenos hidrocarbonetos; SO = sesquiterpenos oxigenados; FE = fenilpropanóide; out. = outubro;

Gráfico 3: Concentração dos compostos considerando a classe química.

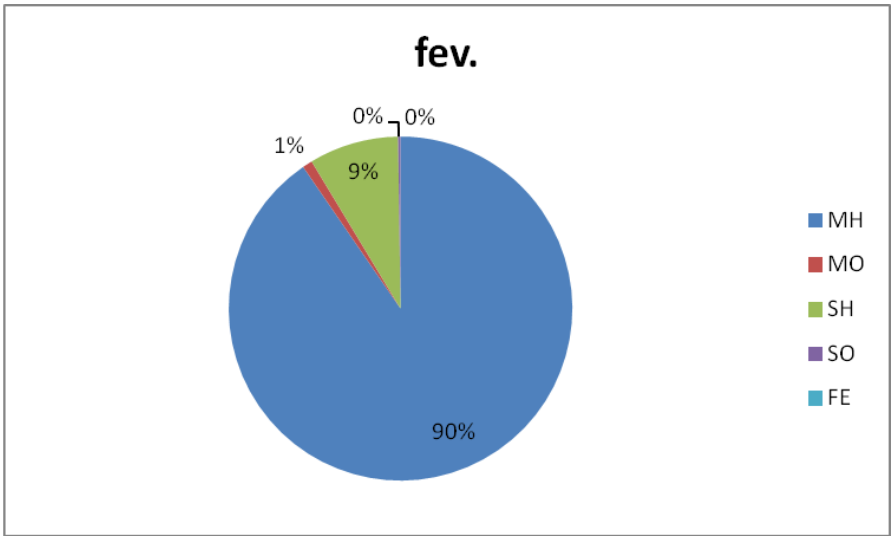


MH = monoterpenos hidrocarbonetos; MO = monoterpenos oxigenados;
SH = sesquiterpenos hidrocarbonetos; SO = sesquiterpenos oxigenados;
FE = fenilpropanóide; nov. = novembro.

Os meses de fevereiro e maio em relação aos dois primeiros períodos de análise apresentaram um aumento na concentração dos monoterpenos hidrocarbonetos, sendo fevereiro e maio o de maior concentração desta classe de substância. Todos os outros grupos de compostos, apresentaram menor concentração nestes períodos (Gráficos 4 e 5).

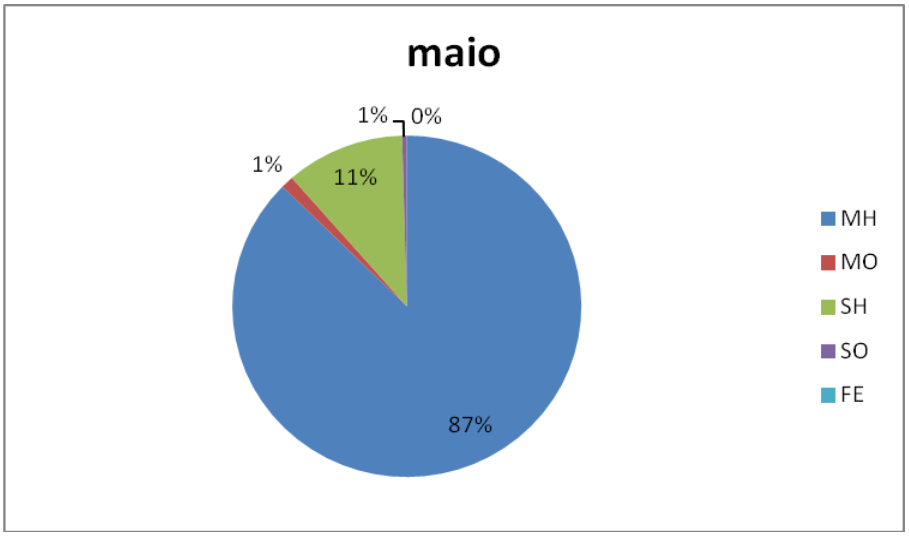
O óleo essencial de doze espécimes de *P.dilatatum*, obtidos no período chuvoso na Amazônia Legal, demonstrou que neste período as classes de substâncias mais expressiva foram os sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados (ANDRADE et al, 2011).

Gráfico 4: Concentração dos compostos considerando a classe química.



MH = monoterpenos hidrocarbonetos; MO= monoterpenos oxigenados;
SH = sesquiterpenos hidrocarbonetos; SO = sesquiterpenos oxigenados;
FE = fenilpropanóide; fev. = fevereiro.

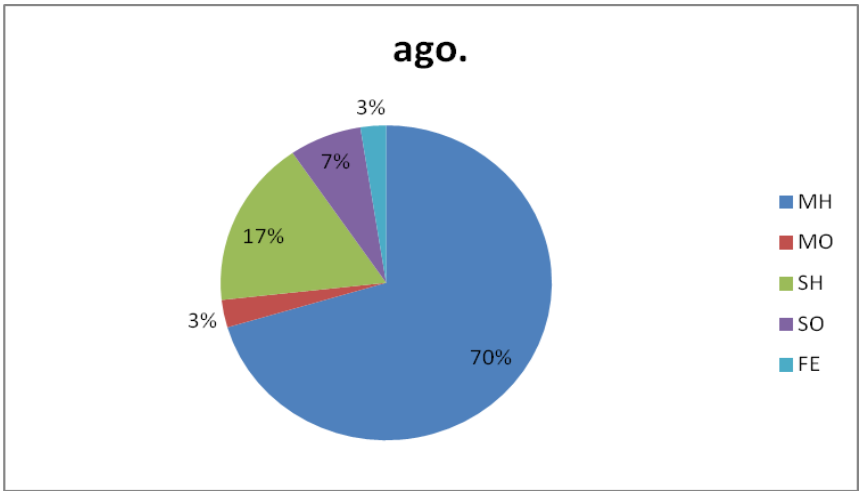
Gráfico 5: Concentração dos compostos considerando a classe química.



MH = monoterpenos hidrocarbonetos; MO = monoterpenos oxigenados;
SH = sesquiterpenos hidrocarbonetos; SO = sesquiterpenos oxigenados;
FE = fenilpropanóide.

O mês de agosto é o que possui a menor concentração de monoterpenos hidrocarbonetos, porém ocorre um aumento na concentração das outras classes de substâncias, sendo que este é o único período que possui um fenilpropanóide (Gráfico 6).

Gráfico 6: Concentração dos compostos considerando a classe química.



MH = monoterpenos hidrocarbonetos; MO = monoterpenos oxigenados;
SH = sesquiterpenos hidrocarbonetos; SO = sesquiterpenos oxigenados;
FE = fenilpropanóide; ago.= agosto.

O estudo da variação no óleo essencial de *P. aduncum* realizado por Ferreira (2011), demonstrou que enquanto as folhas na sombra aumentam os fenilpropanóides e diminuem os

sesquiterpenos, o comportamento do óleo das raízes nessas condições é inverso. O teor e a produção do óleo das folhas não mostraram diferenças significativas, mas das raízes aumenta a produção em plantas no sol. Considerando que o mês de agosto têm grande insolação e que em florestas tropicais, mesmo dentro da mata, há incidência significativa de raios solares (LARCHER, 2000) o resultado do presente trabalho demonstra que as resposta aos estímulos de produção de uma classe de substância por espécies do mesmo táxon podem ser diferentes.

As substâncias que predominam o óleo essencial das folhas de *P. obliquum*, são o α-pineno (37,7%), canfeno (22,6%) e o β-pineno (17,5%), tal resultado demonstra que o espécime amazônico possui um quimiotipo semelhante ao da Costa Rica (MAYER et al, 2008), porém, é divergente em relação aos espécimes coletados no Panamá (MUNDINA et al, 1998) e Equador (GUERRINI et al, 2009). A determinação do quimiotipo é imprescindível na obtenção de fitofármacos seguros, considerando a ampla variedade de metabólitos secundários (LIMA et al, 2003).

Mayer et al (2008), analisaram o óleo essencial de *P.obliquum* obtido na Costa Rica e o perfil químico dos compostos voláteis demonstrou ser rico em terpenos como o α-pineno (20,76%), germacreno-D (12,89%), β-pineno (12,43%) e α-copaeno (11,78%).

Há várias substâncias em comum entre o espécime coletado na Costa Rica (MAYER et al, 2008) e a amostra proveniente da ESEC-Cuniã, como o α-cubebeno, α-gurjuneno, γ-elemeno, germacreno-D, γ-cadineno e α-calacorene.

Apesar da similaridade de concentração dos componentes principais de *P.obliquum* provenientes da Costa Rica e da ESEC-Cuniã muitos outros compostos divergem em relação as concentrações, como é o caso do germacreno-D e do α-copaeno com uma concentração de 12,89% e 11,78%, respectivamente, para o primeiro país e 0,41- 0,80% e 0,07-0,50%, para o espécime brasileiro. Tanto a variação entre os constituintes de uma espécie como a prevalência de um quimiotipo pode estar relacionada com as condições ambientais que uma região oferece (MORAIS, 2009[2]).

Espécimes de *P. obliquum* coletadas no Equador, em contraste com os resultados da presente pesquisa, mostraram baixo teor no óleo essencial de α-pineno (1.75%), canfeno (0,52%) e β-pineno (2,01%) (GUERRINI et al, 2009). Outras espécies de piperáceas coletadas na região Amazônica possuem um alto teor destes constituintes. Na espécie *P. anonifolium*, a variação entre os espécimes de α-pineno é de 7,3-53,1%, e o β-pineno 2,3-22,9%, mas, esta espécie possui uma baixa concentração de canfeno (0,1%-0,2) (ANDRADE et al, 2009).

O canfeno (3-metileno-2,2-dimetil-1,7,4-biciclo-hexano) é o hidrocarboneto principal do conjunto do canfeno. Esta substância e seus respectivos derivados oxigenados, borneol e a

cânfora, são muito comuns nos vegetais, como nas Coníferas (COSTA, 1994), porém apresenta baixo teor na maioria das piperáceas da região amazônica (0,1-06%), com algumas exceções, como em *P. renitens* (5,6%) (SOLEANE et al, 2007), *P. cernuum* (12,2%) (ANDRADE et al, 2009) e *P. obliquum* do presente trabalho, que teve uma variação de 19,6% - 22,6%. Esta substância e outros terpenos possuem ação agrotóxica frente a diferentes insetos (VIEGAS Jr., 2003).

O α-pineno (4,7,7,-trimetil-1,7,5-biciclo-3-hexeno) e o β-pineno (4-metileno-7,7-dimetil-1,7,5-biciclo-hexano) são substâncias que compõem o complexo do pinano, que representam os constituintes mais comuns nas essências. Tais compostos são matéria-prima da cânfora sintética, além de outros fármacos e produtos como materiais de limpeza, tintas, vernizes (AZAMBUIA, 2013; COSTA, 1994), além de serem potenciais antibacterianos contra a endocardite infecciosa causada por bácterias Gram-positivas (LEITE et al, 2007).

Em uma análise comparativa dos óleos voláteis de nove espécies de *Piper* (*P. aduncum, P.amalago, P. arboreum, P. cernuum, P. hispidum, P. regnelii, P. submarginalum, P. vicosanum e Pothomorphe umbellata*) Mesquita et al (2005) identificou como as substâncias mais recorrentes o β-pineno (9/9) e espatulenol (9/9), seguidos por E-cariofileno (8/9), óxido de cariofileno (8/9), germacreno D (7/9), α-pineno (7/9) e limoneno (6/9).

Alguns metabólitos secundários são encontrados apenas em alguns espécimes como o monoterpeno hidrocarboneto acíclico limoneno (2-metil-6-metileno-2,7-octano-dieno) (COSTA, 1994; MAYER et al, 2008; GUERRINI et al, 2009), composto predominante da espécie *Pinus pinea* L. produtora de diversos óleo-resinas utilizadas pelas indústrias de tintas e vernizes, denominados essências terebentinas (COSTA, 1994). Esta substância é ativa na defesa contra insetos e demais organismos que se alimentam das plantas que o possuem (TAIZ & ZEIGER, 2009).

O safrol, componente principal do espécime de *P. obliquum* obtida no Equador, (GUERRINI, 2009) não foi identificado no espécime em estudo. Esta substância é um fenil-éter, molécula precursora de piperonal e butóxido de piperonila, ambas utilizadas pela indústria, respectivamente, de perfumes e inseticidas (MAIA & ANDRADE, 2009; WADT & KAGEYAMA 2004; SILVA & OLIVEIRA, 2000).

Uma espécie pode ter vários quimiotipos, com predominância de uma substância em detrimento de outra, como demonstra a espécie *P. hispidinervum* nativa do Estado do Acre, que possui um quimiotipo rico em safrol (72,3%-97,3%), e outro com a miristicina (71,2%) como substância principal e pouco safrol (18,4%) (ANDRADE et al, 2009).

Várias espécies podem ter o mesmo composto como componente majoritário, pois a presença de uma substância e sua variabilidade é influenciada por fatores biológicos ou abióticos (LIMA et al, 2003), como demonstra o estudo das folhas e galhos da espécie *P. krukoffii* coletada na Floresta Nacional dos Carajás (Pará), que investigada quanto ao óleo essencial apresentou também a miristicina entre os constituintes com maior porcentagem (40,3% e 26,7%, respectivamente) (SILVA et al, 2011).

Mundina et al (1998), analisou o óleo essencial de *P. obliquum*, proveniente do Panamá, e os constituintes majoritários também divergiram do presente estudo. O β-cariofileno foi a substância principal (27.6%), constituinte não encontrado para *P. obliquum* coletada na ESEC Cuniã, apesar de ser um terpeno comum nas piperáceas amazônicas (MAIA & ANDRADE, 2009). Outros levantamentos das composições químicas dos óleos essenciais das piperáceas tem demostrado que o β-cariofileno é uma substância comum neste táxon (MUNDINA et al, 1998; SUMATHYKUTTY et al, 1999; POTZERNHEIM et al, 2006).

O segundo constituinte do óleo essencial do espécime do Panamá foi o sesquiterpeno oxigenado, óxido de cariofileno (8.3%) (MUNDINA et al, 1998), substância presente em oito espécies de piperáceas analisadas por Mesquita et al (2005) e presente no óleo essencial dos espécimes coletados na ESEC-Cuniã, porém em baixa concentração (0,13-1,60%).

Algumas substâncias de *P. obliquum* do Panamá como o espatulenol (10,60%), o β-bourboneno (1,30%) (MUNDINA et al, 1998) foram encontradas apenas no óleo essencial obtido no mês de agosto em baixas concentrações (1,00% e 0,30%, respectivamente). Os frutos de *P.tuberculatum* também possuem estes compostos (5,3% e 2,8%, respectivamente) (FACUNDO et al, 2008).

Vários compostos são comuns entre *P.obliquum* do Panamá e da ESEC-Cuniã, como o β-elemeno, δ-cadineno. Algumas das substâncias em comum entre estes países são encontradas em outras piperáceas como em *P. renitens*, que possui como principais constituintes o guaiol (13%), Germacreno D (13.8%), α-pineno (12%) e β-pineno (12,3%) (SOLEANE et al, 2007).

As variações do cadineno e cariofilano são substâncias recorrentes em *P.obliquum*, estes compostos são considerados entre os principais sesquiterpenos bicíclicos e possuem atividades farmacológicas (COSTA, 1994). O cadineno está entre os sesquiterpenos mais comuns entre as essências, ele possui o núcleo comum ao cadinano, mas com as duplas ligações em locais diferentes, sintetizando assim, várias formas de cadineno.

O farnesol (2,6,10-trimetil-2,6,10-dodecatrieno-12-ol) é apontado como um precursor de sesquiterpenos monocíclicos, através da perda de água, sendo os principais o bisabolano,

germacreno e humulano. O humuleno é um hidrocarboneto monocíclico, foi isolado pela primeira vez de *Humulus Lupulus* (COSTA, 1994), posteriormente foi encontrada em várias plantas, como *P. hostimanianum* (MORAIS et al, 2007).

Das substâncias químicas de *P. obliquum* coletada na ESEC-Cuniã, apenas seis são comuns para os todos os outros espécimes já pesquisados (MUNDINA et al, 1998; MAYER et al, 2008; GUERRINI et al, 2009) (Tabela 5).

Tabela 5: Composição química do óleo essencial de *P. obliquum*: substâncias em comum

Substância	Brasil - ESEC-Cuniã (%)	Panamá (%)	Costa Rica (%)	Equador (%)
α-pineno	26,60 - 37,70	0,20	20,67	1,75
β-pineno	16,40 - 17,50	0,20	12,43	2,01
α-copaeno	0,07 - 0,17	5,60	11,78	0,50
α-humuleno	0,33 - 0,70	2,30	< 0,01	0,09
γ-muuroleno	0,04 - 0,18	0,60	1,06	0,24
α-muuroleno	0,20 - 0,70	0,80	7,61	0,32

Cores em destaque por concentração: preto = baixíssima; azul = baixa; vermelho = alta.

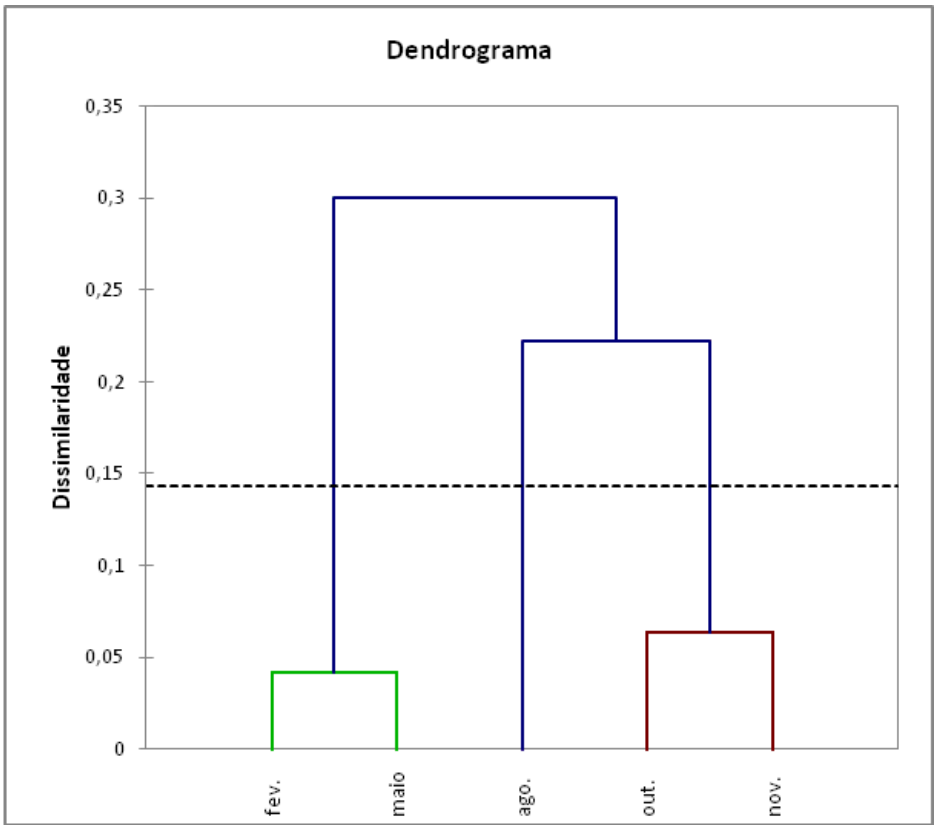
A divergência na composição do óleo essencial dos espécimes de *P. obliquum* dos quatro países pode estar correlacionada a diferenças de pressão ambiental, fatores genéticos e estágio de vida (MORAIS, 2009[1]).

4.2 Relação entre Amostra, Concentração e Substância

O complexo fator biótico e abiótico tem a capacidade de influenciar nos componentes químicos do óleo essencial, pela adaptação fisiológica das plantas em resposta as condições oferecidas. Estas adaptações revelam diferentes composições químicas determinando assim os quimiotipos (ODUM, 1971; ANVISA, 2005; MELO, 2010).

Os resultados obtidos a partir da aplicação da técnica CAH baseada nos constituintes químicos dos óleos essenciais coletados nos diferentes períodos, estabeleceu nitidamente a formação de dois grupos, representados pelas amostras dos meses de fevereiro e maio (2012), e o outro por outubro, novembro (2011) e agosto (2012), o que evidencia a influência sazonal nos compostos predominantes de *P.obliquum*. O resultado da análise está apresentado no dendograma 1.

Dendograma 1: Resultado da classificação por (CAH).



O grupo formado pelas amostras dos períodos de fevereiro e maio é o que possui mais características em comum, possuindo o menor intervalo (0,042) de similaridade (Tabela 6). Nestes períodos há a presença das mesmas substâncias, e também oito destas apresentaram um padrão de variação semelhante, com seu menor teor no mês de fevereiro e um aumento na concentração no mês de maio, sendo que muitos compostos apresentaram valores baixíssimos no óleo essencial e poucos exibiram altas concentrações, como é o caso do α-pineno, canfeno e β-pineno.

A maior diferença está entre os períodos de fevereiro e agosto (0,269%), este apresentou o óleo essencial com o maior quantitativo de substâncias (40) e a amostra proveniente daquele foi o de menor quantidade (32). Nestes meses os fatores abióticos: chuva *versus* seca são opostos. A disponibilidade de água no ambiente contribui na delimitação de produção de compostos primários (RAVEN & ZEDLER, 2007), o que influencia diretamente na formação de produtos da rota metabólica secundária (SANTOS, 2004).

Os meses de outubro, novembro e agosto, apesar de formar um grupo se divide em 2 classes, pois há uma distância significativa entre eles, sendo 0,185 e 0, 181%, outubro e novembro, respectivamente, em relação a agosto.

Tabela 6: Resultado da matriz de proximidade (distância de Bray e Curtis), aplicada para as 5 unidades amostrais de *P.obliquum* usando dados de teor das substâncias

	out.	nov.	fev.	maio	ago.
out.	0	0,063	0,130	0,124	0,185
nov.	0,063	0	0,161	0,152	0,181
fev.	0,130	0,161	0	0,042	0,269
Maio	0,124	0,152	0,042	0	0,264
ago.	0,185	0,181	0,269	0,264	0

Out. =outubro; Nov. = novembro; fev. = fevereiro; ago. = agosto.

Pode ser verificado, da mesma forma, a nítida divisão dos grupos em classes pela observação dos valores máximos das concentrações das substâncias e os desvios padrão (tabela 7).

Tabela 7: Estatística descritiva, aplicada para as 5 unidades amostrais de *P.obliquum* usando dados de teor das substâncias

Variável	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
out.	0,000	28,300	2,154	5,641
nov.	0,000	26,600	2,167	5,459
fev.	0,000	37,100	2,231	6,997
maio	0,000	37,700	2,296	6,994
ago.	0,000	23,800	2,119	4,615

Destaque de cores para as classes: 1 = verde; 2 = amarelo; 3 = azul.

As substâncias que apresentaram um médio e alto teor no óleo essencial (Tabela 2) são as principais responsáveis por definir os grupos. Estas possuem valores próximos em relação às concentrações, tanto entre o grupo formado pelas amostras 3 e 4 (fev/maio), quanto para o grupo formado pelas amostras 1, 2 e 3 (out./nov. e ago.), com exceção do β-pineno que apresentou pouca variação entre os meses de outubro, novembro, fevereiro e maio.

O α-pineno e o limoneno foram as substâncias que apresentaram a diferença mais visível entre os meses de outubro (28,3%; 4,8%), novembro (26,6%; 5,7%), fevereiro (37,1%;

3,9%), maio (37,7%) e agosto (23,8%; 4,3%), elas representam compostos de alta e média concentração. Apesar de estas substâncias serem as responsáveis pela separação dos grupos (1, 2, 5 e 3, 4), os componentes de baixa concentração também são determinantes importantes na divisão das classes.

Algumas substâncias foram identificadas apenas no mês de agosto, como o 1,8-cineol, bourboneno, α-calacorene, elemol, espatulenol e meti eugenol. A síntese das substâncias é proveniente de informações genéticas da planta, porém, fatores bióticos ou abióticos possuem a capacidade de redirecionar a rota sintética dos metabólitos secundários (MORAIS, 2009²).

O composto precursor do limoneno, o terpineol-4 (CRUZ et al, 2011), exibiu baixa concentração (0,2-0,4%) no resultado da presente análise e também para o espécime do Equador (0,06%) (GUERRINI et al, 2009). Outras espécies também acumulam pouco este composto, como *P. jacquemontianum* (0,1%), *P. erectipilum* (0,1%), *P. glandulosissimum* (0,3%), *P. divaricatum* (0,1%), *P. marginatum* (0,2%) (ANDRADE et al, 2009).

Alguns compostos não foram identificados em todos os períodos analisados, como é o caso de carotol (0,03%, 0,26% e 0,8%) e α-cadinol (0,3%, 0,75% e 2,3%), que ocorreu nos meses de outubro, novembro e agosto. Estes compostos tiveram ocorrência apenas nos espécimes coletados na ESEC-Cuniã.

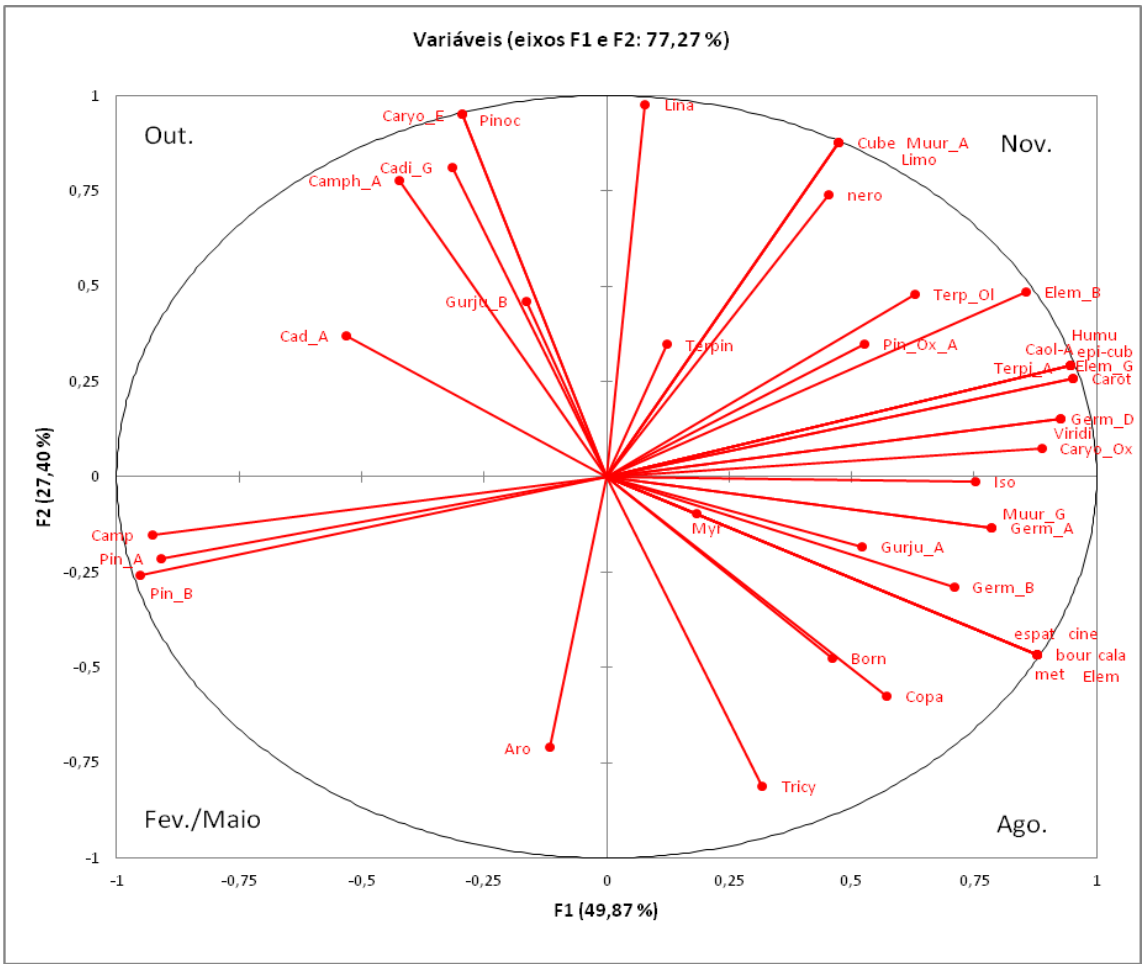
Os resultados da Análise de Componentes Principais (ACP) realizados com dados das substâncias do óleo essencial de *P.obliquum* obtidos em cinco períodos, mostraram que há relação da concentração e presença de muitos compostos químicos com o período de coleta. A análise evidenciou que 77,27% de variação para o primeiro eixo estão relacionadas a uma significativa influência das variáveis na distribuição de substâncias em relação ao período de coleta. Os autovalores, a variância explicada e acumulada, estão descritos na tabela 8.

Algumas substâncias apresentaram variação relacionada às condições ambientais do período de coleta, estas demonstraram possuir correlações positiva e negativa com o período coletado (gráfico 7). A análise, também demonstrou que alguns compostos também estão correlacionados entre si, com um nível de significância de α: 0,05%, tais como: bourboneno, metil-eugenol, elemol, α-calacoreno, 1,8-cineol e espatulenol; e também o α-cadinol, carotol, γ-elemeno, epi-cubebeno, α-humuleno e terpinoleno.

Tabela 8: Resultados da Análise de componentes principais (ACP) com os autovalores e variância explicadas para os 3 primeiros eixos

Eixo	Autovalor	Variância explicada (%)	Variância acumulada (%)
1	26,823	59,606	59,606
2	10,476	23,279	82,886
3	7,701	17,114	100,000

Gráfico 7: Análise de Componentes Principais para os componentes característicos do óleo volátil foliar de *P. obliquum* em função do período coletado. Significados das abreviaturas no Apêndice A.



As cargas das componentes, das quais se observam as variáveis mais importantes, foram mais expressivas para a primeira componente, com destaque para o carotol e α-cadinol; na segunda componente, a principal variável foi o linalol; e na terceira componente apenas o mirceno (Tabela 9).

Tabela 9: Resultado da ACP para as cargas fatoriais das três componentes

Substâncias	CP1	CP2	CP3
Aro	-0,116	-0,711	-0,258
Born	0,459	-0,476	0,233
bour	0,878	-0,466	-0,053
Cad_A	-0,531	0,369	-0,078
Cadi_G	-0,316	0,812	0,352
Caol-A	0,952	0,259	-0,164
cala	0,878	-0,466	-0,053
Camp	-0,926	-0,153	-0,276
Camph_A	-0,422	0,779	-0,436
Carot	0,952	0,259	-0,164
Caryo_Ox	0,888	0,075	-0,093
Caryo_E	-0,295	0,950	0,101
Copa	0,571	-0,576	0,155
cine	0,878	-0,466	-0,053
Cube	0,474	0,877	0,065
Elem	0,878	-0,466	-0,053
Elem_B	0,855	0,485	-0,028
Elem_G	0,947	0,292	0,025
epi-cub	0,947	0,292	0,025
espat	0,878	-0,466	-0,053
Germ_A	0,786	-0,133	0,585
Germ_B	0,711	-0,289	-0,154
Germ_D	0,926	0,153	0,276
Gurju_A	0,522	-0,184	0,651
Gurju_B	-0,165	0,460	0,778
Humu	0,947	0,292	0,025
Iso	0,752	-0,013	-0,656
Limo	0,474	0,877	0,065
Lina	0,078	0,978	-0,114
met	0,878	-0,466	-0,053
Muur_A	0,474	0,877	0,065
Muur_G	0,786	-0,133	0,585
Myr	0,183	-0,097	0,941
nero	0,453	0,739	0,316
Pin_A	-0,909	-0,214	0,344
Pin_B	-0,952	-0,259	0,164
Pin_Ox_A	0,526	0,349	-0,762
Pinoc	-0,295	0,950	0,101
Terp_Ol	0,630	0,478	-0,439
Terpi_A	0,947	0,292	0,025
Terpin	0,122	0,347	-0,929
Tricy	0,316	-0,812	-0,352
Viridi	0,926	0,153	0,276

CP1= componente principal 1; CP2= componente principal 2; CP3= componente principal 3; Significado das abreviaturas no Apêndice A. Destaque em vermelho para as principais componentes.

As substâncias em destaque da CP1 apresentam correlação positivas entre si, ou seja, possuem o mesmo comportamento de variação ao longo do tempo, e várias destas, possuem correlação positiva com o período de agosto. Todas as substâncias destacadas da CP2 possuem suas maiores concentrações no mês de novembro, com exceção do γ-cadineno e nerolidol que possuem maior teor no mês de outubro, porém, esta diferença não é significativa, pois pela análise hierárquica podemos verificar que, estes meses estão agrupados em uma mesma classe. A CP3 evidenciou o mirceno como componente principal, ele teve o seu maior teor no mês de maio, esta substância é uma das que não apresentaram variação significativa ao longo do tempo (3,2% - 3,7%), como pode se visualizado na tabela 2.

O α-pineno, β-pineno e outras substâncias exibiram correlação positiva com os meses de fevereiro e maio, e correlação negativa com os meses de outubro e novembro. Portanto, estes compostos químicos apresentaram uma influência diretamente proporcional com o mês de fevereiro, ao contrário do limoneno que nesses períodos apresentam suas menores concentrações (gráfico 7/tabela 2).

Algumas piperáceas da Amazônia possuem alto teor de α-pineno e β-pineno, em detrimento do limoneno, como é o caso da *P. anonifolium* (53,1%; 22,9%; 1,7%,) e *P. hostimanianum (*45,6%; 6,1%; 5,7%), respectivamente (ANDRADE et al, 2009).

Outras piperáceas revelam que quando o limoneno está com altíssimo teor, o α-pineno e o β-pineno possuem baixa concentração. Espécimes de *P. demeraranum* e *P. tuberculatum* apresentaram este padrão de variação, no entanto, este modelo não é identificado em todas as plantas deste gênero (ANDRADE et al, 2009).

Influências ambientais dos períodos de fevereiro-maio, provavelmente não interferiram na concentração de algumas substâncias do presente estudo, como o β-pineno, pois este permaneceu constante (17,5%), e o α-pineno, que evidenciou sua maior concentração em maio (37,7%) e um valor aproximado no período de fevereiro (37,1%). Na avaliação sazonal dos compostos do óleo essencial da espécie *Eugenia neonitida*, o α-pineno teve a sua maior concentração no mês de fevereiro (3,1%) (DEFAVERI, 2011), o que sugere que as condições deste período favorece o aumento de sua concentração.

Lima et al (2003) afirma que a maioria das espécies apresenta um padrão de diminuição na produção de monoterpenos frente a baixa intensidade luminosa. Porém, a maioria dos estudos é realizada em regiões com condições diferentes da região amazônica, este modelo provavelmente não se aplica para espécimes amazônicos, pois o α-pineno, β-pineno e limoneno são todos da classe dos monoterpenos e apresentaram repostas diferentes em relação ao período coletado.

Outras substâncias que possuem uma correlação positiva com o mês de fevereiro são o canfeno e allo-aromandreno (gráfico 7). E as que revelaram uma correlação positiva com o mês de outubro foram o trans-pinocarveol E-cariofileno, γ-cadineno, α-canfolenal, β-gurjuneno e α-cadinol.

Entre as várias substâncias que demonstraram possuir uma correlação positiva com os meses de outubro e novembro se destaca o linalol, que apenas nestes períodos fez parte da composição do óleo essencial de *P.obliquum*. O estudo realizado por Mendes et al (2012) verificou que o linalol não ocorreu na composição do óleo essencial da *Dalberguia frutescens* no período de maior precipitação, exibindo seus maiores índices nos meses de menor precipitação e maior insolação.

No presente trabalho o α-terpineol apresentou baixa concentração (0-0,5%) e mostrou uma correlação positiva com o mês de agosto, este composto também estava presente nos meses de outubro e novembro, porém no mês de fevereiro foi ausente, retornando a aparecer no mês de maio (0,03%) (Gráfico 8). Na avaliação sazonal do óleo essencial de *Tetradenia riparia* o α-terpineol demonstra baixo teor em todos os períodos analisados (0,57%-0,83%) com maior concentração no verão (dez.-fev.) (GAZIM et al, 2013).

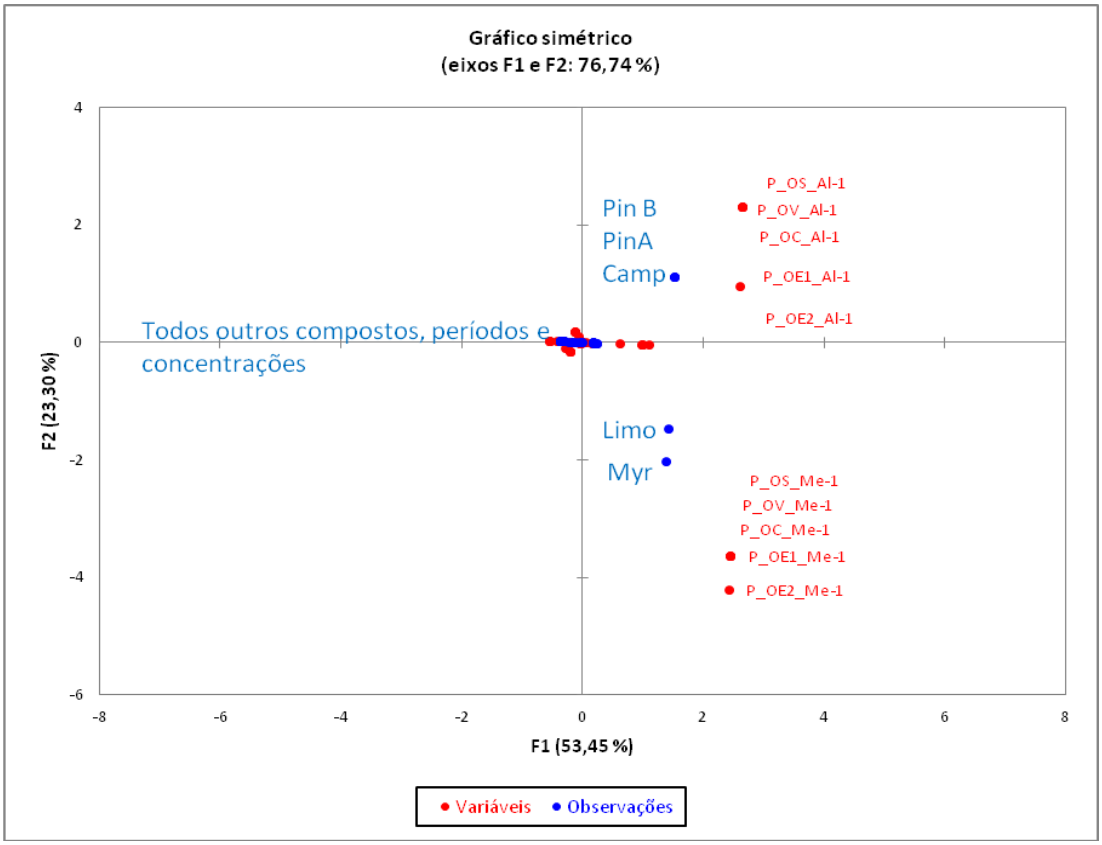
O α-cadinol e o carotol foram identificados apenas nos meses de outubro (0,3%; 0,03%), novembro (0,75%; 0,2%) e agosto (2,3%; 0,8%). Para a espécie *Tetradenia riparia*, este composto apresentou suas maiores porcentagens (8,33%) nos meses de primavera-verão (out.-fev.) (GAZIM et al, 2013).

Através do ACM foi possível verificar que a maioria das substâncias apresentou baixíssimo e baixo teor (gráfico 8), independente do período coletado (Apêndice E).

Os compostos que demonstraram padrões divergentes foram o α-pineno, o canfeno e o β-pineno, apresentando alta concentração (12,5%-37,7%). O limoneno no mês de novembro apresentou um teor alto (5,7%) e concentrações médias para os demais períodos.

O α-pineno foi o composto majoritário para todos os períodos analisados, compreendendo entre 23,8% (Ago.) e 37,7% (Maio). O canfeno mostrou-se como a segunda substância em teor e variou entre 17,1% e 23,5%, para os meses de agosto e fevereiro, respectivamente (Tabela 2). A maioria das piperáceas da região amazônica independente do período coletado apresenta o canfeno em baixa concentração (ANDRADE et al, 2009).

Gráfico 8: Resultado gerado através da ACM, com dados de substâncias.



Abreviaturas no Apêndice A; concentração: Me = média, Al = alta; e período coletado: E1 = outubro, E2 = novembro, C = fevereiro, V = maio e S = agosto.

O mirceno, em todos os períodos analisados apresentou média concentração (3,2%-3,7%), padrão não divergente em outras piperáceas, pois na maioria das espécies seu teor é baixíssimo a médio, com algumas exceções, como em espécimes de *P. kelegianum* (5,2%), *P. hostimanianum* (8,1%) e *P. montealegranum* (13,0%) (ANDRADE et al, 2009).

Os resultados da ACM complementam as observações da ACP, que demonstram a correlação das concentrações das substâncias com os períodos amostrados. A variação das substâncias de *P. obliquum*, em resposta aos períodos de coleta, consolida o princípio que a defesa pelo quimismo é uma das estratégias dos vegetais por não poderem se locomover em busca de condições ambientais melhores para suprir suas necessidades (MORAIS, 2009[2]).

O fator ambiental climático além, de regular o crescimento e a distribuição das plantas, é indispensável para a sobrevivência dos vegetais (LARCHER, 2000).

5 CONCLUSÃO

Todos os compostos presentes no óleo essencial de *P. obliquum* que compreende os meses de outubro e novembro (2011), fevereiro e maio (2012) pertencem à classe dos terpenos, destes a maioria são sesquiterpenos hidrocarbonetos, apesar dos compostos majoritários serem monoterpenos hidrocarbonetos.

Os compostos do óleo essencial do mês de agosto mostraram ser divergente em relação aos dos demais períodos por apresentar cinco substâncias restritas a esta amostra, possuir um fenilpropanóide e diminuir em sua composição a presença de monoterpenos hidrocarbonetos. A dupla rota biossintética de *P.obliquum,* demonstra a plasticidade metabólica dos espécimes frente às pressões ao longo do ciclo climático.

A análise de agrupamento demonstra que houve variabilidade química das concentrações dos compostos nos diferentes períodos e estas parecem estar relacionadas aos fatores abióticos (chuva *versus* seca) dos períodos de outubro e novembro de 2011, fevereiro, maio e agosto de 2012.

Estes resultados são apoiados pelas análises de componentes principais e análise de correspondência múltipla que demonstram também que a maioria das substâncias produzidas foi em baixa (e baixíssima) concentração independente do período coletado.

As substâncias de maior concentração (α-pineno, canfeno, β-pineno e limoneno) demonstraram claramente suas correlações com os períodos coletados. O maior rendimento dos compostos majoritários foi no período chuvoso, provavelmente o sistema hídrico deste período pode ter sido a influência essencial para o aumento da produtividade dos metabólitos secundários.

A variabilidade química de *Piper obliquum* frente às condições climáticas enfatiza a sazonalidade como fator chave na variação das concentrações dos compostos encontrados.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essencial oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy.** Illinois, Allured Pub. Corporation, 1995.

ADDINSOFT, 2004. XIstat for Excel, version 7.5. **Addinsoft**, New York.

AIZZO, JUSSARA ROJAS e SILVA. **O gênero *Piper* L. (Piperaceae) no campus José Ribeiro Filho.** Porto Velho: UNIR, 2011. Monografia (Ciências Biológicas) Núcleo de Ciências Exatas e da Terra. Universidade Federal de Rondônia-UNIR, 2011.

AMARAL, J.H. **Variações diárias, sazonais e intraespecíficas em *Piper solmsianum***.São Paulo: USP, 2008. Dissertação: Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual de São Paulo, 2008.

ANDRADE, E. H.A.; GUIMARÃES, E.F.; MAIA, J.G. S. **Variabilidade Química em Óleos Essenciais de Espécies de Gênero *Piper* da Amazônia**. Universidade Federal do Pará-UFPA, 2009.

_____. ALVES, C.N.; GUIMARÃES, E.F.; CARREIRA,L.M.; MAIA,J.G.S. Variability in Essencial Oil Composition of *Piper dilatatum* L.C. Rich. **Biochemical Systematics and Ecology,** v. 39, p. 669-675, 2011.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 98, de 26 de dezembro de 2005. Disponível em: <http// www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 mar. 2013.

AZAMBUIA, W. Óleos Essenciais. Disponível em: http://www.oleosessenciais.org/tag/alfa-pineno/. Acesso em: 09 maio 2013.

BERGO, L. C.; MENDONÇA, H. A.; SILVA, M. R. Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) no rendimento de óleo essencial. **Acta Amazônica**, v. 35, n.2, p. 111-117, 2005.

BDMTM - Biblioteca Digital de La Medicina Tradicional Mexicana. **Flora Medicinal Indígena de México // zapoteco** Disponível em: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&po=zapoteco&te=Hierba_santa&id=6370&clave_region=4>. Acesso em: 12 abr. 13.

BOTREL, P.P.; PINTO, J.E.B.P.; FERRAZ, V.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FIGUEIREDO, F.C. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

BRASIL, PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. **Plano da Amazônia Sustentável**: diretrizes para o Desenvolvimento Sustentável da Amazônia. Brasília: MMA, 2008.
BRAZ Filho, R. Contribuição da Fitoquímica para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Revista Química Nova**, v.33, n.1, p. 229-239, 2010.

BURGER,W. Piperaceae. **Flora Costaricensis**. Fieldiana: Botany. Field Museum of Natural History Vol.35, 1971.

COLIN, M. The Plant List; WCSP, 2012. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/25001727?tab=distribution> Acesso em: 03 jun. 2012.

COSTA, A.F. **FARMACOGNOSIA.** Fundação Calouste Gulbenkian. v.1, Lisboa, 1994.

CRUZ, S. M.; CÁCERES, A.; ÁLVAREZ, L.; MORALES, J.; APEL, M.A.; HENRIQUEZ, A.T.; SALAMANCA, A.G.; GIMÉNEZ, A.; VÁSQUEZ, Y.; GUPTA, M.P. Chemical composition oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the dichloremethane and methanol extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.21, n.4, p. 587-593, 2011.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio.**Química Nova na escola,** n.7, p.21-25, 1998.

DILL, L.S.M. **Estudo Fitoquímico dos Constituintes Voláteis e Fixos de *Piper hispidinervum* SW. e Avaliação in vitro da Atividade Leishmanicida e Antiplasmodial.** Porto Velho: UNIR, 2009. Dissertação: Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental. Universidade Federal de Rondônia, 2009.

DYER, L. A.; RICHARDS J.; DODSON, C.D. Isolation, Synthesis, and Evolutionary Ecology of Piper Amides. In: _____.; PALMER, A.D.N. **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution.** Kluwer Academic/Plenum Plublishers, 2004.

DEFAVERI, A.C.A.; SATO, A.; BORRÉ, L.B.; AGUIAR, D.L.M.; GIL, R.A.S.S.; ARRUDA, R.C.O.; RIEHL, C.A.S. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (Myrtaceae) Essential Oils: Composition, Seasonality Influence, Antioxidant Activity and Leaf Histochemistry. **Journal Brazilian Chemical Society** v. 22, n. 8, p. 1531-1538, 2011.

FACCHETTI, R. & CADOPPI, A. Análise de Óleos Essenciais por Cromatografia a Gás Ultra-Rápida (ULTRA FAST GC). **Revista Analytica** n.16, p. 63-66, 2005.

FACUNDO, V.A.; REZENDE, C.M.; PINTO, A.C. Essential Oil from *Piper carniconnectivum* C.DC. leaves and stem. **Journal Essential Oil Reserch**, v.18, p. 296-297, 2006.

_____. POLLI, A.R.; RODRIQUES, R.V.; MILITÃO, J.L.S.T.; STABELLI, R.G.; CARDOSO, C.T. Constituintes Químicos Fixos e Voláteis dos Talos e Frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das Raízes de P. hispidum H.B.K. **Acta Amazônica**, v.38, n.4, p. 733-742, 2008.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à Análise Fitoquímica. IN: SIMÕES,M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *orgs.* **FARMACOGNOSIA: Da Planta ao Medicamento** -5 ed.rev.ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

FERREIRA, H.P. **Los Clasificadores Nomminales Del Yanomama de Papiu (Brasil). Centro de Investigaciones y Estudios Superiores en Antropologia Social** (CIESAS). Maestría en Lingüística Indoamericana (MLI). México, 2009, 378p.

FERREIRA, M.I.A. **Trocas Gasosas, Biomassa, Teor e Composição do Óleo Essencial de Folhas e Raízes de *Piper aduncum* L. sob Diferentes Níveis de Luminosidade.** Botucatu: UNESP, 2011. Dissertação (Faculdade de Ciências Agronômicas) Universidade Estadual de São Paulo, 2011.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinérea* F.Mull ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 15, n.3,p. 191-194, 2005.

FRANÇA, Suzelei de Castro. Abordagens Biotecnológicas para a Obtenção de Substâncias Ativas. IN: SIMÕES,M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *orgs*. **FARMACOGNOSIA: Da Planta ao Medicamento.** 5 ed.rev.ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

GAZIM, Z.C.; AMORIM, A.C.L.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M.; NASCIMENTO, I.A.; FERREIRA, G.A.; CORTEZ, D.A.G. Seasonal Variation, Chemical Composition, and Analgesic and Antimicrobial Activities of the Essential Oil from Leaves of Tetradenia *riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. Molecules, 15, 5509-5524; doi: 10.3390/**molecules** 15085509. Disponível em: www.mdpi.com/journal/molecules. Acesso em: 30 maio 2013.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N.P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Revista Química Nova**, v. 30, n 2, p. 374, 2007.

GONÇALVES, H.P. **Avaliação da Atividade leishmanicida de bioativos da Amazônia, extraídos de *Piper aleyreanum* e *Piper carniconnectivum* contra *Leishmania amazonensis* *"in vitro".*** Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental. Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; ELSTENER, E.F. Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 471–478, 2002.

GREIG, N.; Introduction. In: Dyer, L. A. & Palmer, A. D. N (ed.). **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004.

GUERRINI, A. ; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADO, M.E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Equador. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.27, p. 39–48, 2009.

GUIMARÃES, E.F. CARVALHO-SILVA, M., MONTEIRO, D., MEDEIROS, E.S. 2013. Piperaceae in **Lista da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB12824>. Acesso em: 14 mar. 2013.

HARMER, S.L.; HOGENESCH, J.B.; STRAUME, M.; CHANG, H.S.; HAN, B.; ZHU, T.; WANG, X.; KREPS, J.A.; KAY, S.A. Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock. **Science,** v. 290, p. 2110-2113, 2000.

HIPPOLYTO, R. & PAVON, J. **Peruvianarum, Et Chilensis**. Regiae Academiae Medicae Matritensis. 2 ed, Botanicis, Romae, 1797, 222p.

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

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal.** RiMa. São Carlos, SP, 2000.

LEITE, M. A.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; DINIZ, M.F.F.M.; TRAJANO, V.M.; MEDEIROS, I.A. Inhibitory effect of β-pineno, α-pinene and eugenol on the grouth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n1, p. 121-126, 2007.

LIMA, H.R.P.; KAPLAN, M.A.C.; CRUZ, A.V.M. Influência dos Fatores Abióticos na Produção e Variabilidade de Terpenóides em Plantas. Floresta e Ambiente, v.10, n.2, p.71-77, 2003.

MAIA, J.G.S. & ANDRADE, E.H.A. **Database of the Amazon Aromatic Plants and Their Essential Oils**. Química Nova, v.32, n.3, p. 595-622, 2009.

_____. SILVA, M.L.; LUZ, A.I.R.; ZOGHBI, M.G.B.; RAMOS, L.S. Espécies de Piper da Amazônia Ricas em Safrol. **Revista Química Nova**, v.10, n.3, p. 200-204, 1987.

MACHADO, M.P.; BERGO, C.L.; DESCHAMPS, C.; BIZZO, H.R.; BIASI, L.A. Efeito da secagem natural e artificial da biomassa foliar de Piper hispidinervum na composição química do óleo essencial. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.1, p. 265-270, 2013.

MAGNUSSON, W.E.; LIMA, A.P.; LUIZÃO, R.; COSTA, F.R.C.; CASTILHO, C.V.; KINUPP, V.F. RAPELD: uma modificação do método de Gentry para inventários de biodiversidade em sítios para pesquisa ecológica de longa duração. **Biota Neotropica**, v.5, n.2, p. 1-6, 2005.

MARTÃO, V.M. Análise da capacidade antioxidante do óleo essencial de *Piper obliquum* Ruiz et Pav. (dados não publicados), 2012.

MARTINS, A.P.; SALGUEIRO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; CAÑIGUERAL, S.; CASANOVA, J.; CUNHA, A.P.; ADZET,T. Essential Oils From Four Piper Species. **Phytochemistry**, v.49, n7, p. 2019-2023, 1998.

MARTINS-DA-SILVA, R.C.V. **Coleta e Identificação de Espécimes Botânicos.** EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. Belém-Pará, 2002.

MAYER, V.; SCHABER, D.; HADACEK, F. Volatiles of myrmecophytic *Piper* plants signal stem tissue damage to inhabiting *Pheidole* ant-partners. **Journal of Ecology,** v.96, p. 962-970, 2008.

MELO, R.S. **Efeito Inseticida das Frações Hexânica, Etérea e Etanólica de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae), Sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Teresina, Piauí, 2010.

MENDES, C.E.; CASARIN, F.; OHLAND, A.L. Efeitos das Condições Ambientais sobre o Teor e Variabilidade dos Óleos Voláteis de *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae). **Revista Química Nova**, v.35, n. 9, p. 1787-1793, 2012.

MENSOR LL, MENEZES FS, LEITÃO GG, REIS AS, DOS SANTOS TC, COUBE CS, LEITÃO SG. Screning of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Reserch** 15: 127-130 , 2001.

MESQUITA, J.M.O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v. 15, n.1, p.6-12, 2005.

MORAIS, L.A.S.[1] Influência dos Fatores Abióticos na Composição Química dos Óleos Essenciais. **Revista Horticultura Brasileira** v. 27, n. 2, (Suplemento CD Rom) S4050-4063. 2009.

_____. [2] Óleos Essenciais no Controle Fitossanitário. In: BETTIOL, W. & MORANDI, M.A.B. (ed.). Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. EMBRAPA Meio Ambiente. Jaguariúna, 2009, 414p.

MORAIS, S.; M.; FACUNDO, V.A.; BERTINI, L.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; ANJOS JÚNIOR, J.F.; FERREIRA, S.A.; BRITO, E.S.; SOUSA NETO, M.A. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils from Piper Species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p. 670-675, 2007.

MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; GUPTA, M.P.; ADZET, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Leaf Essential Oils Of Three Panamanian Piper Species**. Journal Phytochemistry**, v.47, n.7, p. 1277-1282, 1998.

ODUM, E.P. **Fundamentos de Ecologia**. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 1971.

OLIVEIRA, Fransisco Ventura. **Avaliação Antioxidante de *Piper* cf. *krukoffi***. Porto velho: UNIR, 2012. Monografia (Departamento de Química) Universidade Federal de Rondônia, 2012.

PESTANA, M.H. & GAGEIRO, J.N. **Análise de Dados para Ciências Sociais:** A complementariedade do SPSS. 5ª ed. Edições Sílabo, Lisboa, 2008.

PLETSCBI, M. Compostos Naturais Biologicamente Ativos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.1, n. 4, p.12-15, 1998.

PPBIO[1] - Programa de Pesquisa em Biodiversidade. Disponível em: <http://ppbio.inpa.gov.br/sitios/cunia/gestaointegrada>. Acesso em: 12 mar. 2012.

PPBIO[2] - Programa de Pesquisa em Biodiversidade. Disponível em: <http://ppbio.inpa.gov.br/sitios/cunia>. Acesso em: 12 mar. 2012.

POTZERNHEIM, M.C.L.; BIZZO, H.R.; VIEIRA, R.F. Analysis of the Essential Oil of Three Species of Piper Collected in the Region of the Distrito Federal (Cerrado – Brazilian Savannah) and Comparison with Oils of Plants from Region of Paraty, State of Rio de Janeiro (Atlantic Rain Forest)**. Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.16, n.2, p.246-251, 2006**.**

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal.** 7ª edição Editora Guanabara Koogan, 2007.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e Domesticação de Plantas Medicinais. IN: SIMÕES,M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *orgs.* **FARMACOGNOSIA:** Da Planta ao Medicamento. 5 ed.rev.ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

ROPKE, C.D.; OSTROSKY, E.A.; KANEKO, T.M.; CAMILO,C.M..; SAWADA, T.C.H.; BARROS. Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α-tocoferol e 4-nerolidilcatecol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 39, n. 2, p. 209-217, 2003.

SANTOS, Rosana Isabel. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES,M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *orgs.*. **FARMACOGNOSIA:** Da Planta ao Medicamento. 5 ed.rev.ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SANTOS, S.A.; ALVES, S.M.; FIGUEIREDO, F.J.C.; ROCHA NETO, O.G. Descrição de Sistemas e Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **Comunicado Técnico 99.** Embrapa Amazônia Oriental, 2004.

SILVA, J.K.R.; ANDRADE, E.H.A.; KATO, M.J.; CARREIRA, L.M.M.; GUIMARÃES, E.F.; MAIA, J.G. Antioxidant Capacity and Larvicidal and Antifungal Activities of Essential Oils and Extracts from Piper krukoffii. **Natural Products Communications,** v. 6, n. 9, p. 1361-1366, 2011.

SILVA, A. C. P. R & OLIVEIRA, M. N. Caracterização botânica e química de três espécies do gênero Piper no Acre. Embrapa Acre. **Boletim de Pesquisa** n. 23, janeiro, 2000.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira & SPITIZER, Volker. Óleos Voláteis. In:_____. SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. orgs. **FARMACOGNOSIA:** Da planta ao Medicamento. 5 ed.rev.ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SOLEANE, H.; AZEVEDO, M.S.; FACUNDO, V.A. Essential Oil of *Piper renitens* (Miq.) Yuncker Leaves and Stems (Piperaceae) from Brazilian Amazonian Forest. **Journal Essential Oil Resesearch,** v. 19, p. 557–558, 2007.

SOUZA Filho, A.P.; VASCONCELOS, M.A.M.; ZOCHBI, M.G.B.; CUNHA, R.L. Efeitos potencialmente alelopáticos dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC. e *Pogostemon heyneanus* Benth sobre plantas daninhas. **Acta Amazônica** v.39, n.2, p. 389-396, 2009.

SUMATHYKUTTY, M.A.; MADHUSUDANA, R.; PADMAKUMARI, K.P.; NARAYANAN. Essential Oil Constituents of Some Piper Species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p.279-282, 1999.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2009.

TEBBS, M.C. Revision of Piper (Piperaceae) in the New World. 1. Review of characters and taxonomy of Piper section Macrostachys. **Bull. Br. Mus. (Nat. His.)** Bot. v.19, p. 117-158. 1989.

TEIXEIRA, SIRLEI DIAS. **Estudo Fitoquímico de *Piper gaudichaudianum* e sua Interação com Morcegos Frugívoros**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Área de Concentração: Química Orgânica. Curitiba-PR, 2003.

UIEDA, W.; SATO, T.M.; CARVALHO, M.C.; BONATO, V. Fruits as unusual food items of the carnivorous bat Choropterus auritus (Mammalia, Phillostomidae) from southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia,** v. 24, n.3, p. 844-847, 2007.

VALADEAU, C.; CASTILLO, J.A.; SAUVAIN, M.; LORES, A.F.; BOURDY, G. The Rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanesha (Amuesha), an Amazonian Peruvian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology,** v.127, p. 175-192, 2010.

VALENTIN, J.L. **Ecologia Númerica:** Uma Introdução à Análise multivariada de dados ecológicos. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2000.

VALENTINI, C.M.A.; SILVA, L.E.; MACIEL, E.N.; FRANCESCHINI, E.; SOUSA Jr., P.T.; OGLIO, E.L.D.; COELHO, M.F.B. Variação Annual do Rendimento e Composição Química dos Componentes Voláteis da *Siparuna guianensis* AUBLET. Revista Química Nova, v.33, n.7, p.1506-1509, 2010.

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

VIEGAS Jr., C. Terpenos com Atividade Inseticida: uma Alternativa para o Controle Químico de Insetos **Revista Química Nova,** v. 26, n.. 3, p. 390-400, 2003.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Documentos 316.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.

WADT, L. H. O. & KAGEYAMA, P. Y.; Estrutura Genética e Sistema de Acasalamento de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n.2, p. 151-157, 2004.

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

ZOLLO, P.H.A.; BIYITI, L.; TCHOUMBOUGNANG, C.M.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BOUCHET, P.H. Aromatic Plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical Composition and Antifungal Activity of Thirteen Essential Oils from Aromatic Plants of Cameroon. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, p. 107-114, 1998.

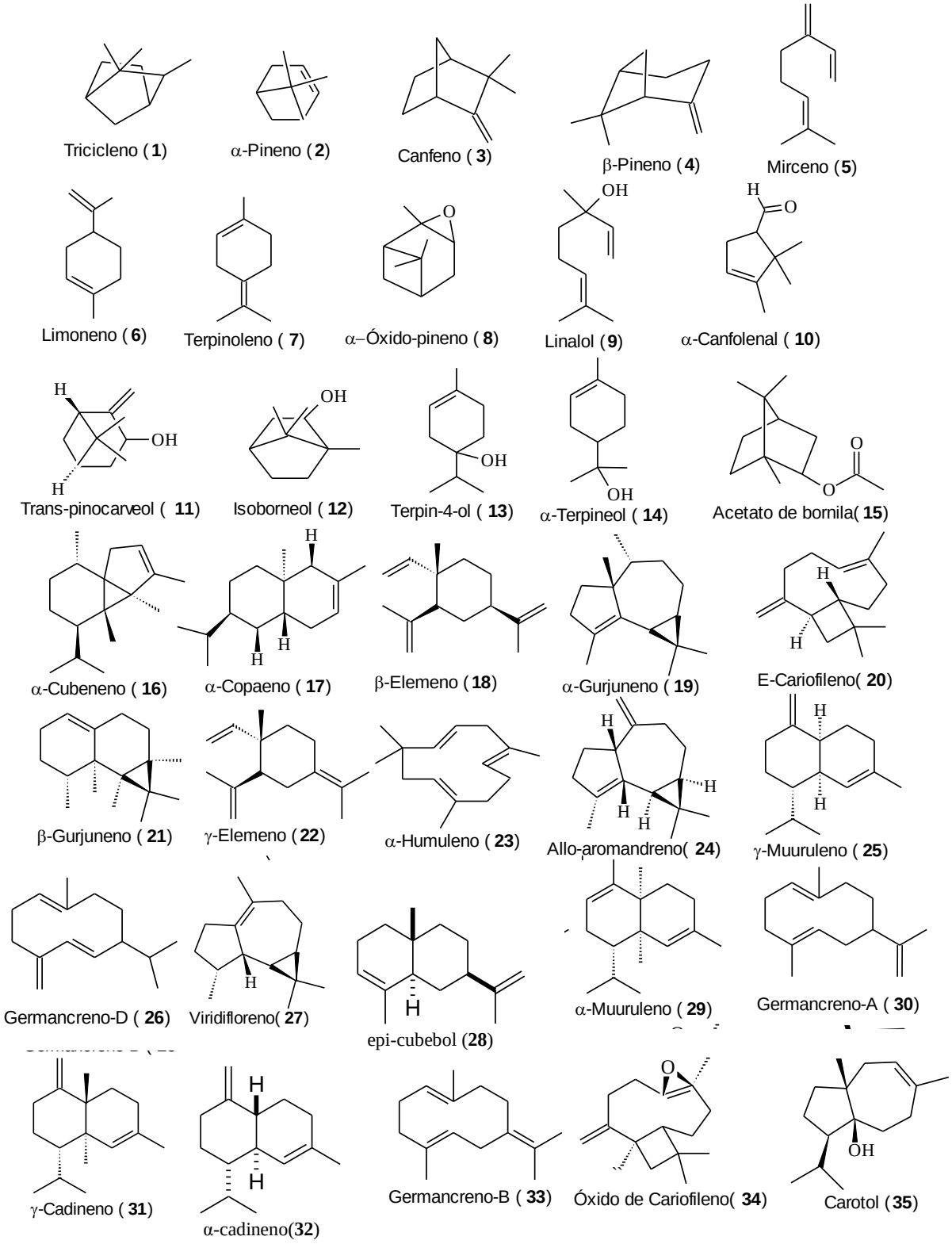
APÊNDICE

APÊNDICE A-Dados da Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

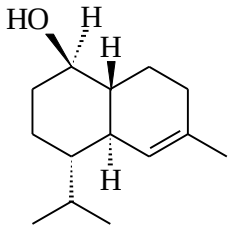
Nº Estr.	**TR**	**IR**	**IR (Lit.)**	**Composto**	**ABR**
1	10,713	909	926	Tricicleno	Tricy
2	11,753	931	939	α-pineno	Pin_A
3	12,490	945	953	Canfeno	Camp
4	14,051	973	980	β-pineno	Pin_B
5	15,015	989	991	Mirceno	Myr
6	17,190	1022	1031	Limoneno	Limo
37	17,242	1019	1033	1,8-cineol	Cine
7	20,906	1072	1088	Terpinoleno	Terpin
8	21,454	1078	1095	Óxido de α-pineno	Pin_Ox_A
9	21,861	1083	1098	Linalol	Lina
10	23,459	1101	1125	α-canfolenal	Camph_A
11	24,168	1112	1139	Trans-pinocarveol	Pinoc
12	26,049	1138	1156	Isoborneol	Iso
13	26,872	1149	1177	Terpin-4-ol	Terp_Ol
14	27,817	1161	1189	α-terpineol	Terpi_A
15	34,209	1248	1285	acetato de bornila	born
16	38,275	1304	1351	α-cubebene	Cube
17	39,864	1332	1376	α-copaeno	Copa
38	40,271	1337	1384	β-bourboneno	bour
18	40,989	1352	1391	β-elemeno	Elem_B
39	41,481	1358	1401	metil-eugenol	met
19	41,953	1368	1409	α-gurjuneno	Gurju_A
20	42,549	1378	1418	(E)-cariofileno	Caryo_E
21	43,126	1387	1432	β-gurjuneno	Gurju_B
22	43,532	1395	1433	γ-elemeno	Elem_G
23	44,610	1409	1454	α-humuleno	Humu
24	45,007	1415	1461	Allo-aromandreno	Aro
25	46,113	1429	1477	γ-muuroleno	Muur_G
26	46,303	1432	1480	Germacreno- D	Germ_D
27	45,577	1435	1493	Viridifloreno	Viridi
28	47,163	1443	1494	epi-cubedol	epi-cub
29	47,560	1448	1499	α-muuroleno	Muur_A
30	47,721	1450	1503	Germacreno- A	Germ_A
31	48,326	1457	1513	γ-cadineno	Cadi_G
32	48,941	1465	1524	α-cadineno	Cad_A
40	49,124	1465	1542	α-calacorene	Cala
41	50,415	1481	1549	elemol	Elem
33	50,690	1486	1556	Germacreno- B	Germ_B
42	51,891	1500	1564	(E)-nerolidol	nero
43	51,989	1502	1576	espatulenol	espat
34	52,184	1507	1581	Óxido de cariofileno	Caryo_Ox
35	55,559	1577	1594	Carotol	Carot
36	56,269	1591	1653	α-cadinol	Caol-A

Nº Estr. = número da estrutura no Apêndice B; TR = tempo de retenção; IR = índice de retenção; IR (Lit.) = índice de retenção na literatura (ADAMS, 1995); ABR = abreviatura do nome da substância.

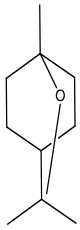
APÊNDICE B - Estruturas Químicas do Óleo Essencial



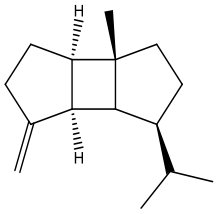
Cont.



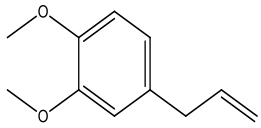
α-Cadinol (**36**)



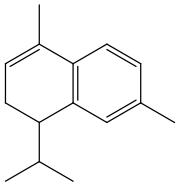
1,8-cineol **(37)**



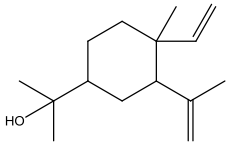
β-bourboneno **(38)**



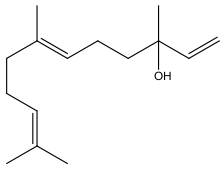
metil-eugenol **(39)**



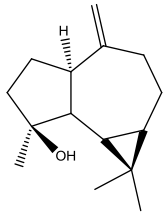
α-calacorene (**40**)



elemol (**41**)

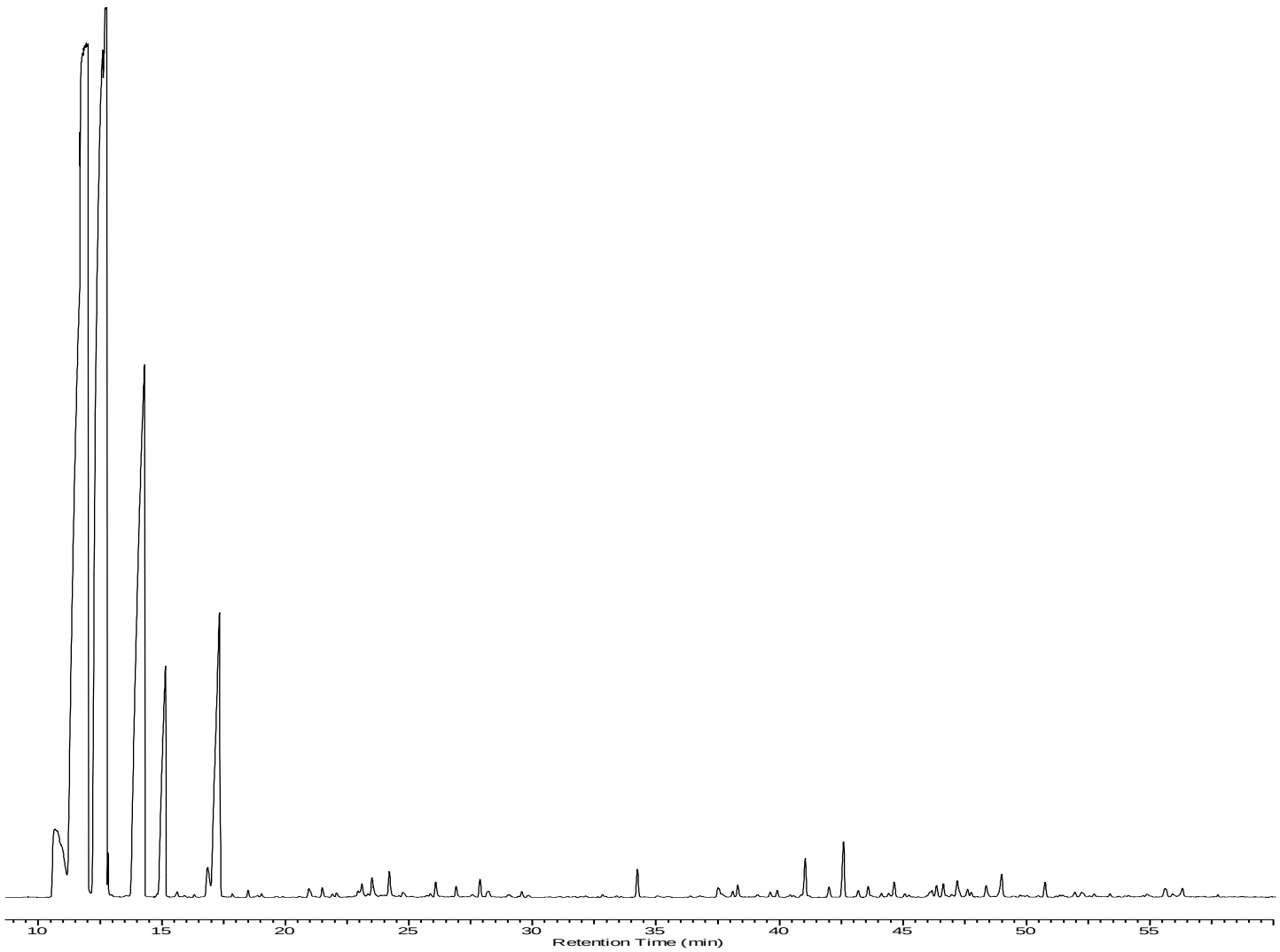


(E)-nerolidol (**42**)



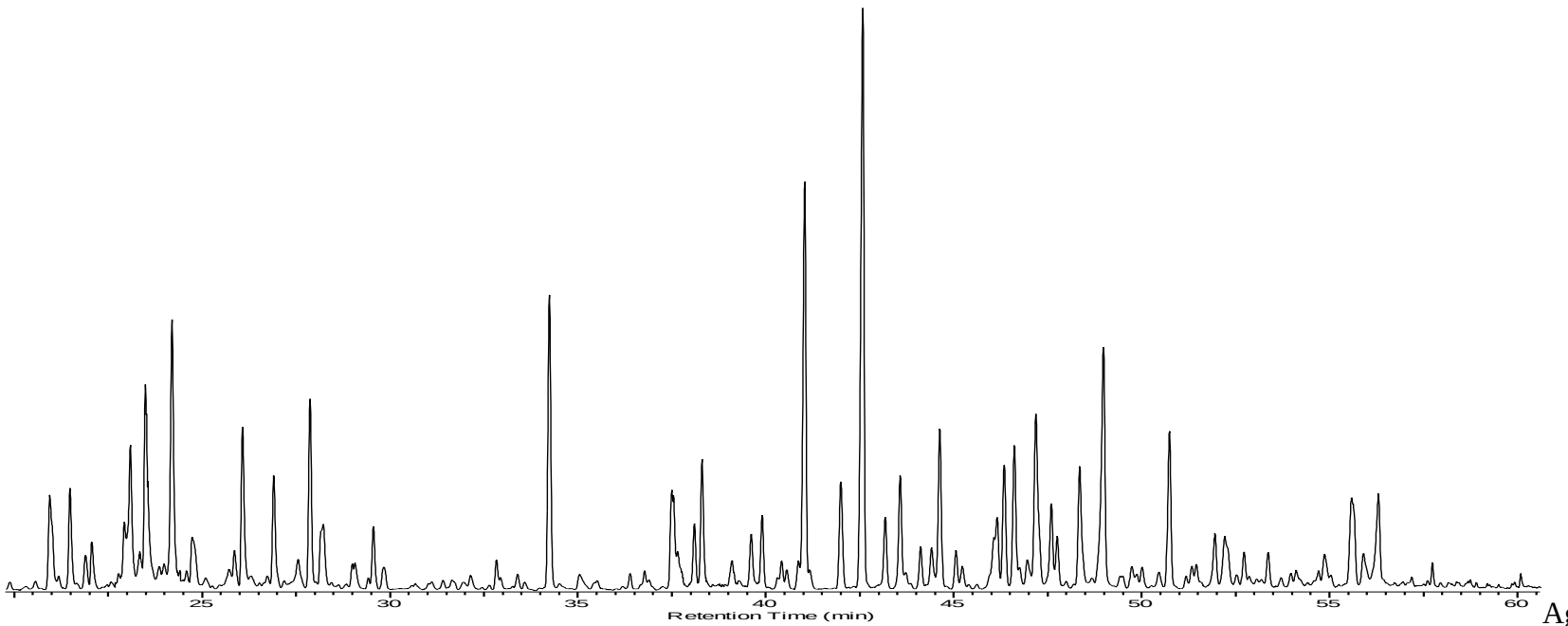
espatulenol (**43**)

APÊNDICE-C- Cromatogramas do óleo essencial de *P.obliquum* analisado por CG e CG-MS.



Obs. PKRU-1 e PKRU-3= cromatograma do óleo essencial de *P.obliquum* dos meses de outubro e fevereiro, respectivamente.

Obs. PKRU-2 e PKRU-4= cromatograma do óleo essencial de *P.obliquum* dos meses de novembro e maio, respectivamente.



Agosto.

APÊNDICE D- Variação dos compostos do Óleo Essencial de *P.obliquum* segundo a classe de substâncias.

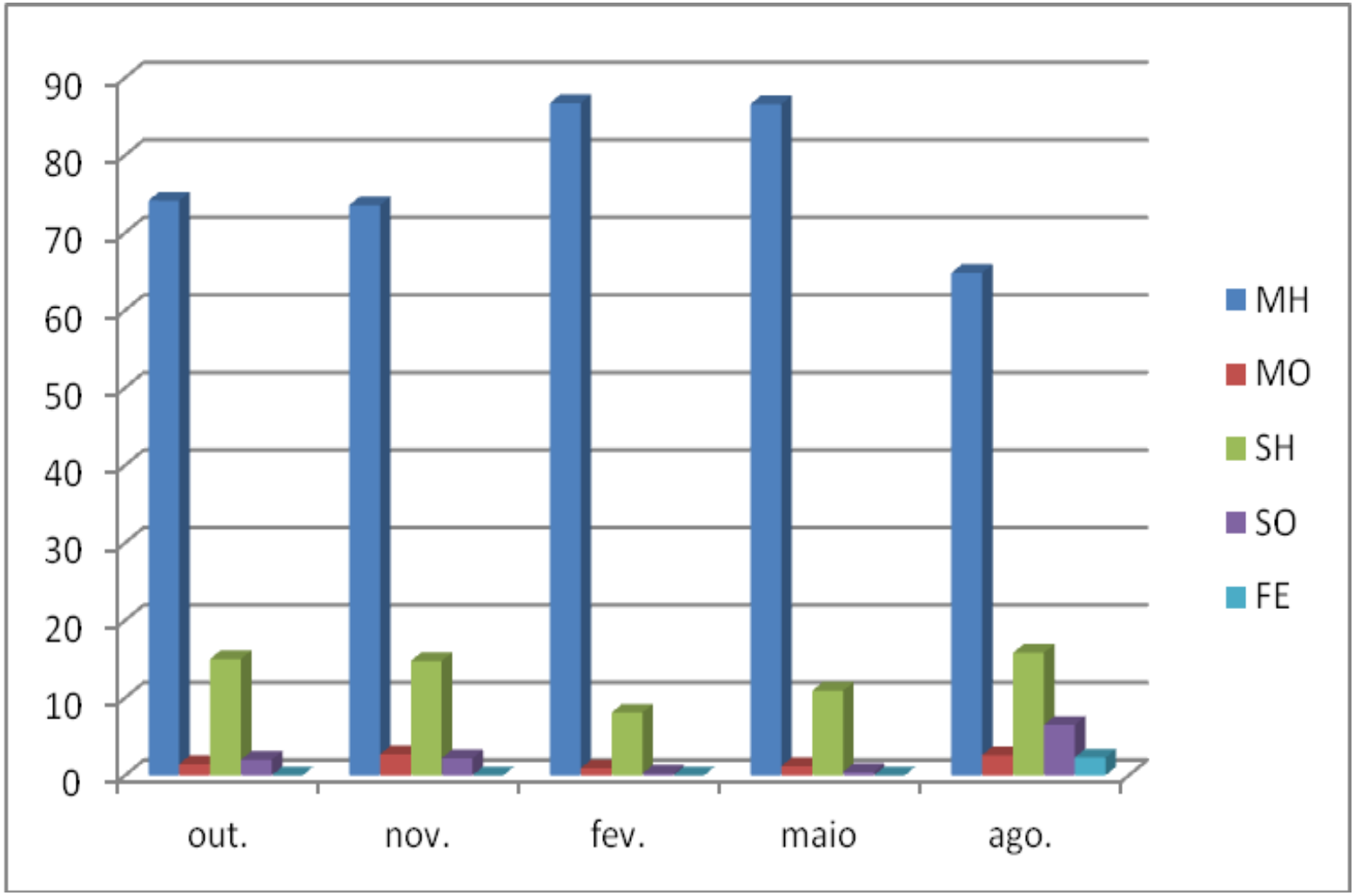


Gráfico 10- Variabilidade das concentrações das classes substâncias de *P.obliquum* em relação aos períodos analisados.out =outubro; nov.= novembro; fev. = fevereiro; ago. = agosto. MH = monoterpeno hidrocarboneto; MO = monoterpeno oxigenado; SH = sesquiterpeno hidrocarboneto; SO = sesquiterpeno oxigenado; FE = fenilpropanóide.

APÊNDICE E- Variação da Composição Química do Óleo Essencial de *P.obliquum.*

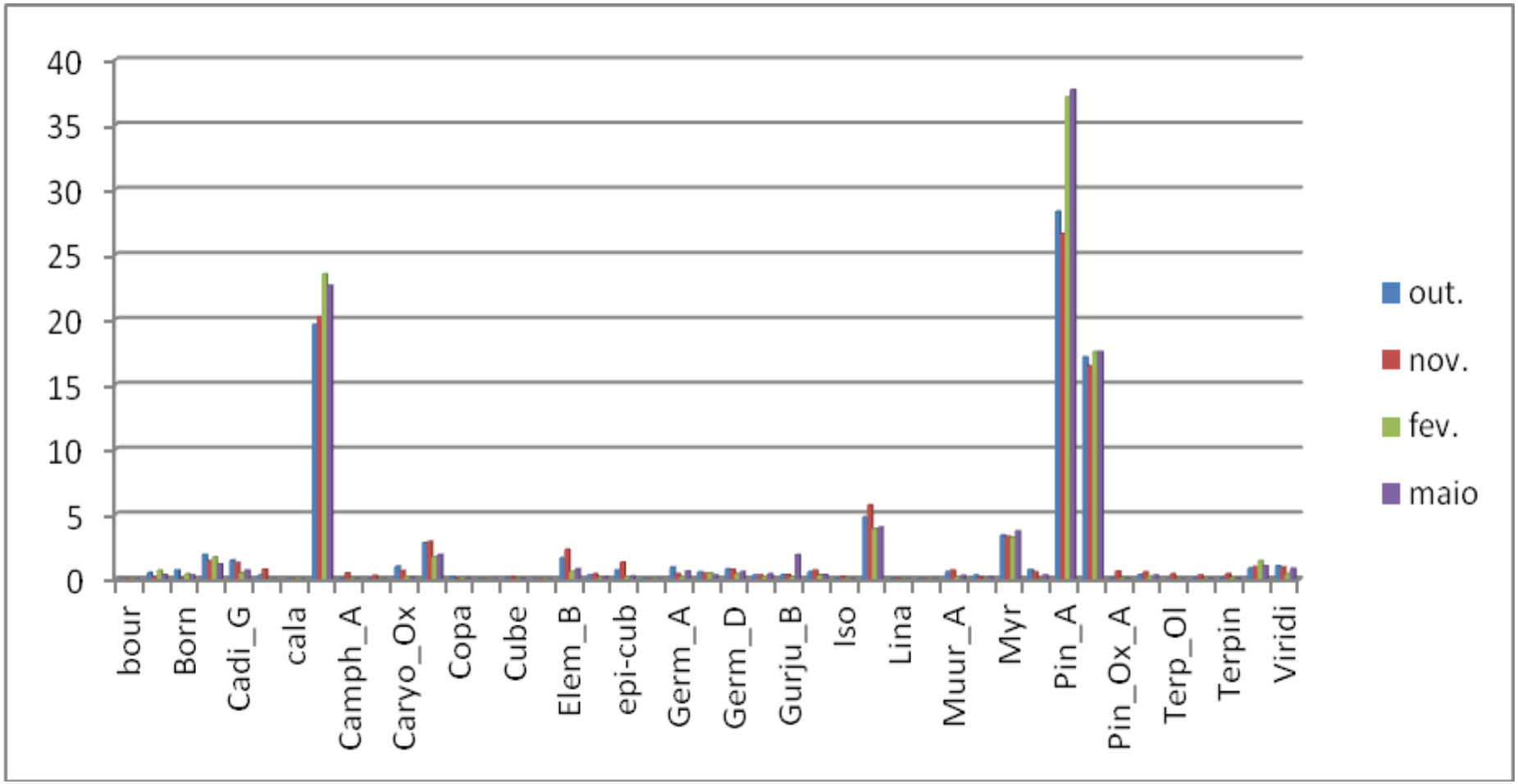


Gráfico 11- Variabilidade das concentrações (%) das substâncias de *P.obliquum* em relação aos períodos analisados. out =outubro; nov.= novembro; fev. = fevereiro; ago. = agosto. Abreviaturas das substâncias no APÊNDICE A.

APÊNDICE F- Fotos da ESEC-Cuniã em alguns períodos de coleta.

Aizzo, C.J. 2011/2012.

ESEC-Cuniã: outubro (2011) e maio (2012), respectivamente.

AIZZO, C.J., 2012.

ESEC-Cuniã: agosto de 2012.