

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SAGRADO CORAÇÃO

MARIANA GILIOLI

Estudo comparativo e identificação dos principais componentes do óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e por Índice de Retenção.

Bauru

Outubro/2021

MARIANA GILIOLI

Estudo comparativo e identificação dos principais componentes do óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e por Índice de Retenção.

Monografia do curso de Engenharia Química apresentado à Programa Institucional de bolsas de Iniciação Científica PIBIC/FAP, referente ao período de Agosto/2020 a Fevereiro/2021, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Telascrea.

Bauru

Outubro/2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

G474e	<p>Gilioli, Mariana</p> <p>Estudo comparativo e identificação dos principais componentes do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> L. (Piperaceae) por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e por Índice de Retenção / Mariana Gilioli. -- 2021. 59f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Marcelo Telascrea</p> <p>Monografia (Iniciação Científica em Engenharia Química) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Cromatografia Gasosa. 2. Índice de Retenção. 3. NIST 62. 4. Óleo essencial. 5. <i>Piper ssp.</i> I. Telascrea, Marcelo. II. Título.</p>
-------	--

Elaborado por Lidyane Silva Lima - CRB-8/9602

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me capacitar a desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Telascrea pela orientação valiosa e imprescindível durante todo desenvolvimento da pesquisa, me dando base e me acompanhando durante todas as atividades, compartilhando seu conhecimento comigo.

Ao Centro Universitário do Sagrado Coração pela oportunidade concedida para realização da pesquisa.

À PIBIC/FAP pelo apoio financeiro.

À banca examinadora pelas críticas e sugestões.

À FCA UNESP de Botucatu – Departamento de Horticultura da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP de Botucatu e aos professores Dra. Jordany Aparecida de Oliveira Gomes e Prof. Dr. Felipe Pereira Giardini Bonfim por permitir utilizar os extratores.

Aos professores César Gaburi (Jardim Botânico de Bauru), Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques (IAC Campinas), Dra. Eliana Maria N. Gabriel e Thiago Roberto Bertola (EMA Botucatu) e Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (IQ Unesp Araraquara) pelo apoio com as coletas das plantas.

À Profa. Dra. Márcia Ortiz M. Marques por me auxiliar na identificação dos principais componentes dos óleos obtidos.

Aos meus pais, irmã e namorado pelo apoio fundamental em todos os momentos, por serem exemplos em minha vida e pelo amor sem fim.

À todos aqueles que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Façamos nosso futuro agora e
façamos dos nossos sonhos a
realidade de amanhã.”

Malala Yousafzai

RESUMO

Esta monografia apresenta as extrações de óleos essenciais de folhas de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) e a identificação dos seus principais componentes por técnicas cromatográficas e por cálculos de índices de retenção. Na primeira etapa do trabalho, realizou-se coleta de folhas frescas de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) em três localidades: Bauru (SP), São Manoel (SP), Botucatu (SP) e em Araraquara (SP). Após as extrações utilizando aparato do tipo Clevenger das amostras obtidas em Botucatu por cromatografia gasosa, foram identificados no total 25 componentes, sendo estes o (E)-nerolidol (34,44%) e o linalool (23,82%) como componentes majoritários, ambos fazem parte de mais de 50% da amostra. A análise da amostra obtida de Araraquara permitiu a identificação de 21 componentes, sendo eles o linalool (8,82%), o safrole (7,22%), a asaricina (42,15%), o n-pentadecano (9,69%) e miristicina (8,87%). No óleo essencial obtido de folhas de Bauru foram identificados no total 26 componentes. Destes, destacam-se o linalool (8,22%), (E)-cariofileno (9,85%), α -humuleno (9,18%), γ -muuroleno (5,25%), o biciclogermacreno (14,49%) e (E) - nerolidol (16,05%). Da amostra de São Manuel de óleo essencial foram identificados no total 15 componentes. Esta amostra foi a que mostrou menor número de substâncias de todos os óleos estudados. Destes, destacam-se o sequiterpeno (E) - nerolidol com 63,79% do óleo. Comparando os 4 óleos essenciais analisados permitiu verificar que os componentes α -pineno, β -pineno, δ -3-careno, limoneno, (E)- β -ocimeno, linalool, (E)- cariofileno, γ -muuroleno e (E)- nerolidol apareceram em todos os óleos essenciais das amostras obtidas de plantas das quatro cidades, porém em composições diferentes. A análise dos dados permitiu verificar que o componente linalool aparece com destaque apenas na amostra da cidade de Botucatu, enquanto que na amostra de Araraquara predomina a asaricina. Já o (E)-nerolidol aparece em todos os óleos essenciais, destacando-se os óleos obtidos de plantas das cidades de Bauru, Botucatu e São Manuel. Em menores concentrações, o biciclogermacreno se destaca na amostra obtida de Bauru. Dessa forma, mesmo com as questões da pandemia do Covid-19, conseguiu-se fechar e atender a todos os objetivos propostos. Assim, os dados sugerem esse óleo essencial deve continuar sendo estudado, pois foram identificadas substâncias de potencial terapêutico interessante.

Palavras-chave: Cromatografia Gasosa. Índice de Retenção. NIST 62. Óleo essencial.

Piper ssp.

ABSTRACT

This monograph presents the extractions of essential oils from leaves of *Piper aduncum* L. (Piperaceae) and the identification of its main components by chromatographic techniques and by calculation of retention indices. In the first stage of the work, fresh leaves of *Piper aduncum* L. (Piperaceae) were collected in three locations: Bauru (SP), São Manoel (SP), Botucatu (SP) and in Araraquara (SP). After extractions using Clevenger-type apparatus from samples obtained in Botucatu by gas chromatography, a total of 25 components were identified, these being (E)-nerolidol (34.44%) and linalool (23.82%) as major components, both are part of more than 50% of the sample. The analysis of the sample obtained from Araraquara allowed the identification of 21 components, namely linalool (8.82%), safrole (7.22%), asaricin (42.15%), and n-pentadecane (9, 69%) and myristicin (8.87%). In the essential oil obtained from Bauru leaves, a total of 26 components were identified. Of these, we highlight linalool (8.22%), (E)-caryophyllene (9.85%), α -humulene (9.18%), γ -muurolene (5.25%), bicyclogermacrene (14.49%) and (E) - nerolidol (16.05%). From the São Manuel sample of essential oil, a total of 15 components were identified. This sample showed the lowest number of substances of all studied oils. Of these, we highlight the sesquiterpene (E) - nerolidol with 63.79% of the oil. Comparing the 4 essential oils analyzed, it was possible to verify that the components α -pinene, β -pinene, δ -3-carene, limonene, (E)- β -ocimene, linalool, (E)-caryophyllene, γ -muurolene and (E) - nerolidol appeared in all essential oils from samples obtained from plants from the four cities, but in different compositions. Data analysis showed that the linalool component is highlighted only in the sample from the city of Botucatu, while in the sample from Araraquara, asaricin predominates. On the other hand, (E)-nerolidol appears in all essential oils, especially those obtained from plants in the cities of Bauru, Botucatu and São Manuel. At lower concentrations, bicyclogermacrene stands out in the sample obtained from Bauru. Thus, even with the issues of the Covid-19 pandemic, it was possible to close and meet all the proposed objectives. Thus, the data suggest that this essential oil should continue to be studied, as substances with interesting therapeutic potential were identified.

Keywords: Gas Chromatography. Retention Index. NIST 62. Essential oil. *Piper* ssp.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
1.1 Óleos Essenciais.....	9
1.2 Funções biológicas e importância dos óleos essenciais	10
1.3 Extração do óleo essencial.....	12
1.3.1 Hidrodestilação.....	12
1.4 Análises de óleos essenciais.....	13
1.5 O gênero Piper	15
1.6 <i>Piper aduncum</i> L.....	16
1.7 Óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> L.....	17
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Aquisição do material vegetal – coletas.....	19
3.2 Preparo do material vegetal	20
3.3 Extração dos óleos essenciais.....	20
3.4 Preparo das amostras de óleo essencial.....	21
3.5 Análises por Cromatografia Gasosa (CG) e por Espectrometria de Massas (CG-EM)	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
4.1 Material Vegetal	22
4.2 Preparo do material vegetal	28
4.3 Extração dos óleos essenciais.....	29
4.4 Preparo das amostras de óleo essencial.....	32
4.5 ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS	33
5. DISCUSSÃO	36
5.1 Material Vegetal	36
5.2 Preparo do material vegetal	38
5.3 Extração e preparo das amostras	38
5.3.1 Obtenção dos óleos essenciais em <i>Piper aduncum</i> L.	38
5.3 Análise qualitativa dos óleos essenciais	40
5.3.1 AMOSTRA I – Município de Botucatu-SP	41
5.3.2 AMOSTRA II – Município de Araraquara-SP	42
5.3.3 AMOSTRA III – Município de Bauru-SP.....	44
5.3.4 AMOSTRA IV – Município de São Manuel-SP.....	45
5.3 Análise comparativa entre as amostras I, II, III e IV.....	46
5.4 Comparação dos dados obtidos com os dados da literatura	48
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7. DISPENSA DE APRESENTAÇÃO AO CEP OU CEUA	52
8. REFERÊNCIAS	53
ANEXO I.....	59

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Óleos Essenciais

Óleos essenciais, também chamados de voláteis ou etéreos, são líquidos oleosos com fragrâncias agradáveis na maioria das vezes, sendo, por isso, chamados de essências. São obtidos de materiais vegetais advindos de folhas, flores, ervas, frutas, cascas, galhos e entre outros. Existem cerca de 3.000 óleos essenciais, desses apenas 10% são comercialmente importantes, principalmente na área de sabores e fragrâncias (VAN de BRAAK e LEIJTEN, 1999; BURT, 2004; SIMÕES E SPITZER, 1999).

De forma geral, óleos voláteis são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal característica como o próprio nome diz, é a volatilidade. Os óleos possuem sabor acre e picante, quanto a sua cor, quando são extraídos geralmente são incolores ou levemente amarelados, são poucos os que apresentam cor. São pouco estáveis, principalmente na presença de ar, luz, etc. Seus constituintes podem ser hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, ésteres, éteres, ácidos orgânicos e outros (SIMÕES E SPITZER, 1999; TELASCREA, 2008).

Os óleos essenciais são retirados de várias plantas aromáticas que geralmente se localizam em países temperados a quentes como países mediterrânicos e tropicais onde esses representam uma grande parte da farmacopeia tradicional (BAKKALI *et al.*, 2008).

Entre a vastidão dos produtos vegetais, os óleos essenciais merecem atenção especial. A hipótese coevolucionária, apresentada por Fraenkel, Erlich e outros desde a década de 1960 (FRAENKEL, 1959; EHRLICH e RAVEN, 1964), propõe que a relação planta-animal é um fator fundamental para aumentar a biodiversidade em insetos e plantas (FÜRSTENBERG-HÄGG, ZAGROBELNY e BAK, 2013) e que o metabolismo secundário faz parte de um sistema químico que permite às plantas se defenderem contra os predadores. De fato, parece que plantas com maior diversidade química apresentam melhores defesas do que aquelas com diversidade mais limitada (WAR *et al.*, 2012).

O termo “óleo essencial” foi usado pela primeira vez no século 16 pelo médico Paracelsus von Hohenheim, que denominou de “quinta essentia” o componente de um medicamento feito por ele (EDRIS, 2007).

Os egípcios foram os primeiros a utilizarem os aromas dos óleos essenciais, usavam em rituais e cerimônias nos templos e pirâmides, referente a documentos encontrados datados de 4.500 anos a.C. (TELACREA, 2008).

1.2 Funções biológicas e importância dos óleos essenciais

Desde a idade Média, os óleos essenciais tem sido usados para diversas aplicações bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitárias, inseticidas, medicinais e cosméticas, principalmente nos dias atuais em indústrias farmacêuticas, sanitárias, cosméticas, agrícolas e alimentícias. Por exemplo, *d-limoneno*, *acetato de geranyl* ou *d-carvona* são empregados em perfumes, cremes, sabões, como aditivos aromatizantes para alimentos, como fragrâncias para produtos de limpeza doméstica e como solventes industriais. Na natureza, os óleos essenciais realizam um papel importante na proteção das plantas atuando como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e servem também contra herbívoros, pois algumas das plantas aromáticas acabam reduzindo seu apetite por essas plantas. Além disso, podem atrair alguns insetos para ajudar a dispersão de pólenes e sementes, ou repelir outros indesejáveis. (BAKKALI *et al.*, 2008).

A *Salvia leucophylla* Greene é um caso exemplar de alelopatia e do papel desempenhado pelos monoterpenos (especialmente o 1,8-cineol e a cânfora, neste caso) como inibidores da germinação de sementes e da competição. Uma revisão sobre a liberação de óleos essenciais de sálvia foi proposta por SAKAI e YOSHIMURA (2012), que estudaram a volatilização de folhas vivas para a atmosfera e subsequente passagem para o solo; lixiviação de folhas vivas e mortas diretamente para o solo; volatilização das folhas mortas para a atmosfera e, em seguida, a passagem para o solo.

Geralmente, repelentes de insetos formam uma barreira de vapor sobre a pele que impede que o artrópode pouse sobre ela. (BROWN E HEBERT, 1997). Alguns repelentes à base de plantas são comparáveis ou até melhores que os sintéticos, no entanto, tendem a ter uma vida curta na sua eficácia dependendo de sua volatilidade. Os repelentes sintéticos podem causar danos ambientais e riscos para a saúde humana (PITASAWAT *et al.*, 2003). Portanto, houve um aumento nos esforços de busca por repelentes naturais e ecológicos. O gênero *Cymbopogon* spp. produz os repelentes naturais mais utilizados no mundo. Por exemplo, o óleo de *Cymbopogon winterianus*, misturado com 5% de vanilina, resultou em 100% de proteção por 6 horas contra o *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* e *Anopheles dirus*, resultados comparados aos observados com DEET a 25% (N, N-dietil-3-metilbenzanmida) (TAWATSIN *et al.*, 2001; NERIO; OLIVERO-VERBEL e STASHENKO, 2009).

Devido ao grande potencial terapêutico dos óleos essenciais, pesquisadores começaram a testá-los contra o câncer, aproveitando o fato de que seu mecanismo de ação é diferente da citotóxica clássica que atingem as células normais e causam diversos efeitos colaterais, com isso, relatórios indicaram que os componentes do óleo essencial, especialmente os monoterpenos, apresentam múltiplos efeitos no metabolismo do mevalonato, que são responsáveis pela atividade supressora de tumores terpenos (ELSON, 1995; EDRIS, 2007).

Foi demonstrado que os monoterpenos exercem quimiopreventivos bem como atividades quimioterapêuticas em modelos de tumores mamários e, portanto, pode representar uma nova classe de agentes terapêuticos (EDRIS, 2007).

A substância α -bisabolol, um importante álcool sesquiterpeno contido no óleo essencial da camomila pode ser considerado um inibidor de apoptose de grande potencial em células de glioma malignas, além de não ser tóxico em animais nem reduz a viabilidade das células astrogliais normais (CAVALIERI *et al.*, 2004, EDRIS, 2007).

Além da atividade contra o câncer, os óleos voláteis tem varias outras funções, algumas serão citadas a seguir.

A aterosclerose é um processo onde há formação de placas de ateroma na camada mais interna da artéria, a camada íntima (BARTER, 2005). Porém, pode ser retardada inibindo a oxidação de LDLs usando uma alta ingestão diária de antioxidantes. Óleos essenciais e seus componentes voláteis, apontam atividade antioxidante contra o LDL (GRASSMANN *et al.*, 2003, 2005; EDRIS, 2007).

A trombose geralmente está associada à ativação plaquetária e a liberação de eicosanóides que contribuem para iniciação e agravamento da trombose, foi mostrado que o óleo essencial de lavanda, (*Lavandula hybrida* Reverchon cv.), tem um grande efeito antiplaquetário do espectro e foi capaz de inibir plaquetas agregação induzida por ADP, ácido araquidônico, colágeno e o agonista estável do receptor de tromboxano sem propriedades pró-hemorragicas (BALLABENIA *et al.*, 2004; EDRIS, 2007).

Grandes evidências de estudos in vitro mostram que os óleos essenciais podem atuar como agentes antibacterianos contra um amplo espectro de cepas bacterianas patogênicas, como por exemplo tomilho e orégano que podem inibir *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella typhimurium* (PENALVER *et al.*, 2005; EDRIS, 2007).

O vírus Herpes Simplex do tipo I e II, causa algumas das infecções virais mais comuns mas também pode levar a óbito, estudos demonstram que os óleos essenciais como

de *Melissa officinalis* L pode inibir a replicação do HSV-2, devido à presença citral e citronelal e a capacidade de replicar o HSV-1 pode ser suprimida por incubação com diferentes óleos essenciais in vitro. Destes, o óleo essencial de capim-limão apresentou maior atividade anti-HSV-1 e inibição viral completa após incubação por 24 h, mesmo em uma concentração de 0,1% (MINAMI et al., 2003). O óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) apresentou altos níveis de atividade virucida contra HSV-1, HSV-2 e resistentes a ciclovirais cepa do HSV-1 em testes de suspensão viral, sendo vantajosos, já que possuem baixa toxicidade em comparação com os antivirais sintéticos (EDRIS, 2007).

O diabetes é uma doença onde o corpo não produz ou usa adequadamente a insulina do corpo, são necessárias mais pesquisas sobre os óleos em função do diabetes pelo fato de não existirem muitos estudos sobre o potencial dos óleos como agentes hiperglicêmicos. Contudo, o óleo essencial de alecrim mostrou efeito hiperglicêmico e efeitos inibitórios da liberação de insulina em coelhos diabéticos (AL-HADEL et al., 1994, EDRIS, 2007).

1.3 Extração do óleo essencial

O produto de extração pode variar em qualidade, quantidade e composição de acordo com o clima, composição do solo, órgão vegetal, idade, vegetação e estágio do ciclo (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006). Portanto, para obter óleos essenciais de composição constante, eles devem ser extraídos nas mesmas condições, no mesmo solo e sob o mesmo clima (BAKKALI et al., 2008).

Um grande número de técnicas convencionais pode ser usado para amostrar a fração volátil: destilação a vácuo, destilação a vapor ou hidrodestilação, extração de solvente off-line combinada com destilação, extração simultânea de destilação, extração com fluido supercrítico e micro-ondas assistida por amostragem e hidrodestilação assistida por micro-ondas e amostragem de *headspace* de alta capacidade de concentração. Deve-se ressaltar que somente o produto obtido por hidrodestilação ou destilação a vapor pode ser chamado de óleo essencial (RUBIOLO et al., 2010). O material deve ser fresco, porém sugere-se o seu congelamento com N₂ líquido, sendo posteriormente triturado com um almofariz e pistilo de porcelana. Esse processo garantirá a integridade do óleo na matriz vegetal (TELASCREA et al., 2008).

1.3.1 Hidrodestilação

Um óleo essencial é classicamente obtido usando equipamentos baseados no processo de destilação introduzida por Clevenger (1928a; 1928b). Em teoria, as recuperações de voláteis são quantitativas para um tempo de destilação infinito; artefatos ou substâncias de degradação térmicas ou oxidativa podem ser produzidos, mas eles são aceitos como resultado de um processo tradicional. Aparelhos e modos de operação para obter óleos essenciais estão bem estabelecidos e são descritos em várias farmacopeias. A Farmacopeia Brasileira volume 2 indica que se deve proceder utilizando um balão de 1 L contendo 500 mL de água como líquido de destilação. A droga (planta) previamente triturada deve ser colocada com 100 mL de água. Após isso deve-se transferir imediatamente para o balão e proceder a hidrodestilação a partir de 50 g da droga durante 4 horas. O óleo essencial obtido deve ser mantido a -18°C e em frasco de vidro âmbar (para evitar fotodegradação) e sob ambiente N_2 até sua análise (BRASIL, 2010; TELASCREA et al., 2008).

1.4 Análises de óleos essenciais

A análise de uma amostra de óleo essencial envolve geralmente a separação, identificação e determinação quantitativa de seus componentes. A volatilidade e polaridade dos componentes do óleo essencial fazem da cromatografia gasosa (CG) capilar a técnica de escolha para sua análise, pois os óleos essenciais, em geral, são misturas complexas de componentes com características físico-químicas semelhantes (RUBIOLO et al., 2010; MARRIOTT, SHELLIE e CORNWELL, 2001).

Uma separação exaustiva de óleo essencial por CG pode, preferencialmente, ser obtida combinando duas fases estacionárias de polaridade diferente. As fases estacionárias apolares mais utilizadas na análise de rotina de óleo essencial são, em geral, aquelas baseadas em metil polissiloxanos, metilfenil-polissiloxanos e polietilenoglicol como a fase polar. A identificação é geralmente realizada por dados cromatográficos (índices de Kovat's, índices de retenção lineares, tempo de retenção relativo, tempo de retenção), mensuráveis com um detector universal como o detector FID (detector de chama) ou por dados espectrais, principalmente, por técnicas inferidas como espectrometria de massa (CG-EM), como recomendam a *International Organization of the Flavor Industry* (IOFI) e o *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (RUBIOLO et al., 2010). A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

também é proposta como um detector para detecção de óleos essenciais (GC-FT-IR) (HERRES, 1987; BICCHI et al., 2004; MARRIOTT, SHELLIE e CORNWELL, 2001).

A utilização da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), ainda permite a obtenção de espectros de massas dos picos cromatográficos através da análise dos íons totais (TIC) e esses podem ser comparados com uma base de dados, como a NIST62 - *National Institute of Standards and Technology* que serve como um parâmetro de comparação e dessa forma permite a identificação mais correta dos componentes (ADAMS, 2012).

Uma aplicação direta do uso dos índices de retenção e dos espectros de massa na identificação de componentes de óleos essenciais é o trabalho realizado por TELASCREA e colaboradores (2008) que estudaram os óleos essenciais de folhas de quatro *Cryptocarya* spp endêmicas na Mata Atlântica no Estado de São Paulo. Os principais componentes do óleo de *Cryptocarya moschata* foram identificados como sendo linalol (34,3%), α -terpineno (17,0%), γ -terpineno (10,4%), 1,8-cineole (5,8%) e trans-ocimeno (4,8%), enquanto os de *C. botelhensis* foram α -pineno (22,7%), β -pineno (9,2%), trans-verbenol (8,4%), trans-pinocarveol (5,5%) e myrtenal (5,4%). Os principais compostos do óleo de *C. mandioccana* foram β -cariofileno (13,8%), espatulenol (10,2%), óxido de cariofileno (7,8%), δ -cadineno (6,9%) e biciclogermacreno (6,4%), enquanto os de *C. saligna* foram germacreno D (15,5%), biciclogermacreno (13,8%), espatulenol (11,8%) e germacreno B (5,7%).

A partir de análises realizadas utilizando um espectrômetro de massa acoplado com cromatógrafo gasoso com programação de temperatura seguindo ADAMS (1995) e obtenção de espectros de massa, pode-se identificar os componentes acima comparando com as referências da biblioteca NIST 62 (MCLAFFERTY e STAUFFER, 1989) e suas porcentagens relativas foram calculadas a partir das áreas de pico normalizadas. Os índices de retenção (VAN DEN DOOL, 1963) foram determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de padrões de *n*-alcano (C-10 a C-30), medidos nas mesmas condições cromatográficas descritas acima e comparados com os valores publicados (ADAMS, 1995).

A demanda por análises mais rápidas de GC está aumentando. Embora investigado desde o início dos anos 60, o GC de alta velocidade (eficiência) foi usado apenas para análise de óleos essenciais de rotina nas últimas décadas. A maneira mais fácil de acelerar

uma separação de GC é reduzir o comprimento da coluna, mantendo a sua resolução (separação) suficiente (CRAMERS et al., 1999; DAVID et al., 1999).

Os vários aspectos teóricos e práticos envolvidos com a análise por GC rápida foram revisados por CRAMERS e colaboradores (1999). Duas abordagens foram propostas para acelerar a análise de um óleo essencial. A primeira e mais amplamente utilizada envolve colunas curtas com diâmetro interno estreito (< 0,1 mm), enquanto a segunda abordagem leva em conta colunas capilares curtas com diâmetro interno convencional (BICCHI et al., 2004). A cromatografia gasosa com colunas de diâmetro estreito, foi aplicada pela primeira vez à análise de óleos essenciais por PROOT e SANDRA (1986).

O SCC-GC pode ser aplicado com sucesso na análise quantitativa de rotina de um EO de média complexidade (até cerca de 30 componentes), uma vez que a eficiência das colunas capilares é frequentemente muito maior do que o necessário. Uma separação eficaz pode, portanto, ser obtida mesmo com uma coluna de 5m (em vez de 30m), cuja eficiência (ou seja, o número de pratos teóricos) é de quatro a oito vezes menor, mas que permite que o tempo de análise seja encurtado pelo mesmo fator, se combinado com um programa de temperatura adequado. Quando a eficiência é insuficiente para uma boa separação, sua falta pode ser compensada pela adoção de uma fase estacionária com uma seletividade adequada (CRAMERS et al., 1999; BICCHI et al., 2004; MARRIOTT, SHELLIE e CORNWELL, 2001).

1.5 O gênero *Piper*

O gênero *Piper* é o maior da família Piperaceae, contendo mais de 700 espécies, dos quais cerca de 170 crescem de forma nativa no Brasil. Este gênero inclui arbustos, árvores, cipós, ervas e as espécies e pode ser considerado o de maior importância, tanto do ponto de vista científico quanto econômico. Muitas espécies possuem atividades farmacológicas, inseticidas, ou outros usos econômicos (SOUSA *et. al.*, 2008; FAZOLIN *et. al.*, 2006; SILVA *et. al.*, 2019).

No Brasil, a família *Piperaceae* está representada pelos gêneros *Ottonia* Spreng., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Piper* L., *Pothomorphe* Miq. e *Sarcorrhachis* Trel., totalizando 450 espécies. *Piper* e *Peperomia* são os maiores gêneros, respectivamente com 265 e 166 espécies (BARDELLI; KIRIZAWA; DE SOUSA, 2008).

É uma espécie que se destaca das demais pela produção de OE's passível de cultivo e é considerada de grande importância para o desenvolvimento da Amazônia pelas suas propriedades medicinais e por ser uma fonte sustentável de matérias-primas químicas para o aproveitamento industrial químico, farmacêutico e da horticultura (POHLIT, 2006; FERREIRA, 2015).

Segundo os estudos de SILVA *et. al.*, 2019 suas folhas são alternadas, completas, normalmente assimétricas, palminervadas ou pendentes e são comumente encontradas em florestas de florestas tropicais ombrófilas.

Os constituintes químicos desse gênero podem apresentar lignanas, neolignanas, terpenóides, propenil fenóis, chalconas, flavonas, benzenopiranos e amidas, das quais piperidina e pirrolidina são as mais abundantes (SILVA *et. al.*, 2019).

Muitas pessoas nos trópicos usam o gênero Piper para muitos propósitos, como alimentos, especiarias, perfumes, óleos, iscas de peixe, veneno de peixe, inseticidas, alucinógenos e muitos medicamentos (BARRET 1994; JOLY 1993; CHULTES e RAFFAUF 1990; WADT, EHRINGHAUS, KAGEYAMA, 2004).

A família das Piperáceas possui atividade microbiana reconhecida (BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004; REGASINI *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2013), destacando-se a atividade antifúngica de muitas espécies com seus 62 constituintes já identificados, como as amidas de *Piper tuberculatum* (NAVICKIENE *et. al.*, 2000) e *Piper arboreum* (SILVA *et. al.*, 2001), os ácidos benzóicos prenilados de *Piper aduncum* e *Piper gaudichaudianum* (BALDOQUI *et. al.*, 1999; LAGO *et. al.*, 2004) e os piperolídeos de *Piper malacophyllum* (LAGO *et. al.*, 2005).

1.6 *Piper aduncum* L.

Segundo FAZOLIN *et. al.*, 2006 a *Piper aduncum* pode ser encontrada desde o nível do mar até altitudes consideráveis. Sua distribuição geográfica se dá na América Central, Antilhas e América do Sul. No Brasil, é encontrada nos Estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Mato Grosso, Ceará, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná.

De acordo com WADT, EHRINGHAUS, KAGEYAMA, 2004 esta espécie foi identificada na década de 1970 por pesquisadores do Instituto Nacional de Pesquisa na Amazônia (INPA).

P. aduncum L., é um arbusto de ampla distribuição tropical, com ocorrência em solos areno-argilosos, é conhecido popularmente como “pimenta-de-macaco” e “apertaruão”. Esta espécie é considerada uma planta invasora, pois são facilmente encontradas em terrenos, beiras de estrada e áreas recém desmatadas. São de alta rusticidade e elevada resistência às mudanças climáticas (SOUSA *et. al.*, 2008).

As folhas apresentam pecíolo de 0,3 a 0,8 cm de comprimento, lâmina elíptica, são ovado-elípticas, apresentam base assimétrica, arredondado-cordada, ápice agudo ou acuminado, escabrosas, ásperas ao tato em ambas as faces e glandulosas (FAZOLIN *et. al.*, 2006).

Segundo pesquisas feitas por FERREIRA, 2015, outros fatores importantes para a utilização do gênero *Piper* dizem respeito ao seu ciclo vegetativo relativamente curto, a alta tolerância a solos ácidos de baixa fertilidade, facilidade de propagação vegetativa e uma ampla capacidade de adaptação a diferentes ambientes. Essas características facilitam a domesticação e o cultivo desta planta, representando uma alternativa viável para a geração de renda para os agricultores, pois essa espécie apresenta um alto teor de óleo essencial em relação a outras espécies aromáticas.

1.7 Óleo essencial de *Piper aduncum* L.

Extratos orgânicos das folhas de *P. aduncum* apresentaram atividades moluscicida, citotóxica e antibacteriana, que se associou a presença de dihidrochalconas e derivados prenilados do ácido benzóico (ORJALA *et al.*, 1993 & 1994; SOUSA *et. al.*, 2008).

O uso medicinal de “pimenta-de-macaco” tem sido relatado: em doenças ginecológicas e distúrbios intestinais (Van den Berg, 1993), como diurético, antiblenorrágico, carminativo, excitante digestivo, para malefícios do fígado, contra a erisipela e tratamento de úlceras crônicas (Coimbra, 1994; SOUSA *et. al.*, 2008).

Possui atividade antibacteriana (*Gram* positivo e *Gram* negativo, inclusive contra *Neisseria gonorrhoeae*, agente causador da gonorréia), o óleo essencial de *P. aduncum* foi testado contra o fungo *Clinipellis perniciosus*, conhecido como “vassoura-de-bruxa”, responsável por ataque patogênico ao cacau e cupuaçu. Na concentração de 50 a 100 ppm inibiu 100% o crescimento e a germinação deste fungo, além dos fungos patogênicos do trigo, cebola, repolho, banana e outros (Bastos, 1997; SOUSA *et. al.*, 2008; POHLIT, 2006).

O óleo essencial de *P. aduncum* apresentou atividade inseticida e larvicida contra insetos fitófagos e mosquitos transmissores de dengue e malária, eliminando-os totalmente quando em baixas concentrações (Bernard et al., 1995; Souto, 2006). O óleo essencial de *P. aduncum* apresenta excelente rendimento (2,5 a 3,5%) e é rico em dilapiol (31,5 a 91,1%), um éter fenílico com elevado padrão de oxigenação (Maia *et al.*, 1998, SOUSA *et. al.*, 2008).

Existe uma evidência muito forte para a potencialidade dos extratos, frações e princípios ativos de *P. aduncum*, aplicados ao tratamento de tinhas, piодermas, dermatofitoses, micoses e outras doenças de pele, essa atividade *in vitro* é muito relevante para a validação de remédios utilizados em dermatologia (GOODMAN; GILMAN, 1996; POHLIT, 2006).

2. OBJETIVOS

O presente projeto de Iniciação Científica apresenta como objetivo geral e específicos:

2.1 Objetivo Geral

Realizar a extração de óleo essencial de folhas de *Piper aduncum* L presente nas cidades de Botucatu/SP, São Manuel/SP, Bauru/SP e Araraquara/SP, identificando seus principais componentes por técnicas cromatográficas e por cálculos de índices de retenção e comparar a identificação com dados da literatura.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter folhas de *Piper aduncum* L.
- Extrair o óleo essencial por hidrodestilação.
- Analisar a amostra por Cromatografia Gasosa (CG).
- Realizar a identificação dos principais componentes por CG acoplado à Espectrometria de Massa e comparar os espectros obtidos com dados da literatura.
- Obter os índices de retenção (IR) e comparar os dados da literatura.
- Comparar a identificação obtida com dados de identificação em outros trabalhos da literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aquisição do material vegetal – coletas

Após identificação de área de coleta, folhas de *Piper aduncum* L. foram coletadas de setembro a outubro nas cidades de Bauru/SP, São Manoel/SP, Botucatu/SP e Araraquara/SP, ambas no interior de São Paulo.

As coletas foram realizadas em locais indicados pelo Sr. César Gaburi (Jardim Botânico de Bauru), Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques (IAC Campinas), Dra.

Eliana Maria N. Gabriel e Thiago Roberto Bertola (EMA Botucatu) e com o Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (IQ Unesp Araraquara).

Foram coletados cerca de 1,0 a 2,0 kg de material vegetal fresco (folhas e galhos) em cada cidade, dando-se prioridade às folhas integras e saudáveis. Esses materiais foram identificados, acondicionados em embalagens adequadas e acondicionados em isopores cobertos com gelo, sendo, posteriormente, transportados para o devido tratamento.

3.2 Preparo do material vegetal

A folhas íntegras e inteiras foram separadas dos galhos. Todos os materiais obtidos em cada cidade foram tratados separadamente e sendo identificadas para que não houvesse mistura entre as regiões coletadas. Após a separação dos galhos que foram descartados, as folhas foram secas em sombra e na temperatura ambiente. Após 5 dias de secagem, todos os materiais foram moídos em Moinho Tipo Willye (modelo TE-650, marca TECNAL).

Após a moagem, os quatro materiais foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados e acondicionados em freezer (- 18°C) para aguardar a extração que seria realizada no dia seguinte.

3.3 Extração dos óleos essenciais

Pesou-se, em uma balança de precisão (Mod. Bel S2202H) cerca de 100 g de folhas secas de cada cidade. No balão de fundo redondo de 1,0 L foram colocados os 100g de folhas secas e água ultrapura até 70% da capacidade do balão para evitar refluxo do sistema.

As extrações foram realizadas utilizando o sistema de extração com condensador tipo Clevenger resfriado com água a aproximadamente 5°C. Utilizou-se uma manta aquecedora (Fisatom Mod. 202) e um banho ultra termostato (Nova Ética) para manter o banho a 5°C. Estabeleceu-se o tempo de 2 h para cada extração.

Todas as quatro extrações de óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Plantas Medicinais, do Departamento de Produção Vegetal – setor de Horticultura da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP de Botucatu, onde o uso dos equipamentos e do espaço foram gentilmente acompanhados pela Dra. Jordany Aparecida de Oliveira Gomes, sob responsabilidade do Prof. Dr. Felipe Pereira Giardini Bonfim.

3.4 Preparo das amostras de óleo essencial

Após o fim das 2 horas de cada extração, totalizando 4 extrações finais (uma para cada cidade), os óleos essenciais obtidos foram retirados com apoio de pipetas do tipo *Pasteur* e transferidas para frascos tipo *Ependorfs* de *teflon*[®], que foram devidamente identificados e acondicionados em freezer (-18°C) aguardando o envio para as análises por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e cálculos dos índices de retenção. As massas de óleos essenciais obtidos em cada extração foram anotadas para avaliação do rendimento.

3.5 Análises por Cromatografia Gasosa (CG) e por Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises serão realizadas usando um modelo Shimadzu QP-5000 espectrômetro de massa com cromatógrafo a gás equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W Scientific) (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm). A temperatura do forno será programada de 60 a 240°C, com gradiente de temperatura de 3°C por minuto. As temperaturas do injetor e interface serão mantidas a 240 e 230°C, respectivamente (ADAMS, 2012). O gás carreador será hélio a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ (volume constante). Os espectros de massa serão obtidos a 70 eV no modo de íons totais (TIC). Amostras (1,0 µL) de concentrações conhecidas serão injetadas manualmente no modo *split* (20: 1).

As análises foram gentilmente fornecidas e realizadas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) Fazenda Santa Elisa, no Centro de Recursos Genéticos Vegetais em colaboração com a Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques.

3.6 Identificação dos componentes do óleo essencial

As identificações dos componentes do óleo essencial serão feitas utilizando como referência os espectros de massas obtidos dos picos cromatográficos e comparados com dados teóricos da biblioteca de dados NIST 62 (MCLAFFERTY e STAUFFER, 1989; ADAMS, 2007).

Os índices de retenção serão determinados em relação aos tempos de retenção de uma série de padrões de *n*-alcanos (C-10 a C-30), medidos nas mesmas condições cromatográficas descritas acima e comparados com os valores publicados. A equação 1 (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963) será utilizada para o cálculo do índice de retenção:

$$I = [(T's - T' Cn) / (T' Cn + 1 - T's)100] + 100. Cn \quad (1)$$

Onde:

I = índice de retenção

T's = tempo de retenção ajustado da substância analisada;

T' Cn = tempo de retenção ajustado do *n*-alcano que elui antes da substância;

T' Cn+1 = tempo de retenção ajustado do *n*-alcano que elui após a substância;

Cn = número de carbonos do *n*-alcano que elui antes da substância analisada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Material Vegetal

As folhas de *Piper aduncum L.* coletadas no período da manhã entre setembro e outubro foram obtidas nas cidades de Bauru, São Manoel, Botucatu e Araraquara todas

no interior de São Paulo. Vale ressaltar que as coletas foram realizadas seguindo todos os protocolos de prevenção contra o Covid-19, como uso de máscaras, luvas, distanciamento e ao final uso de álcool 70%.

Na Figura 1 pode-se visualizar os mapas das localidades das cidades escolhidas para a coleta dos materiais vegetais.

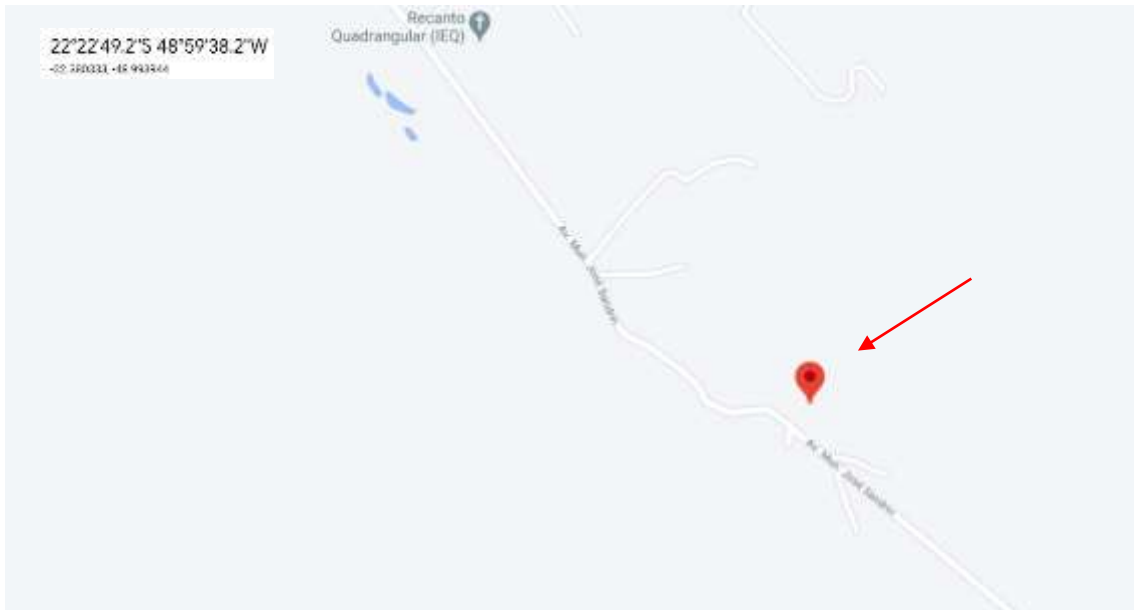
Figura 1. Localização das cidades onde foram realizadas as coletadas das plantas.



Fonte: Google Mapas

Todos os materiais vegetais estudados foram localizados por GPS (*Global Position System*). Na Figura 2, pode-se ver as coordenadas 22°22'49.2"S e 48°59'38.2"W no município de Bauru/SP. A Figura 3 mostra o local que a planta foi coletada e a imagem de uma amostra de folha de *Piper aduncum* L. obtida.

Figura 2. Localização da coleta de folhas de *Piper aduncum* L.(Bauru/SP).



Fonte: Google Mapas

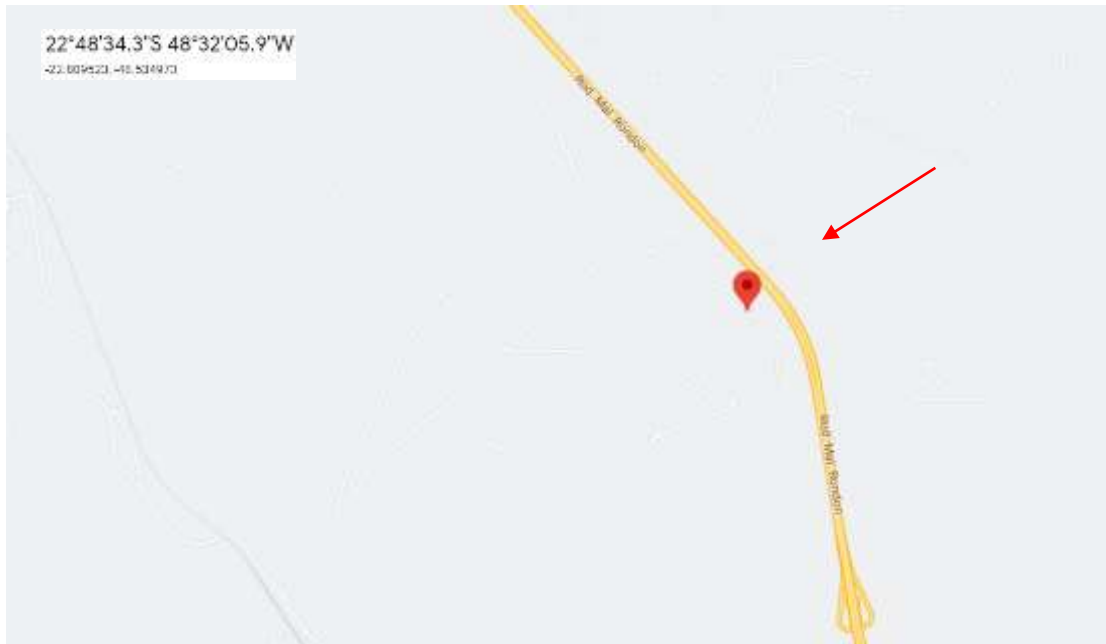
Figura 3. Local de coleta e folha de *Piper aduncum* L. (Bauru/SP).



Fonte: Próprio autor

A Figura 4 mostra a localização das plantas de *Piper aduncum* L. com as coordenadas 22°48'34.3"S 48°32'05.9"W em São Manoel/SP. A Figura 5 mostra a imagem de uma amostra de folha de *Piper aduncum* L. obtida no local.

Figura 4. Localização da coleta de folhas de *Piper aduncum* L. (São Manoel/SP).



Fonte: Google Mapas

Figura 5. Local de coleta e folha de *Piper aduncum* L. (São Manoel/SP).



Fonte: Próprio autor

As Figura 6 e 7 mostram a localização das plantas coletadas em Botucatu/SP na EMA (Escola do Meio Ambiente) juntamente com suas coordenadas 22°53'30.9\"/>

Figura 6. Localização da coleta de folhas de *Piper aduncum* L., Botucatu-SP.



Fonte: Google Maps

Figura 7. Local de coleta e folha de *Piper aduncum* L.(Botucatu/SP).



Fonte: Próprio autor

O último local a ser coletado foi Araraquara/SP nas coordenadas 21°45'16\"/>

Figura 8. Localização da coleta de folhas de *Piper aduncum* L.(Araraquara-SP).



Fonte: Google Mapas

Figura 9. Local de coleta e folha de *Piper aduncum* L., Botucatu-SP.



Fonte: Próprio autor

Foram coletados ramos e galhos contendo folhas inteiras e saudáveis. Foram feitas pequenas coletas, em diversos pontos dos locais visitados, para garantir o máximo de homogeneidade no material vegetal obtido. Após as diversas coletas, os materiais foram acondicionados em sacos devidamente identificados, colocados em isopores com gelo para manter sua integridade para aguardar o processo posterior.

4.2 Preparo do material vegetal

Após a separação das folhas, as mesmas foram organizadas em nichos por cidade. Os materiais foram levados a secagem à sombra em temperatura ambiente até que desidratassem por cerca de 5 dias, como mostra um exemplo na Figura 10.

Figura 10. Exemplo de secagem de folhas (*Piper aduncum* L. Araraquara/SP).



Fonte: Próprio autor

As folhas de cada coleta foram secas separadamente em nichos e foram constantemente movimentadas para permitir uma secagem mais adequada, evitando assim a ação de fungos por conta da umidade. Essa etapa foi mantida durante 5 dias até a total secagem do material vegetal. As folhas secas foram transportadas em sacos plásticos devidamente identificados e foram moídas em sistema de Moinho Tipo Willye (TE-650, marca TECNAL), Figura 11. O material obtido foi acondicionado em sacos plásticos devidamente identificados e foram estocados em freezer aguardando a extração. A moagem foi feita no Departamento de Horticultura da FCA Unesp Botucatu/SP.

Figura 11. Moinho utilizado na moagem.



Fonte: Próprio autor

Na Figura 12 é mostrada uma amostra de folhas secas e moídas de *Piper aduncum* L. obtidas da cidade de São Manuel/SP.

Figura 12. Folhas moídas de *Piper aduncum* L..

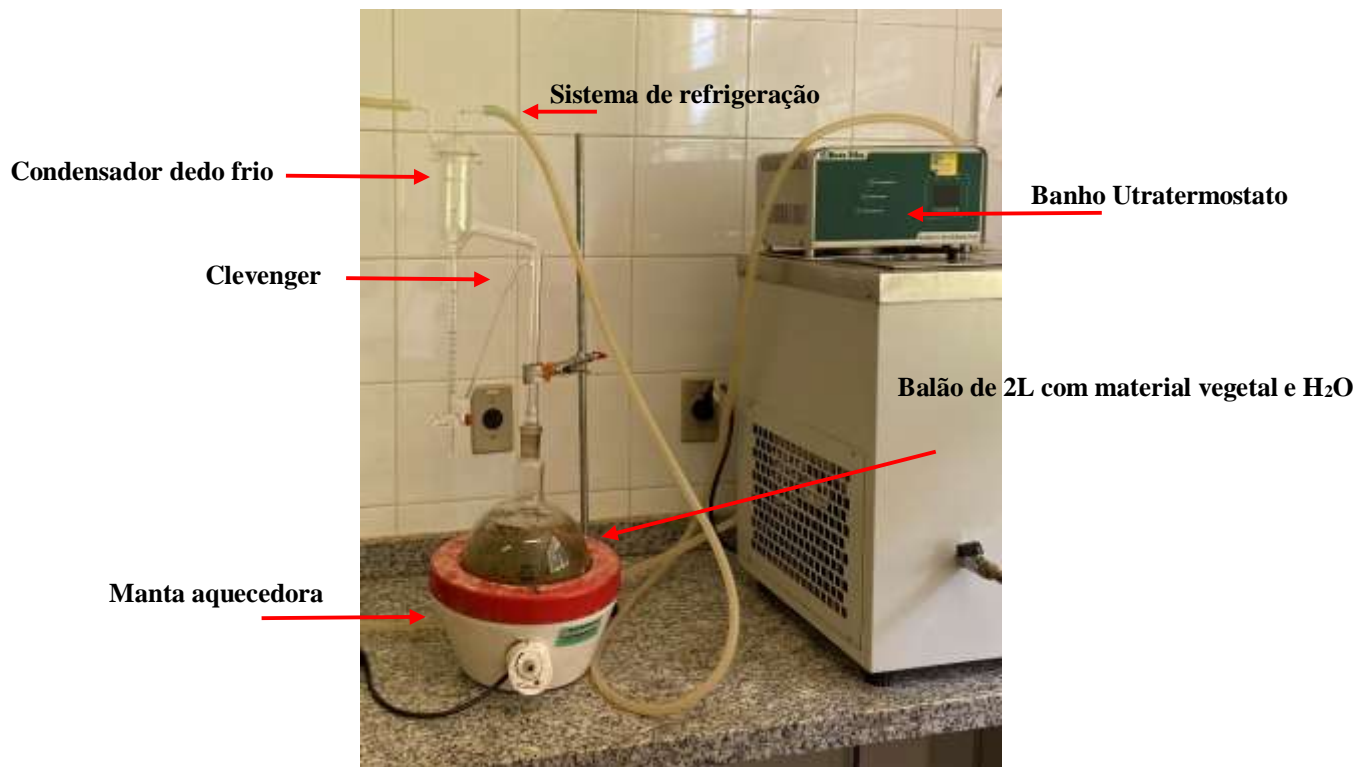


Fonte: Próprio autor

4.3 Extração dos óleos essenciais

As extrações foram realizadas usando o sistema de extração descrito na Figura 13. O sistema era formado por um balão de fundo redondo, um condensador tipo Clevenger e pelo sistema de refrigeração. O sistema Clevenger é o aparato mais indicado para extrações de óleos essenciais.

Figura 13. Sistema de extração: manta, balão e sistema Clevenger com dedo frio.



Fonte: Próprio autor

Foram realizadas quatro extrações: uma para cada amostra de planta de cada cidade. As extrações foram identificadas como I (Botucatu/SP), II (Araraquara/SP), III (Bauru/SP) e IV (São Manoel/SP). Para o processo ganhar tempo, duas extrações foram feitas simultaneamente em série, ambas conectadas ao sistema de refrigeração durante o tempo de 2 horas. O sistema em par montado pode ser observado na Figura 14.

Figura 14. Sistemas de extração em série.



Fonte: Próprio autor

A massa utilizada em cada processo de extração foi aproximadamente de 100 g de folhas seca (Figura 15). Todas as massas foram anotadas para posterior cálculo de rendimento. O sistema montado para as folhas se encontra na Figura 16.

Figura 15. Pesagem das folhas secas.



Fonte: Próprio autor

Figura 16. Sistema de extração planta seca à temperatura ambiente.

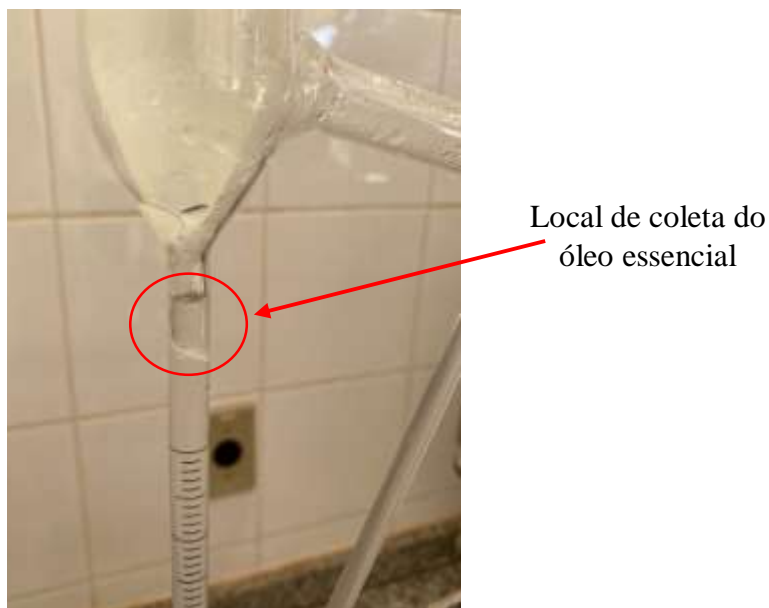


Fonte: Próprio autor

4.4 Preparo das amostras de óleo essencial

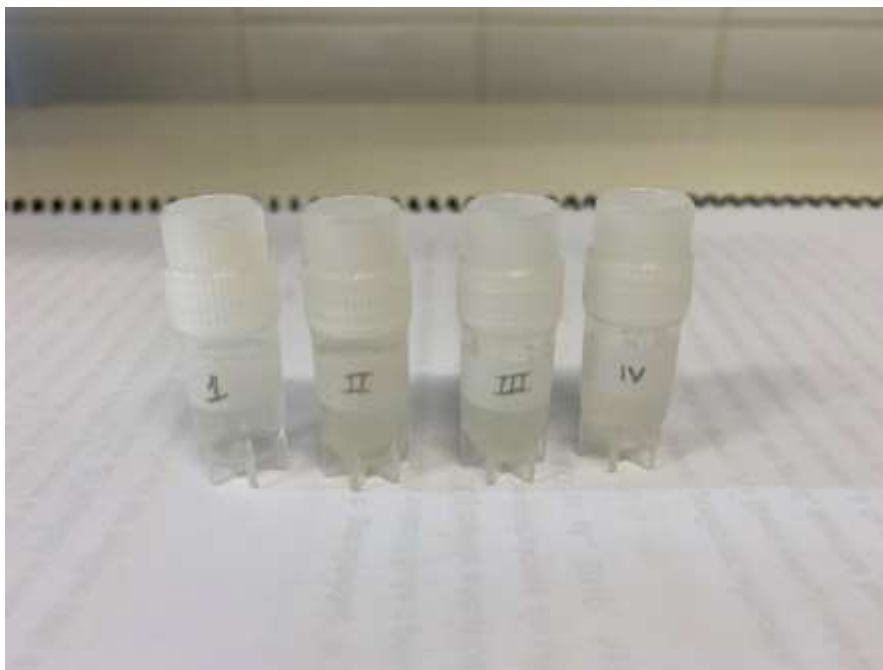
As amostras dos óleos essenciais (I, II, III e IV) obtidos da condensação foram coletadas em sua totalidade no ponto indicado na Figura 17. As amostras de óleos essenciais foram acondicionadas em frascos de *Ependorf* de *teflon*[®] devidamente identificados e acondicionados em freezer (-18°C), aguardando o envio das amostras para o Instituto Agronômico de Campinas - IAC (Figura 18).

Figura 17. Local de coleta de óleo essencial no sistema Clevenger.



Fonte: Próprio autor

Figura 18. *Ependorfs* contendo os óleos essenciais de cada extração.



Fonte: Próprio autor

4.5 ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS

Os óleos essenciais obtidos de folhas de Botucatu (amostra I), Araraquara (amostra II), Bauru (amostra III) e São Manuel (amostra IV) foram analisados por Cromatografia Gasosa. Cromatogramas das amostras foram obtidos e são apresentados na Figura 19.

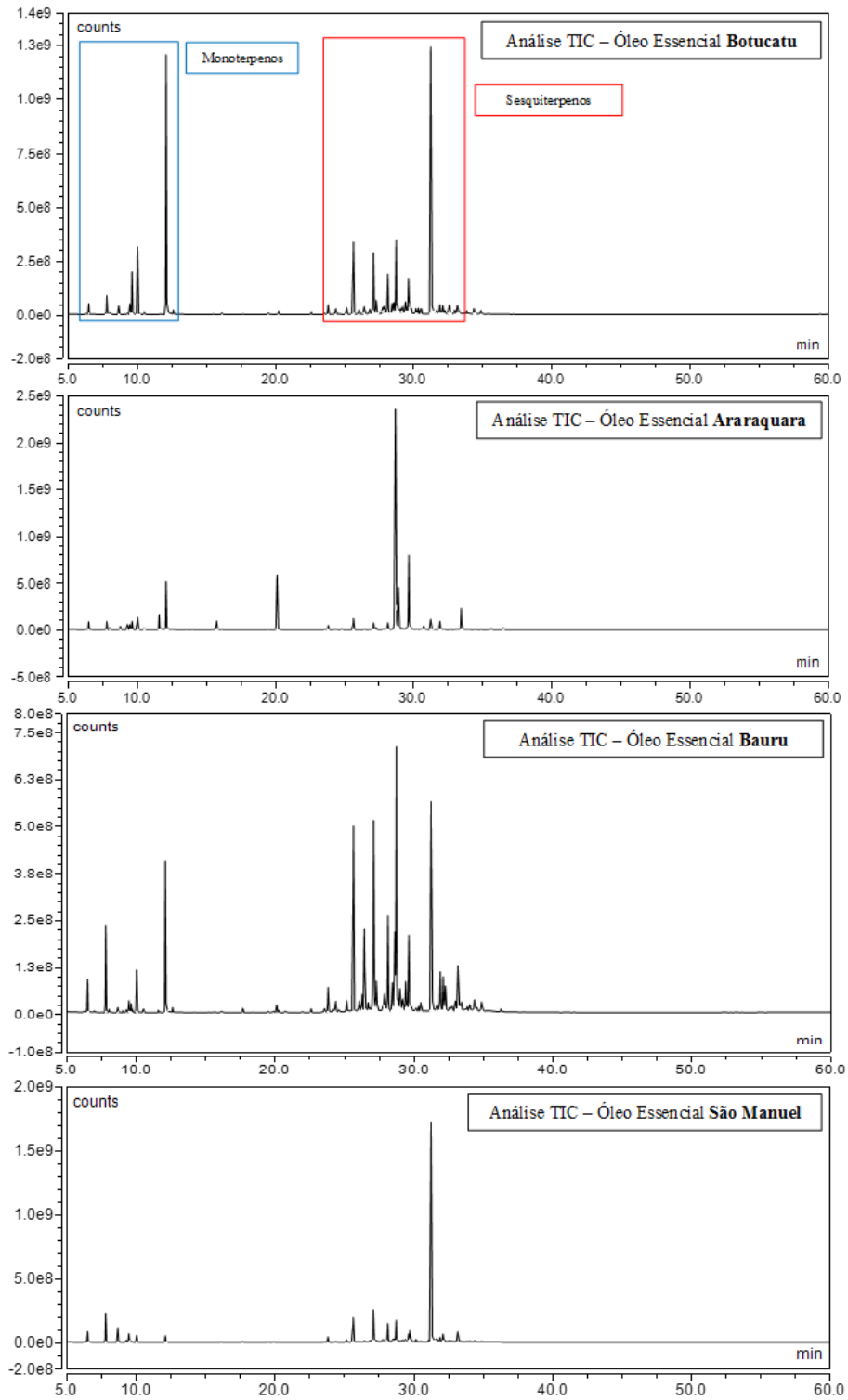
As análises foram realizadas durante 60 minutos de acordo com as informações da metodologia. A título de comparação qualitativa, colocou-se os cromatogramas com os picos cromatográficos um após ao outros para uma análise mais precisa.

Através dos dados obtidos nas identificações, que serão discutidos nos próximos tópicos, pode-se dividir os cromatogramas em duas grandes áreas: os monoterpenos (terpenos com 10 carbonos), entre os tempos de retenção de 5,0 a 22 minutos; os sesquiterpenos (terpenos com 15 carbonos), entre os tempos de retenção de 22 a 35 minutos.

Analisando qualitativamente a presença de monoterpenos (C_{10}), verifica-se que as óleos essenciais de Botucatu e Bauru foram os que apresentaram maior % relativa destes compostos. Já nos óleos essenciais de Araraquara e de São Manuel predominaram os sesquiterpenos (C_{15}). O óleo essencial obtido de Bauru foi o que apresentou qualitativamente a maior quantidade de sesquiterpenos de todas as amostras.

O óleo essencial de Botucatu mostra dois componentes, um monoterpeno e um sesquiterpeno, com maiores intensidades. No óleo essencial de Araraquara pode-se verificar a presença de um sesquiterpeno majoritário e o único que, excepcionalmente, mostra um pico cromatográfico em 20 minutos, identificado como safrol (7,22%). O óleo essencial de Bauru é o que mostrou maior diversidade de substâncias, tanto mono como sesquiterpenos. No óleo essencial de São Manuel verificou-se a predominância de apenas um sesquiterpeno. Este foi identificado como (*E*)- nerolidol.

Figura 19. Cromatogramas TIC obtidos dos óleos essenciais analisados.



Fonte: IAC e o Próprio Autor

5. DISCUSSÃO

5.1 Material Vegetal

O gênero *Piper* é o maior da família Piperaceae, com mais de 700 espécies sendo que cerca de 170 crescem de forma nativa no Brasil. A *Piper aduncum* L., é um arbusto de ampla distribuição tropical, com ocorrência em solos areno-argilosos, conhecido popularmente como “pimenta-de-macaco” e “aperta-ruão”. Com grandes propriedades medicinais é usada para diversos fins, como: doenças ginecológicas, tratamento de úlceras, diurético, carminativo, entre outros. Além disso, a “pimenta-de-macaco” possui em sua composição dilapiol, que é responsável por atividades fungicidas, inseticidas e pelo efeito antibiótico (SOUSA et al., 2008).

A espécie de *P. aduncum* se desenvolve como arbustos ou arvoretas eretas de 3 m de altura, ramos sem saliências, meio nodoso com entrenós variando de 4,9 a 7,7 cm (CHRIST et al., 2016). A haste de sustentação do limbo, também chamada pecíolo possuem 0,22 a 1,05 cm de comprimento, sem sobrepor a base da lâmina de folha. Lâmina foliar simétrica, cartácea, elíptico, escabroso, base assimétrica, um lado 2-4 mm mais curto que o outro, cordado, ápice acuminado e dois lados agudos (MONTEIRO, 2018).

As nervuras secundárias, possuem de 6 a 8 cm, dispostas até ou pouco acima da porção mediana não atingindo o ápice da folha, escabrosa ao longo das veias, glandular e áspero ao tato nos dois lados. (FAZOLIN et al., 2006).

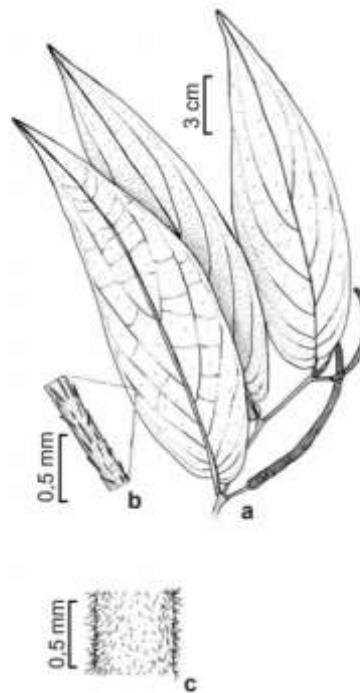
Ao comparar-se folhas *Piper aduncum* L. coletadas no interior de São Paulo (Figura 20), com dados da literatura (Figura 21), pode-se comprovar morfológicamente que as plantas coletadas nas 4 cidades estão de acordo com as informações da literatura.

Figura 20. Folhas de *Piper aduncum* L.



Fonte: Próprio autor

Figura 21. Morfologia *Piper aduncum* L.



a: galhos com espiga; **b:** detalhe de tricomas em veias secundárias; **c:** detalhe de tricomas em galhos. Fonte: adaptado de Christ et al., (2016).

Por se tratar de uma planta abundante em nossa região, optou em coletar amostras em várias cidades para estudos de comparação de perfis relacionadas a potenciais variações circadianas e sazonais.

5.2 Preparo do material vegetal

Muitos procedimentos para preparo de plantas para extração de óleos essenciais sugerem a secagem do material para evitar os efeitos da umidade da folha (TELASCREA et al., 2008). Optou-se na secagem à sombra de todos os materiais vegetais, como sendo a menos agressiva em relação à volatilidade dos óleos essenciais. Em 5 dias as folhas já estavam bem desidratadas, sem problemas com formação de fungos e estavam prontas para os processos de moagem (NAVICKIENE et al., 2006).

5.3 Extração e preparo das amostras

5.3.1 Obtenção dos óleos essenciais em *Piper aduncum* L.

A *Piper aduncum* L. é uma planta nativa muito aromática e apresenta um alto teor de óleo essencial (cerca de 2,5 a 4,0%). O óleo é rico em dilapiol que é um éter fenílico (SILVA, A.L. et al., 2013). O processo de extração de óleo essencial que utilizou o aparato Clevenger (SANTOS et al., 2004; CLEVINGER, 1928a e 1928b) é considerado o processo mais eficiente na obtenção de óleos essenciais, pois permite uma extração limpa de solventes tóxicos e livre de subprocessos que poderiam permitir perda de material ou até contaminação do mesmo (NAVICKIENE et al., 2006).

Foram realizadas quatro extrações, sendo feitas aos pares e ligadas em série ao sistema de refrigeração. Na primeira série foram conectadas I (Botucatu/SP) e II (Araraquara/SP) e na segunda série III (Bauru/SP) e IV (São Manoel/SP).

O ambiente do laboratório ficou tomado pelo aroma do óleo essencial em todo tempo das extrações. Após 2 horas de extração, observou-se que havia a presença de uma fase oleosa (óleo essencial) em todas as quatro extrações. As quantidades variaram entre as extrações das amostras das 4 cidades, como o esperado. A Figura 22 mostra o processo de extração.

Figura 22. Extração dos óleos essenciais das plantas de III (Bauru-SP) e IV (São Manoel).



Fonte: Próprio autor

A Tabela 1 apresenta os valores de massas de folhas secas utilizadas em cada processo e as respectivas massas de óleos essenciais obtidos. Os rendimentos de óleos essenciais obtidos em relação às quantidades de plantas mostraram que a extração com plantas de Araraquara/SP foi a que apresentou maior rendimento (1,22%), seguida por Botucatu/SP (0,85%). Os rendimentos de São Manuel (0,48%) e de Bauru (0,46%) foram próximos. Dessa forma, pode-se concluir que

Tabela 1: Resultado dos rendimentos dos óleos essenciais.

Localidade	Massa do material seco (g)	Massa do óleo essencial (g)	Rendimento (%)
I (Botucatu)	100,76	0,8542	0,85
II (Araraquara)	100,33	1,2308	1,22
III (Bauru)	100,17	0,4579	0,46
IV (São Manoel)	100,03	0,4844	0,48

Na Figura 23, pode-se observar nitidamente a presença de óleo essencial e sua cor transparente ligeiramente amarelada bem leve.

Figura 23. Óleo essencial extraído pronto para ser coletado.



Fonte: Próprio autor

Como comentado anteriormente, observou-se que o maior rendimento foi do óleo essencial obtido no local II (Araraquara-SP). Estudos mostraram que o tempo de corte, ataque por herbívoros e até incidência de radiação solar podem influenciar no rendimento do óleo essencial dessa planta (SILVA, et al., 2013). Os processos de secagem foram os mesmos (local, tempo e temperatura) e não devem ter influenciado na secagem desse material vegetal (FIGUEIREDO, 2011; NAVICKIENE et al., 2006).

Os óleos essenciais de *Piper aduncum* L. das quatro cidades foram pesados, armazenados e identificados. As amostras de óleos foram encaminhadas pela Dra. Jordany Aparecida de Oliveira Gomes, em dezembro/2020, ao Instituto Agronômico de Campinas (IAC) - Fazenda Santa Elisa, no Centro de Recursos Genéticos Vegetais sob responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques, onde as análises por Cromatografia Gasosa acoplada Espectrometria de Massas (CG-EM) e Índices de Retenção forão realizados.

5.3 Análise qualitativa dos óleos essenciais

Cerca de 1,0 mg de cada amostra dos óleos essenciais extraídos de folhas de *Piper aduncum* colhidas em Botucatu (amostra I), Araraquara (amostra II), Bauru (amostra III)

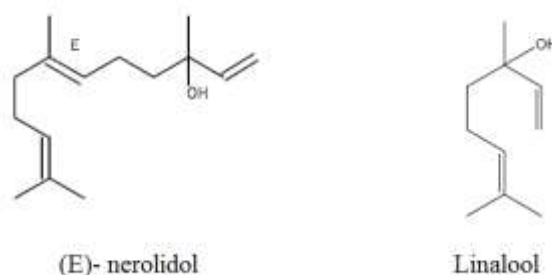
e São Manuel (amostra IV), diluídos em 1,0 mL de acetato de etila (padrão HPLC), foram analisadas por Cromatografia Gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

A identificação dos constituintes químicos das amostras foi efetuada por meio da análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com a biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST 62). Os índices de retenção foram obtidos através da co-injeção das amostras com o padrão de n-alcenos (C_9 - C_{24} , Sigma USA) e os dados foram comparados com dados da literatura das substâncias (ADAMS, 2007). A identificação dos componentes das quatro amostras foi realizada pela equipe da Profa. Márcia Ortiz Mayo Marques do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que colaborou com o desenvolvimento deste projeto. Isso foi necessário, devido as questões de restrições impostas pela pandemia do Covid-19.

5.3.1 AMOSTRA I – Município de Botucatu-SP

A análise qualitativa da amostra permitiu a identificação de 98,13% de todos os picos cromatográficos observados. Foram identificados no total 25 componentes. Destes, destacam-se o (*E*)- nerolidol (34,44%) e linalool (23,82%) como componentes majoritários. Ambos fazem parte de mais de 50% da amostra. Destes compostos majoritários o linalool ($C_{10}H_{18}O$) é um monoterpene (terpenos com 10 carbonos) e o (*E*)-nerolidol ($C_{15}H_{26}O$) é um sesquiterpene (terpeno com 15 carbonos), ambos de cadeias abertas. Os nomes IUPAC para o (*E*)- nerolidol é (*E*)-3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol e o linalool 3,7-dimetil-1-6-octadien-3-ol. Suas estruturas podem ser vistas na Figura 24.

Figura 24. Estrutura dos principais compostos na amostra de Botucatu-SP.



Fonte: ADAMS (2007).

Na Tabela 2 pode ser observar os componentes identificados, cada qual com seu índice de retenção linear calculado (**IRC**) e seu índice de retenção linear obtido da literatura (**IRL**) (ADAMS, 2007).

Tabela 2. Identificação dos compostos no óleo essencial de Botucatu-SP.

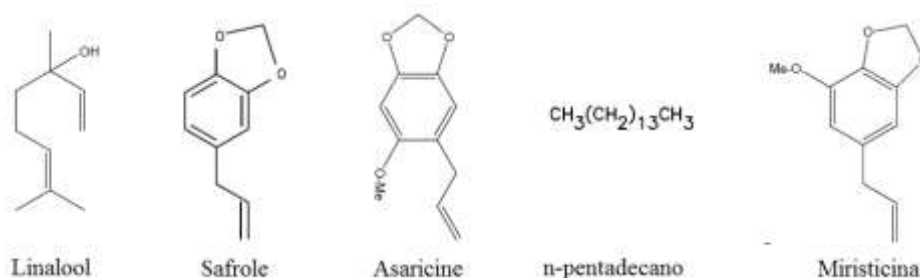
IRC	IRL	Substância	% relativa
934	932	α -pineno	0,52
979	974	β -pineno	1,13
1008	1008	δ -3-careno	0,46
1029	1024	limoneno	0,66
1033	1032	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	2,52
1044	1044	(<i>E</i>)- β -ocimeno	4,22
1099	1095	linalol	23,82
1376	1374	α -copaeno	0,71
1420	1417	(<i>E</i>)- cariofileno	5,85
1439	1439	aromadendreno	0,51
1456	1452	α -humuleno	4,53
1461	1458	allo- aromadendreno	0,76
1472	1475	(<i>E</i>)-candina-1(6),4-diene	0,52
1481	1478	gama-muuroloeno	3,39
1489	1489	β -selineno	0,79
1492	1492	δ -selineno	0,37
1496	1500	biciclogermacreno	5,55
1513	1513	γ -cadinene	0,77
1519	1522	δ -cadineno	2,80
1521	1521	(<i>E</i>)calamenene	1,01
1560	1561	(<i>E</i>)- nerolidol	34,44
1577	1577	espatulenol	0,80
1583	1582	óxido de cariofileno	0,86
1610	1608	epóxido de humuleno II	0,63
1643	1644	α -muurulol	0,51
Total identificado			98,13

Fonte: Análise dos dados IAC – Campinas.

5.3.2 AMOSTRA II – Município de Araraquara-SP

A análise qualitativa da amostra permitiu a identificação de 96,32% de todos os picos cromatográficos observados. Foram identificados no total 21 componentes. Destes, destacam-se o linalool (8,82%), o safrole (7,22%), a asaricina (42,15%), o *n*-pentadecano (9,69%) e miristicina (8,87%). Destes compostos majoritários são monoterpenos os compostos linalool (C₁₀H₁₈O), o safrole (C₁₀H₁₀O₂), a asaricina (C₁₁H₁₂O₃) e miristicina (C₁₁H₁₂O₃). Destaca-se apenas como sesquiterpeno o componente *n*-pentadecano (C₁₅H₃₂). Suas estruturas podem ser vistas na Figura 25.

Figura 25. Estrutura dos principais compostos na amostra de Araraquara-SP.



Fonte: ADAMS (2017).

Na Tabela 3 pode ser observar os componentes identificados, cada qual com seu índice de retenção linear calculado (IRC) e seu índice de retenção linear obtido da literatura (IRL) (ADAMS, 2007).

Tabela 3. Identificação dos compostos no óleo essencial de Araraquara-SP.

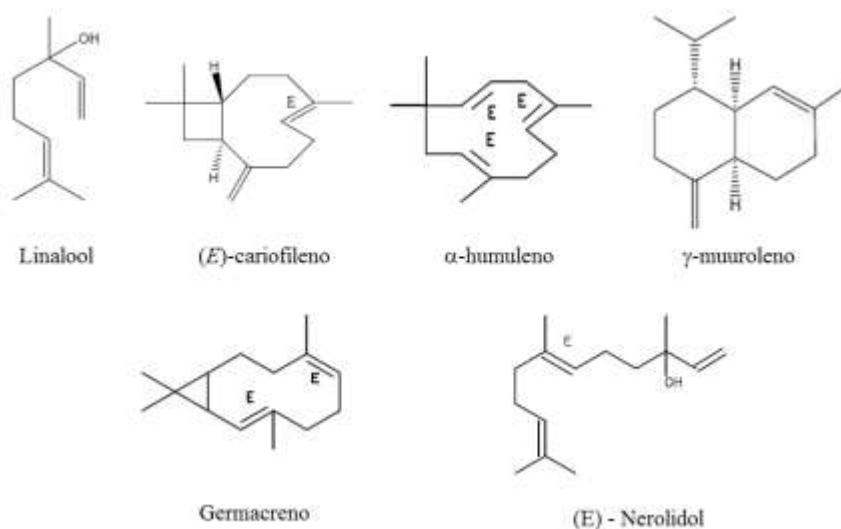
IRC	IRL	Substância	% relativa
934	932	α -pineno	0,89
979	974	β -pineno	1,12
988	988	mirceno	0,27
1011	1008	δ -3-careno	0,5
1024	1022	o-cimeno	0,63
1029	1024	limoneno	0,7
1034	1032	(Z)- β -ocimeno	0,98
1044	1044	(E)- β -ocimeno	1,46
1086	1085	terpinoleno	2,11
1100	1095	linalol	8,82
1187	1179	p-cimen-8-ol	2,05
1289	1285	safrol	7,22
1377	1374	α -copaeno	0,67
1421	1417	(E) cariofileno	1,82
1482	1478	γ -muuroleno	1,18
1491	1495	asaricina	42,15
1500	1500	n-pentadecano	9,69
1519	1517	miristicina	8,87
1547	1555	elemicin	0,49
1560	1561	(E)- nerolidol	2,43
1618	1620	dill apiole	2,27
Total identificado			96,32

Fonte: Análise dos dados IAC – Campinas.

5.3.3 AMOSTRA III – Município de Bauru-SP

A análise qualitativa da amostra permitiu a identificação de 94,96% de todos os picos cromatográficos observados. Foram identificados no total 26 componentes. Destes, destacam-se o linalool (8,22%), (*E*)-cariofileno (9,85%), α -humuleno (9,18%), γ -muuroleno (5,25%), o biciclogermacreno (14,49%) e (*E*) - nerolidol (16,05%). Destes compostos majoritários os sesquiterpenos são predominantes como o (*E*)-cariofileno ($C_{15}H_{24}$), α -humuleno ($C_{15}H_{24}$), γ -muuroleno ($C_{15}H_{24}$), biciclogermacreno ($C_{15}H_{24}$) que são compostos isoméricos e o (*E*)- nerolidol ($C_{15}H_{26}O$). Suas estruturas podem ser vistas na Figura 26.

Figura 26. Estrutura dos principais compostos na amostra de Bauru-SP.



Fonte: ADAMS (2017).

Na Tabela 4 pode ser observar os componentes identificados, cada qual com seu índice de retenção linear calculado (IRC) e seu índice de retenção linear obtido da literatura (IRL) (ADAMS, 2007).

Tabela 4. Identificação dos compostos no óleo essencial de Bauru-SP.

IRC	IRL	Substância	% relativa
934	932	α -pineno	1,03
979	974	β -pineno	3,35
1008	1008	δ -3-careno	0,17
1029	1024	limoneno	0,47
1034	1032	(Z)- β -ocimeno	0,31
1044	1044	(E)- β -ocimeno	1,52
1100	1095	linalol	8,22
1377	1374	α -copaeno	1,15
1420	1417	(E)- cariofileno	9,85
1436	1439	α -guaieno	0,69
1439	1439	aromadendreno	4,11
1456	1452	α -humuleno	9,18
1461	1458	allo- aromadendreno	1,05
1475	1475	(E)-candina-1(6),4-diene	0,62
1481	1478	γ -muuroleno	5,25
1489	1489	β -selineno	1,38
1496	1500	biciclogermacreno	14,49
1499	1500	α -muuruleno	0,99
1502	1509	α -bulnesene	2,41
1513	1513	γ -cadinene	1,28
1519	1522	δ -cadineno	2,97
1560	1561	(E)- nerolidol	16,05
1577	1577	espatulenol	2,38
1583	1582	óxido de cariofileno	2,39
1610	1608	epóxido de humuleno II	3,13
1640	1644	α -muurulol	0,52
Total identificado			94,96

Fonte: Análise dos dados IAC – Campinas.

5.3.4 AMOSTRA IV – Município de São Manuel-SP

A análise qualitativa da amostra permitiu a identificação de 96,74% de todos os picos cromatográficos observados. Foram identificados no total 15 componentes. Esta amostra foi a que mostrou menor número de substâncias de todos os óleos estudados. Destes, destacam-se o sequiterpeno (E) - nerolidol com 63,79% do óleo.

Na Tabela 5 pode ser observar os componentes identificados, cada qual com seu índice de retenção linear calculado (IRC) e seu índice de retenção linear obtido da literatura (IRL) (ADAMS, 2007).

Tabela 5. Identificação dos compostos no óleo essencial de São Manuel-SP.

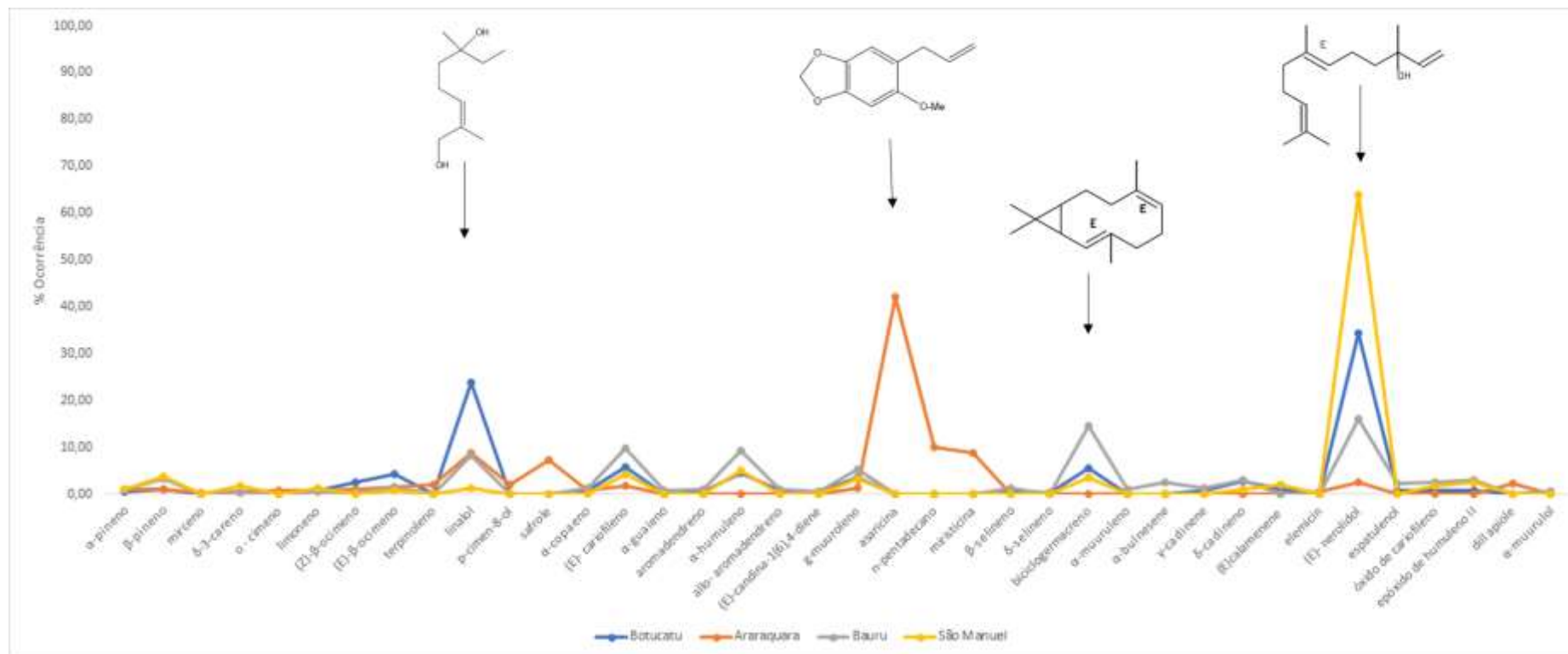
IRC	IRL	Substância	% relativa
934	932	α -pineno	1,10
979	974	β -pineno	3,82
1008	1008	δ -3-careno	1,77
1029	1024	limoneno	1,17
1044	1044	(<i>E</i>)- β -ocimeno	0,77
1100	1095	linalol	1,21
1420	1417	(<i>E</i>)- cariofileno	4,17
1456	1452	α -humuleno	5,01
1481	1478	γ -muuroleno	3,30
1496	1500	biciclogermacreno	3,44
1519	1522	δ -cadineno	1,12
1522	1521	(<i>E</i>)calamenene	1,93
1561	1561	(<i>E</i>)- nerolidol	63,79
1583	1582	óxido de cariofileno	1,66
1610	1608	epóxido de humuleno II	2,48
Total identificado			96,74

5.3 Análise comparativa entre as amostras I, II, III e IV.

Os componentes α -pineno, β -pineno, δ -3-careno, limoneno, (*E*)- β -ocimeno, linalool, (*E*)- cariofileno, γ -muuroleno e (*E*)- nerolidol apareceram em todos os óleos essenciais das amostras obtidas de plantas das quatro cidades, porém em composições diferentes como mostraram as tabelas acima.

Fazendo um comparativo entre todas as amostras das quatro cidades, pode-se elaborar um gráfico completo, onde, qualitativamente se verifica as substâncias predominantes em cada amostra (Figura 27). A análise do gráfico permitiu verificar que o componente linalool aparece com destaque apenas na amostra da cidade de Botucatu, enquanto que na amostra de Araraquara predomina uma substância que apareceu apenas no óleo essencial desta cidade, a asaricina. Já o (*E*)-nerolidol aparece em todos os óleos essenciais, destacando-se os óleos obtidos de plantas das cidades de Bauru, Botucatu e São Manuel. Em menores concentrações, o biciclogermacreno se destaca na amostra obtida de Bauru.

Figura 27. Comparação das % de cada composto nas quatro amostras de óleos estudados e indicação das substâncias com maiores teores.

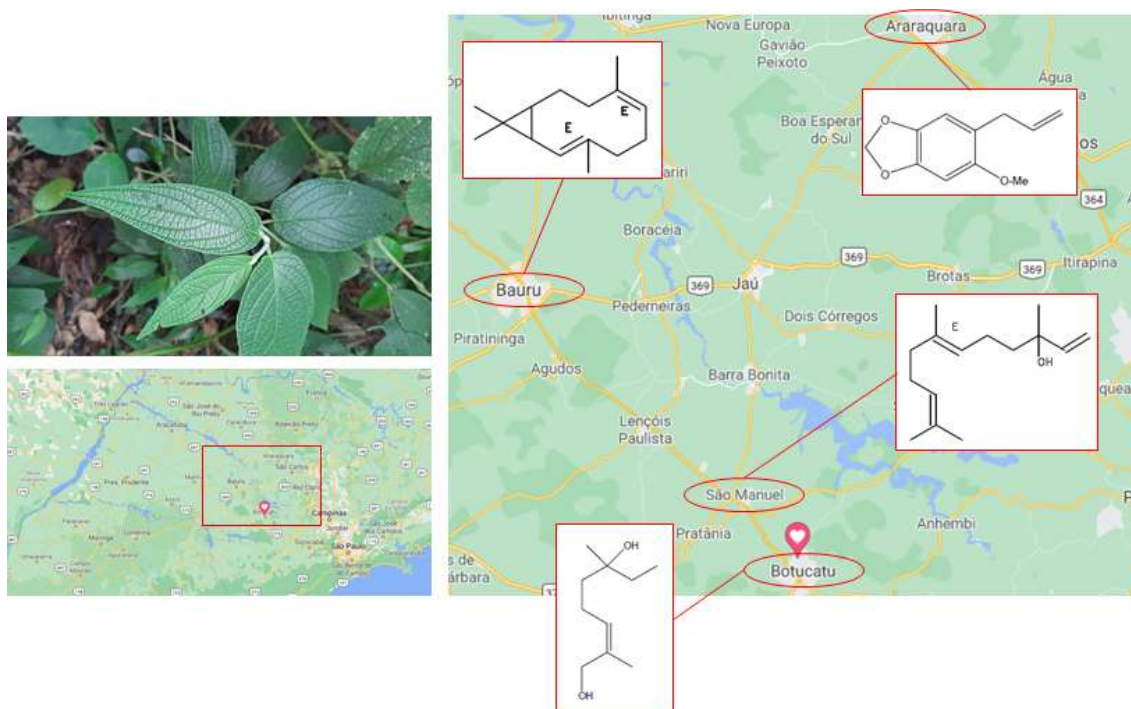


Fonte: O próprio autor

Esperava-se, a princípio, que devido à proximidade entre as cidades de Botucatu e São Manuel, que os óleos essenciais fossem semelhantes, mas não foi isto que foi observado.

Na Figura 28, pode-se verificar os principais componentes de ocorrência e suas respectivas fontes (cidades).

Figura 28. Principais componentes em cada óleos essência de *Piper aduncum* estudado.



Fonte: O próprio autor

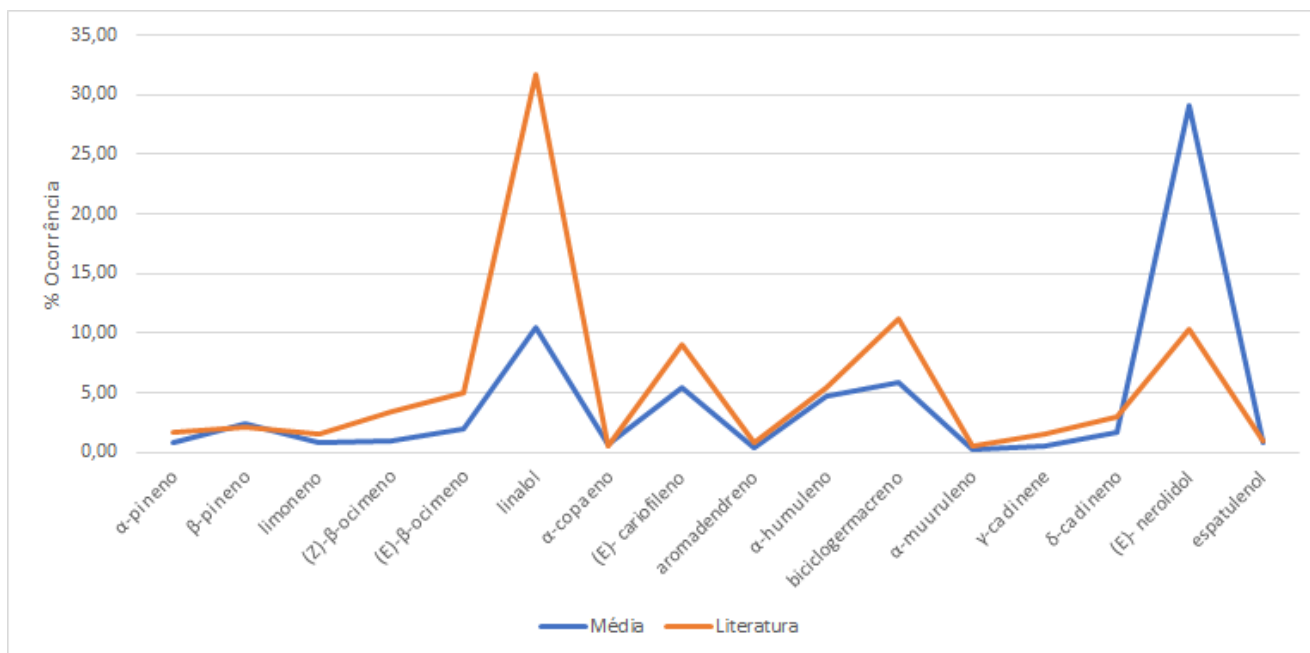
5.4 Comparação dos dados obtidos com os dados da literatura

Navickiene e colaboradores (2006) estudaram os óleos essenciais de *P. aduncum* extraídos por Clevenger e analisados por CG-EM e por índices de retenção. Mesma metodologia proposta para este trabalho. Os autores estudaram os óleos essenciais extraídos de folhas, caules e frutos. Além disso, o trabalho comparou os óleos essenciais obtidos com outras espécies de Piperaceae.

A título apenas de comparação qualitativa, sabendo das questões relacionadas à variabilidade circadiana e sazonal, levantou-se as substâncias que ocorrem na análise da literatura e foi realizada uma comparação com a % média relativa dos componentes dos óleos essenciais obtidos das quatro cidades (amostras I, II, III e IV).

Na Figura 29, pode-se analisar que quando se compara os dados médios obtidos para os óleos essenciais de *Piper aduncum* (Bauru – Araraquara – São Manuel – Botucatu) com a literatura (NAVICKIENE et al., 2006), ocorre uma inversão interessante.

Figura 29. Comparação entre os dados de % médios obtidos nas amostras I a IV com dados da literatura.



Fonte: O próprio autor e NAVICKIENE et al (2006).

Analisando os dados, verificou-se uma inversão entre os picos do linalool e (E)-nerolidol entre os estudos aqui realizados e os da literatura. Enquanto, na comparação com os dados da literatura o componente linalool mostrou baixa intensidade relativa nas amostras de I a IV predominando na literatura. Já o (E)-nerolidol mostrou maior % média relativa nas amostras de I a IV quando comparado aos dados observados na literatura.

O (E)-nerolidol tem um aroma floral e frutado com fundo de madeira. É muito usado em fragrâncias finas, cosméticos, xampus, sabonetes, produtos de limpeza e detergentes. Seu consumo global é estimado em aproximadamente 10 a 100 toneladas por ano. Também é aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA como um agente aromatizante de alimentos. Além disso, o alto teor de (E)-nerolidolina do óleo essencial é notável, pois este álcool sesquiterpênico foi relatado por possuir várias atividades biológicas e farmacológicas, como antimalárica, antileishmania, antiúlcera,

antibacteriana, antifúngica e como um intensificador de penetração cutânea de uso tópico (PADALIA et al., 2015).

Futuros estudos de variabilidade sazonal e circadiana poderão ser realizados em plantas amostradas em São Manuel, já que a amostra de óleo desta localidade contém 63,79%, ou seja, mais da metade do óleo essencial é constituído por esta substância, indicando um interessante potencial a ser explorado.

As diversas atividades biológicas relatadas de (E)-nerolidol o tornam útil para o desenvolvimento de terapêuticas de origem natural; portanto, o óleo de *P. aducum* pode ser explorado como uma nova fonte potencial de (E)-nerolidol que tem um uso difundido nas indústrias de sabores alimentícios, perfumes, cosméticos e farmacêuticos. Além disso, novas áreas ecológicas para seu cultivo comercial em sistema agroflorestal podem ser exploradas futuramente e para sua adequada utilização industrial (LAPCZYNSKI et al., 2008).

Hematpoor e colaboradores (2018) demonstraram que a asaricina isolada de extrato metanólico de raízes de outras espécies de *Piper* (*P. armentosum*), induzem a parada do ciclo celular e gera apoptose em células de câncer de mama humano invasivo (MDA-MB-231). A investigação farmacológica mostrou que a asaricina induz apoptose, conforme demonstrado pelo aumento da liberação de LDH, diminuição do potencial de membrana da mitocôndria e aumento da liberação de citocromo c. Este estudo fornece informações importantes sobre os mecanismos pelos quais a asaricina media a apoptose por meio da via intrínseca.

Assim, os dados sugerem que a asaricina é um potencial agente terapêutico na supressão do crescimento do câncer de mama. No óleo essencial da amostra obtida em Araraquara, pode-se identificar cerca de 42,15% de asaricina na amostra, ou seja, quase metade do óleo é constituído desta substância, o que também sugere que os estudos com as plantas coletadas neste local devam continuar.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante este estudo, pode-se realizar a extração e a identificação das 4 amostras de óleos essenciais através de técnicas cromatográficas. Analisando qualitativamente a presença de monoterpenos (C10), verifica-se que as os óleos essenciais de Botucatu e Bauru foram os que apresentaram maior % relativa destes compostos, enquanto os óleos essenciais de Araraquara e de São Manuel predominaram os sesquiterpenos (C15). O óleo essencial obtido de Bauru foi o que apresentou qualitativamente a maior quantidade de sesquiterpenos de todas as amostras.

Da amostra de obtida em Botucatu foram identificados no total 25 componentes, sendo estes o (E)- nerolidol (34,44%) e o linalool (23,82%) como componentes majoritários, ambos fazem parte de mais de 50% da amostra. A análise da amostra obtida de Araraquara permitiu a identificação de 21 componentes, sendo eles o linalool (8,82%), o safrole (7,22%), a asaricina (42,15%), o n-pentadecano (9,69%) e miristicina (8,87%). No óleo essencial obtido de folhas de Bauru foram identificados no total 26 componentes. Destes, destacam-se o linalool (8,22%), (E)-cariofileno (9,85%), α -humuleno (9,18%), γ -muuroleno (5,25%), o biciclogermacreno (14,49%) e (E) - nerolidol (16,05%). Da amostra de São Manuel de óleo essencial foram identificados no total 15 componentes. Esta amostra foi a que mostrou menor número de substâncias de todos os óleos estudados. Destes, destacam-se o sequiterpeno (E) - nerolidol com 63,79% do óleo.

A comparação das quatro amostras de óleos essenciais analisados permitiu verificar que os componentes α -pineno, β -pineno, δ -3-careno, limoneno, (E)- β -ocimeno, linalool, (E)- cariofileno, γ -muuroleno e (E)- nerolidol apareceram em todos os óleos essenciais das amostras obtidas de plantas das quatro cidades, porém em composições diferentes. A análise dos dados permitiu verificar que o componente linalool aparece com destaque apenas na amostra da cidade de Botucatu, enquanto que na amostra de Araraquara predomina a asaricina. Já o (E)-nerolidol aparece em todos os óleos essenciais, destacando-se os óleos obtidos de plantas das cidades de Bauru, Botucatu e São Manuel. Em menores concentrações, o biciclogermacreno se destaca na amostra obtida de Bauru.

Dessa forma, esta monografia, mesmo com as questões da pandemia do Covid-19, conseguiu fechar e atender a todos os objetivos propostos. Assim, os dados sugerem esse óleo essencial deve continuar sendo estudado, pois foram identificadas substâncias de potencial terapêutico interessante.

7. DISPENSA DE APRESENTAÇÃO AO CEP OU CEUA

A carta de dispensa de apresentação ao CEP OU CEUA foi preenchida e encontra-se no ANEXO I desta monografia.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, Robert P. et al. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.
- BARDELLI, Karen Cristina; KIRIZAWA, Mizué; DE SOUSA, Amélia Vera Guimarães de Sousa. O gênero Piper L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. *Hoehnea*, p. 553-561, 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 446–475, 2008.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de Piper aduncum sobre Crinipellis perniciososa e outros fungos fitopatogênicos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.
- BAYALA, B.; BASSOLE, I.H.; SCIFO, R.; GNOULA, C.; MOREL, L.; LOBACCARO, J.M.; SIMPORE, J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components—A review. *Am. J. Cancer Res.*, 19, 591–607, 2014.
- BAJWA, S.; KULSHRESTHA, A. Fungal infections in intensive care unit: Challenges in diagnosis and management. *Ann. Med. Health Sci. Res.*, 3, 238, 2013.
- BASSOLÉ, I.H.N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R.C.; DICKO, M.H. Composition and antimicrobial activities of Lippia multiflora moldenke, Mentha piperita L. and Ocimum basilicum L. Essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, 15, 7825–7839, 2010.
- BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett. Appl. Microbiol.*, 43, 149–154, 2006.
- BERNARD, C. B. et al. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *Journal of Chemical Ecology*, v. 21, n. 6, p. 801-814, 1995.
- BICCHI, C., BRUNELLI, C., CORDERO, C., RUBIOLO, P., GALLI, M., & SIRONI, A. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities. *Journal of Chromatography A*, 1024(1-2), 195-207. M. Proot, P. Sandra. *J. High Res. Chromatogr.* 1986, 9, 618, 2004.
- BURT, SARA. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 694-698, 2v/il., 2010.
- CHRIST, Jheniffer Abeldt et al. The genus Piper (Piperaceae) in the Mata das Flores State Park, Espírito Santo, Brazil. *Rodriguésia*, v. 67, n. 4, p. 1031-1046, 2016.
- CHU, W.; MCLEAN, R.J. Quorum signal inhibitors and their potential use against fish diseases. *J. Aquat. Anim. Health*, 28, 91–96, 2016.

- CLEVINGER, J. F. Apparatus for the determination of volatile oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* (1912), v. 17, n. 4, p. 345-349, 1928a.
- CLEVINGER, J. F. Report on (the analysis of) fluidextract of ginger. *Assoc Off Agric Chem J*, v. 17, p. 346-349, 1928b.
- CRAMERS, C. A., JANSSEN, H. G., VAN DEURSEN, M. M., & LECLERCQ, P. A. High-speed gas chromatography: an overview of various concepts. *Journal of chromatography A*, 856 (1-2), 315-329, 1999.
- DAVID, F., GERE, D. R., SCANLAN, F., & SANDRA, P. Instrumentation and applications of fast high-resolution capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 842 (1-2), 309-319, 1999.
- DAVID, F., GERE, D. R., SCANLAN, F., & SANDRA, P. Instrumentation and applications of fast high-resolution capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 842 (1-2), 309-319, 1999.
- EDRIS, Amr E. *Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review*. Wiley InterScience, p. 308-323, 2 jan. 2007.
- EHRlich, P.R.; RAVEN, P.H. Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evol. Psychol.*, 586–608, 1964.
- FAZOLIN, Murilo et al. *Potencialidades da Pimentadamacaco (Piper aduncum L.): Características Gerais e Resultados de Pesquisa*. Embrapa, Acre, 2006.
- FERREIRA, F.D.; MOSSINI, S.A.G.; FERREIRA, F.M.D.; ARROTÉIA, C.C.; DA COSTA, C.L.; NAKAMURA, C.V.; MACHINSKI JUNIOR, M. The inhibitory effects of *Curcuma longa* L. essential oil and curcumin on *Aspergillus flavus* link growth and morphology. *Sci. World J.*, 343804, 2013.
- FIGUEIREDO, Pablo Busatto. *AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE SECAGEM NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE Piper aduncum*. 2011. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- FRAENKEL, G.S. The raison d'etre of secondary plant substances. *Science* 129, 1466–1470, 1959.
- FREIRES, I.A.; DENNY, C.; BENSO, B.; DE ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules*, 20, 7329–7358, 2015.
- FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 10242–10297, 2013.
- GILMAN, Alfred Goodman et al. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. In: *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 1996. p. xxi, 1436-xxi, 1436.
- GLAS, J.J.; SCHIMMEL, B.C.; ALBA, J.M.; ESCOBAR-BRAVO, R.; SCHUURINK, R.C.; KANT, M.R. Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 17077–17103, 2012.
- GUO, J.; YUAN, Y.; LIU, Z.; ZHU, J. Development and structure of internal glands and external glandular trichomes in *pogostemon cablin*. *PLoS ONE*, 8, e77862, 2013.

- HARE, J.D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 56, 161–180, 2011.
- HERRES, W.. HRGC–FTIR: Capillary Gas Chromatography–Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Theory and Applications. Huethig: Heidelberg, Germany, 1987.
- HEMATPOOR, Arshia et al. Phenylpropanoids isolated from *Piper sarmentosum* Roxb. induce apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species and mitochondrial-dependent pathways. *Chemico-biological interactions*, v. 279, p. 210–218, 2018.
- HOLOPAINEN, J.K.; BLANDE, J.D. Where do herbivore-induced plant volatiles go? *Front. Plant Sci.*, 11, 185, 2013.
- HUANG, S.-S.; KIRCHOFF, B.K.; LIAO, J.-P. The capitate and peltate glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. (lamiaceae): Histochemistry, ultrastructure, and secretion. *J. Torrey Bot. Soc.*, 135, 155–167, 2008.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Vocabulary of Natural Materials: ISO/DIS9235.2; 2013. Available online:http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=51017 (acessado em 09 de março de 2019).
- IRITI, M.; FAORO, F. Chemical diversity and defence metabolism: How plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3371–3399. 2009.
- IRITI, M.; COLNAGHI, G.; CHEMAT, F.; SMADJA, J.; FAORO, F.; VISINONI, F.A. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of Lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: A comparative study. *Flavour Fragr. J.*, 21, 704–712, 2006.
- JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976—1986 Literature Review: Aspects of the Test Methods. Leiden, The Netherlands. p. 395-398, 30 nov. 1986.
- LAPCZYNSKI, A. et al. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and chemical toxicology*, v. 46, n. 11, p. S247-S250, 2008.
- KLAUNIG, J.E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 254, 86–99, 2011.
- MARONI, Beatriz Castro; DI STASI, Luiz Claudio; MACHADO, Silvia Rodrigues. *Plantas medicinais do cerrado de Botucatu: guia ilustrado*. Unesp, 2006.
- MARRIOTT, Philip J.; SHELLIE, Robert; CORNWELL, Charles. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, v. 936, n. 1-2, p. 1-22, 2001.
- MARKUS LANGE, B.; TURNER, G.W. Terpenoid biosynthesis in trichomes—Current status and future opportunities. *Plant Biotechnol. J.*, 11, 2–22, 2013.
- MCLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D.; *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*, John Wiley Sons: New York, 1989.
- MONTEIRO, DE Flora of the canga of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Piperaceae. *Rodriguésia*, v. 69, n. 3, p. 1285-1309, 2018.

NAVICKIENE, Hosana M. Deboni et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

NAGEGOWDA, D.A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett.*, 584, 2965–2973, 2010.

NERIO, Luz Stella; OLIVERO-VERBEL, Jesus; STASHENKO, Elena. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, p. 372-378, 2009.

O'BRYAN, C.A.; PENDLETON, S.J.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture—In vitro studies on antibacterial mode of action. *Front. Vet. Sci.*, 2, 35, 2015.

OHMIZO, C.; YATA, M.; KATSU, T. Bacterial cytoplasmic membrane permeability assay using ion-selective electrodes. *J. Microbiol. Methods*, 59, 173–179, 2004.

ORJALA, Jimmy et al. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, v. 34, n. 3, p. 813-818, 1993.

ORJALA, Jimmy et al. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 1, p. 18-26, 1994.

PADALIA, Rajendra C. et al. The essential oil composition of *Melaleuca leucadendra* L. grown in India: A novel source of (E)-nerolidol. *Industrial Crops and Products*, v. 69, p. 224-227, 2015.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 237–243, 2002.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MAUSE, R. *Piper aduncum* L.: Pluripotente Plant and Important Phytochemical Substance Source. *Fitos, Manaus, Amazonas*, v. 2, n. 1, jun/set 2006.

PROOT, M., & SANDRA, P. High speed capillary GC on 10 m× 100 µm id FSOT Columns. *Journal of High-Resolution Chromatography*, 9 (11), 618-623, 1986.

REED, J.C. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*, 3, 17–22, 2003.

RUBIOLO, P., SGORBINI, B., LIBERTO, E., CORDERO, C., AND BICCHI, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and fragrance journal*, 25 (5), 282-290, 2010.

RUSSO, R.; CORASANITI, M.T.; BAGETTA, G.; MORRONE, L.A. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 397821, 2015.

SAKAI, A.; YOSHIMURA, H. Monoterpenes of *Salvia leucophylla*. *Curr. Bioact. Compd.*, 8, 90–100, 2012.

SILVA, A.L. et al. Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. *Rev. bras. plantas med., Botucatu*, v. 15, n. 4, supl. 1, p. 670-674, 2013.

- SILVA, F.; FERREIRA, S.; QUEIROZ, J.A.; DOMINGUES, F.C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: Its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *J. Med. Microbiol.*, 60, 1479–1486, 2011.
- SILVA, Minelly Azevedo Da et al. Chemical constituents and bioactivities of essential oils from plants of the genus Piper L. (PIPERACEAE): A REVIEW. *South American Journal*, Rio Branco, v. 6, p. 776-817, ago/dez 2019.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis, p. 387-416. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFRGS, Porto Alegre, 1999.
- SHARIFI-RAD, JAVAD et al. Biological activities of essential oils: From plant chemocology to traditional healing systems. *Molecules*, v. 22, n. 1, p. 70, 2017.
- SOYLU, E.M.; KURT, S.; SOYLU, S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food Microbiol.*, 143, 183–189, 2010.
- STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.*, 10, 1881–1896, 2005.
- SOUTO, R. N. P. Avaliação das atividades repelente e inseticida de óleos essenciais de Piper da Amazônia em *Anopheles marajoara*, *Stegomyia aegypti* e *Solenopsis saevissima*. 2006. Tese de Doutorado. Tese, Universidade Federal do Pará e Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 221 p.
- TELASCREA, M., ARAÚJO, C. C. D., CAVALHEIRO, A. J., MARQUES, M. O., FACANALI, R., & DE MORAES, P. L. Essential oils from leaves of *Cryptocarya* spp from the atlantic rain forest. *Química Nova*, 31(3), 503-507, 2008.
- TOLOUEE, M.; ALINEZHAD, S.; SABERI, R.; ESLAMIFAR, A.; ZAD, S.J.; JAIMAND, K.; TAEB, J.; REZAEI, M.-B.; KAWACHI, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Int. J. Food Microbiol.*, 139, 127–133, 2010.
- VAN DEN BERG, Maria Elisabeth. Plantas medicinais na Amazônia (contribuição ao seu conhecimento sistemático). Coleção Adolpho Ducke, 1982.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. 1963.
- VAN de BRAAK, S.A.A.J., LEIJTEN, G.C.J.J., *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116, 1999.
- XIE, Z.; KAPTEYN, J.; GANG, D.R. A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. *Plant J.*, 54, 349–361, 2008.
- ZITZELSBERGER, C.; BUCHBAUER, G. Essential oils as “a cry for help”. A review. *Nat. Prod. Commun.*, 10, 1127–1138, 2015.
- ZUZARTE, M.; VALE-SILVA, L.; GONÇALVES, M.; CAVALEIRO, C.; VAZ, S.; CANHOTO, J.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of phenolic-rich

Lavandula multifida L. essential oil. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31, 1359–1366, 2012.

WADT, Lúcia Helena de Oliveira; EHRINGHAUS, Christiane; KAGEYAMA, Paulo Yoshio. Genetic diversity of “Pimenta Longa” genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. *Genetics and Molecular Biology, Brazil*, p. 74-82, 2004.

WAR, A.R.; SHARMA, H.C.; PAULRAJ, M.G.; WAR, M.Y.; IGNACIMUTHU, S. Herbivore induced plant volatiles: Their role in plant defense for pest management. *Plant Signal. Behav.*, 6, 1973–1978, 2011.

WAR, A.R.; PAULRAJ, M.G.; AHMAD, T.; BUHROO, A.A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.*, 7, 1306–1320, 2012.



CARTA DE DISPENSA DE APRESENTAÇÃO AO CEP OU CEUA

À

COORDENADORIA DO PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNISAGRADO

Informo que não é necessária a submissão do projeto de pesquisa intitulado “Estudo comparativo e identificação dos principais componentes do óleo essencial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e por Índice de Retenção”, ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) ou à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) devido à resolução 466 do CONEP está isento da submissão ao comitê, por se tratar de projeto onde não ocorrerão manipulações genéticas, nem de seres vivos e nem de material biológico vivo.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Marcelo Telascrea

Bauru, 10 de março de 2020.