



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Rubens Diego de Carvalho Castilho

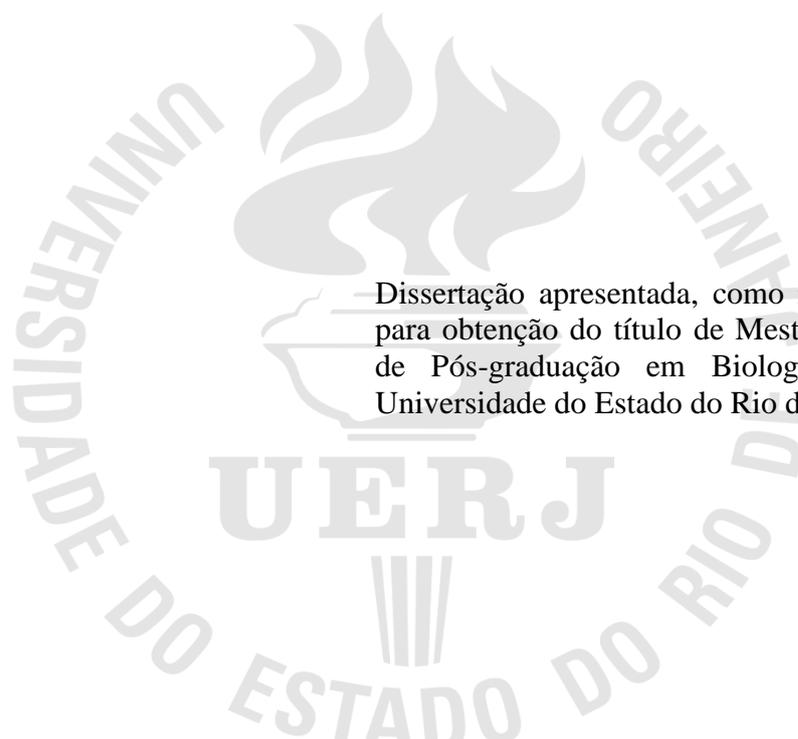
**Estudo do óleo essencial de *Piper anisum* (Spreng.) Angely da Mata Atlântica  
e avaliação do potencial moluscicida contra caramujos da espécie  
*Biomphalaria glabrata*.**

Rio de Janeiro

2021

Rubens Diego de Carvalho Castilho

**Estudo do óleo essencial de *Piper anisum* (Spreng.) Angely da Mata Atlântica e avaliação do potencial moluscicida contra caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elsie Franklin Guimarães

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

C352 Castilho, Rubens Diego de Carvalho  
Estudo do óleo essencial de *Piper anisum* (Spreg.) Angely da Mata Atlântica e avaliação do potencial moluscicida contra caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*/ Rubens Diego de Carvalho Castilho. – 2021.  
91 f. : il.

Orientador: Davyson de Lima Moreira.  
Coorientadora: Elsie Franklin Guimarães.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Piperaceae - Mata Atlântica - Teses. 2. Moluscidas - Teses 3. Esquistossomose - Teses. 4. Essências e óleos essenciais - Teses. I. Moreira, Davyson de Lima. II. Guimarães, Elsie Franklin. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582.672

Patricia Bello Meijinhos CRB7/5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Rubens Diego de Carvalho Castilho

**Estudo do óleo essencial de *Piper anisum* (Spreng.) Angely da Mata Atlântica e avaliação do potencial moluscicida contra caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 27 de Janeiro de 2022.

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (Orientador)  
Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elsie Franklin Guimarães (Coorientadora)  
Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Flávio José da Silva Dantas  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. André Mesquita Marques  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Helena Regina Pinto Lima  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

Rio de Janeiro

2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico a elaboração deste trabalho a Krishna, o sol de minha consciência e a minha falecida avó, Maria da Glória Vilhena Castilho, por ter me ensinado que amor é sinônimo de serviço e prestabilidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Natureza** e a **Vida**, por fazer emergir elementos necessários para que houvesse o ensejo de pensar, sentir e interpretar de maneira sensata os fatos observados.

Não há condições de se chegar em algum lugar, ou observar paragens superiores sem subir em ombros de gigantes, como disse Newton, portanto, gostaria de agradecer ao estimado Dr. **Davyson de Lima Moreira**, pelos anos de instrução, ideias, empolgação e inspiração nos processos científicos.

A queridíssima e amada **Dra. Elsie Franklin Guimarães**, por sua energia acolhedora, sua bondade incomensurável e a amorosidade que tens por seus discípulos, agradeço por este amor que nos une!

A colega **Jéssica Regina Sales Felisberto**, por sempre estar disponível, ter uma incrível energia de assistência, serviço e colaboração, a você toda minha gratidão, do fundo do meu coração!

E, como a vida é uma incrível caixa de surpresas, ao longo dela amechamos regalos inolvidáveis e inefáveis, um deles foi o colega **Rudá Antas Pereira**, que de forma genuína se colocou a me auxiliar quando outros não puderam, esse ato jamais será esquecido e aguardo desejoso de lhe ofertar minha mão servil para lhe apoiar em suas demandas!

Estendo meu agradecimento ao colega **Ygor Jessé Ramos** por suas ideias proativas, criativas e excepcionais, seus conhecimentos tão generosamente distribuídos ao grupo e a devoção que tens para com seus colegas, sou-lhe muito grato.

E para quem realmente conhece o Rubens, sabe que trabalhar com animais não seria algo tão simples, mas como ele confia no universo, pessoas lindas adentram as portas de sua vida como a **Rosângela Ribeiro de Carvalho**. Sou-lhe profundamente grato por me apoiar, orientar, demonstrar e auxiliar com todas as técnicas referentes aos amiguinhos caramujos!

Agradeço também ao amigo **Daniel Machado**, pela força com os óleos essenciais e pela amizade! Não poderia deixar de lembrar e curvar-me em agradecimentos a **Irene Fonseca** por toda sua prestatividade e colaboração, não somente comigo, mas com toda a equipe, você é incrível! Bem como ao grande **Paulo Victor Souza** por sua disponibilidade, amistosidade e gentileza em colaborar no que se solicita, que sejas sempre este ser humano admirável!

E como a vida não é feita apenas de serviço, estudo e propagação de saberes, agradeço aos amigos do coração, **Ramon Paschoal**, **Rafael Santos** e **Carlos Henrique**, pela parceria,

as gargalhadas, as tardes de descontração, isso faz o processo de aprendizagem ainda mais prazeroso.

Agradeço aos meus pais, **Soraya de Carvalho** e **Arsenio Fernandes**, por jamais terem duvidado da minha capacidade e vontade de crescer, esse apoio foi o fermento da minha massa.

Agradeço aos meus amores, **Lucia**, **Mariah** e **Samuel**, através de vossas vidas eu burilo a minha e sou grato por lapidar meu instrumento e hoje poder entender e vislumbrar meu samadhi, através dos meus sadhanas...

Gratidão a vida!!!! Hare Krishna!

Qualquer que seja a competência, as capacidades e genialidade que possamos ter – tudo isso é significativo apenas quando há equilíbrio.

*Sadhguru*

## RESUMO

CASTILHO, Rubens Diego de Carvalho. *Estudo do óleo essencial de Piper anisum (Spreng.) Angely da Mata Atlântica e avaliação do potencial moluscicida contra caramujos da espécie Biomphalaria glabrata*. 2022. 91 f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A Mata Atlântica é considerada um dos 25 *hotspots* do mundo, sendo demasiadamente importante aumentar os conhecimentos sobre a mesma visando garantir melhores condições de preservação e o estudo da família Piperaceae contribui com o pressuposto. No gênero *Piper* L. é muito comum ocorrer substâncias da via biossintética do chiquimato como os fenilpropanoides, descritos na literatura como eficientes moluscicidas. Portanto, esse trabalho tem como objetivo a análise da composição química do OE produzido pela espécie *Piper anisum* (Spreng.) Angely e avaliar seu potencial moluscicida contra caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. As substâncias químicas dos OE foram identificadas por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a detector por Ionização por Chama (CG-DIC) possibilitando análise de variância entre as composições de cada estação. Para o OE de primavera registrou-se o propanoide 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMB) (51,34%) e o monoterpeneo 1,8-cineol (17,64%); no verão, o BMB (99,12%); no outono registrou-se 55,67% de BMB e 13,13% de 1-propil-3,4-metilenodioxibenzeno; e no inverno 96,86% de BMB. O OE de primavera demonstrou menor atividade, pois na concentração de 100µg/mL levou a 30% de óbito enquanto que nas demais 100%. Os OEs de inverno e verão foram mais ativos devido o alto teor de BMB (20µg/mL = 60% e 60µg/mL = 80% de óbito, respectivamente). E o BMB isolado em 38µg/mL levou a 70% de óbito. Esse trabalho contribuiu para demonstração da atividade moluscicida ligada à substância BMB presente na espécie, além de demonstrar a variabilidade química existente nos materiais botânicos coletados em diferentes estações do ano, corroborando com mais dados químicos sobre a espécie para à literatura, e conjecturar sobre relação estrutura-atividade dos componentes presentes no OE.

**Palavras-chaves:** Piperaceae. Diversidade química. 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno. Esquistossomose. Fenilpropanoide. Bioatividade. *Piper anisum*.

## ABSTRACT

CASTILHO, Rubens Diego de Carvalho. *Study of essential oil of Piper anisum (Spreng.) Angely from the Atlantic Forest and evaluation of the molluscicidal potential against snails of the species Biomphalaria glabrata*. 2022. 91 f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

The Atlantic Forest is considered one of the 25 hotspots of the world, being too important to increase the knowledge about it in order to guarantee better preservation conditions and the study of the Piperaceae family contributes with the assumption. In the genus *Piper* L. it is very common to find substances from the shikimate biosynthetic pathway, such as phenylpropanoids, described in the literature as efficient molluscicides. Therefore, this work aims to analyze the chemical composition of the EO produced by *Piper anisum* (Spreng.) Angely and to evaluate its molluscicidal potential against snails of the species *Biomphalaria glabrata*. The chemical substances of the EOs were identified by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography coupled to Flame Ionization Detector (GC-FID) allowing analysis of variance between the compositions of each season. For spring EOs, the propanoid 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene (BMB) (51.34%) and the monoterpene 1,8-cineole (17.64%) were recorded; in summer, the BMB (99.12%); in the fall 55.67% BMB and 13.13% 1-propyl-3,4-methylenedioxybenzenes were recorded; in winter, 96.86% of BMB were found. The spring EO showed less activity, because at the concentration of 100µg/mL it led to 30% death, while in the others, 100%. The winter and summer EOs were more active due to the high BMB content (20µg/mL = 60% and 60µg/mL = 80% death, respectively). And isolated BMB at 38µg/mL led to 70% death. This work contributed to demonstrate the molluscicidal activity linked to the substance BMB present in the species, besides demonstrating the chemical variability existing in the botanical materials collected in different seasons of the year, corroborating with more chemical data about the species to the literature, and conjecture about the structure-activity relationship of the components present in the EO.

Key-words: Piperaceae. Chemical diversity. 1-Butyl-3,4-methylenedioxybenzene. Schistosomiasis. Phenylpropanoid. Bioactivity. *Piper anisum*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Distribuição mundial de Piperaceae .....	20
Figura 2 –	Exemplares de espécies pertencentes a cada um dos gêneros da família Piperaceae .....	20
Figura 3 –	Partes aéreas de <i>Piper nigrum</i> (Piperaceae) com destaque para folhas e infrutescência.....	21
Figura 4 –	Exemplificação da diversidade morfológica do gênero <i>Piper</i> L.....	22
Figura 5 –	Esquema de derivação biossintéticas do metabolismo vegetal.....	24
Figura 6 –	Partes aéreas de espécies populares de <i>Piper</i> L.....	25
Figura 7 –	Fórmulas estruturais planas de safrol (1) e piperina (2) .....	25
Figura 8 –	Esquema de formação biossintética de terpenos.....	27
Figura 9 –	Esquema de biossíntese dos fenilpropanoides e terpenoides.....	28
Figura 10 –	Partes aéreas de <i>Piper anisum</i> encontrada em Raíz da Serra, Magé – RJ.....	33
Figura 11 –	Estruturas químicas planas de substâncias isoladas do gênero <i>Piper</i> sect. <i>Ottonia</i> .....	34
Figura 12 –	Estruturas químicas de aristolactamas e amidas isoladas da espécie <i>Piper anisum</i> .....	35
Figura 13 –	Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	38
Figura 14 –	Processo de expansão e disseminação da Esquistosomose em território brasileiro .....	39
Figura 15 –	Modelo morfológico com os principais caracteres para identificação do gênero <i>Biomphalaria</i> sp .....	42
Figura 16 –	Etapas conduzidas no processo de emulsificação dos OEs de <i>P. anisum</i> .	48
Figura 17 –	Ajuste de pH da água mole sintética.....	49
Figura 18 –	Aquários de criação de caramujos da espécie <i>B. glabrata</i> .....	51
Figura 19 –	Demonstrativo de ambiente experimental para ensaio de atividade moluscicida com OEs de <i>P. anisum</i> .....	52
Figura 20 –	Partes aéreas coletadas de <i>Piper anisum</i> nas quatro estações do ano.....	54
Figura 21 –	Cromatogramas obtidos por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas dos óleos essenciais de <i>Piper anisum</i> coletadas nas quatro estações do ano.....	56

Figura 22 – Dendrograma para agrupamento hierárquico construído a partir das amostras de óleos essenciais de <i>P. anisum</i> coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ nas quatro estações do ano.....	59
Figura 23 – Gráfico <i>score</i> construído a partir das substâncias identificadas nas amostras sazonais (quatro estações do ano) do óleo essencial de <i>Piper anisum</i> coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ.....	60
Figura 24 – Dendrograma comparativo construído a partir das amostras sazonais de OEs de <i>Piper anisum</i> coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ e correlacionadas com dados da literatura.....	61
Figura 25 – Gráfico <i>score</i> construído a partir das substâncias identificadas nas amostras sazonais do óleo essencial de <i>Piper anisum</i> coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ, e correlacionadas com os dados disponíveis na literatura.....	62
Figura 26 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GP100) após 48h de exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído na primavera.....	66
Figura 27 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GP150) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído na primavera.....	67
Figura 28 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GP200 e GP250) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído na primavera.....	68
Figura 29 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GV60) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no verão.....	69
Figura 30 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GV80) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no verão Óbitos GV60.....	70
Figura 31 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GV100) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no verão.....	70
Figura 32 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GO100, GO150, GO175) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no outono.....	71
Figura 33 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GI90, GO100) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no inverno.....	72
Figura 34 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GI20) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no inverno.....	73
Figura 35 – Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GI35) após exposição	

	ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no inverno.....	73
Figura 36 –	Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (GI45) após exposição ao óleo essencial de <i>Piper anisum</i> extraído no inverno.....	74
Figura 37 –	Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (BMB25) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno.....	75
Figura 38 –	Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (BMB38) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno.....	75
Figura 39 –	Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (BMB50) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno.....	76
Figura 40 –	Observação de óbito de <i>Biomphalaria glabrata</i> (BMB75) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno.....	77
Quadro 1 –	Descrição de hospedeiros, potenciais e não hospedeiros dentro do gênero <i>Biomphalaria</i> sp.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Atividades biológicas de alguns arilpropanoides.....	29
Tabela 2 –	Alguns fenilpropanoides em <i>Piper L</i> .....	31
Tabela 3 –	Caracterização do local de coleta e dados de deposição em herbário de <i>P. anisum</i> (Spreng.)Angely, na Serra da Estrela – RJ.....	46
Tabela 4 –	Demonstrativo das concentrações usadas em cada teste moluscicida com BMB e os OEs da espécie <i>P. anisum</i> .....	52
Tabela 5 –	Constituição química do óleo essencial de <i>P. anisum</i> da Raíz da Serra, Magé – RJ, nas quatro estações do ano.....	57
Tabela 6 –	Comparativo de acervo químico do óleo essencial das folhas de <i>P. anisum</i> deste trabalho com registros da literatura.....	63
Tabela 7 –	Demonstrativo geral de óbitos observados de <i>Biomphalaria glabrata</i> , após exposição aos OEs de <i>P. anisum</i> coletadas nas quatro estações do ano e a substância pura BMB.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAH	Agrupamento Hierárquico
ACP	Análise de Componentes Principais
AMS	Água Mole Sintética
BMB	1-Butil-3,4-metilenodioxibenzeno
CG-DIC	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Detector por Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CMO	Caminho do Ouro
COLS	Colaboradores
CP1	Componente Principal Primário
CP2	Componente Principal Secundário
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GC	Grupo Controle
GI20	Grupo de Inverno 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GI35	Grupo de Inverno 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GI45	Grupo de Inverno 45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GI50	Grupo de Inverno 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GI75	Grupo de Inverno 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GI90	Grupo de Inverno 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GI100	Grupo de Inverno 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GO100	Grupo de Outono 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GO150	Grupo de Outono 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GO175	Grupo de Outono 175 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GP50	Grupo de Primavera 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GP100	Grupo de Primavera 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GP150	Grupo de Primavera 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GP200	Grupo de Primavera 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

GP250	Grupo de Primavera 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GV60	Grupo de Verão 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GV80	Grupo de Verão 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GV100	Grupo de Verão 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
h	Hora(s)
HRJ	Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
IPP	Difosfato de isopentelina
IR	Índice de Retenção
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
MEP	Metileritritol Fosfato
MEV	Ácido Mevalônico
OE	Óleo Essencial
OE-I	Óleo Essencial de Inverno
OE-O	Óleo Essencial de Outono
OE-P	Óleo Essencial de Primavera
OE-V	Óleo Essencial de Verão
PAL	Fenilalanina Amonialiasa
RBw	Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro
RJ	Rio de Janeiro
pH	Potencial de Hidrogênio
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UTO	Unidades Taxonômicas Operacionais
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por Mililitro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
1.1	<b>Mata Atlântica</b> .....	18
1.2	<b>Família Piperaceae</b> .....	19
1.2.1	<u>Gênero <i>Piper</i> L.</u> .....	21
1.3	<b>Metabolismo secundário em Piperaceae</b> .....	23
1.3.1	<u>Óleos essenciais em Piperaceae</u> .....	26
1.4	<b>Gênero <i>Piper</i> L. (<i>Piper anisum</i>)</b> .....	32
1.4.1	<u>Metabólitos secundários em <i>Piper anisum</i> (Spreng.) Angely</u> .....	33
1.5	<b>Esquistossomose</b> .....	36
1.6	<b>Gênero <i>Biomphalaria</i> (<i>Gastropoda</i>)</b> .....	40
1.7	<b>Espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)</b> .....	42
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	44
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	44
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
3.1	<b>Material vegetal</b> .....	45
3.2	<b>Extração do óleo essencial</b> .....	46
3.3	<b>Análise dos componentes do OE</b> .....	46
3.4	<b>Emulsificação do óleo essencial de <i>Piper anisum</i> para teste de potencial moluscicida e Obtenção do 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMB)</b> .....	47
3.5	<b>Ajuste de concentrações de OE nas soluções do experimento</b> .....	48
3.6	<b>Preparação da solução veículo (água mole sintética) para o ensaio de atividade moluscicida</b> .....	49
3.7	<b>Cultivo dos caramujos da espécie <i>B. glabrata</i> (Say, 1818)</b> .....	50
3.8	<b>Teste de atividade moluscicida do óleo essencial de <i>P. anisum</i></b> .....	51
3.9	<b>Processamento dos dados e análises estatísticas</b> .....	53
4	<b>RESULTADOS</b> .....	54
4.1	<b>Rendimento, fenologia e composição dos óleos essenciais de <i>P. anisum</i></b> .....	54
4.2	<b>Análises estatísticas multivariadas para coletas das quatro estações do ano</b> .....	59
4.2.1	<u>Comparação da composição química dos OEs das quatro estações do ano com dados da literatura</u> .....	61

4.3	<b>Avaliação do potencial moluscicida do óleo essencial das folhas de <i>P. anisum</i></b> .....	64
4.3.1	<u>Óleo essencial de primavera</u> .....	64
4.3.2	<u>Óleo essencial de verão</u> .....	69
4.3.3	<u>Óleo essencial de outono</u> .....	71
4.3.4	<u>Óleo essencial de inverno</u> .....	72
4.3.5	<u>1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno isolado</u> .....	74
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	79
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	84

## INTRODUÇÃO

Doenças parasitárias ocorrem significativamente na população brasileira, principalmente em regiões de carência (PEREIRA et al., 2020). Estas são classificadas como negligenciadas devido a escassez de tratamento, ineficiência, precariedade ou desatualização do mesmo, o que leva a mortalidade ou agravamento dos sintomas de milhões de pessoas no Brasil e no mundo (SAUCHA; SILVA; AMORIM, 2015).

A esquistossomose, doença parasitária causada pelo verme helminto trematódeo da espécie *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, necessita para seu completo desenvolvimento encontrar um hospedeiro intermediário, neste caso, os caramujos da classe *Gastropoda* pertencentes ao gênero *Biomphalaria* (CARLOS DE SOUZA et al., 2011). Estes gastrópodes são de elevada preocupação para o Brasil, considerando o tamanho significativo da população da espécie *B. glabrata* (WHO, 2017).

Como profilaxia para a doença supracitada, desde a década de 1960, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o emprego de uma substância sintética chamada niclosamida, capaz de matar os moluscos impedido o amadurecimento dos vermes trematódeos. No entanto, o produto químico é extremamente tóxico para o ecossistema aquático ao qual é aplicado, sendo necessário o estudo e aplicação de novas ferramentas que atuem como biocontroladores, mas que não ofereça riscos ao meio ambiente (RIBEIRO et al., 2021).

O óleo essencial é uma mistura de substâncias químicas voláteis sintetizadas nos organismos vegetais, aos quais são atribuídas muitas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antibacteriano, antifúngico, anti-helmíntico, inseticida, moluscicida, anestésico entre outras (MARQUES et al., 2011; MELO et al., 2021; MOREIRA et al., 2001). Das famílias botânicas que compõem a Flora brasileira, Piperaceae possui especial destaque no meio científico, devido ao elevado potencial de ações biológicas descritas para suas espécies. O gênero *Piper* L., o mais abundante da família, é descrito na literatura como tendo espécies ricas em substâncias voláteis originárias das vias acetato-mevalonato, metileritritol fosfato (terpenoides), e da via do chiquimato que leva à biossíntese de fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2017).

Volumosos estudos demonstram atividade moluscicida conferidas pelas substâncias arilpropanoídicas safrol, dilapiol, miristicina, apiol e eugenol, as quais podem ser encontradas

em diversas espécies do gênero *Piper* L. (DO CARMO et al., 2012; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; MAIA; ANDRADE, 2009; SOUSA et al., 2014).

Moreira e cols. (1997), demonstraram pelo estudo de óleo essencial da espécie *Piper anisum* (Spreng) Angely, a presença do constituinte 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno em elevado teor (~95%). Esse butilbenzeno também é originário da via do chiquimato, como as substâncias supracitadas, apresentando grande semelhança estrutural, assim, conjectura-se uma possível ação biológica similar aos fenilpropanoides descritos anteriormente. Por outro lado, o estudo com a espécie vegetal *Piper anisum* ampliaria com importantes informações do perfil químico (quantificação e qualificação) dos óleos essenciais para a região de Magé, somando novos dados aos já existentes para Teresópolis (MOREIRA; KAPLAN, 1997), Paraty (SANTOS et al., 2001) e Marambaia (PEREIRA et al., 2021).

Com base nessas considerações e pelo histórico do uso de plantas bioativas da família Piperaceae, destaca-se a necessidade de um maior engajamento científico para elaboração de novas formas de controle biológico do molusco *B. glabrata* e, conseqüentemente, controle da disseminação das patogenias transmitidas por estes, sem que haja danos nocivos ao ecossistema.

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. Mata Atlântica

A Mata Atlântica representa um patrimônio relevante para o Brasil, merecendo especial atenção dos estudiosos com vista a aumentar o conhecimento do seu grande potencial biológico, bem como o alto grau de endemismo e a sua importante interação Flora e Fauna (MYERS et al., 2000; SANTOS; BEZZERA; ALVES, 2021). Os fragmentos florestais deste bioma são localizados ao Leste do Brasil, compreendendo também, o Leste paraguaio e região Nordeste da Argentina (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2011). Inicialmente, esse bioma possuía uma extensão de cerca 12% do território brasileiro, com uma área de aproximadamente 1.300,000 milhões de km<sup>2</sup>. Todavia desde a chegada dos primeiros europeus no Brasil em 1.500, passa por contínuo processo de degradação, tornando-se um dos biomas mais afetados antropicamente do país. Atualmente, conta com cerca de aproximadamente 8% de sua cobertura original, em fragmentos isolados e em diferentes estados de conservação, como pode ser observado ao longo da costa brasileira, interior da região Sul e Sudeste, Sul do Mato Grosso do Sul e Goiás, no interior dos Estados do Nordeste, bem como a região de Misiones (MMA, 2002; GARLINDO-LEAL; CÂMARA, 2005; RIBEIRO et al., 2011; CASTUERA-OLIVEIRA; DE OLIVEIRA-FILHO; EISENLOHR, 2020).

De enorme heterogeneidade, a Mata Atlântica contém altos índices de diversidade e endemismo para variados organismos, devido a um complexo conjunto de condições climáticas, geomorfológicas e ecológicas, bem como as influências oceânicas (MORELLATO; HADDAD, 2000; MYERS et al., 2000). Devido a essas características, foi caracterizada por Myers e colaboradores, no ano 2000, como um dos *hots spots* para conservação da biodiversidade. Isto lhe confere uma grande prioridade mundial em termos de conservação da diversidade biológica, pois trata-se de um ambiente com elevado índice de endemismo e grande variedade de espécies, todavia com enormes ameaças de extinção.

O padrão climatológico – chuvas periódicas – é o que contribui para a formação dos tipos vegetacionais dentro da Mata Atlântica que são Florestas Ombrófilas (revestimento de cadeias montanhosas de baixa e média altitude ao longo da costa e precipitações periódicas durante todo ano) e Florestas Semidecíduas (presença de indivíduos caducifólios durante estações secas – há clara definição entre temporadas de precipitação e seca), além de incluir

outros tipos de fitofisionomias, tais como manguezais, restingas e campos de altitude (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; CASTUERA-OLIVEIRA; DE OLIVEIRA-FILHO; EISENLOHR, 2020).

Considerando-se registros fósseis do Quaternário, reuniram-se dados que corroboram às informações paleoclimáticas Pleistocênicas, o que sugere distintos graus de atingimento nos pólos da Mata Atlântica, na qual demonstra grande faixa da porção Sul sendo substituída por formação semi-árida, sendo portanto mais fragmentada do que seu extremo oposto. Existe, dessa forma, a presença de uma extensa e estável área para refúgio, formada há 21.000 anos, na última glaciação (MONTEIRO, 2015).

Por outro lado, a vasta diversidade genética presente na Floresta Atlântica teve sua origem anterior ao Pleistoceno, o que abre margem para outras explicações da origem e estruturação da diversidade biológica neste bioma. A teoria Paleogeográfica do Neogeno (Plioceno a Mioceno), a qual sugere que alterações paisagísticas, cursos de rios, intensa atividades tectônicas foram fatores que colaboraram para a formação de um padrão homogêneo de organismos em determinadas regiões (MONTEIRO, 2015). Outra tentativa de explicação do fenômeno se dá pela teoria dos gradientes ecológicos e/ou formações de barreiras físicas (rios, montanhas e fragmentos) como modificadoras de fluxo gênico, notória e expressiva em animais terrestres (MONTEIRO, 2015).

Entender as nuances ecológicas que permitem a Mata Atlântica ser um bioma de elevada expressão da biodiversidade, não somente no tocante a Fauna, mas principalmente em relação à Flora, contribui significativamente para a compreensão das interações, formação, composição e meios de sustentação da mesma.

Dentre a grande diversidade florística descrita para o bioma, é de notória representatividade espécies pertencentes a família Piperaceae.

## 1.2. Família Piperaceae

A família Piperaceae possui distribuição pantropical com cerca de 3.700 espécies (Figura 1) distribuídas em cinco gêneros: *Manekia* Trel., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Piper* L., *Verhuellia* Miq. e *Zippelia* Blume (Figura 2) (JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004).

Figura 1 – Distribuição mundial de espécies da família Piperaceae



Fonte: Stevens et al., 2021.

De acordo com o sistema de classificação de Angiospermae APG IV (2016), a família Piperaceae está inserida no clado Magnolídea, ordem Piperales, juntamente com Aristolochiaceae e Saururaceae. No Brasil estão presentes 464 espécies, concentradas principalmente nas florestas tropicais, com maior quantitativo na Mata Atlântica, o que aumenta a importância deste bioma em relação às espécies da família distribuídas nos gêneros *Manekia*, *Peperomia* e *Piper* (TEBBS, 1993; FLORA DO BRASIL 2020) (Figura 2).

Figura 2 – Exemplos de espécies pertencentes a cada um dos gêneros da família Piperaceae



Legenda: **1** - *Manekia* Trel.; **2** - *Verhuellia* Miq.; **3** - *Zippelia* Blume; **4** - *Peperomia* Ruiz & Pav.; **5** - *Piper* L.

Fonte: Tropicos, 2021.

Piperaceae torna-se especialmente conhecida devida popularidade da espécie *Piper nigrum* L. (Figura 3), mundialmente chamada de pimenta-preta (ou pimenta-do-Reino) sendo, desde a antiguidade, a especiaria mais consumida e com elevada expressão comercial. Era também muito cobiçada no século XV, fato este que levou navegadores às terras do continente Americano (COSTA; MEDEIROS, 2000). Em Portugal, no Século XV, cerca de

60 kg da pimenta-do-Reino era facilmente permutada por 52 g de ouro (ALBUQUERQUE et al., 2001). Além de toda difusão como especiaria, *P. nigrum* era muito empregada medicinalmente como antioxidante, anti-inflamatória (ANANDARAJ; SARMA, 1995), digestiva, no melhoramento das atividades estomacais, entre outras (NISHIMURA et al., 2011).

Essa e outras representações de importantes espécies na família despertam enorme interesse da comunidade científica acerca da diversidade química e das propriedades medicinais do gênero *Piper* L.

Figura 3 – Partes aéreas de *Piper nigrum* (Piperaceae) com destaque para folhas e infrutescência.



Fonte: tropicos.org,

#### 1.2.1. Gênero *Piper* L.

*Piper* L. é considerado um dos dez maiores gêneros neotropicais de Magnoliidae e o maior em Piperaceae. No mundo são registradas cerca de 2.000 espécies, sendo 289 endêmicas do Brasil. Na figura 4 é possível visualizar a diversidade morfológica das espécies do gênero (JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004; GUIMÃRAES et al., 2010; FLORA DO BRASIL, 2020).

Figura 4 – Exemplificação da diversidade morfológica do gênero *Piper* L.



Legenda: **1** - *Piper corcovadense* (Miq.) C. DC.; **2** - *Piper rivinoides* Kunth; **3** - *Piper amalago* L.; **4** - *Piper pseudopothifolium* C. DC.

Fonte: Flora do Brasil, 2020.

Geralmente, suas espécies habitam áreas sombrias, úmidas ou margens de rios, entretanto, podem ser encontradas nas bordas de mata e no interior de clareiras, naturais ou abertas por ação antrópica. Muitas das espécies do gênero são plantas pioneiras e estão envolvidas no processo de regeneração e manutenção da diversidade de florestas (GREIG, 1993; QUEIROZ; DE BARROS; GUIMARÃES, 2020).

Morfologicamente, as espécies do gênero *Piper* L. são subarbustos, arbustos ou arvoretas, de caules intumescidos, lignificados; ramos eretos e nodosos. Suas folhas são alternas, membranáceas, cartáceas ou coriáceas quando *in natura*; sésseis ou pecioladas, às vezes, peltadas; as bainhas são curtas ou prolongam-se até a lâmina, podendo ser alada; as lâminas possuem forma, consistência e tamanhos variáveis providas ou não de glândulas translúcidas ou opacas; o padrão de nervação pode ser acródromo, broquidódromo, campidódromo ou eucampidódromo; as inflorescências apresentam-se em formato de espigas ou racemos opostas às folhas ou em umbela axilares, eretas, pêndulas ou flexuosas; perfis persistentes ou caducos; as brácteas podem estar presentes ou ausentes no pedúnculo; as flores são geralmente bissexuais, diminutas, dispostas em raque sulcada, com textura lisa, papilosa ou franjada, protegidas por bráctea floral de diversas formas, pediceladas, variando de glabra a pilosa; o ovário pode ocorrer de forma elíptico, obovoide, ovoide, tri ou tetragonal com estames 2-6; os Frutos são do tipo drupa com pericarpo delgado, obpiramidal, obovoide ou trigonal, elíptico, sulcado-tetragonal liso ou papiloso; a quantidade de estigmas é geralmente

entre 3-4 sendo possível, porém raro com 6-9, com estiletos podendo estar presente, ausentes ou inconspícuos (GUIMARÃES; VALENTE, 2001).

Estudos químicos, ecológicos e evolutivos de espécies de *Piper* L. têm se intensificado devido o interesse científico nas biomoléculas produzidas pelo gênero, fazendo dessas espécies promissoras fontes de pesquisa (SILVA, 2008; PEREIRA et al., 2021).

### 1.3. Metabolismo secundário em Piperaceae

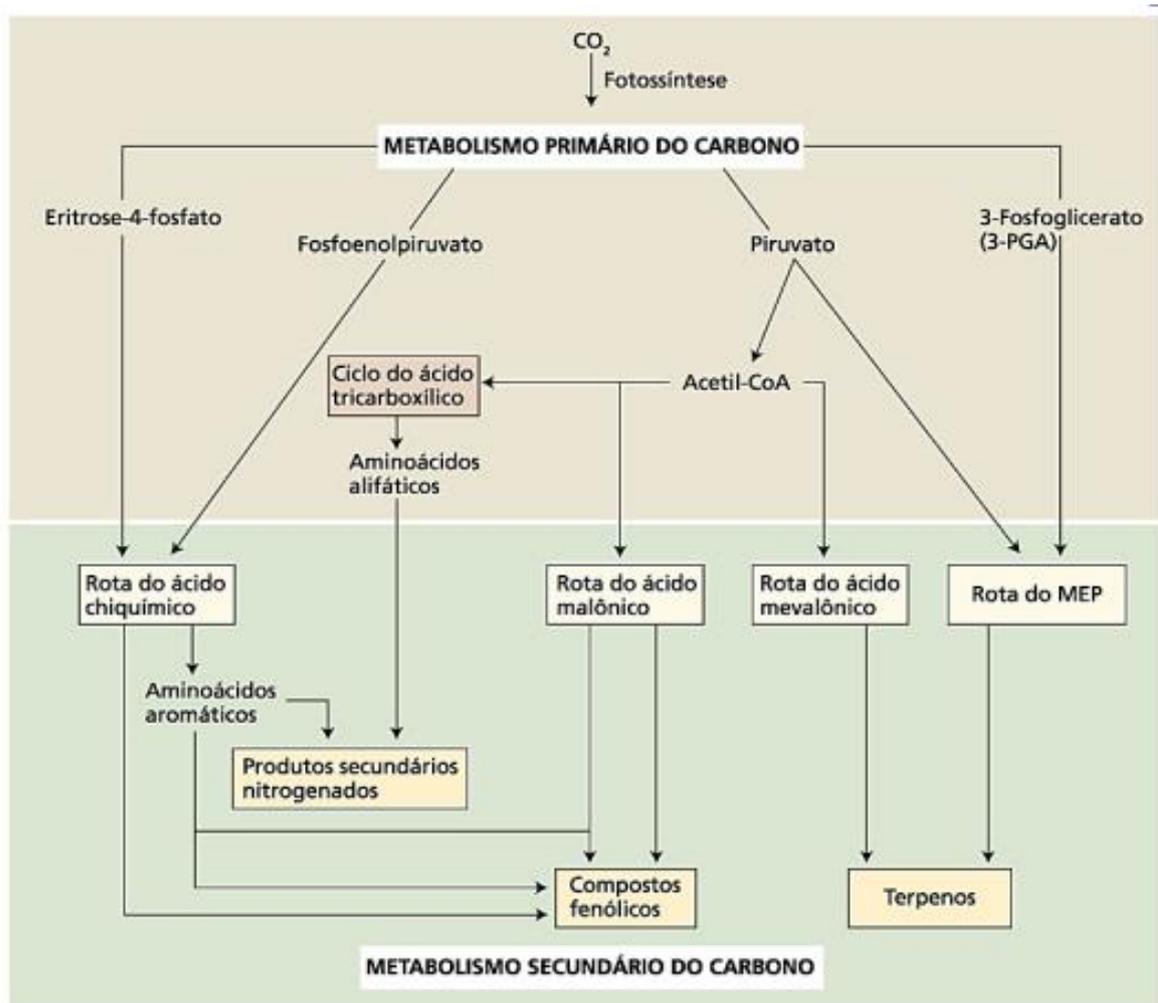
Entende-se como metabolismo o conjunto de reações químicas que ocorrem em organismos vivos, e nas plantas, há constante controle das unidades orgânicas precursoras por meio de genes que expressam enzimas para a realização de reações na produção de substâncias orgânicas, também conhecidas como metabólitos (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996). É esse metabolismo que permeia a vida e faz com que essa dinâmica ocorra.

Nos organismos de origem vegetal é conhecido por ser dividido em dois, o metabolismo primário ou basal e o metabolismo secundário ou especial (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014). Exemplos de metabólitos primários são os aminoácidos, sacarídeos, lipídios e ácidos nucleicos, cuja finalidade orgânica é a manutenção da vida, ou seja, este tipo de metabolismo é condição básica para a sustentação da vida à reprodução do vegetal (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014). O metabolismo secundário, por sua vez, dá origem a substâncias em menor escala, sendo restritas em sua distribuição e com funcionalidades específicas, todavia são tão importantes quanto as substâncias sintetizadas no metabolismo basal. A diversidade química dos metabólitos conferem ampla variedade de atividades biológicas para os vegetais, tais quais sinalizadores químicos em relação às outras espécies; respostas moleculares ao ambiente; defesa contra herbivoria, patógenos ou competidores; proteção contra radiação UV; atração de polinizadores; entre outras (KAPLAN; BORIN, 1996; GERSHENZON; ENGELBERTH, 2013; GOTTLIEB; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

A riqueza das substâncias do metabolismo secundário vegetal, em comparação aos demais organismos, pode estar associada às demandas ecológicas enfrentadas pelas plantas, pois são sésseis, sendo esta a maneira pela qual encontraram para enfrentar os reveses naturais é promovendo certa diversidade de classes químicas que as auxiliem nos mais diferentes processos de interação ecológica e adaptativa (HARBORNE, 1988).

Esses metabólitos são sintetizados por alguns intermediários específicos, originários do metabolismo primário, como o acetato, alguns aminoácidos, piruvato e açúcares. São classificados, majoritariamente, pelas vias biossintéticas, como as vias dos ácidos aminados, do chiquimato, do ácido mevalônico, dos policetideos e do fosfato de metileritritol (Figura 5) (SILVA, 2008; SIMÕES et al., 2017).

Figura 5 – Esquema de derivação biossintética do metabolismo vegetal



Fonte: Adaptado de Simões et al., 2017.

A química da Família Piperaceae é caracterizada pela presença de substâncias originárias da via biossintética do chiquimato, inclusos lignoides e derivados do ácido cinâmico; vias do acetato-mevalonato (terpenos), bem como as vias mistas, os flavonoides, amidas e cromenos (MOREIRA et al., 2016).

As múltiplas aplicações na medicina tradicional das espécies de *Piper* L., além da já citada pimenta-preta, também são conhecidas mundialmente por sua eficiência medicinal as

espécies *Piper methysticum* G. Forst., (Figura 6-a) denominada popularmente como kava-kava e usada como eficaz ansiolítico, devida presença de cavalactonas, e a espécie *P. longum* L. (pimenta-longa) (Figura 6-b) muito empregada como anti-inflamatória. O valor comercial e o elevado potencial apresentado pelas espécies do gênero *Piper* L. é visto quando substâncias presentes no metabolismo secundário demonstram importância medicinal elevada, como por exemplo, a piperina encontrada em *P. nigrum* e safrol presente em *P. hispidinervum* C. DC., (Figura 6-c) (Figura 7) (FLORES et al., 2009; MARQUES et al., 2010; LAPORTE et al., 2011; JUNIOR et al., 2012).

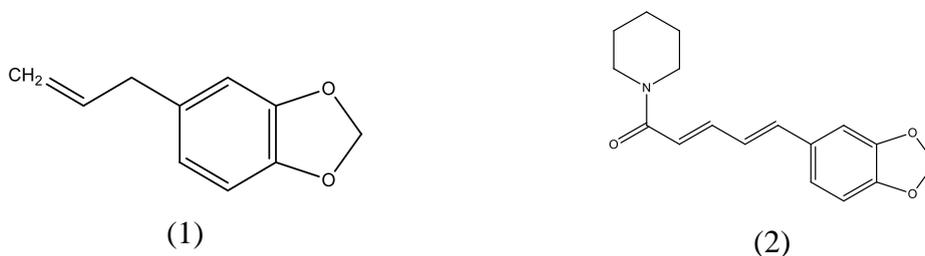
Figura 6 – Partes aéreas de espécies populares de *Piper* L.



Legenda: **a** – *Piper methysticum* G. Forst.; **b** – *Piper longum* L.; **c** – *Piper hispidinervum* C.DC.

Fonte: Tropicos.org

Figura 7 – Fórmulas estruturais planas do safrol (1) e da piperina (2)



Fonte: adaptado de Cunico et al., 2005; Marques et al., 2010.

Além das substâncias fixas originadas no metabolismo secundário dos vegetais, provenientes de diferentes rotas biossintéticas, tais como amidas, alcaloides, lignoides, ácidos benzoicos, cromenos e flavonoides, que representam elevada importância devido suas

potencialidades farmacológicas, há também um grupo de substâncias químicas voláteis, chamadas de óleos essenciais (OE) (RAPADO et al., 2010; SIMÕES et al., 2017).

### 1.3.1. Óleos essenciais em Piperaceae

Os óleos essenciais são misturas lipofílicas, de natureza complexa – devida a proporção / síntese das substâncias, no tocante à composição e sua produção –, normalmente odoríferas, apresentando-se em estado líquido, com aparência oleosa em temperatura ambiente e são obtidos de matéria-prima vegetal (SIMÕES et al., 2017).

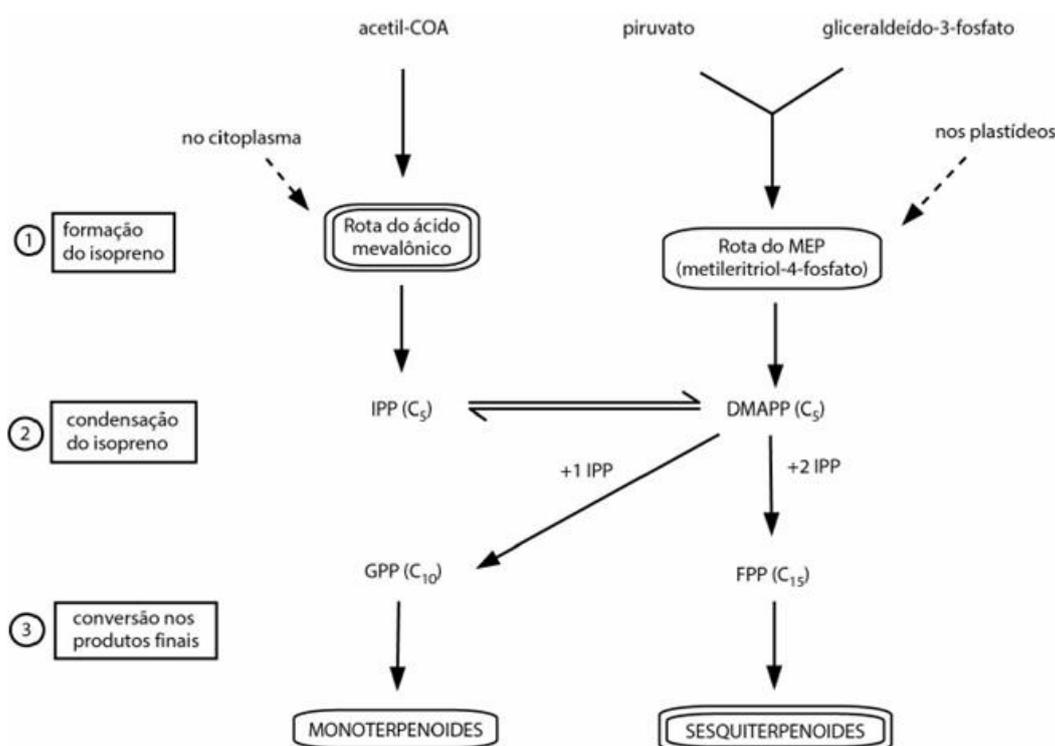
Para ser categorizado como OE, o material precisará atender a algumas exigências determinadas pela *International Standard Organization* (ISO), a qual definiu como óleo volátil produtos obtidos de partes de plantas, pelo emprego de técnicas como arraste com vapor d'água, espremeduras de pericarpos de frutos cítricos e hidrodestilação (SIMÕES et al., 2017). Apesar de ser chamado de óleo, por sua natureza hidrofóbica, este se difere dos óleos fixos (normalmente obtidos por prensagem de sementes) devida alta volatilidade das substâncias que o compõe. Essa característica dos OE permite que seus constituintes se desprendam da matriz, alcançando a atmosfera e sendo percebidos pelos agradáveis (a maioria) e intensos aromas, sendo por este motivo denominados óleos essenciais (SIMÕES et al., 2017).

Cabe ressaltar que o emprego de OE medicinalmente possui registro na humanidade desde tempos remotos. Há cerca de 6.000 anos os antigos egípcios os utilizavam em práticas religiosas, funções de beleza, cura, bem-estar físico e mental, sendo obtidos de flores, folhas, sementes e resinas. Substâncias aromáticas também eram associadas a incensos, óleos corporais e acessórios variados pelos antigos indianos e chineses, isto muito antes da era cristã. Mas, somente a partir da Idade Média, com a introdução de aparelhos para destilação, desenvolvidos por cientistas muçulmanos, foi que os OEs passaram a ser comercializados como substâncias aromáticas (TYRREL, 1990).

Quimicamente há enorme variedade de substâncias presentes nos OEs, todavia as estruturas mais encontradas, devido à quimiodiversidade, são os terpenoides e os fenilpropanoides. Porém, há registros de álcoois, cetonas, aldeídos, ésteres, éteres, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, peróxidos e cumarinas (SIMÕES et al., 2017).

Os terpenoides derivam de unidades isoprênicas (2-metilbutadieno) conhecidas como isopreno. Ao ligar-se a grupos fosfato, essas unidades de isopreno originam duas unidades (C5) básicas precursoras da via biossintética dos terpenos, o difosfato de isopentelina (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP). A condensação desses dois precursores leva à formação do difosfato de geranila. Dessa forma, originam-se os monoterpênicos. Os sesquiterpenos são formados a partir da reação entre uma unidade de IPP mais uma unidade do pirofosfato de geranila (C10) gerando o difosfato de farnesila (C15). As reações e rotas biossintéticas de formação dos mono- e sesquiterpenos são compartimentalizadas no vegetal, conforme Figura 8. Os mono- e sesquiterpenos são os terpenoides principais que constituem os OEs, porém, não é raro o registro de diterpenos voláteis (ABBAS et al., 2017; SIMÕES et al., 2017).

Figura 8 – Esquema de formação biossintética de terpenos



Legenda: IPP – Difosfato de isopentenila; DMAPP – Difosfato de dimetilalila; GPP – Difosfato de geranila; FPP – Difosfato de farnesila.

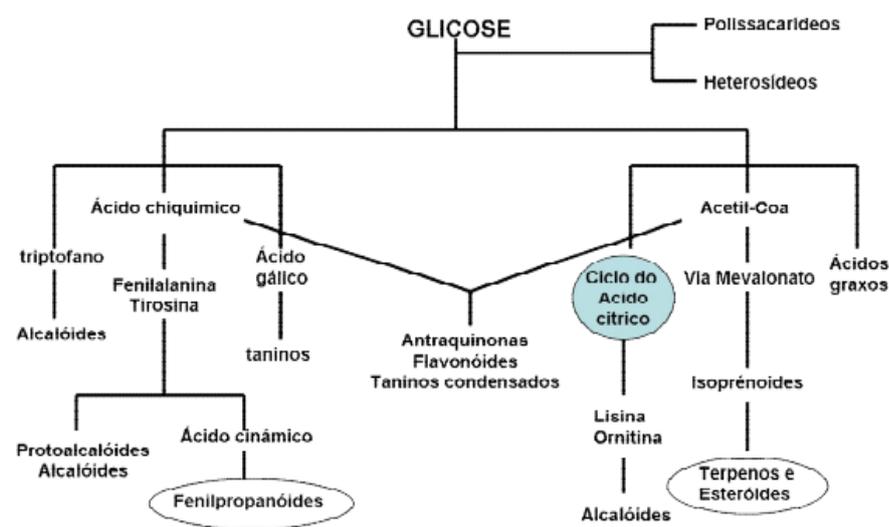
Fonte: adaptado de Sticher, 2007 *apud* Simões et al., 2017.

Como mencionado acima, as rotas biossintéticas para os formação dos terpenoides ocorrem em locais distintos da estrutura celular: a rota do ácido mevalônico (MEV) sucede-se no citoplasma, enquanto que a do 2-C-metileritritol-4-fosfato (MEP), nos plastídeos. Normalmente ou preferencialmente, nos plastídeos são formados os monoterpênicos, diterpenos e tetraterpenos (C<sub>40</sub>), enquanto no citoplasma os sesquiterpenos e triterpenos (C<sub>30</sub>). Todavia, o

intercambio intercompatimentos é plenamente viável, podendo haver trocas de precursores entre si (OOTANI et al., 2013).

Os fenilpropanoides estruturalmente possuem um esqueleto carbônico cujo seu anel aromático encontra-se ligado à três átomos de carbono. Sua formação origina-se a partir da via biossintética do chiquimato, onde subsequentes reações enzimáticas – originados a partir da fenilalanina – catalisadas pela fenilalanina amonialiase (PAL), produzem ácido cinâmico, que por meio de reduções enzimáticas dará lugar para formação de alilbenzenos e/ou propenilbenzenos (esqueletos carbônicos dos fenilpropanoides) e, pela oxidação com degradação de cadeias laterais, formam aldeídos aromáticos. A figura 9 permite a visualização da metade à esquerda da via mencionada (OOTANI et al., 2013).

Figura 9 – Esquema de biossintese dos fenilpropanoides e terpenoides



Fonte: SANTOS et al., 2004 *apud* OOTANI et al., 2013.

Substâncias sintetizadas na via dos fenilpropanoides tais como safrol, dilapiol, apiol, eugenol, miristicina, asaricina e sarisan, têm sido isoladas de diversas espécies de diferentes famílias botânicas, incluindo de Piperaceae. Tais substâncias possuem acentuadas atividades biológicas, conforme descrito na tabela 1.

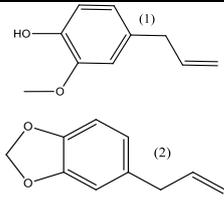
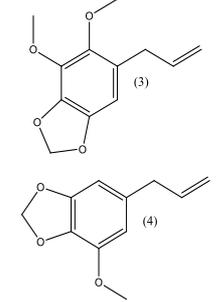
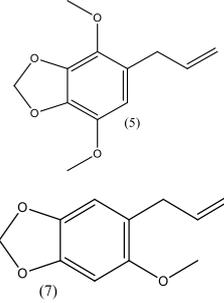
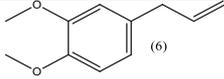
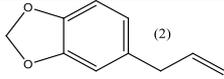
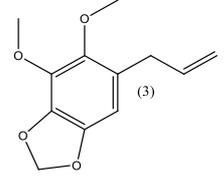
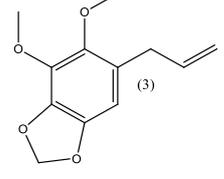
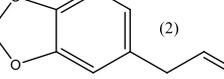
Tabela 1 – Atividades biológicas de alguns arilpropanoídeos.

<b>Atividade biológica</b>	<b>Referência</b>
<b>Dilapiol</b>	
Antifúngica	MAIA; ANDRADE, 2009.
Antibacteriana	
Inseticida	
Larvicida	
Moluscicida	
Plasmodicida	NEGREIROS; MIQUELONI; AZEVEDO, 2012.
<b>Safrol</b>	
Inseticida	MAIA; ANDRADE, 2009.
Antibacteriana	VALAREZO et al., 2021.
Precursor em Perfumaria	MAIA; ANDRADE, 2009.
Moluscicida	DO CARMO et al., 2012.
<b>Eugenol</b>	
Moluscicida	KUMAR; SINGH; SINGH, 2009.
Antisséptico dental	GÜLÇİN, 2011.
Analgésico	
Apoptose em células leucêmicas	
Anticonvulsivante	
Anticandida	
Bacteriostático e Antibacteriano	
Antifúngico	
<b>Asaricina</b>	
Antifúngico	LORENZO et al., 2000.
Inseticida	
Larvicida	MARQUES; KAPLAN, 2015.
<b>Apiol</b>	
Antioxidante	MAHMOOD; HUSSAIN; MALIK, 2014.
Antiproliferativa (Câncer de Cólon)	STEFANO; PITONZO; SCHILLACI, 2011.
Moluscicida	SOUSA et al., 2014.
Ovicida moderado (moluscos)	
<b>Miristicina</b>	
Moluscicida	SOUSA et al., 2014.
Ovicida moderado (moluscos)	
Antioxidante	MAHMOOD et al., 2014.
<b>Sarisan</b>	
Antifúngico	LIU et al., 2020.
Inseticida (promissor contra dengue)	GUO et al., 2013.

Como apresentado na tabela acima, uma gama de atividades biológicas são conferidas às substâncias fenilpropanoídicas, e muitas delas são responsáveis por conferir as ações medicinais às espécies do gênero *Piper* L., como por exemplo, o safrol em *Piper hispidinervum* que inibe o crescimento de bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (LOBATO et al., 1989). O uso em endodontia do eugenol para a remoção do cone utilizado na realização de canais dentários (guta-percha) é um clássico, pois substituiu o clorofórmio, solvente nocivo e usado neste procedimento (CALDERARI, 2002). Também demonstra a eficiência de *Piper betle* L. quanto à atividade hipotensora em camundongos, devida presença de safrol (78,9%) e eugenol (6,2%) (CHEN et al., 1995). Portanto, muitas espécies, além das supracitadas, são ricas em substâncias fenilpropanoídicas, como o exemplo dos experimentos de atividade anti-helmíntica – *in vitro* contra vermes acantocéfalos – com *Piper hispidinervum* (91,4% de safrol) e *P. callosum* Ruiz & Pav. (62,7% de safrol) que demonstraram uma menor concentração para a obtenção do DL<sub>50</sub> em relação à *Piper hispidum* Kunth (30,9% de  $\gamma$ -terpineno) (DOS SANTOS et al., 2018).

A tabela 2 demonstra os componentes fenilpropanoídicos comumente encontrados em algumas espécies de *Piper* L. – apenas para elucidar a riqueza química desta classe química dentro do gênero.

Tabela 2 – Alguns fenilpropanoides em *Piper* L.

Espécies de <i>Piper</i> L.	Fenilpropanoides	Estruturas planas	Referências
<i>Piper mikanianum</i>	Eugenol (1); Safrol (2)		POSER; RORIG; HENRIQUES, 1994.
<i>Piper guineense</i>	Dilapiol (3); Miristicina (4)		MARTINS et al., 2019.
<i>Piper solmsianum</i>	Apiol (5); Dilapiol (3); Miristicina (4) Sarisan (7)		MARTINS et al., 2019; MOREIRA et al., 2000.
<i>Piper divaricatum</i>	Eugenol (1); Metileugenol (6)		VILHENA et al., 2019.
<i>Piper callosum</i>	Safrol (2)		MAIA; GREEN; MILCHARD, 1993.
<i>Piper hispidum</i>	Dilapiol (3); Apiol (5)		FACUNDO et al., 2008.
<i>Piper aduncum</i>	Dilapiol (3)		GUERRINI et al., 2009.
<i>Piper xylosteoides</i>	Safrol (2); Eugenol (1); Metileugenol (6)		DE B. F. FERRAZ et al., 2010.

#### 1.4. Gênero *Piper* L. (*Piper anisum*)

O gênero *Piper* L. é dotado de categorias infragenéricas, seções ou subgêneros, variadas que são organizadas em três grandes grupos para regiões tropicais, *Macropiper* Miq. (Pacífico Sul), *Piper* L. (Ásia), *Arctotonia* Trel., *Churumayu* Raf., *Enckea* Kunth, *Macrostachys* Miq., *Ottonia* Spreng., *Pothomorphe* Miq., *Radula* Miq., *Sarcorrhachis* Trel. e *Schilleria* Kunth, (América do Sul) (TEBBS, 1993; JARAMILLO; MANOS, 2001; CARVALHO-SILVA; GUIMARÃES, 2009). Apesar de haver características anatômicas distintas, análises filogenéticas confirmam a monofilia entre as seções e o gênero *Piper* (JARAMILLO; MANOS, 2001), o que faz com que a espécie *Ottonia anisum* seja descrita, após as revisões taxonômicas supracitadas, como *Piper anisum* (Figura 10). As espécies de *Piper* L. sect. *Ottonia* Spreng. são conhecidas pela população como anestésia, jaborandi e/ou jaguarandi e distribuem-se amplamente pelo Brasil, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, encontradas no Sul e Sudeste, em locais sombreados.

Em seus atributos morfológicos *P. anisum* é uma espécie subarborescente que pode atingir de 1 a 2 metros de altura com ramos estriados e pubescentes. Suas folhas apresentam pecíolo estriado e hirta, as lâminas são assimétricas, elíptica a oblonga-elíptica, papiráceas, com ápice agudo-acuminado, sendo, às vezes falcado de base assimétrica, arredondada-cordada, glabras na face adaxial e densamente hirta na face abaxial, o padrão de venação varia de broquidódroma à eucamptodroma. As inflorescências apresentam-se em racemo com raque estriada, hirta, com pedúnculo hirta e estriado, possuindo ainda, bractéolas glabras ou hirtas. Suas flores possuem quatro estames com pedicelo hirta ou hispídulo e ovário com estilete inconspícuo ou ausente, enquanto que os estigmas são em número de três, filiformes podendo ser ereto ou curvo. O fruto é ovoide-tetragonal, glabro ou hirta. A fase reprodutiva do vegetal (floração e frutificação) costuma ocorrer no período entre setembro a março (MONTEIRO; GUIMARÃES, 2009). *Piper anisum* caracteriza-se, marcantemente, pela densa pubescência na nervura mediana da face abaxial e esparsa na bráctea floral, raque, frutos e pedicelos. A planta é um arbusto ciófilo, higrófilo, com caule, ramos e folhagens aromáticos (cheiro de anis), seus racemos quando em fruto possuem coloração que varia de verde-claro à nigrescentes. (Figura 10).

A ocorrência *P. anisum* é muito comum na região Central do Brasil, sendo popularmente conhecida como falso-jaborandi e tendo uso medicinal tradicional bem diversificado. É comum ser empregada como diurética, diaforética, ptialagoga e afrodisíaca.

Além disso, sua tintura é usada como estimulante em paralisias, realizando fricções locais, bem como em casos de reumatismo e odontalgias, pois promove dormência e anestesia (CUNICO et al., 2005). Endêmica do Nordeste e Sudeste brasileiro a espécie é muito utilizada por comunidades quilombolas em rituais religiosos e por índios da América do Sul e Central para tratamento de dores de estômago, artrite reumatoide, úlcera, males gastrointestinais e como tônico (BATISTA et al., 2019).

Figura 10 – Partes aéreas de *P. anisum* encontrada em Raíz da Serra, Magé –RJ



Fonte: O autor, 2020.

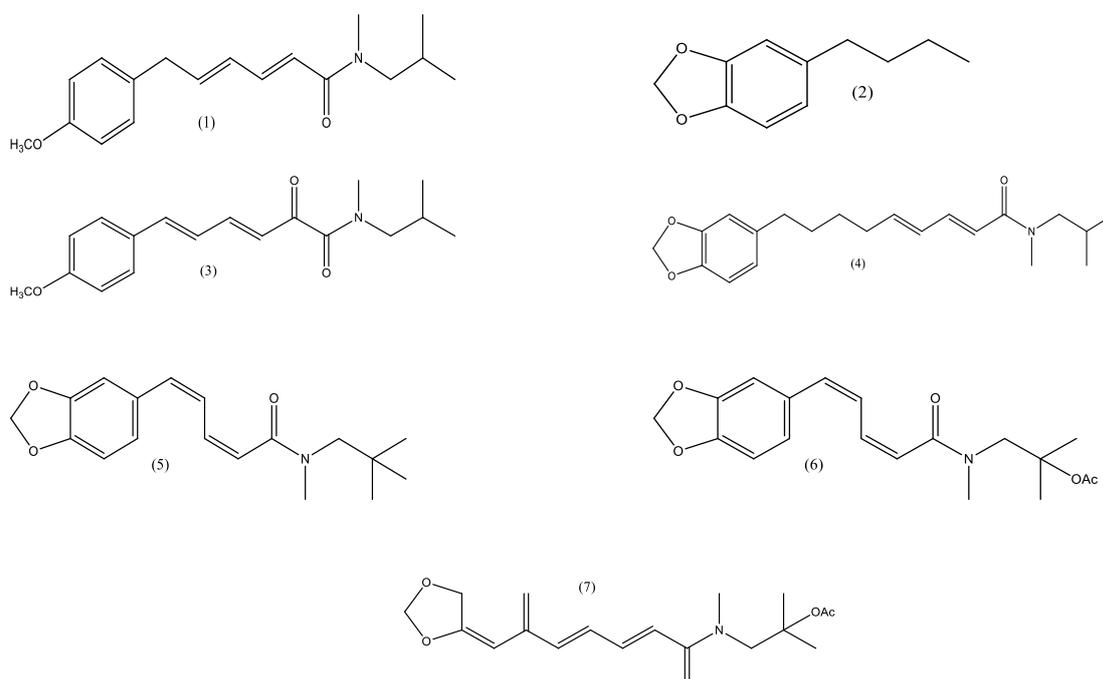
#### 1.4.1. Metabólitos secundários em *Piper anisum* (Spreg.) Angely

Estudos fitoquímicos do gênero *Piper* seção *Ottonia* demonstram expressiva e rica presença de amidas, especialmente a piperovatina (Figura 11), isolada da espécie *Ottonia vahlii* Kunth em 1895. Em 1967 Pinder e Price, ao reavaliarem o óleo essencial obtido da mesma espécie identificaram a substância 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMB) (Figura 11), além de isolarem uma nova isolbutilamida, o ácido *p*-metoxicinamal pirúvico (Figura 11) (CUNICO et al., 2005). Outra amida, inédita na época, foi isolada de raízes de *P. anisum* em 1981, a (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-9-piperonil-nona-2,4-dienamida (Figura 11). No mesmo ano,

outras três amidas inéditas foram elucidadas (isopiperlongumina, corcovadina e isocorcovadina) de *P. corcovadense* (Miq.) C. DC (CUNICO et al., 2005).

Marques e cols. (2011) isolaram e identificaram um grupo alcaloídico denominado aristolactamas em raízes das espécies de *Piper* sect. *Ottonia*, as quais devidas suas características estruturais únicas possuem elevadas atividades biológicas tais como, anti-inflamatória, antiartrítica, antirreumática, antiPAF e neuroprotetora.

Figura 11 – Estruturas químicas planas de substâncias isoladas do gênero *Piper* sect. *Ottonia*.



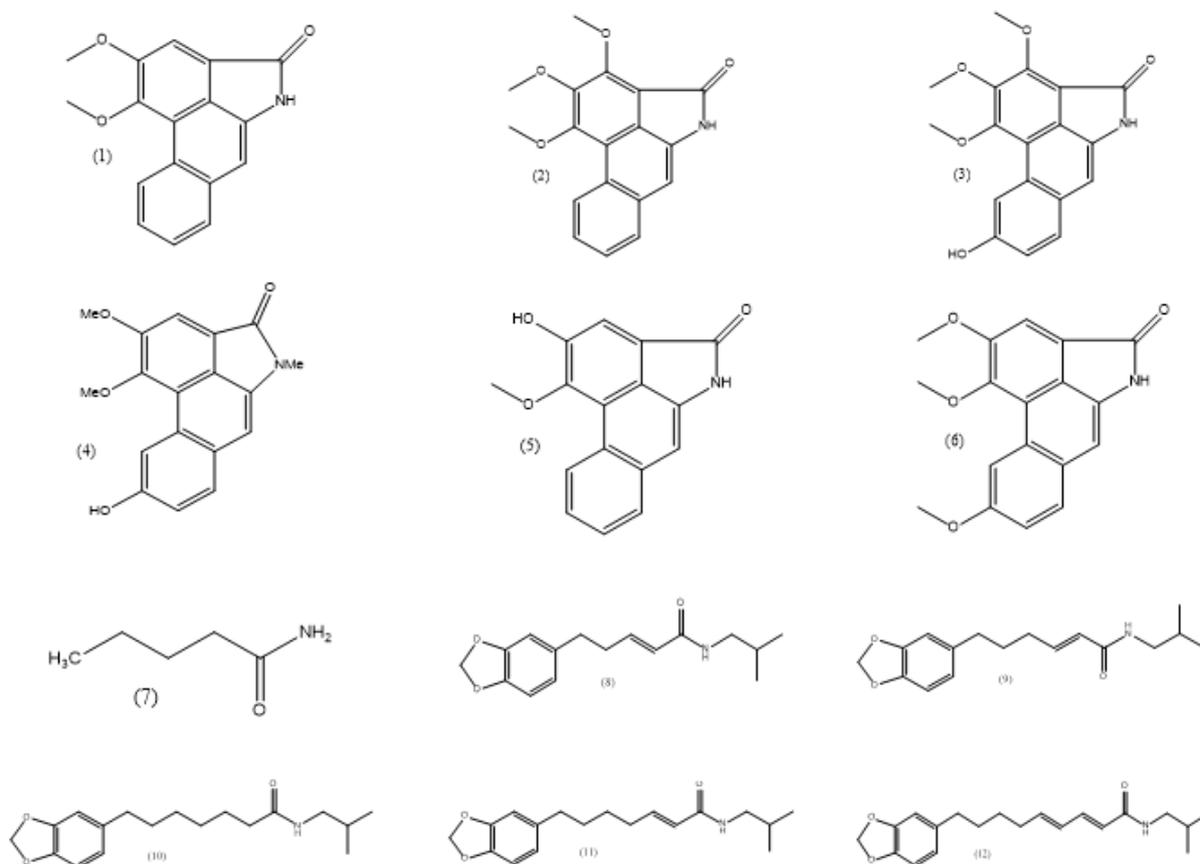
Legenda: (1) Piperovatina; (2) 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno; (3) ácido *p*-metoxicinamal pirúvico; (4) (2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-9-piperonil-nona-2,4-dienamida; (5) Isopiperlongumina; (6) Isocorcovadina; (7) Corcovadina.

Fonte: Adaptado de Cunico et al., 2005.

As aristolactamas foram isoladas por técnicas cromatográficas e denominadas como, aristolactama BII, piperolactama C, stigmalactama, goniothalactama, aristolactama AII e aristolactama BIII (Figura 12) (MARQUES et al., 2011).

As amidas valeramida, 4,5-diidropiperlongumina, *N*-isobutil-6-piperonil-2-hexanamida, piperovatina, diidropiperlongumina, piperlongumina e piperlongumina (Figura 12) foram testadas em cobaias (*Cavia porcellus*) para avaliação de atividade anestésica, demonstrando resultados estatísticos expressivos em comparação à lidocaína (LÓPEZ et al., 2016).

Figura 12 – Estruturas químicas planas de aristolactamas e amidas isoladas da espécie *P. anisum*.



Legenda: (1) Aristolactama BII; (2) Piperolactama C; (3) Stigmactama; (4) Goniothalactama; (5) Aristolactama AII (6) Aristolactama BIII; (7) Valeramida; (8) 4,5-diidropiperlongumina; (9) *N*-isobutil-6-piperonil-2-hexanamida; (10) Diidropipercollosidina; (11) Pipercollosidina; (12) Pipercolpsina.

Fonte: Adaptado de Marques et al., 2011.

As substâncias encontradas nos óleos voláteis de *Piper sect. Ottonia* normalmente são terpenoides, mono e sesquiterpenos, fenilpropanoides e/ou fenilbutanoides, na qual destacam-se para *P. corcovadense*,  $\beta$ -pineno, felandreno, *p*-cimeno, limoneno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno, *trans*-cariofileno, (*Z*)- $\beta$ -farneseno, aloaromadendreno, *epi*-biciclosesquifelandreno, biclogermacreno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\gamma$ -cadineno,  $\delta$ -cadineno, germacreno B e o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (CUNICO et al., 2005; DA SILVA et al., 2016). Para a espécie *P. anisum* as substâncias elucidadas e encontradas no metabolismo secundário para óleos essenciais foram,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno,  $\delta$ -cadineno, germacreno D,  $\gamma$ -muroleno, *E*-cariofileno, *E*-nerolidol biclogermacreno,  $\delta$ -elemeno,  $\beta$ -gurjuneno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -cubebeno, (*Z*)-  $\beta$ -farneseno, (*E*)-  $\beta$ -farneseno, (*E,E*)-  $\alpha$ -farneseno, cubebol,  $\alpha$ -bisabolol, espatunelol,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno, widdrol e

1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, (MOREIRA et al., 1997; SANTOS et al., 2001; PEREIRA et al., 2021).

A literatura acerca dos óleos essenciais para *Piper* sect. *Ottonia* é muito reduzida, existindo para a espécie em questão apenas três estudos, o de Moreira e cols. (1997), Santos e cols. (2001) e Pereira e cols. (2021) no qual para o primeiro e o terceiro o constituinte majoritário é o BMB, no entanto para o segundo não há a presença do metabólito para a região de Paraty – RJ.

Existem poucos dados na literatura acerca das atividades biológicas dos OEs de *P. anisum*, no entanto, outras espécies do gênero *Piper* sect. *Ottonia* já foram estudadas como é o caso de *P. corcovadense* que também tem como marcador majoritário o BMB demonstrando algumas atividades relevantes para a substância (DA SILVA et al., 2016).

Outra observação é a similaridade química entre as substâncias C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (safrol, eugenol, miristicina, apiol, dilapiol) que são sintetizadas na rota biossintética do chiquimato, assim como o C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub> denominado 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno. Portanto, acredita-se que tais similaridades confirmam ao BMB alguma atividade moluscicida conforme ocorre com os demais arilpropanoides como mencionado nas tabelas 1 e 2.

### 1.5. Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença causada por vermes helmínticos trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo popularmente conhecida como barriga d'água. A patogenia é endêmica no interior do Brasil e seu contágio ocorre devido a precariedade no sistema de saneamento básico. Atualmente existem 6 espécies pertencentes ao gênero *Schistosoma* – *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. malayensis* e *S. mekongi* - capazes de parasitar humanos. Todavia, especificamente, na América do Sul, a única que obteve sucesso ecológico foi *S. mansoni*. Segundo dados do Ministério da Saúde (2014), as esquistossomoses teriam origem nas bacias dos rios Nilo e Yangtze, localizados na África e na Ásia, respectivamente. Há descrições de ovos de *Schistosoma* encontrados em múmias egípcias de 1.250 a.C (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). A parasitose também é conhecida por bilharziose ou bilharzíase, devido a descoberta do pesquisador egípcio Theodor Bilharz no ano 1852 em uma necropsia no Cairo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Um melhor entendimento e assertiva dicotomização começou em 1904 com Katsurada, que descreveu a espécie *S. japonicum*. Os trabalhos continuaram e somente em 1907 com Sambon e Manson e Pirajá da Silva (1908), evidenciando que os exemplares descrito por Bilharz na verdade se tratavam de espécies distintas, *S. haematobium*, os quais afetam, preferencialmente, o trato urinário e o *S. mansoni*, espécie mais relevante no que tange questões de Saúde Pública Brasileira (KATZ; ALMEIDA, 2003).

O sucesso da espécie *S. mansoni* no Brasil se deu devido ao fato de ter encontrado hospedeiro intermediário disponível, os caramujos planorbídeo do gênero *Biomphalaria*, além de todos os fatores abióticos necessários para seu desenvolvimento, como temperaturas altas, saneamento básico deficiente, córregos, rios, lagoas e valas com irrigação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

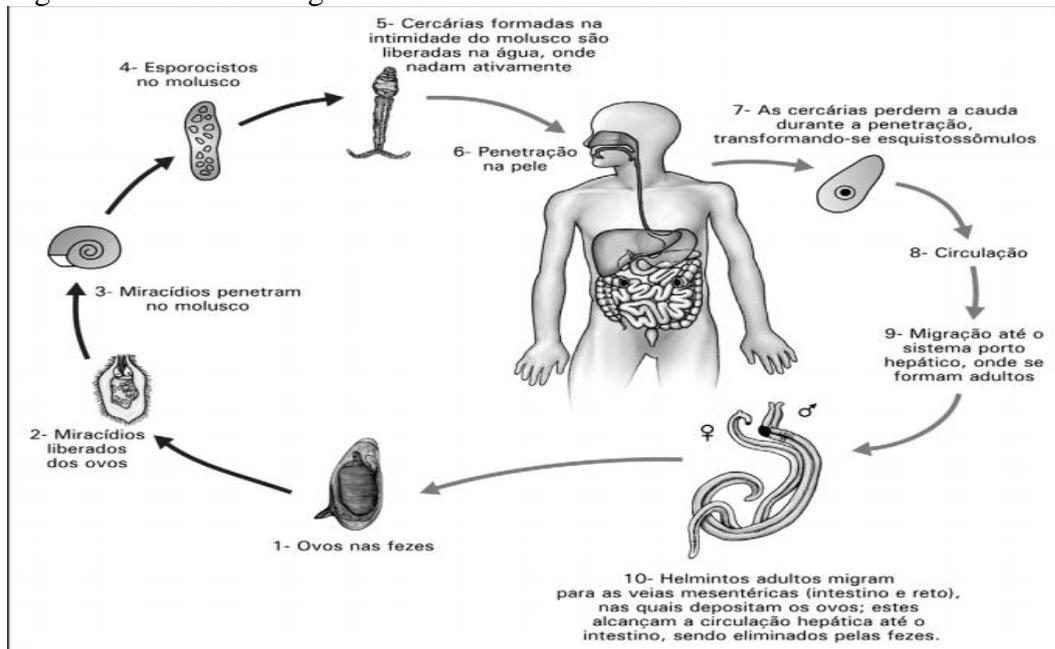
Este encaixe ecológico adaptado permitiu que o parasito obtivesse sucesso ecológico em novo habitat, engendrando seu mecanismo biológico em um ciclo de dois hospedeiros, o intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e definitivo (seres humanos – *Homo sapiens sapiens*) sendo, portanto, um organismo heteroxênico com fase assexuada e sexuada (Figura 13). No plexo venoso mesentérico, macho e fêmea de *S. mansoni* trocam seus gametas por cópula, na qual o macho (com cerca de 1 cm de comprimento) de morfologia foleácea, coloração esbranquiçada, encaixa seu canal ginecóforo em uma fêmea. Após fecundação, a fêmea, isolada ou ainda acomplada ao macho migra para vasos de capilares intestinais contra o fluxo sanguíneo, realizando a postura de ovos. A quantidade de ovos varia de acordo com a idade do helminto. Fêmeas com até dois anos põem aproximadamente 400 mil ovos por dia, todavia, mesmo contrariando fatores biológicos tradicionais – nos quais elucidam que a espécie vivem até 5 anos – casais de helmintos chegam aos 30 anos, porém com ovipostura mínina ou irrisória (CARLOS DE SOUZA et al., 2011).

Para a formação do miracídio no interior do ovo, o que expressa sua maturação, cerca de uma semana é exigida. Após, da submucosa dos pequenos vasos atingem a luz intestinal para serem liberados juntamente ao bolo fecal, todo este processo ocorrem em 20 dias. Liberados, os ovos eclodem e em circunstâncias favoráveis, principalmente temperatura (28°C), luminosidade e índices de oxigenação límnica. Todavia são extremamente frágeis, os miracídeos, sendo levados à morte por fatores como acidez acarretada por urina e níveis de salinidade do corpo d'água, bem como caso não alcancem a luz intestinal no hospedeiro vertebrado (CARLOS DE SOUZA et al., 2011). Uma vez liberadas, a larvas buscam hospedeiros (em 10 a 15 min) para a continuação do processo de seu desenvolvimento, encontrando invetebrados vetores ou não vetores (caramujos até mesmo girinos), mas,

somente os que se deparam com os moluscos do gênero *Biomphalaria* desenvolver-se-ão. Uma vez no sítio biológico específico, o miracídio libera seus cílios transformando-se em um esporocisto primário, que por poliembrionia torna-se um esporocisto secundário migrando para a região digestiva e ovo teste do planorbídeo onde ocorrerá a reprodução assexuada, na qual um miracídeo poderá gerar mais de 100 mil cercarias (forma contaminante humana) (CARLOS DE SOUZA et al., 2011).

Em condições ecológicas ótimas, isto é, com temperaturas elevadas e alta luminosidade, estima-se que o melhor horário para atingirem a água seja de 11 às 17 h, segundo Carlos de Souza e cols. (2011). Sobrevivem no ambiente cerca de 2 dias e nem sempre encontram o hospedeiro definitivo ideal, parasitando outros mamíferos e até aves, porém, ao encontrar um humano a penetração acontece em até 15 min por fixação de ventosas no folículo piloso, movimentação ativa da larva e ação lubrificante de secreções de glândulas histolíticas, o que acarreta intensa irritação epidérmica no hospedeiro (CARLOS DE SOUZA et al., 2011).

Figura 13 – Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.

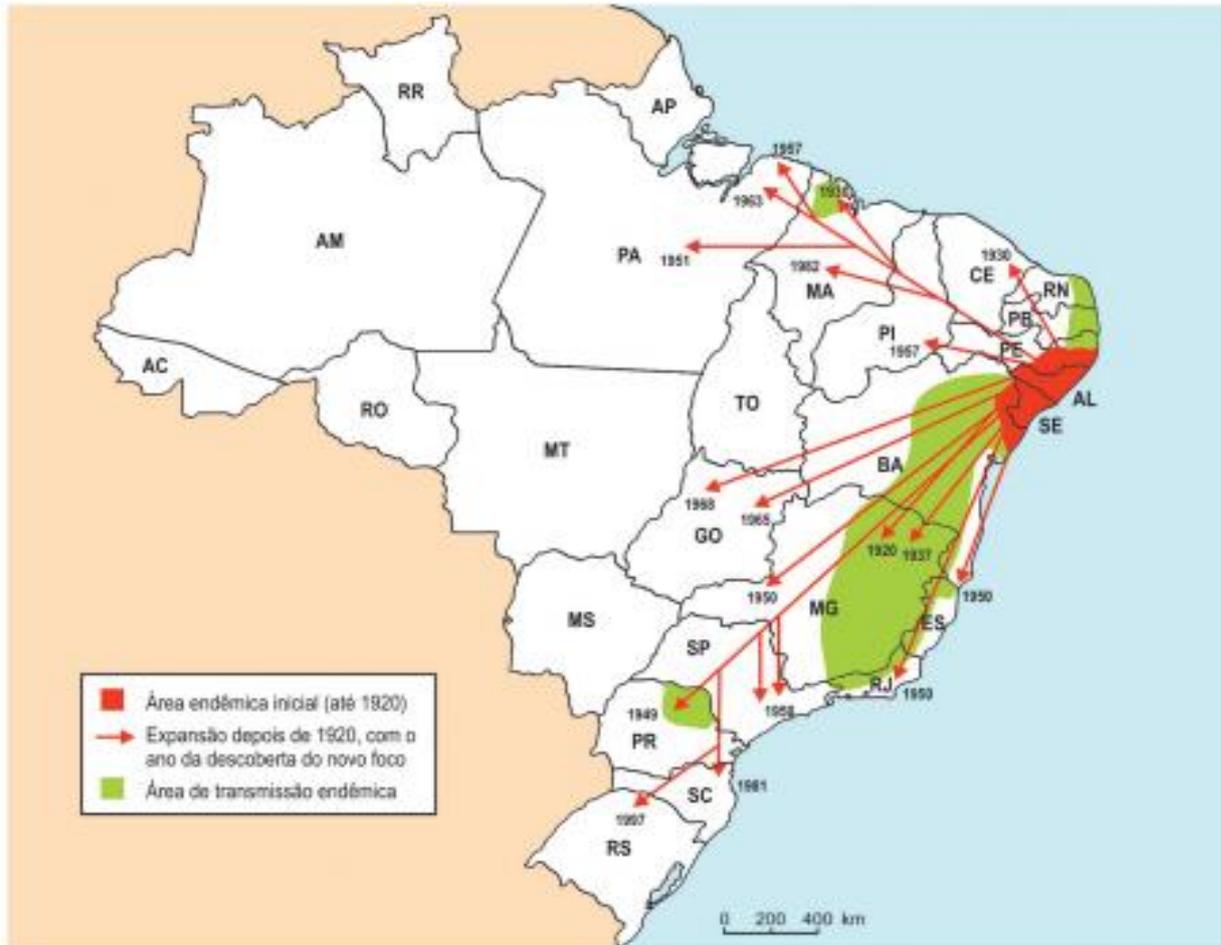


Fonte: Carlos de Souza et al., 2011.

A hipótese corrente é que a espécie chegou em território brasileiro pelo tráfico negro de escravizados africanos, todavia há referências à existência da doença antes deste período (KATZ; ALMEIDA, 2003). Com a abolição da escravatura ocorreram migrações em vulto, o que ajudou na disseminação da doença em diversos Estados brasileiros. Atualmente, estende-se em faixa contínua ao longo do Rio Grande do Norte à Minas Gerais. Sendo

encontrada no Pará, Maranhão, Ceará, Piauí, Goiás, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Distrito Federal, conforme demonstra a figura 14 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Figura 14 – Processo de expansão e disseminação da Esquistosomose em território brasileiro.



Fonte: Brasil, Vigilância da Esquistossomose mansoni. Diretrizes técnicas. Ministério da Saúde. 4ª edição, pág. 14, 2014.

Ainda no século XXI essa parasitose continua sendo grande problema de Saúde Pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2018), cerca de 240 milhões de pessoas em todo mundo são afetadas e aproximadamente 700 milhões vivem em regiões endêmicas.

Existem, atualmente, cinco espécies capazes de desencadear o ciclo reprodutivo do parasito (Tabela 3), sendo três efetivamente hospedeiros - *B. glabrata* (Say, 1818), *B. straminea* (Dunker, 1845) e *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) – além de *B. peregrina* e *B. amazonica* aos quais não apresentam riscos de desencadeamento dos processos biológicos, pois o ciclo ocorre apenas experimentalmente, isto é, sem relatos do evento por vias naturais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A ampla compreensão da distribuição, taxonomia, ecologia e genética do hospedeiro da esquistossomose se faz necessária para a elaboração de técnicas e métodos de combate à doença, pois isto possibilita a elucidação do papel do mesmo na propagação e transmissão da parasitose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Quadro 1 – Descrição de hospedeiros naturais, potenciais e não hospedeiros dentro do gênero *Biomphalaria* sp.

<b>Hospedeiros naturais</b>	<i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818)
	<i>Biomphalaria tenagophila</i> (Orbigny, 1835)
	<i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848)
<b>Hospedeiros potenciais</b>	<i>Biomphalaria amazonica</i> Paraense, 1966
	<i>Biomphalaria peregrina</i> (Orbigny, 1835)
<b>Não hospedeiros</b>	<i>Biomphalaria intermedia</i> (Paraense & Deslandes, 1962)
	<i>Biomphalaria kuhniana</i> (Clessin, 1883)
	<i>Biomphalaria schrammi</i> (Crosse, 1864)
	<i>Biomphalaria oligoza</i> Paraense, 1975
	<i>Biomphalaria occidentalis</i> Paraense, 1981
	<i>Biomphalaria tenagophila guaibensis</i> Paraense, 1984

Fonte: Ministério da saúde, 2007.

### 1.6. Gênero *Biomphalaria* (*Gastropoda*)

Dentre as características dos organismos da classe *Gastropoda* que permite dicotomização destacam-se, o giro de 180° da massa visceral durante o desenvolvimento embrionário. Em algumas espécies marinhas e terrestres o fenômeno de detorção também é possível. A presença de dentes quitinosos (rádula) em morfologia, número e série diversificados, a depender da dieta do grupo. O manto ou pálio, que é um fino tecido que recobre as vísceras que dá origem à concha. A cavidade palial ou do manto, região que permite a promoção de diversas atividades fisiológicas tais como, reprodução, respiração e excreção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Seu sistema respiratório é aberto com respiração branquial, pulmonar ou tegumentar (a depender da espécie e habitat). Animais com tubo digestório completo possuem orifício bucal e anal, além de glândulas anexas. O sistema nervoso é ganglionar e podem possuir 1 ou 2 pares de testículos. Possuem uma massa cefalopodal, que consiste em uma expansão muscular

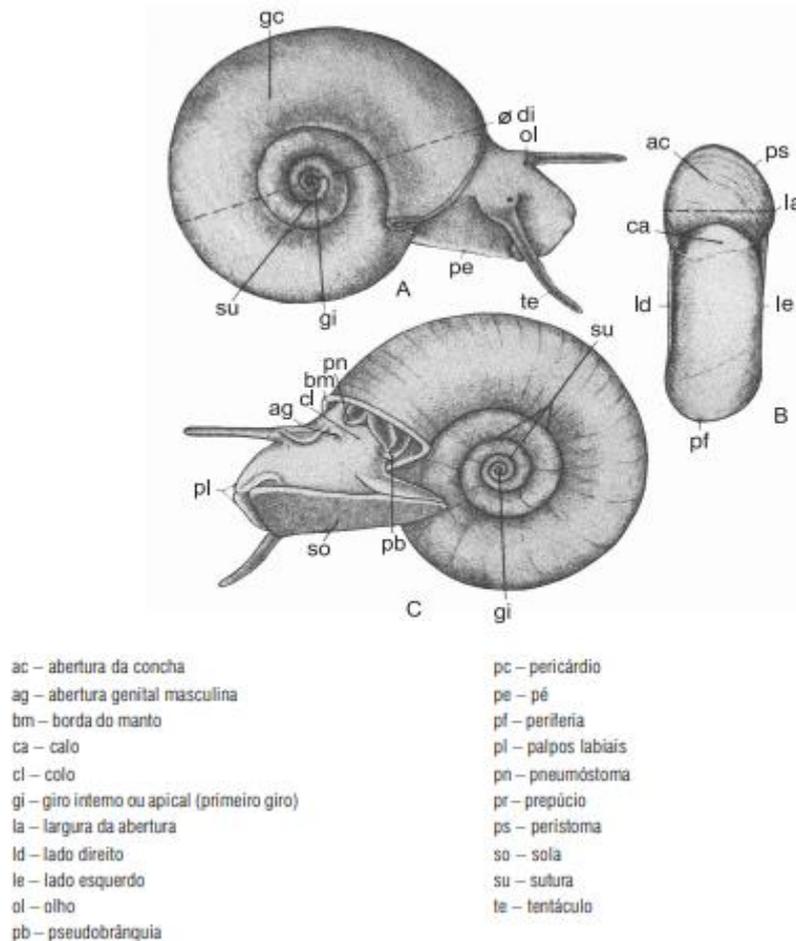
na superfície ventral do organismo, que se torna similar a uma sola, que no entanto, encontra-se soldada à cabeça, correspondendo à região que é projetada para fora nos movimentos naturais. Essa massa (corpo do animal) fica presa à concha devida presença do músculo columelar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O indivíduo adulto do gênero *Biomphalaria* possui concha bicôncava planispiral sinistrógira. São classificados na família Planorbidae e são hermafroditas. O ovotéstis, um órgão produtor de células sexuais masculinas e femininas, fica posicionado no extremo caudal do animal. Desta forma os giros centrais da concha sequenciam ductos para a liberação dos gametas, que em determinado ponto anatômico se anastomosa em um ramo masculino e outro feminino (PARAENSE, 2008). O assoalho da cavidade respiratória ou cavidade pulmonar é ladeado pelo túbulo renal e é extremamente vascularizado por dois importantes vasos anatômicos, no esquerdo veia renal, no direito veia pulmonar (PARAENSE, 2008). No interior da massa bucal existe a rádula (aparelho raspador), seguindo o saco bucal contendo glândulas salivares, o esôfago, estômago, glândulas digestivas e intestinos, compondo desta forma, o aparelho digestivo deste grupo (PARAENSE, 2008).

Taxonomicamente sua descrição se dá conforme se segue. A figura 15 auxilia na identificação do gênero (PARAENSE, 2008)

Casca subdiscoidal, planulada, pináculo côncavo, última espiral maior que as demais; umbigo aberto, mas raso; concha planispiral, diâmetro varia entre 7 a 40 mm, em indivíduos adultos; coloração natural amarelo-palha, todavia podem apresentar tons de marrom ao preto a depender dos constituintes presentes em criadouros, como o óxido de ferro que age como um corante; apresentam dois tentáculos longos, filiformes, com olhos basiposicionados, mandíbula com morfologia em T (em vista frontal), contorna toda cavidade oral. Colo com aberturas genitais, na qual a masculina está na região posterior da base tentacular esquerda e a feminina mais distal ao tentáculo, precisamente sob a pseudobrânquia; pés oblongos; dobradura do manto na região encefálica da massa visceral, formando a cavidade pulmonar (PARAENSE, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Figura 15 – Modelo morfológico com os principais caracteres para identificação do gênero *Biomphalaria* sp.



Fonte: Paraense, 2008.

### 1.7. Espécie *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)

Anatomicamente as conchas dos indivíduos adultos podem medir entre 20 a 40 mm de diâmetro; 5 a 8 mm de largura contendo de 6 a 7 giros com paredes laterais dos giros arredondadas. No manto encontra-se o caracter de maior relevância para a dicotomização e determinação taxonômica, que é a presença de uma crista totalmente pigmentada sobre o tubo renal; em exemplares jovens essa crista existe apenas uma tênue linha que dará origem a característica identificadora. O sistema reprodutor possui uma bolsa vaginal completamente definida (PARAENSE, 2008).

De acordo com os registros encontrados na literatura sobre a potencial bioatividade da espécie vegetal *P. anisum*, especificamente dos constituintes de seu OE contra os hospedeiros intermediários – *Biomphalaria glabrata* – do helminto *Schistosoma mansoni* causador esquistossomose e buscando encontrar um agente limitador do ciclo de vida deste hospedeiro, este trabalho tem a finalidade de avaliar a capacidade do OE de *P. anisum* como uma alternativa ao uso da droga sintética niclosamida, altamente danosa para o ecossistema. Sendo assim, seguem-se os objetivos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Analisar a composição química do óleo essencial de *Piper anisum* (Spreng.) Angely coletada em fragmento da Mata Atlântica e avaliar seu potencial moluscicida contra caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar coleta de folhas da espécie *P. anisum* em fragmento de Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro;
- ✓ Extrair e identificar os constituintes voláteis do óleo essencial das folhas de *P. anisum* nas diferentes estações do ano;
- ✓ Realizar levantamento bibliográfico sobre o perfil químico de óleos essenciais de *P. anisum* para dimensionar a estabilidade fenotípica química da espécie, com auxílio de análise multivariada;
- ✓ Realizar um estudo comparativo do óleo essencial da espécie *P. anisum* coletadas em diferentes sítios no Estado do Rio de Janeiro;
- ✓ Realizar cultivo e cuidado dos caramujos da espécie *B. glabrata* (Say, 1818);
- ✓ Avaliar o potencial moluscicida do óleo essencial de *P. anisum* e de seu constituinte majoritário contra caramujos adultos da espécie *B. glabrata*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

O material botânico foi coletado na localidade de Raíz da Serra, no município de Magé, no Estado do Rio de Janeiro, sendo portanto, um grande fragmento da Mata Atlântica. O complexo pertence ao Parque Nacional da Serra dos Órgãos e o acesso se deu pela rota conhecida como caminho do ouro. A coleta foi respaldada pela autorização SISBIO n. 57296-4. As coletas dos exemplares ocorreram no mesmo local, abrangendo as quatro estações do ano. No dia 20 de novembro de 2019 foi realizada a coleta de primavera, 16 de fevereiro de 2021 a de verão, 30 de maio a de outono e 22 de agosto de 2021 a coleta de inverno. Todas as coletas aconteceram na mesma faixa de horário, entre 10h e 10h50, e no mesmo dia da semana. A exsicata foi produzida com o material da primeira coleta, primavera, pois o exemplar estava apresentando frutos e flores.

Os dados de herborização, número de coleta, informações sobre o indivíduo e caracterização geográfica do sítio de captação encontram-se na tabela 3.

A identificação do material botânico foi realizada pela Dra. Elsie Franklin Guimarães e o número de registro encontra-se também na tabela 3 para os materiais depositados no herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB) e no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ).

A quantidade do material (folhas) variou entre 100 g a 200 g que foram colocados em sacos plásticos do tipo *ziplock* para posterior extração do OE. Atividades fenológicas do indivíduo foram observadas, isto é, análise de fase reprodutiva (inflorescências e frutos) e fase vegetativa (demais partes do vegetal) (DEFAVERI et al., 2011).

Tabela 3 – Caracterização do local de coleta e dados de deposição em herbário de *P. anisum* (Spreng.) Angely, na Serra da Estrela – RJ.

Acesso	Latitude/Longitude	Altitude	Tamanho do indivíduo	Registro
CMO	S 22°33'20.5092" / W43°10'44.6844"	5 m	1,30 m	RB817633
CMO	S 22°33'20.5092" / W43°10'44.6844"	5 m	1,30 m	HRJ13453

Legenda: CMO = Caminho do Ouro.

### 3.2. Extração do óleo essencial

O procedimento empregado para obtenção do OE de *P. anisum* segue protocolo sugerido por Oliveira e cols. (2013b), que consiste em utilizar, aproximadamente, 150 g de folhas frescas cominuidas manualmente com auxílio de tesoura e submetidas ao método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. O material triturado foi transferido para um balão volumétrico de fundo redondo de 2 L, no qual foram adicionados 700 ml de água destilada e, em seguida, iniciou-se o aquecimento do balão, com auxílio de manta aquecedora. O processo de hidrodestilação foi realizado por um período de 2 h. Após finalização do procedimento, os OEs puros foram separados da fase aquosa, submetidos à secagem com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Sigma-Aldrich, Brasil) e armazenados em frascos âmbar fechados (para evitar possível fotoisomerização e fotociclização), em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ , até o momento das análises. Os rendimentos foram calculados pelo peso do OE e o peso do material vegetal fresco utilizado na extração, multiplicado por 100 para expressar em teor percentual.

### 3.3. Análise dos componentes do óleo essencial

O OE obtido por hidrodestilação foi solubilizado em diclorometano P.A. (Tedia®, Brasil) até a concentração final de aproximadamente 1000 ppm e submetido à análise por

Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) em equipamento HP Agilent GC 6890 – MS 5973, para aquisição dos espectros de massas. Em relação aos dados quantitativos sobre os constituintes presentes no OE e determinação do Índice de Retenção (IR) foram conduzidas análises por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada ao Detector por Ionização de Chamas (CG-DIC), em equipamento HP-agilent 6890. As duas análises foram feitas na Plataforma Analítica de Farmaguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

As condições para análises por CG-EM foram: coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25  $\mu$ m, espessura de filme), programação de temperatura de 60 °C a 240 °C, com incremento de 3 °C/ min e usando hélio (99,99%) como gás carreador, com fluxo constante de 1,0 mL/ min, varredura de massas entre  $m/z$  40 - 600 u.m.a., com energia de impacto de 70 eV, em modo positivo. Foi injetado 1 $\mu$ L da solução de OE, sem divisão de fluxo, com temperatura de injetor de 270 °C. As análises por CG-DIC foram feitas nas mesmas condições das análises por CG-EM, exceto pelo gás carreador empregado, que foi hidrogênio (OLIVEIRA, 2013b).

Os índices de retenção (IR) foram determinados a partir do tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C<sub>8</sub>-C<sub>28</sub>, Sigma-Aldrich, Brasil) obtidos por CG-DIC, nas mesmas condições de análises dos óleos essenciais. As substâncias presentes nos óleos essenciais foram identificadas por comparação de seus espectros de massas com registros de banco de dados do equipamento (WILEY 7n; NIST) e por comparação dos IR calculados (DOOL; KRATZ, 1963) com aqueles da literatura (ADAMS, 2017). Busca na literatura configurou uma fonte de comparação das substâncias presentes nos óleos entre a espécie em diferentes localidades.

#### **3.4. Emulsificação do óleo essencial de *Piper anisum* para teste de potencial moluscicida e obtenção do 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMB)**

A emulsão do OE foi realizada para melhor homogeneização e solubilização na solução veículo (água mole sintética – AMS) que foi utilizada para os experimentos com os caramujos. Para tal, empregou-se 100 mg de OE e 1000  $\mu$ L de água destilada. Ambos os líquidos foram acomodados em um microtubo (*ependorff*) de 150 mL. Após, o conteúdo foi levado ao agitador de tubos (vórtex) da marca Phoenix (modelo AP56) por 3 min. Em

seguida, a solução (OE + H<sub>2</sub>O) foi introduzida no banho de ultrassom (QUIMIS®) por 15 min em temperatura ambiente. Ao fim do processo obteve-se a emulsão (figura 16).

A substância majoritária do OE de *P. anisum*, o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (BMB) foi gentilmente cedida pelo Dr. Andre Mesquita Marques, pesquisador de Farmanguinhos/FIOCRUZ. O BMB foi isolado do OE da espécie *P. anisum* por cromatografia em coluna com gel de sílica, eluída com diferentes eluentes, e demonstrou grau de pureza acima de 98% por análise por CG-EM e CG-DIC.

Figura 16 – Etapas conduzidas no processo de emulsificação dos OEs de *P. anisum*.



Legenda: **1** = agitador de tubos (vórtex); **2** = banho de ultrassom; **3** = solução emulsionada.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.5. Ajuste de concentrações do óleo essencial nas soluções do experimento

Para a obtenção da concentração esperada para o ensaio moluscicida, tomou-se uma alíquota da emulsão – que variou de acordo com a concentração final desejada – para posterior solubilização em um volume de AMS de 400 mL em um béquer de 600 mL de capacidade. Para a realização do procedimento empregou-se a fórmula abaixo:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Onde: A concentração inicial ( $C_1$ ) foi de 100.000 µg de OE e/ou BMB puro isolado, o volume inicial ( $V_1$ ) foi o X da equação, a concentração final ( $C_2$ ) (50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL,

etc.) e por fim, o volume final ( $V_2$ ) o total de líquido (AMS) levado nos recipientes (400.000  $\mu\text{L}$ ).

O cálculo resultou em um volume específico da alíquota do emulsionado a ser usado para diluição no volume final.

### 3.6. Preparação da solução veículo (água mole sintética) para o ensaio de atividade moluscicida

A experiência com os caramujos foi realizada em solução veículo, ou seja, água mole sintética (AMS), cuja dureza mede-se pela da quantidade de cátions de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{++}$ ), sendo o pH ajustado entre 7,2 a 7,6.

A água mole foi preparada a partir de duas soluções:

#### Solução 1:

- |  |         |
|--|---------|
| a) Sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) | 1,5 g   |
| b) Água destilada  | 1000 mL |

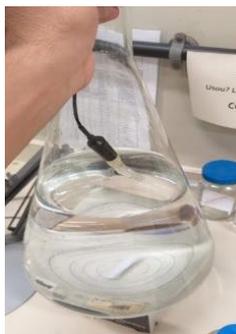
#### Solução 2:

- |  |         |
|--|---------|
| a) Cloreto de potássio (KCl)   | 0,02 g  |
| b) Bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )                         | 4,8 g   |
| c) Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) | 6,1 g   |
| d) Água destilada  | 1000 mL |

Para o preparo da AMS adicionou-se 20 mL da solução 1 e 10 mL da solução 2 em 970 mL água destilada. Obteve-se, desta forma, o volume final de 1 L. Para a realização de todo o procedimento, preparou-se um total de 5 L, portanto, os volumes utilizados foram 100 mL (solução 1), 50 mL (solução 2) e 4.850 mL de água destilada, respectivamente.

A AMS foi colocada em aeração por 24 h, e após esse período, foram auferidos os valores de oxigênio dissolvido, o pH, a condutividade e a dureza total. O pH foi ajustado com ácido clorídrico (HCl, Sigma-Aldrich, Brasil), sendo Normalidade 1 (N1) (inicial – 8,20), passando para 7,58. (Figura 17). Após ajuste de pH a água foi reservada para uso no procedimento.

Figura 17 – Ajuste de pH da água mole sintética.



Fonte: O autor, 2021

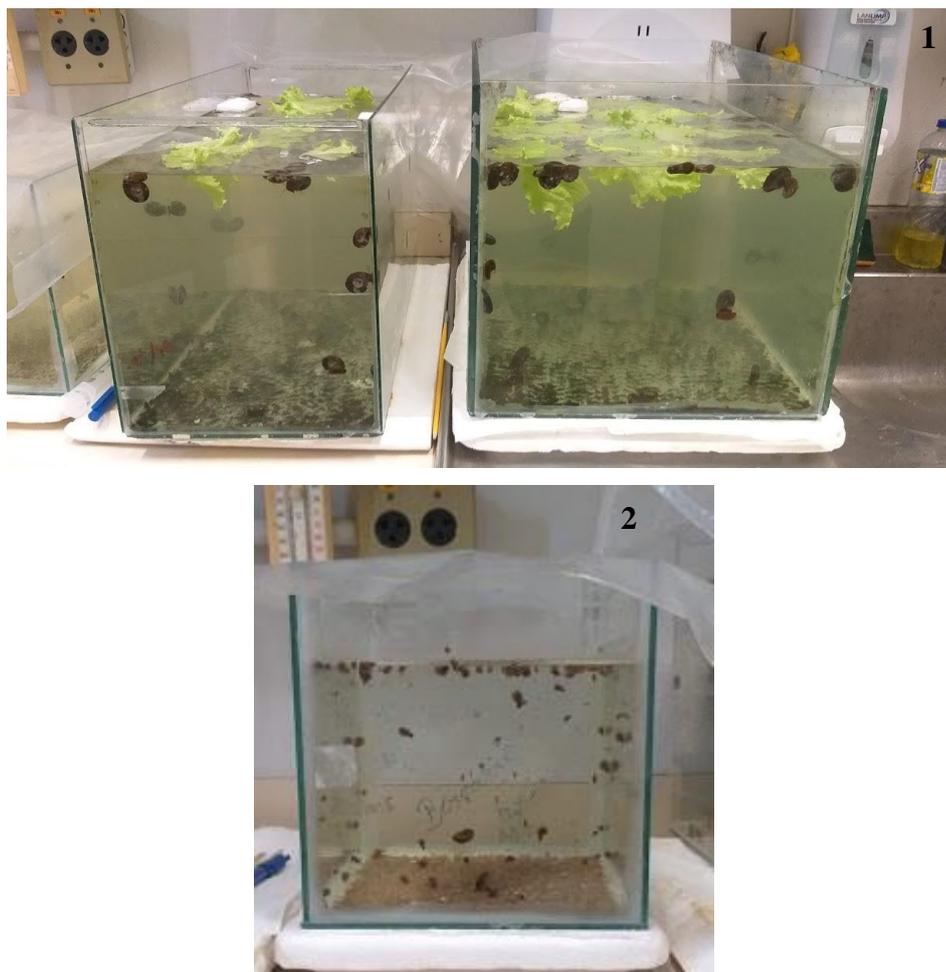
### 3.7. Cultivo dos caramujos da espécie *B. glabrata* (Say, 1818)

Os exemplares utilizados nos testes foram obtidos no Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), e cultivados no Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

O cultivo dos caramujos foi realizado em aquários mantidos sob a iluminação de lâmpadas fluorescentes com ciclo de luz de 12 h e temperatura ambiente entre 23 - 26° C. Os aquários de vidro (Figuras 11 e 12) variaram de 6 L de água (recém-eclodidos) até 16 L de água (adultos), os quais continham de 20 a 80 exemplares. A troca parcial da água foi feita por meio da aspiração dos detritos pelo excesso de excrementos ou pela presença excessiva de alimento. Após a complementação do volume da água dos aquários, o substrato foi repostado. A água do aquário foi destilada para que não causasse impactos desconhecidos pelas diversas substâncias comumente diluídas em águas minerais (zinco, cobre, cloro).

Tanto os caramujos adultos quanto os jovens foram alimentados com folhas de alface frescas, preferencialmente lisa. Os recém-eclodidos se alimentaram com alface desidratado em estufa. Com vistas a simular o ambiente natural foi colocado no aquário uma suplementação de um substrato composto por argila peneirada, carbonato de cálcio e farinha de ostra (10:1,5:2).

Figura 18 – Aquários de criação de caramujos da espécie *B. glabrata*.



Legenda: 1 = aquário com caramujos adultos; 2 = aquário berçário com caramujos jovens.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.8. Teste de atividade moluscicida do óleo essencial de *P. anisum*

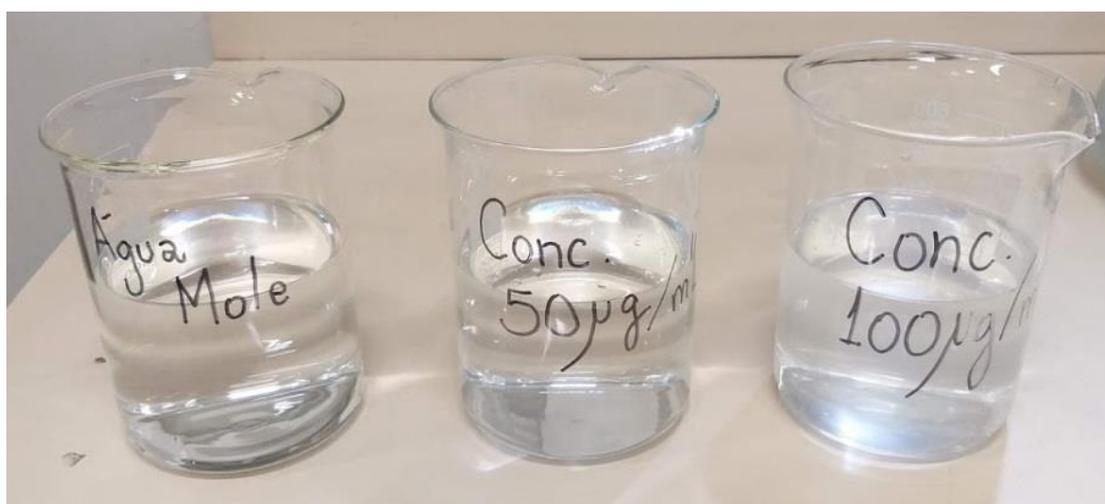
Para o ensaio de potencial moluscicida do OE e da substância pura BMB de *P. anisum*, caramujos adultos da espécie *B. glabrata* foram usados. Os animais foram separados de acordo com tamanho de concha, que variou entre 10 a 12 mm. Após a separação, os exemplares foram depositados em bequeres (600 mL) distintos, cada um contendo 10 indivíduos. Um Grupo Controle (GC) foi usado em cada teste e os demais grupos foram formados para cada uma das concentrações avaliadas. O volume final de AMS foi de 400 mL (Figura 19). Esse procedimento foi realizado para os OEs de **verão, outono, primavera,**

**inverno** e para a **substância pura BMB**, nas concentrações descritas na tabela 5. As concentrações das amostras foram preparadas de acordo com a quantidade de OE disponível.

Tabela 4 – Demonstrativo das concentrações usadas em cada teste moluscicida com BMB e os OEs da espécie *P. anisum*.

Estações	Concentrações ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
<b>Primavera</b>	50, 100, 150, 200 e 250
<b>Verão</b>	60, 80 e 100
<b>Outono</b>	100, 150 e 175
<b>Inverno</b>	20, 35, 45
<b>BMB</b>	50, 75, 90 e 100
	25, 50, 75 e 38

Figura 19 – Demonstrativo de ambiente experimental para ensaio de atividade moluscicida com OEs de *P. anisum*.



Fonte: O autor, 2021.

Os animais foram alimentados com porções diárias de alface lisa no tamanho de 3 cm x 3 cm, desde o momento de alocação no sítio experimental. A taxa de mortalidade e a análise comportamental dos caramujos foram observadas a cada 24 h, durante um período total de 14 dias consecutivos, no qual as primeiras 96 h foram em exposição ao OE de *P. anisum* ou ao BMB. Após o período de 96h, os animais sobreviventes foram transferidos para béqueres contendo apenas AMS (400 mL).

O óbito foi confirmado por teste de reflexo, que consistiu em toques leves na parte mole do animal com pedaço de papel toalha/filtro e, para maior assertividade na confirmação, a análise em estéreo microscópio (Zeiss SV11) para constatação da ausência de batimentos cardíacos. Tanto no período de exposição à amostra (96 h) e no posterior, os caramujos foram

mantidos na incubadora RDE 38 (Super M.S. Mistura) a qual permitiu ter controle de temperatura (25°C) e iluminação durante o período de experimentação.

### 3.9. Processamento dos dados e análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas com o *software* Statistica versão 10 (STAT SOFT, 2010), aplicando as Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH). A composição química dos OE foram tratadas como unidades taxonômicas operacionais (UTO). Para construção de gráficos de ACP e AAH foram utilizados os valores de porcentagem (% área) transformados para arco seno da raiz de  $p$ , extraídos dos dados obtidos por CG (óleo essencial), convertidos em uma matriz, excluindo substâncias que não foram identificadas, bem como aquelas de concentração inferior a 5% (SADGROVE et al., 2014). Análises de Agrupamento Hierárquico (AAH) foram realizadas para verificar semelhanças entre as UTO com base na distribuição das substâncias químicas dos OEs de quatro estações ao longo do período de estudo, agregado aos dados obtidos na literatura. Para obtenção do dendograma foram utilizadas a distância Euclidiana com o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e análise de variância (valor de  $p$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Rendimento, fenologia e composição dos óleos essenciais de *P. anisum*

O rendimento dos OEs das folhas frescas coletadas nas diferentes estações do ano foi muito similar: 0,22% em materiais coletados na primavera; 0,27% no outono; 0,26% no verão e 0,21% no inverno. Registrou-se material na fenofase reprodutiva, apresentando frutos e flores, nas estações de primavera e verão; e fenofase vegetativa, nas estações de outono e inverno (Figura 20).

Figura 20 – Partes aéreas coletadas de *Piper anisum* nas quatro estações do ano.



Legenda: 1 = primavera; 2 = verão; 3 = outono; 4 = inverno.

Fonte: O autor, 2020.

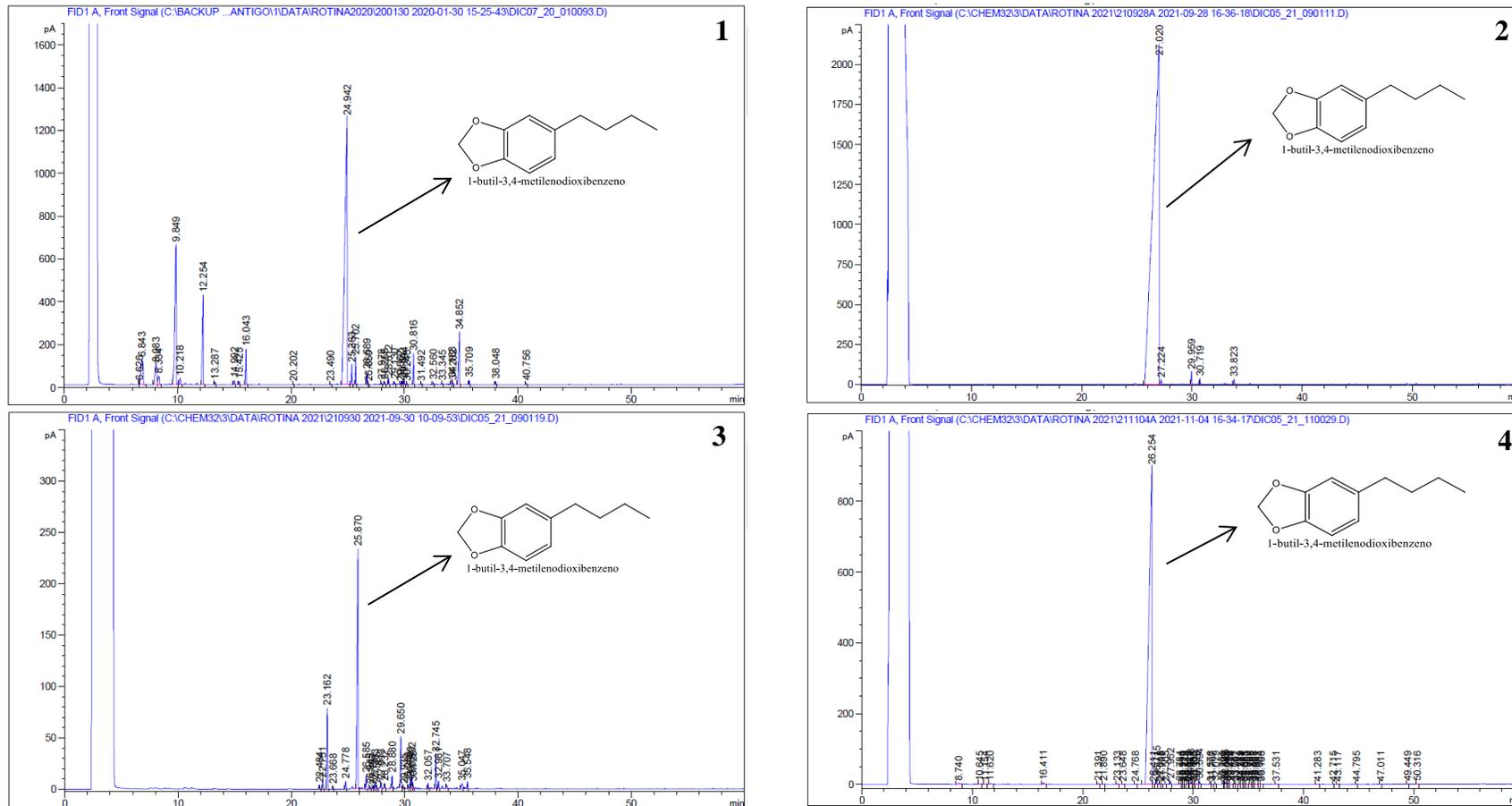
A composição dos OE de *P. anisum* extraídos de folhas frescas coletadas na Raíz da Serra, Magé – RJ nas estações de primavera, verão, outono e inverno estão apresentadas na tabela 6.

No OE da primavera (OE-P) ocorreu uma variação de concentração nas substâncias que variou de 0,03 a 51,34%, em um percentual total de 93,29%. Para o OE de outono (OE-O) com total de identificação de 71,32%, e variando de 1,03% a 55,67%. O OE de verão (OE-V) apresentou-se quase puro em relação ao componente majoritário, o BMB, registrado como 99,12%. E, por fim, o OE de inverno (OE-I) registrou variação das substâncias entre 0,04% e 96,86% (Tabela 6).

Foram identificadas, ao todo, 16 substâncias no OE-P, no qual se destacam os majoritários BMB (51,34%) e os monoterpenos 1,8-cineol (17,64%), (E)- $\beta$ -ocimeno (7,31%),  $\alpha$ -pineno (4,75%) e  $\beta$ -pineno (3,22%).

No OE-V, três substâncias foram caracterizadas: BMB (99,12%), (E)-Nerolidol (0,16%) e  $\delta$ -cadineno (0,37%). Para OE-O, foram identificados o BMB (55,67%), o 1-propil-3,4-metilenodioxibenzeno (13,13%), o (E)- $\beta$ -ocimeno (1,50%) e o  $\alpha$ -copaeno (1,03%). No OE-I, a última estação do ano analisada, oito substâncias foram identificadas, seguindo com o BMB (96,86%), os monoterpenos não oxigenados  $\gamma$ -terpineno (0,13%) e  $\beta$ -felandreno (0,18%), o monoterpeno oxigenado  $\alpha$ -humuleno (0,24%), e os propanoides 1-propil-3,4-metilenodioxibenzeno (0,08%) e o dilapiol (0,04%). Segundo análise de variância, houve um valor significativo de  $p$  para o teor percentual de BMB nos OEs das amostras coletadas nas quatro estações do ano ( $p = 0,009$ ). Os cromatogramas a seguir demonstram os perfis químicos dos OEs de *P. anisum* para cada estação do ano, o que permite melhor visualização dos resultados (figura 21).

Figura 21 – Cromatogramas obtidos por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas dos óleos essenciais de *P. anisum* coletadas nas quatro estações do ano.



Legenda: Eixo x representa o tempo em minutos e o eixo y a resposta do detector em abundância de íons; **1** = primavera; **2** = verão; **3** = outono; **4** = inverno.

Tabela 5 – Constituição química do óleo essencial de *P. anisum* da Raíz da Serra, Magé –RJ, nas quatro estações do ano. (continua)

Constituintes	IR Lit	IR cal	Porcentagem Relativa (Média ± DP)			
			Primavera	Verão	Outono	Inverno
<b>Monoterpenos não oxigenados</b>			<b>34,65</b>	<b>0,00</b>	<b>1,50</b>	<b>0,31</b>
α-pineno	932	923	4,75 ± 0,16	-	-	-
β-pineno	974	976	3,22 ± 0,13	-	-	-
mirreno	988	984	1,12 ± 0,04	-	-	-
1,8-cineol	1026	1022	17,64 ± 0,25	-	-	-
γ-terpineno	1054	1058	-	-	-	0,13 ± 0,00
β-felandreno	945	1025	-	-	-	0,18 ± 0,00
(z)-β-ocimeno	1032	1026	0,58 ± 0,01	-	-	-
(E)-β-ocimeno	1058	1046	7,31 ± 0,01	-	1,50 ± 0,01	-
<b>Monoterpenos oxigenados</b>			<b>1,99</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,24</b>
linalol	1090	1095	1,90 ± 0,08	-	-	-
terpineno-4-ol	1174	1179	-	-	-	0,24 ± 0,00
α-terpineol	1186	1182	0,09 ± 0,01	-	-	-
<b>Sesquiterpenos não oxigenados</b>			<b>3,13</b>	<b>0,37</b>	<b>1,03</b>	<b>0,40</b>
E-cariofileno	1417	1378	0,05 ± 0,01	-	-	-
α-cubebeno	1348	1343	0,05 ± 0,01	-	-	-
α-humuleno	1452	1449	0,62 ± 0,01	-	-	0,19 ± 0,00
α-copaeno	1374	1386	-	-	1,03 ± 0,29	-
biclogermacreno	1434	1386	1,28 ± 0,02	-	-	-
β-Sesquifelandreno	1521	1511	-	-	-	0,21 ± 0,00
δ-cadineno	1522	1572	0,15 ± 0	0,37 ± 0,01	-	-

Tabela 6 – Constituição química do óleo essencial de *P. anisum* da Raíz da Serra, Magé –RJ, nas quatro estações do ano. (continuação)

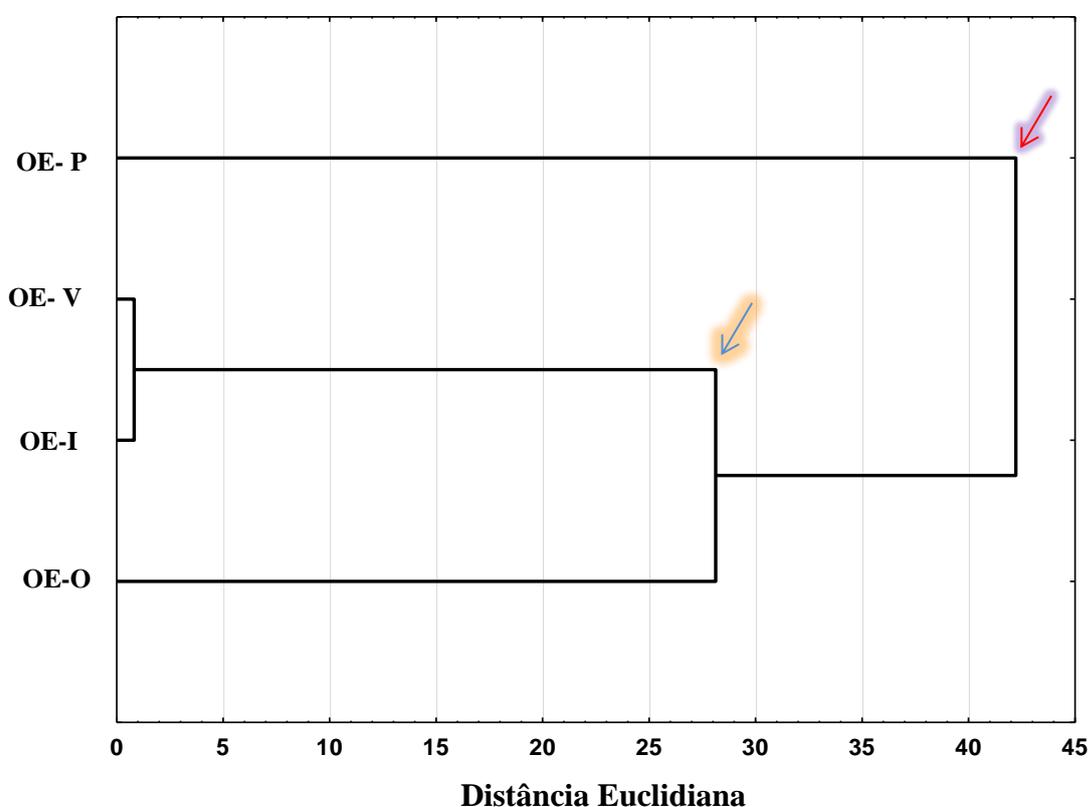
<b>Propanoides (butil, propil e aril)</b>			<b>52,3</b>	<b>99,12</b>	<b>68,8</b>	<b>96,98</b>
1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno	Moreira et al.,1997	-	51,34 ± 0,34	99,12 ± 0,00	55,67 ± 0,20	96,86 ± 0,02
1-propil-3,4-metilenodioxibenzeno	NIST	-	0,96 ± 0,01		13,13 ± 0,08	0,08 ± 0,00
dilapiol	1620	1511	-	-	-	0,04 ± 0,01
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>			<b>1,62</b>	<b>0,16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>E</i> -nerolidol	1561	1510	1,62 ± 0,05	0,16 ± 0,00		
<b>Numero de substâncias identificadas</b>			16	2	4	8
<b>Total de substâncias quantificadas</b>			93,29	99,49	71,32	97,93
<b>Rendimento de OE % (p/p)</b>			0,22	0,26	0,27	0,21
<b>Atividade Fenológica</b>	<b>Fase vegetativa</b>				<b>X</b>	<b>X</b>
	<b>Fase reprodutiva</b>		<b>X</b>	<b>X</b>		

Legenda: IRLit – Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007;2017) e (MOREIRA *et al.*, 1997); IRcalc -Índices de retenção calculados(variação); \*O teor está em média (%) ± desvio padrão (SD).

#### 4.2. Análises estatísticas multivariadas para coletas das quatro estações do ano

O OE-P possui maior diversidade química em comparação aos demais extraídos em outras estações do ano, além de conter a menor concentração da substância majoritária, o BMB, conforme demonstra o dendograma a seguir (figura 22).

Figura 22 – Dendrograma para agrupamento hierárquico construído a partir das amostras de óleos essenciais de *P. anisum* coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ nas quatro estações do ano.



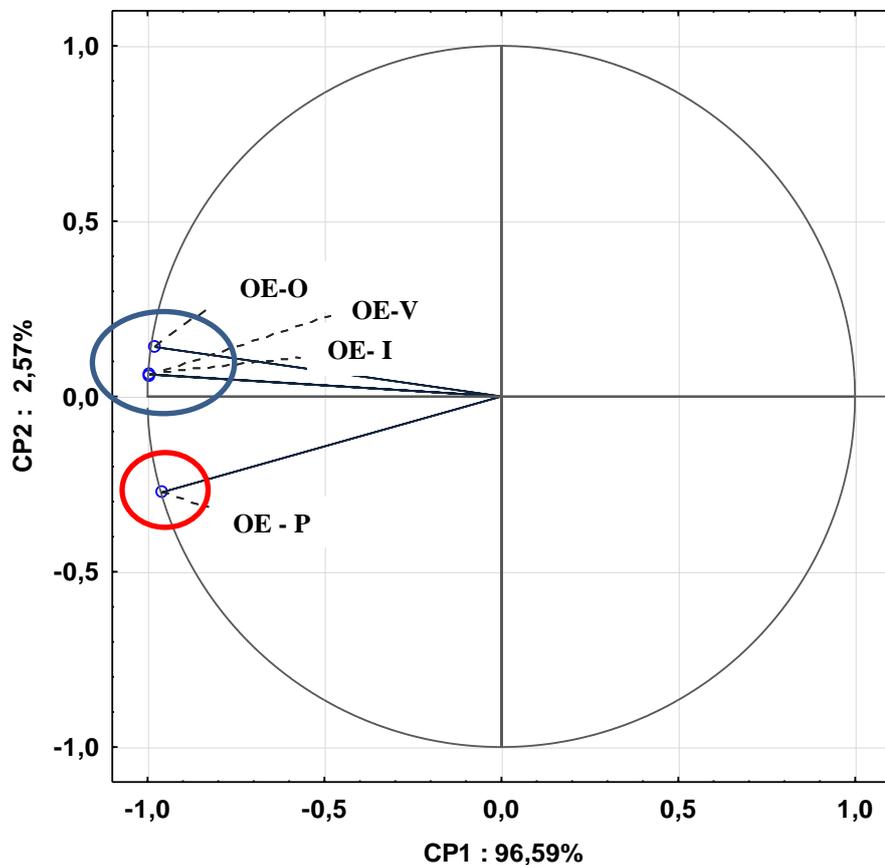
Legenda: **OE-P** = Óleo Essencial de Primavera; **OE-V**= Óleo Essencial de Verão; **OE-I** = Óleo Essencial de Inverno; **OE-O** = Óleo Essencial de Outono.

A seta em vermelho que aponta o vértice superior representa o padrão das substâncias químicas na amostra de OE-P, contendo distância Euclidiana entre 40 e 45, o que confirma a hipótese de maior divergência em relação à concentração de **BMB** e **1,8-cineol** frente aos demais, o que o coloca em um grupo isolado. Por outro lado, os OE-V e OE-I possuem baixa distância Euclidiana entre si, demonstrando maior similaridade em relação aos constituintes químicos do OE, em particular, ao alto teor do **BMB**. A amostra OE-O faz parte do mesmo

grupo de OE-V e OE-I, porém, por essa amostra conter quase metade do teor percentual de BMB, OE-O isola-se em um sub-grupo.

O BMB contribui, na análise multivariada, para agrupamento das amostras, pois confere uma alta porcentagem (96,56%) no eixo de Componente Principal Primário (CP1), enquanto que o Componente Principal Secundário (CP2) expressa uma porcentagem de 2,57% não sendo um fator expressivo para influência na separação dos grupos (figura 23).

Figura 23 – Análise de componente principal construído a partir das substâncias identificadas nas amostras sazonais (quatro estações do ano) do óleo essencial de *P. anisum* coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ.



Legenda: **OE-P** = Óleo Essencial de Primavera; **OE-V**= Óleo Essencial de Verão; **OE-I** = Óleo Essencial de Inverno; **OE-O** = Óleo Essencial de Outono.

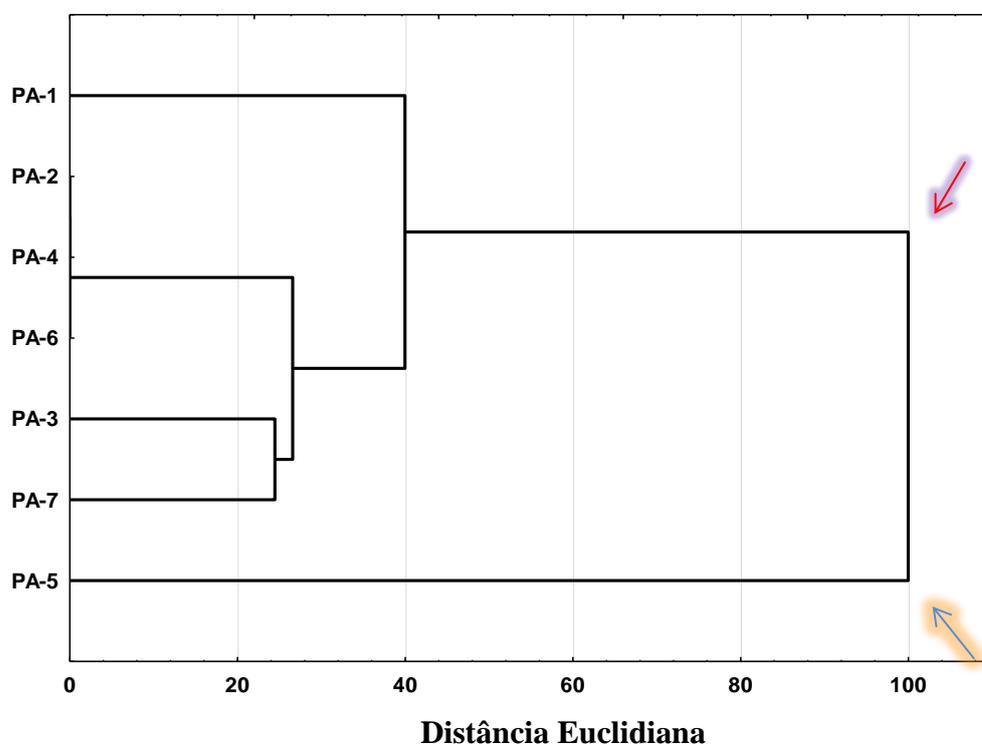
É possível verificar a quase sobreposição dos pontos no gráfico da ACP das estações outono, inverno e verão, devido ao elevado teor percentual de BMB e baixa influência de outras substâncias nessas amostras que atuam na promoção de desvios expressivos em relação às influências de cargas negativas. O maior desvio no gráfico está relacionado à amostra da

primavera, que apresenta-se no eixo negativo, devido influência do teor percentual do 1,8-cineol, que possui um valor negativo de carga (  $CP1 = -0,23$  e  $CP2 = -1,22$ ) em relação aos demais componentes da amostra, contribuindo para esta polarização do BMB vs. 1,8-cineol.

#### 4.2.1. Comparação da composição química dos OEs das quatro estações do ano com dados da literatura

De acordo com dados da literatura sobre a composição química dos OEs de *P. anisum* (MOREIRA et al., 1997; SOUZA et al., 2001; PEREIRA et al., 2021 – tabela 7) o dendrograma gerado demonstra distância Euclidiana de 99,97, o que permite divisão dos grupos por predominância de rotas biossintéticas (figura 24).

Figura 24 – Dendrograma comparativo construído a partir das amostras sazonais de OEs de *P. anisum* coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ e correlacionadas com dados da literatura.



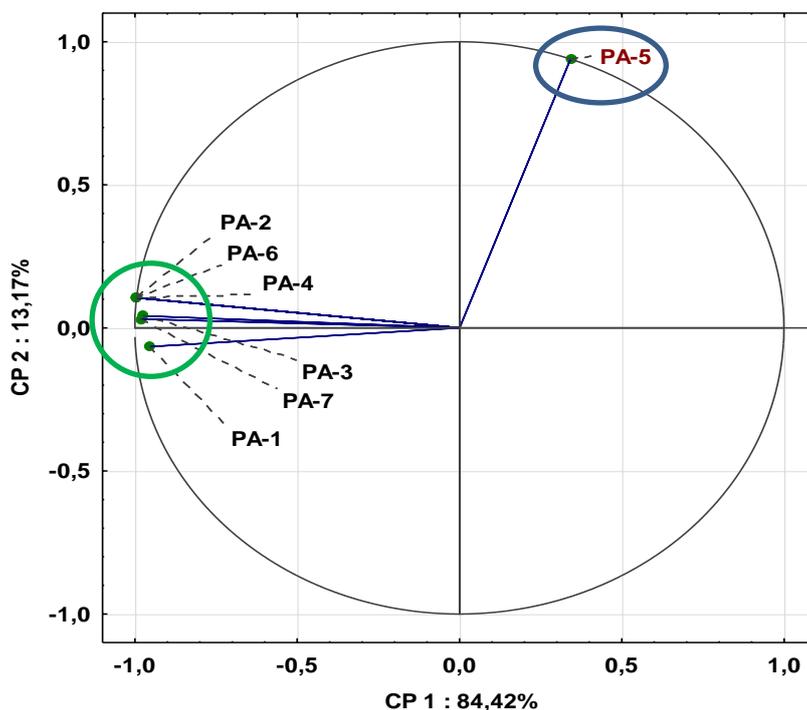
Legenda: **PA-1** = *P. anisum* Primavera; **PA-2** = *P. anisum* Verão; **PA-3** = *P. anisum* Outono; **PA-4** = *P. anisum* Inverno; **PA-5** = *P. anisum* Paraty (SANTOS et al., 2001); **PA-6** = *P. anisum* Teresópolis (MOREIRA et al., 1998); **PA-7** = *P. anisum* Marambaia (PEREIRA et al., 2021).

A seta azul indica a discrepância de PA-5 em relação às demais amostras, fato que ocorre devido a ausência do marcador majoritário BMB e a presença de outras substâncias oriundas da via biossintética do acetato-mevalonato nessa amostra, que contribuem para tamanha divergência.

A seta vermelha aponta para o conjunto de amostras que possuem maior relação entre si, pois contém o mesmo marcador, o BMB. Os subgrupos são formados pelas diferenças entre a concentração do BMB e pela composição química mais semelhante ou mais divergente.

Como o BMB tem sua origem na via biossintética do chiquimato, pode-se inferir que as amostras de OE desse grupo se separam de PA-5 por divergência de rota biossintética. O mesmo padrão de separação e agrupamento é demonstrado no gráfico de ACP (figura 24).

Figura 25 – Análise de componente principal construído a partir das substâncias identificadas nas amostras sazonais do óleo essencial de *P. anisum* coletadas em Raíz da Serra, Magé –RJ, e correlacionadas com os dados disponíveis na literatura.



Legenda: **PA-1** = *P. anisum* Primavera; **PA-2** = *P. anisum* Verão; **PA-3** = *P. anisum* Outono; **PA-4** = *P. anisum* Inverno; **PA-5** = *P. anisum* Paraty; **PA-6** = *P. anisum* Teresópolis; **PA-7** = *P. anisum* Marambaia.

Ratificando a questão supracitada, o círculo verde demonstra o agrupamento da maioria das amostras, variando pouco em termos de cargas e minimamente em relação aos

quadrantes, fato que não ocorre com PA-5 presente em quadrante oposto às demais (círculo azul).

Tabela 6 – Comparativo de acervo químico do óleo essencial das folhas de *P. anisum* deste trabalho com registros da literatura (continua).

Referência	Castilho, 2021.	Castilho, 2021.	Castilho, 2021.	Castilho, 2021.	Santos et al., 2001	Moreira et al., 1997.	Pereira et al., 2021.
Localidade	MAG	MAG	MAG	MAG	PRT	TRS	MRB
Descrição	OE-P	OE-V	OE-O	OE-I	-	-	-
<b>Monoterpenos</b>	<b>36,61</b>	<b>0</b>	<b>1,5</b>	<b>0,55</b>	<b>0,8</b>	<b>1,9</b>	<b>23,0</b>
$\alpha$ -pineno	4,75	-	-	-	0,6	0,4	1,3
$\beta$ -pineno	3,22	-	-	-	0,2	0,9	0,2
mirreno	1,12	-	-	-	-	0,3	0,5
1,8 cineol	17,64	-	-	-	-	-	-
(z)- $\beta$ -ocimeno	0,58	-	-	-	-	-	-
(E)- $\beta$ -ocimeno	7,31	-	1,5	-	-	-	-
limoneno	-	-	-	-	-	0,3	2,6
linalol	1,9	-	-	-	-	-	0,33
$\alpha$ -terpineno	-	-	-	-	-	-	8,3
terpineno-4-ol	-	-	-	0,24	-	-	-
$\gamma$ -terpineno	-	-	-	0,13	-	-	0,1
$\alpha$ -tujeno	-	-	-	-	-	-	0,2
$\alpha$ -felandreno	-	-	-	-	-	-	7,5
$\beta$ -felandreno	-	-	-	0,18	-	-	1,3
ocimeno	-	-	-	-	-	-	0,4
terpinoleno	-	-	-	-	-	-	0,2
$\alpha$ -terpineol	0,09	-	-	-	-	-	-
<b>Sesquiterpenos</b>	<b>3,77</b>	<b>0,37</b>	<b>1</b>	<b>0,39</b>	<b>74,7</b>	<b>2,6</b>	<b>5,8</b>
$\delta$ -elemeno	-	-	-	-	1,9	-	0,1
$\alpha$ -copaeno	-	-	-	-	1,2	-	2,18
$\beta$ -elemeno	-	-	1,0	-	2,5	-	0,22
E-cariofileno	0,05	-	-	-	8,8	-	-
$\beta$ -Gurjuneno	-	-	-	-	0,4	-	-
$\beta$ -cubebeno	-	-	-	-	-	-	0,15
$\alpha$ -cubebeno	0,05	-	-	-	-	-	0,28
$\alpha$ -humuleno	0,62	-	-	0,19	-	-	-
(Z)- $\beta$ -farneseno	-	-	-	-	1,2	-	-
(E)- $\beta$ -farneseno	-	-	-	-	1,1	-	-

Tabela 6 – Comparativo de acervo químico do óleo essencial das folhas de *Piper anisum* deste trabalho com registros da literatura (continuação).

germacreno D	-	-	-	-	10,5	1,5	-
biciclogermacreno	1,28	-	-	-	10,3	-	1,4
$\alpha$ -cariofileno	-	-	-	-	6,9	-	-
$\gamma$ - muuroleno	-	-	-	-	-	0,7	-
(E,E)-a-Farneseno	-	-	-	-	1,6	-	-
$\beta$ -sesquifelandreno	-	-	-	0,2	-	-	-
cubebol	-	-	-	-	2,6	-	-
$\delta$ -cadineno	0,15	0,37	-	-	0,7	0,4	-
$\alpha$ -bisabolol	-	-	-	-	1,4	-	-
<i>E</i> -nerolidol	1,62	-	-	-	11,3	-	-
espatulenol	-	-	-	-	0,5	-	-
<i>epi</i> - $\alpha$ -cadinol	-	-	-	-	0,3	-	-
$\beta$ -bourboneno	-	-	-	-	-	-	0,18
Cubebol	-	-	-	-	0,7	-	-
C15H22O	-	-	-	-	3,2	-	-
<i>epi</i> -a-bisabolol	-	-	-	-	5,5	-	-
$\alpha$ -cadinol	-	-	-	-	1,6	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	-	-	-	-	-	-	1,2
widdrol	-	-	-	-	0,5	-	-
<b>Propanoides</b>	<b>52,3</b>	<b>99,12</b>	<b>68,8</b>	<b>96,98</b>	<b>0,0</b>	<b>95,0</b>	<b>58,4</b>
1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno	51,34	99,12	55,67	96,86	-	95,0	58,36
1-propil-3,4-metilenodioxibenzeno	0,96	-	13,13	0,08	-	-	-
dilapiol	-	-	-	0,04	-	-	-
Total	92,68	92,68	92,68	92,68	75,5	99,5	87,2

Legenda: MAG = Magé; PRT = Paraty; TRS = Teresópolis; MRB = Marambaia.

### 4.3. Avaliação do potencial moluscicida do óleo essencial das folhas de *Piper anisum*

#### 4.3.1. Óleo essencial de primavera

Os experimentos com óleos essenciais de primavera (OE-P) foram realizados nos dias 9 de fevereiro (concentrações finais 50 µg/mL e 100 µg/mL) e 02 de junho (conc. 150 µg/mL, 200 µg/mL e 250 µg/mL).

O comportamento dos caramujos do grupo controle (GC) foi de se agrupar no fundo do recipiente. A etologia dos caramujos sugeriu boa adaptabilidade ao novo ambiente, pois nadavam livremente, emergiam e submergiam, exploravam toda a extensão do novo sítio. Não houve registro de indivíduos em diapausa. Após 10 min no novo ambiente existiam muitas fezes no fundo do recipiente, indicando intensa atividade metabólica/ fisiológica. Isto é, o grupo controle demonstra comportamento natural apesar de alteração do meio de vida.

No grupo dos caramujos tratados com 50 µg/mL (GP50), 5 exemplares permaneceram na superfície, após serem colocados no novo sítio. Após 10 min de exposição, 2 indivíduos entraram em diapausa (recuo exacerbado da porção mole para o interior da concha). A etologia da população registrou hostilidade ao ambiente, pois permaneceram muito inativos. Após 20 min no ambiente, 60% do grupo entrou em diapausa e todos não executavam movimentos físicos. Poucas fezes no fundo do recipiente foram registradas.

No grupo dos caramujos tratados com 100 µg/ mL (GP100), 60% da população encontrava-se na superfície logo após serem adicionados ao novo ambiente; em 5 min do ensaio 40% do grupo entrou em diapausa. A inatividade física foi aparente, bem como não foram registradas fezes no interior do recipiente.

Após 24h no GP50 foram registrados 2 exemplares em diapausa constante, sendo ambos levados ao estereomicroscópio (Zeiss SV11) para teste de reflexo e verificação de batimentos cardíacos. Os caramujos encontravam-se ainda vivos. A população GP50 não se alimentou (alface intáctas). Os exemplares apresentaram coloração mais avermelhada.

No GP100, após 24h do início do teste, todos os caramujos encontravam-se em diapausa (Figura 26). O teste de reflexo foi realizado com todos os indivíduos, confirmando ainda vivos. Os mesmos não se alimentaram, demonstrado com integridade da alface. Percebeu-se coloração esverdeada e inchaço nos pés de alguns representantes da população e presença de fezes no interior da concha. Após 48 horas de exposição o GC, foi registrada alimentação normal, água levemente turva, organismos coexistindo naturalmente, e comportamental normal.

No GP50, após 48h, a alface apresentava pequenas fissuras, sugerindo tentativa de alimentação. Foram ainda registrados exemplares com baixa motilidade, mais lentos do que o GC, e 20% da população encontra-se no fundo do recipiente.

No último observável (GP100), não houve alimentação, 70% da população encontrava-se debilitados, inchados e com baixa movimentação.

Ao analisar espécime a espécime no GP100, registrou-se mortalidade de 30% da população no período de 48 h de exposição ao OE-P de *P. anisum* (Figuras 26).

Figura 26 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GP100) após 48h de exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído na primavera



Legenda: Óbitos 1, 2 e 3.

Fonte: O autor, 2021.

Nas 72 h de exposição o GP50 começou a se comportar com mais desenvoltura no ambiente, sendo que nesta fase já haviam ingerido toda a alface disponibilizada. O GP100 iniciou alimentação após no 3º dias, os 70% restantes da população encontravam-se próximo ao alimento, ainda mantendo-se lentos e debilitados devido estímulo do ambiente. Porém ao completar as 96h de observação, os animais dos três grupos (GC, GP50 e GP100) apresentaram-se completamente normais, alimentaram-se e começaram um processo de reajuste e retomada de comportamento natural. No recipiente do GP100 foi possível notar coloração diferente nas fezes dos animais frente aos demais grupos, algo similar a tonalidade verde.

No quarto dia, as soluções de AMS com as respectivas concentrações de OE foram descartadas e novos 400 mL de AMS recolados. Após a troca (quinto dia), os animais do grupo de GP100, principalmente, demonstraram excelente recuperação, passaram mais tempo no fundo do recipiente, prática esta anteriormente pouquíssimo observada. A alimentação se reestabeleceu para o GP100 sugerindo comportamento comparado ao GC.

Nos dias subsequentes (6, 7, 8 e 9) não se observou discrepâncias do que já se via no tocante ao reestabelecimento comportamental dos animais testados, todavia, um fenômeno ocorreu no décimo dia de ensaio. O GC e o G100 realizaram postura de ovos, confluindo com uma tendência sazonal e/ou de necessidade reprodutiva dentro de uma espécie, mesmo

separadas geograficamente . No décimo primeiro dia, notou-se a segunda desova, igualmente nos dois grupos supracitados.

A primeira ovipostura do GC encontrava-se no fundo do recipiente, tendo sido danificada, isto é, uma postura de 10 ovos, no momento da visualização em estereomicroscópio notou-se apenas 4 ainda no envoltório, claramente violado.

No GP100 ambas as posturas foram de 10 ovos, que seguiram intactas, pois houve uma boa fixação da substância mucosa no revestimento do recipiente. Quanto ao GP50 não houve postura de ovos ou sequer resquícios de substâncias inerentes à reprodução no recipiente.

E ao final do décimo quarto dia todos os animais sobreviventes estavam completamente adaptados, com etologia normal, alimentando-se, dois dos três grupos reproduziram-se.

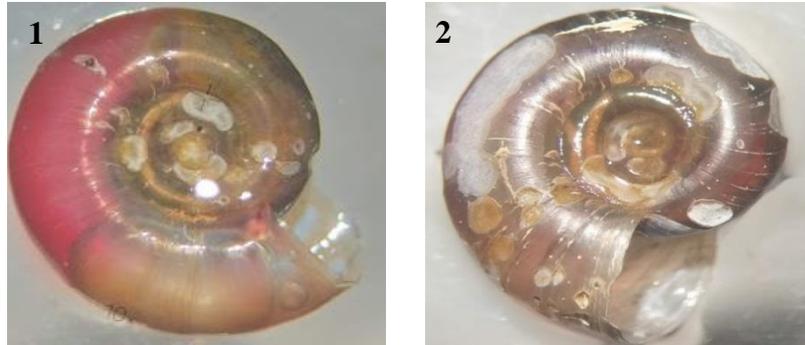
Dando prosseguimento aos ensaios, no dia 02 de junho novos procedimentos com OE-P foram realizados nas concentrações finais de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GP150), 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GP200) e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GP250).

No GP150 o comportamento inicial dos organismos foi de incômodo devido a nocividade do meio com substância diluída, logo houve ataxia em grande parte da população, bem como diapausa. Nas primeiras 24h um óbito foi confirmado e os demais exemplares apresentaram nítida alteração comportamental.

Em 48h foi encontrado mais um indivíduo morto, os demais com movimentos lentos, não houve alimentação pelos sobreviventes e permaneceram com os corpos expostos, isto é, fora da concha e completamente atáxicos. Em 72h permaneceram de forma muito similar ao dia anterior, mas em 96h alimentaram-se, ensaiaram alguma movimentação e ao final da observação já havia fezes no fundo do recipiente.

O GP150 seguiu até o 14º dia de ensaio com os oito sobreviventes adaptados e com comportamento mais dinâmico, aparentando estarem saudáveis após o procedimento, logo, dois óbitos foram registrados ao final. (Figura 27)

Figura 27 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GP150) após exposição ao óleo essencial das folhas de *P. anisum* extraído na primavera

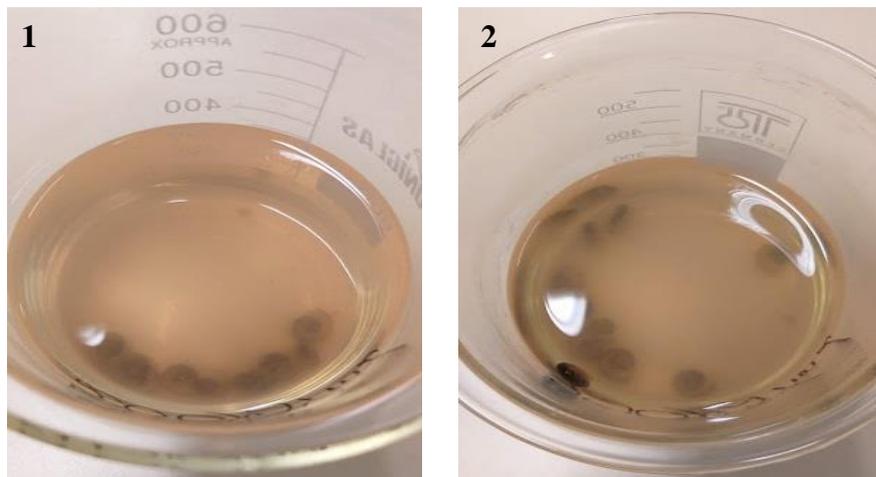


Legenda: **1** = óbito em 24 h; **2** = óbito em 48 h.

Fonte: O autor, 2021.

No GP200 e GP250 ao serem inseridos no ambiente com o OE-P diluído demonstraram muito afetados, ao passo que metade da população, em aproximadamente 10 min de exposição, entrou em diapausa e ficaram imóveis no fundo, três indivíduos na superfície atáxicos e dois tentavam subir pelo porção interna da vidraria similar a tentativa de fuga do ambiente. Em 24h de experimento 100% de ambos os grupos estavam mortos. (Figura 28).

Figura 28 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GP200 e GP250) após exposição ao óleo essencial das folhas de *P. anisum* extraído na primavera



Legenda: **1** = GP200; **2** = GP250

Fonte: O autor, 2021

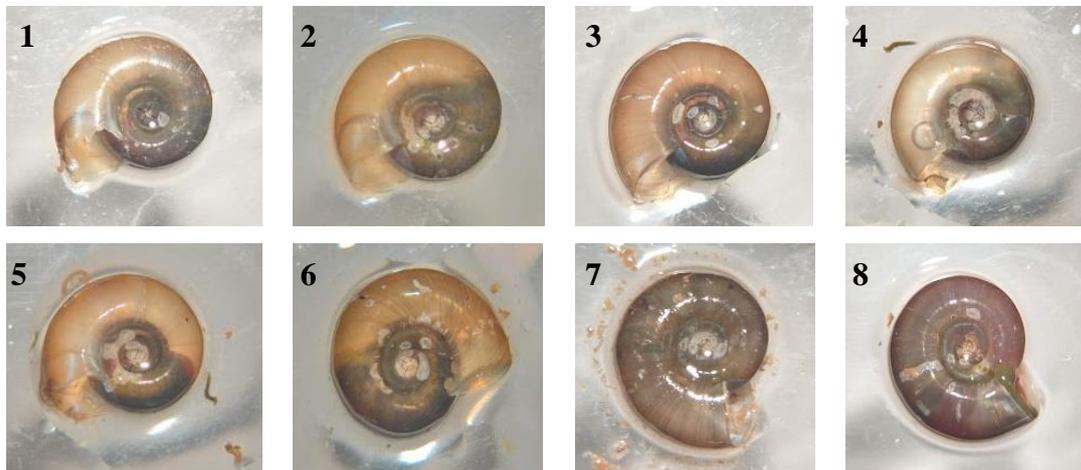
#### 4.3.2. Óleo essencial de verão

No ensaio moluscicida com óleos essenciais de verão (OE-V) as concentrações escolhidas foram 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GV60), 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GV80) e 100 (GV100), além do grupo controle (GC).

No GV60, os animais permaneceram exteriorizados para além da concha e em movimento, sendo que dois indivíduos se situaram no fundo, oito na superfície. Em 24h de exposição ocorreu um total de seis óbitos e os quatro animais sobreviventes estavam atáxicos e em diapausa. Em 48h mais dois óbitos foram confirmados (figura 29), os dois sobreviventes notoriamente buscavam se adaptar ao meio, permaneceram com a massa corporal para fora da concha, porém sem quaisquer movimentos.

O restante da população – dois indivíduos – não passaram das 72h após serem inseridos no meio com o OE-V.

Figura 29 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GV60) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no verão

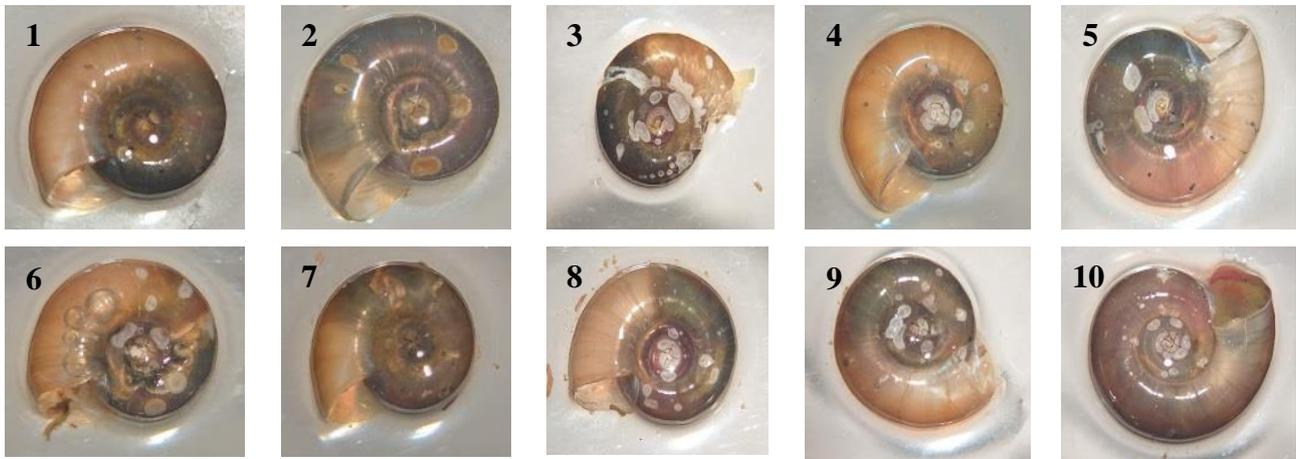


Legenda: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 = óbitos nas primeiras 24 h; 7 e 8 = óbitos em 48 h.

Fonte: O autor, 2021.

Os representantes do GV80, inicialmente, permaneceram em movimentação, mas demonstraram lentidão, três indivíduos submersos e sete emersos. No entanto, após 24h no novo ambiente 80% da população foi a óbito, restando dois indivíduos. Nas 48h seguintes os organismos sobreviventes também morreram, finalizando o procedimento em dois dias (Figura 30).

Figura 30 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GV80) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no verão



Legenda: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 = óbitos nas primeiras 24 h; 9 e 10 = óbitos em 48 h.

Fonte: O autor, 2021.

Já os do GV100, ao serem acomodados no ambiente experimental permaneceram atáxicos e em diapausa, dois no fundo, oito na superfície. Similarmente ao GV80, oito dos dez animais foram à óbito nas primeiras 24h de exposição e os últimos dois em 48h (Figura 31).

Figura 31 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GV100) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no verão



Legenda: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 = óbitos nas primeiras 24h; 9 e 10 = óbitos em 48h.

Fonte: O autor, 2021.

#### 4.3.3. Óleo essencial de outono

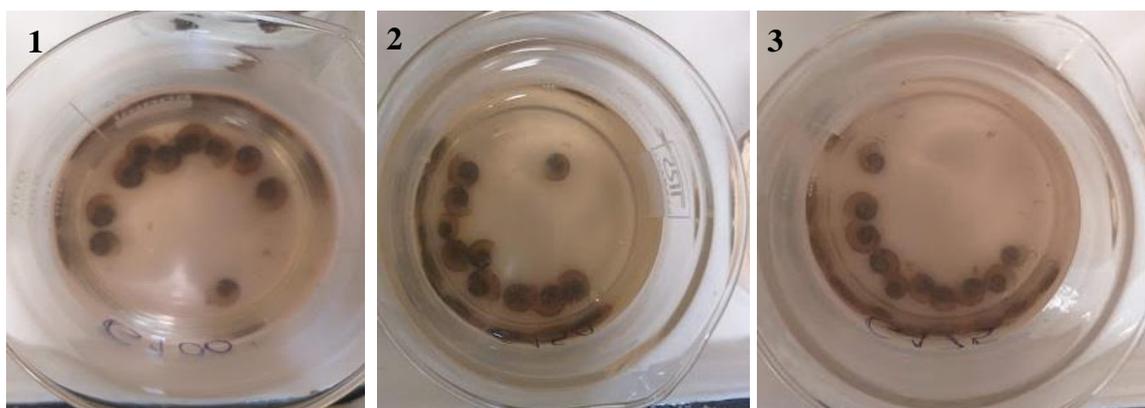
O ensaio realizado com a amostra de OE-O contou com concentrações finais de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GO100), 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GO150) e 175  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GO175).

No início do experimento com o GO100, nove indivíduos permaneceram na região de tensão superficial e um no interior. Quatro apresentaram corpos para fora da concha, de uma forma incomum, com um certo esticamento da massa visceral, três em diapausa – em cerca de 10 min de exposição – e o restante com movimentos lentos e débeis. Logo após 24h do início do processo, toda a população foi a óbito. (Figura 32).

Em GO150, seis dos caramujos inseridos no novo ambiente permaneceram emersos, sendo um desses seis aderido à parede da vidraria, o restante permaneceu em diapausa no fundo. Do mesmo modo que GO100, todos os organismos foram à óbito em 24h. (Figura 32).

Por fim, os moluscos de GO175 comportaram no ambiente espalhando-se, no qual nove submergiram e um permaneceu na parte superior do líquido. O experimento chegou ao fim em 24h com a confirmação da morte de 100% do grupo. (Figura 32).

Figura 32 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GO100, GO150, GO175) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no outono



Legenda: **1** = GO100; **2** = GO150; **3** = GO175.

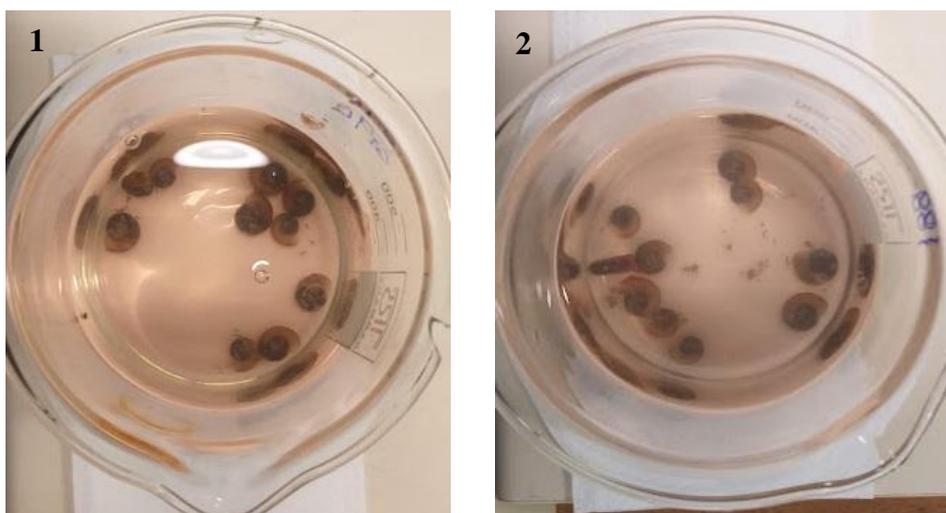
Fonte: O autor, 2021.

#### 4.3.4. Óleo essencial de inverno

Para a elaboração do ensaio moluscicida com o OE-I foram empregadas as concentrações de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GI20), 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GI35), 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GI45), 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GI70), 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GI90) e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GI100). Registrou-se que os animais sempre reagem fortemente ao ambiente, normalmente com os mesmos comportamentos, ataxias, diapausas, emersões ou submersões na solução, o que sugere efetivamente o afetamento dos organismos frente o meio insalubre.

Nas duas últimas concentrações avaliadas houve 100% de óbito nas primeiras 24 horas, o GI70 contou com 90% de óbito nas primeiras 24h e 10% nas 48 h (Figura 33).

Figura 33 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GI90, GI100) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no inverno

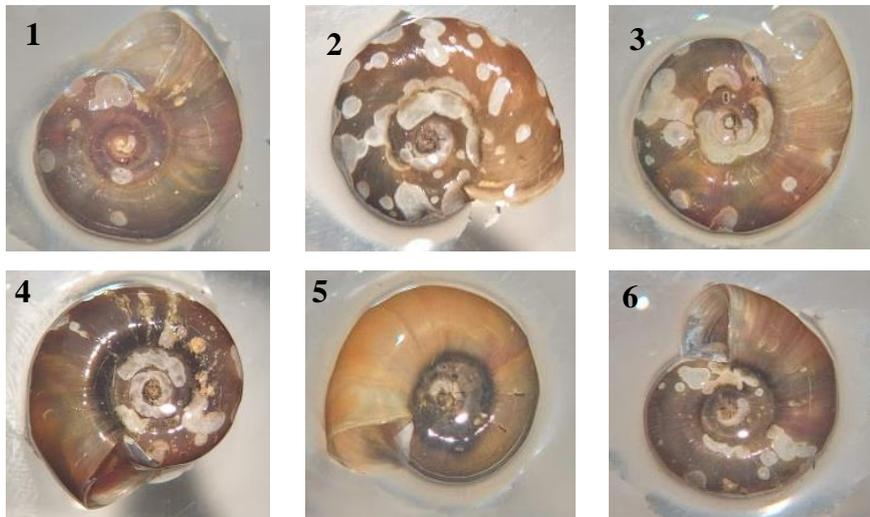


Legenda: **1** = GI90; **2** = GI100

Fonte: O autor, 2021.

O GI20 teve seu primeiro óbito nas primeiras 24h; nas 48h seguintes ocorreu uma baixa de 30% da população e por fim, em 72 h mais 20%, totalizando 60% de mortalidade durante o transcorrer do ensaio (Figura 34).

Figura 34 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GI20) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no inverno

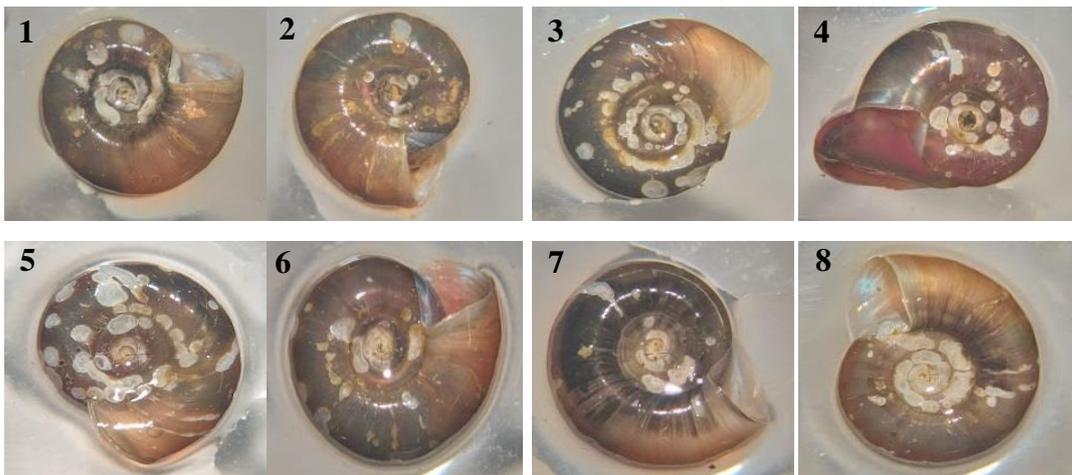


Legenda: 1 = óbito em 24 h; 2, 3 e 4 = óbitos em 48 h; 5 e 6 = óbitos em 72 h.

Fonte: O autor, 2021.

No GI35 iniciam-se os óbitos a partir das 48h com 20% da população; em 72h mais 30% e em 96h mais 30% ao que sobrevivem 2 indivíduos da população inicial (Figura 35).

Figura 35 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GI35) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no inverno



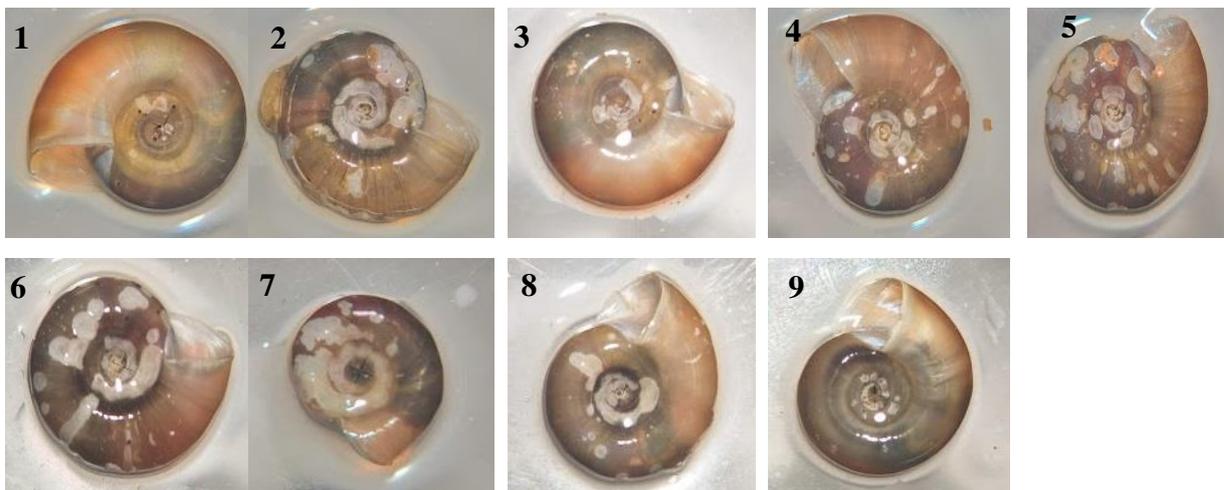
Legenda: 1 e 2 = óbitos em 48 h; 3, 4 e 5 = óbitos em 72 h; 6, 7 e 8 = óbitos em 96 h.

Fonte: O autor, 2021.

Para o GI45 40% dos animais morreram nas primeiras 24h, seguindo de mais 20% em 48 h e 20% em 72h, totalizando 80% de mortalidade. Todavia, após completar as 96h os 20% da população sobrevivente foram para solução de AMS sem agente tóxico e conseguiram

sobreviver, até que no terceiro dia após o tempo de exposição houve mais 1 óbito, perfazendo um total de apenas 1 caramujo vivo (Figura 36).

Figura 36 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (GI45) após exposição ao óleo essencial de *P. anisum* extraído no inverno



Legenda: 1, 2, 3 e 4 = óbitos em 24 h; 5 e 6 = óbitos em 48 h; 7 e 8 = óbitos em 72 h; 9 = óbito no 7º de experimento.

#### 4.3.5. 1-Butil-3, 4-metilenodioxibenzeno isolado

O BMB isolado, componente majoritário no OE de *P. anisum*, foi empregado para a verificação do potencial moluscicida nas concentrações de 25 µg/ mL (BMB25), 50 µg/ mL (BMB50), 75 µg/ mL (BMB75) e, por fim, 38 µg/ mL (BMB38).

Em BMB25, seis caramujos permaneceram na superfície e quatro desceram, aparentemente com movimentação e interação normais. Em 24h de exposição, três indivíduos encontravam-se em diapausa (no fundo), dois exemplares na superfície e os demais em profunda ataxia. Ao completar 48h um óbito foi confirmado (figura 37), não havendo mais nenhuma alteração significativa no grupo até a finalização do experimento no décimo quarto dia.

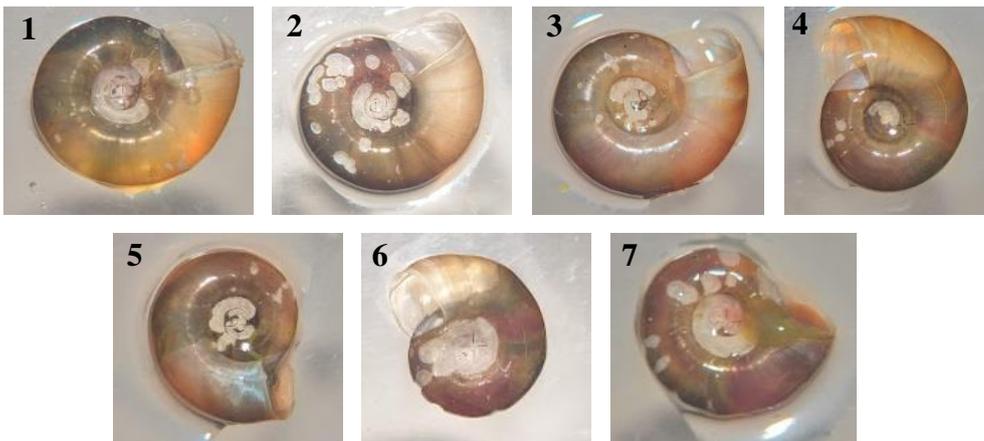
Figura 37 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (BMB25) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno



Fonte: O autor, 2021.

Tendo em vista a discrepância na mortalidade entre BMB25 e BMB50 (100% de óbito), foi realizado um ensaio intermediário, o BMB38. Nas primeiras 24h houve 1 óbito, em 48h 3 e em 72h mais 3, que totalizou 70% de mortes na população inicial (figura 38). Os indivíduos se comportaram da mesma maneira que os demais, apresentando ataxia, diapausa e tentativas de sair do ambiente ou submergir completamente.

Figura 38 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (BMB38) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno



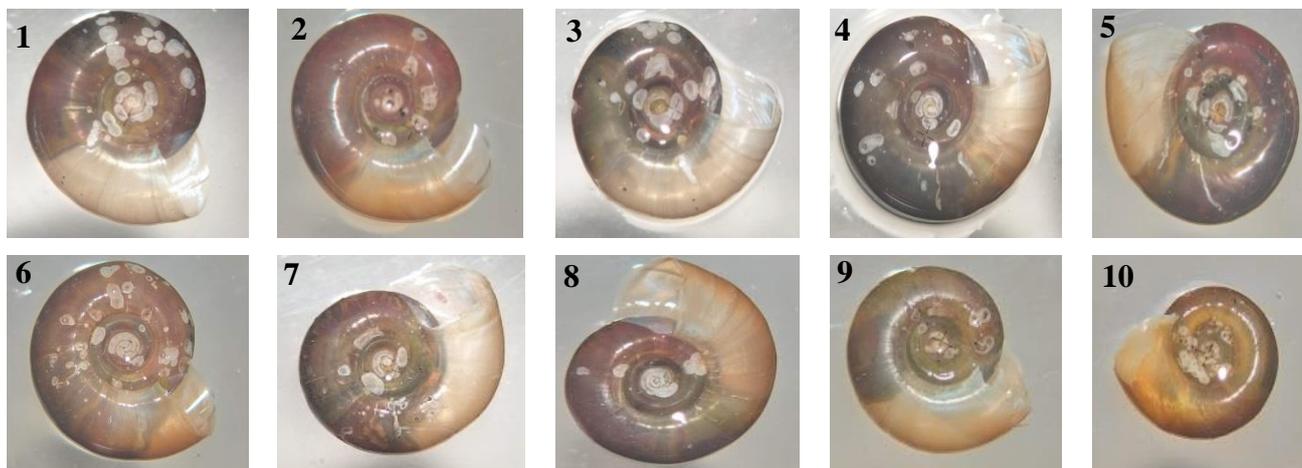
Legenda: **1** = óbitos em 24 h; **2, 3 e 4** = óbitos em 48 h; **5, 6 e 7** = óbitos em 72 h.

Fonte: O autor, 2021.

O ensaio com BMB50 mostrou totalidade de indivíduos atáxicos, em 20 min de exposição, três em diapausa e dois aderidos à parede do béquer. Na sequência das primeiras 24h cinco mortes foram confirmadas e outros cinco encontravam-se demasiadamente

debilitados em diapausa profunda (todo o corpo recolhido). Os demais representantes do grupo foram à óbito nas 48 h consecutivas (Figura 39).

Figura 39 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (BMB50) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno



Legenda: **1 a 5** = óbitos nas primeiras 24 h; **6 a 9** = óbitos em 48 h; **10** = óbito em 72 h.

Fonte: O autor, 2021.

No ensaio com BMB75 o comportamento inicial demonstrou que, após a introdução do grupo no novo ambiente, quatro ficaram na superfície e seis no fundo, todos atáxicos e em diapausa profunda, em 20 min de observação. Sete óbitos foram logo confirmados nas primeiras 24 h (figura 40), os outros 30% da população permaneceu debilitado e com alterações significativas em relação à motilidade, o que os levou à morte nas 48h seguintes, resultando em 100% de óbito (Figura 36).

Figura 40 – Observação de óbito de *Biomphalaria glabrata* (BMB75) após exposição da substância pura 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno



Legenda: **1 a 7** = óbitos nas primeiras 24 h; **8 a 10** = óbitos em 48 h.

Fonte: O autor, 2021.

O quantitativo de óbitos dos experimentos, bem como respectivos períodos foram organizados na tabela 7 para melhor visualização dos resultados.

Tabela 7 – Demonstrativo geral de óbitos observados de *Biomphalaria glabrata*, após exposição aos OEs de *P. anisum* coletadas nas quatro estações do ano e a substância pura BMB.

Amostra	Caramujos expostos (N)	Exposição – Mortalidade acumulativa (n)				Mortos pós-exposição (10 dias) (n)	Sobreviventes (%)	Mortalidade (%)
		24h	48h	72h	96h			
GC	10	0	0	0	0	0	100	0
GP50	10	0	0	0	0	0	100	0
GP100	10	0	3	0	0	0	70	30
GP150	10	1	1	0	0	0	80	20
GP200	10	10	-	-	-	-	0	100
GP250	10	10	-	-	-	-	0	100
GV60	10	6	2	2	-	-	0	100
GV80	10	8	2	-	-	-	0	100
GV100	10	8	2	-	-	-	0	100
GO100	10	10	-	-	-	-	0	100
GO150	10	10	-	-	-	-	0	100
GO175	10	10	-	-	-	-	0	100
GI20	10	1	3	2	0	0	40	60
GI35	10	0	2	3	3	0	20	80
GI45	10	4	2	2	0	1	10	90
GI70	10	9	1	-	-	-	0	100
GI90	10	10	-	-	-	-	0	100
GI100	10	10	-	-	-	-	0	100
BMB25	10	0	1	0	0	0	90	10
BMB38	10	1	3	3	0	0	30	70
BMB50	10	5	4	1	-	-	0	100
BMB75	10	7	3	-	-	-	0	100

Legenda: GC = Grupo Controle; GP50 = Grupo Primavera 50 µg/mL; GP100 = Grupo Primavera 100 µg/mL; GP150 = Grupo Primavera 150 µg/mL; GP200 = Grupo Primavera 200 µg/mL; GP250 = Grupo Primavera 250 µg/mL; GV60 = Grupo Verão 60 µg/mL; GV80 = Grupo Verão 80 µg/mL; GV100 = Grupo Verão 100 µg/mL; GO100 = Grupo Outono 100 µg/mL; GO150 = Grupo Outono 150 µg/mL; GO175 = Grupo Outono 175 µg/mL; GI20 = Grupo Inverno 20 µg/mL; GI35 = Grupo Inverno 35 µg/mL; GI45 = Grupo Inverno 45 µg/mL; GI70 = Grupo Inverno 70 µg/mL; GI90 = Grupo Inverno 90 µg/mL; GI = Grupo Inverno 100 µg/mL; BMB25 = Butilbenzeno 25 µg/mL; BMB38 = Butilbenzeno 38 µg/mL; BMB50 = Butilbenzeno 50 µg/mL; BMB75 = Butilbenzeno 75 µg/mL.

## 5. DISCUSSÃO

Existem poucos dados na literatura que descrevem os constituintes voláteis dos OEs da espécie *P. anisum*, apenas três artigos foram encontrados até a elaboração desta dissertação os quais contribuíram para comparação das substâncias químicas presentes nos OEs para três diferentes fragmentos da Mata Atlântica que são contemplados nos trabalhos de Moreira e colaboradores (1997), Santos e colaboradores (2001) e Pereira e colaboradores (2021) em anos e locais distintos, a comparação demonstrou semelhanças químicas em relação a presença de BMB em Moreira e Pereira e ausência deste componente em Santos e colaboradores (2001). Marques e colaboradores (2008) identificaram e isolaram o BMB, ressaltando a ocorrência do mesmo para uma outra localidade, Xerém-RJ, demonstrando a possível preferência pela via metabólica utilizada pela espécie em questão. Também foi possível perceber que o BMB, quando presente, demonstra alto teor demonstrando-se majoritário nos fragmentos de Mata Atlântica das regiões de Teresópolis - RJ; Xerém - RJ; Marambaia - RJ e Magé - RJ, não sendo evidenciada apenas para a região de Paraty-RJ.

Esta divergência entre presença e ausência de BMB para as demais regiões e Paraty poderia ser justificada, todavia sendo necessárias maiores investigações, através de alguns fatores tais como, diferenças de microclima, especificidade ecológica, fenofase, hora da coleta, interações de *habitat*, condições edáficas, crípticas e/ou possível quimiotipo para a espécie (DA SILVA et al., 2016).

Outro viés a se considerar, devida discrepância química da espécie *P. anisum* coletada na região de Paraty para as demais localidades de coletas, tanto deste trabalho quanto dos que foram encontrados na literatura, seria a realização de nova coleta destes exemplares para extração do OE, quantificação e caracterização dos mesmos para posterior comparação. Há de se considerar, ainda, a possibilidade de identificação do exemplar da região de Paraty, mesmo que na época tenham sido identificados pela especialista da família Piperaceae. A sugestão do autor se baseia no fato de espécies de Piperaceae possuírem diminutos aparatos florais, além de extensa similaridade na morfologia externa, um argumento muito comum para justificar abordagens de pesquisadores anatomistas vegetais para a realização de estudos em taxonomia (GOGOSZ et al., 2012).

A variação nos componentes presentes nas amostras deste trabalho em comparação às quatro estações de coleta sugerem a suscetibilidade às influências aos fatores abióticos e fatores bióticos, de acordo com a demanda dos organismos vegetais no ambiente inserido,

porém é necessário um estudo sazonal para a mesma região afim de comprovar o fato (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; TROWBRIDGE; STOY, 2013). A demanda ambiental vivenciada pelo organismo vegetal requer do mesmo respostas moduladas o que confere uma série de economias e/ou investimentos energéticos que serão mais eficazes na produção das resoluções imediatas e necessárias, o que é definido como efeito de dreno (GIULIANI et al., 2018; MACHADO et al., 2021). Considerando esse viés, o OE-P demonstra maior diversidade química, com menor teor percentual do componente majoritário BMB, fato que pode estar atrelado ao ambiente no momento da coleta, além de ser a estação na qual os espécimens apresentavam flores e parcialmente frutos, o que colabora para atração de agentes polinizadores e repelência de herbívoros. A identificação das substâncias linalol, *E*-nerolidol (ambas conhecidas por atrair polinizadores) e o alto teor percentual relativo de 1,8-cineol (repelência de herbívoros) na composição do OE-P pode corroborar tal hipótese (MACHADO et al., 2021). Ramos e colaboradores (2020) descreveram para o OE das folhas de *Piper mollicomum* Kunth elevado teor percentual de 1,8-cineol durante período de floração. Uma vez que as rotas biossintéticas para produção de mono- (linalol, 1,8-cineol)/ sesquiterpenos (*E*-nerolidol) e butilbenzeno são concorrentes, o aumento na produção de um metabólito pode interferir na produção de outro. No entanto, o mesmo não foi verificado para OE-V. Sendo assim, um estudo sazonal mensal deve ser realizado.

Para o desenvolvimento deste estudo foram selecionadas diferentes concentrações com a finalidade de determinação da dose letal para matar 50% (DL<sub>50</sub>) dos moluscos. No entanto, não foi possível calcular o DL<sub>50</sub> em razão da não disponibilidade de OE e/ ou dos moluscos em função também da pandemia de Covid-19. Dessa forma, para fins de comparação, selecionamos a concentração de 100 µg/mL para comparar os resultados dos OE obtidos nas 04 estações do ano. Houve diferença de atividade apenas para OE-P, o qual resultou mortalidade parcial da população de moluscos na concentração de 100 µg/mL. Todas as demais amostras demonstraram 100% de mortalidade nessa concentração. Esse fato pode ser explicado pela diferença de composição química de OE-P, como mencionado anteriormente (menor teor percentual de BMB e teor percentual relevante de 1,8-cineol). Em pesquisa realizada por Ribeiro (2016) foi demonstrado maior DL<sub>50</sub> para OE das espécies *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. e *Hyptis dilatata* Benth, cujo componente majoritário foi identificado como 1,8-cineol, do que para *Lippia acutidens* Mart. e *Lippia gracilis* Schauer que não registram a presença dessa substância. Os monoterpenos isolados cânfora e 1,8-cineol não demonstram toxicidade aos caramujos da espécie *B. glabrata* (RIBEIRO et al., 2021), o que

contribuiu para a conjectura de menor atividade do OE-P poder ser atribuída à mistura BMB e 1,8-cineol.

Uma analogia entre as concentrações GP50, GV60, GI45 e GI35, permite entender por discrepância das atividades (tabela 7), que apesar da baixa variação de concentração final do OE-P para OE-V há uma taxa de mortalidade de 0 na primeira e 100% na segunda. E concentrações mais baixas de OE-I (GI45 e GI35) em comparação ao OE-P (GP50), conferem mortalidade acentuadas para ambos os experimentos realizados com o óleo de inverno, o que assevera mormente a divergência na composição química e sugerindo a atribuição da ação biológica ao BMB.

Baseado nos dados demonstrados no desenvolvimento deste trabalho e aqueles da literatura em relação ao esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, arilpropanoides são descritos como eficazes moluscicidas, o que leva ao autor observar o esqueleto químico presente nestas. Ao avaliar a estrutura química do componente majoritário da espécie *P. anisum*, o BMB, um C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub>, foi possível perceber que este possui intrínseca relação com as demais substâncias químicas da via do chiquimato – os arilpropanoides – o que contribuiu para a elaboração da hipótese de possível atividade moluscicida. Com base no pressuposto de o derivado butilbenzeno possivelmente conferir atividade moluscicida ao OE da espécie *P. anisum* coletada no fragmento de Mata Atlântica de Magé, foram realizados ensaios moluscicidas com essa substância isolada. De posse do BMB puro e isolado, foram realizados ensaios com diferentes concentrações finais, como apresentado nos resultados. Na concentração de 50 µg/mL todos os moluscos morreram (100%), o que demonstra efetiva atividade do componente majoritário do OE de *P. anisum*. O DL<sub>50</sub> para esta substância não pode ser determinado até o momento, mas sabemos que o mesmo **é menor que 38 µg/mL** (70% de mortes), ou seja, por comparação com dados da literatura, como demonstrado abaixo, o BMB tem grande potencial como moluscicida.

Pesquisa realizada por Alva e colaboradores (2012) demonstrou que as substâncias β-cariofileno e α-bisabolol, marcadores majoritários da espécie *Acanthospermum hispidum* C. DC., resultou em uma DL<sub>50</sub> de **37,8 µg/mL** contra moluscos da espécie *Biomphalaria peregriana*. No trabalho de Gomes e colaboradores (2019) o efeito biológico do eugenol obtido na espécie *Cinnamomum zeylanicum* contra a espécie *B. glabrata* apresentou um DL<sub>50</sub> de **18,62 µg/mL**, demonstrando expressiva letalidade. No entanto, outras substâncias como α-pineno e (Z)-β-ocimeno (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) resultam em DL<sub>50</sub> mais alta (**90 µg/mL**) em ensaios de atividade biológica contra o molusco *B. glabrata*, sendo menos tóxico em baixas concentrações em comparação aos estudos supracitados (DIAS et al., 2013). Por

outro lado, Ribeiro e colaboradores (2021) demonstram  $DL_{50}$  de **7,11  $\mu\text{g/mL}$**  e **10,43  $\mu\text{g/mL}$**  para timol e  $\alpha$ -pineno isolados, respectivamente, contra a mesma espécie de molusco usada no desenvolvimento desta dissertação. Porém, o efeito obtido só foi notável quando as substâncias foram testadas separadamente, pois a mistura entre os monoterpenos acabou diminuindo a ação biológica (RIBEIRO et al., 2021) o que poderia justificar a alta concentração de  $\alpha$ -pineno em conjunto com (*Z*)- $\beta$ -ocimeno nos experimentos de Dias e colaboradores (2013). Segundo Ribeiro e colaboradores (2021) o efeito contra os moluscos é atribuído aos constituinte monoterpênicos, muito comuns em OE.

O autor buscou no desenvolvimento desta Dissertação a relação de estrutura-atividade (SAR), no qual foi possível visualizar alguns atributos comuns nas principais substâncias moluscidas da tabela 1 em comparação com o BMB. Analisando a estrutura da substância majoritária do OE deste trabalho, registra-se a presença de anel aromático, grupo metilenodioxílico ligado ao anel aromático, assim como grupo alquila ( $C_4$ ). A comparação com a estrutura dos fenilpropanoides da tabela 1, por exemplo, safrol, miristicina e apiol, essas também possuem anel aromático, grupo metilenodioxílico e cadeia lateral ligada ao anel aromático, porém, diferente do BMB (alquila), essas substâncias possuem um grupo alila. A semelhança é grande o que pode justificar o efeito moluscida do BMB. As substâncias que possuem no anel aromático uma metoxila e/ ou hidroxila no lugar do grupo metilenodioxílico são mais ativas, como por exemplo o eugenol (Gomes et al., 2019). Portanto, em se tratando de substâncias simples que podem funcionar como moluscida, deve-se pensar em  $C_6-C_3$  ou  $C_6-C_4$ , sendo que o substituinte do anel aromático (pelo menos dois substituintes) pode ser grupo **metoxila e hidroxila; duas metoxilas; duas hidroxilas; metilenodioxila**.

Foi possível com o desenvolvimento desta Dissertação fazer analogias entre as estruturas e suas respectivas atividades de acordo com a presença ou ausência de determinados grupos, no entanto os mecanismos de ação biológica desencadeado no animal por estas substâncias ainda não são conhecidos, sendo de suma importância maiores investigações para sua elucidação. Todavia, dados da literatura sugerem algumas possíveis causas, que são trazidas pelo autor em vista de nortear ou servir como ponto de partida para pesquisas posteriores, tais como, ação à nível celular, promovendo desestabilização metabólica levando à lise; anormalidades estruturais na mitocôndria causando morte celular; danos causados diretamente à membrana celular; inibição da ação de importantes enzimas celulares ou interações eletrostáticas com fosfolipídios presentes no citoplasma (RIBEIRO et al., 2021).

## CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que:

- 1- Existem diferenças significativas no teor de BMB para a espécie *P. anisum* na região de Magé nas quatro estações, sendo as de verão e inverno os maiores;
- 2- O BMB também é o marcador majoritário na espécie *P. anisum* para a região de Magé o que contribui com os dados já existentes para as regiões de Teresópolis, Xerém e Marambaia;
- 3- De acordo com os dados da literatura e os resultados obtidos na elaboração desta Dissertação é bastante provável que o BMB seja um marcador químico para a espécie *P. anisum* do Estado do Rio de Janeiro;
- 4- Os OEs de *P. anisum* com maior teor de BMB e o BMB isolado demonstraram elevada atividade moluscicida, esse é o primeiro registro dessa atividade na literatura para a substância;
- 5- O OE da espécie *P. anisum* da estação de primavera teve menor atividade moluscicida possivelmente pelo sinergismo entre o BMB e o monoterpeneo 1,8-cineol;
- 6- Foi possível considerar atributos da estrutura química de alquilbenzenos com a atividade moluscicida, porém, testes devem ser feitos com substâncias puras e os animais do laboratório para comprovar as propostas sugeridas. Ainda, a preparação de análogos sintéticos desses alquilbenzenos pode melhorar a atividade moluscicida, por exemplo, substituindo hidroxilas que são grupos doadores de elétrons por outros grupos;
- 7- Os achados nesta Dissertação poderão contribuir para melhor entendimento da plasticidade fenotípica química de *P. anisum* no tempo e no espaço e para ampliar o conhecimento dos efeitos biológicos dessa planta que é usada pela população brasileira.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, F. et al. Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. **Planta**, v. 246, n. 5, p. 803–816, 2017.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectrometry**. 4.1 ed. [s.l.] Allured Publishing Corporation, 2017.
- ALBUQUERQUE, F. C. DE et al. Resistência de piperáceas nativas da Amazônia á infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 3, p. 341–348, 2001.
- ALVA, M. et al. Bioactivity of the essential oil of an Argentine collection of *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae). **Natural Product Communications**, v. 7, n. 2, p. 245–248, 2012.
- ANANDARAJ, M.; SARMA, Y. R. Diseases of black pepper (*Piper nigrum* L.) and their management. **Journal of Spices & Aromatic Crops**, v. 4, n. 1, p. 17–23, 1995.
- APG. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.
- BATALHA-FILHO, H.; MIYAKI, C. Y. Filogeografia da Mata Atlântica. **Rev. da Biologia**, v. Vol. Esp., p. 31–34, 2011.
- BATISTA, D. et al. *Piper anisum* as a promising new source of bioactive metabolites. **Chemical Papers**, v. 74, n. 5, p. 1505–1515, 2019.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). In: **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. p. 178.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. In: **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. p. 144.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Educação em saúde para o controle da esquistossomose. In: **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. p. 40.
- CALDERARI, M. T. **Estudo Dos Oleos Essenciais De Piperaceae Do Vale Do Itajaí Em Santá Catarina**. Dissertação de Mestrado—Florianópolis, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

- CARLOS DE SOUZA, F. P. et al. Esquistossomose Related papers. **Rev Bras Clin Med.**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.
- CARVALHO-SILVA, M.; GUIMARÃES, E. F. Piperaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 27, n. 2, p. 235–345, 2009.
- CASTUERA-OLIVEIRA, L.; DE OLIVEIRA-FILHO, A. T.; EISENLOHR, P. V. Emerging hotspots of tree richness in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, n. 1, p. 117–134, 2020.
- CHEN, S. J. et al. C-fiber-evoked autonomic cardiovascular effects after injection of *Piper betle* inflorescence extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, n. 3, p. 183–188, 1995.
- COLLEY, E.; SIMONE, L. R. L.; SILVA, J. DE L. E; Uma viagem pela história da Malacologia. **Estud. Biol., Ambiente Divers.**, v. 34, n. 83, p. 175–190, 2012.
- COSTA, R. S. C.; MEDEIROS, I. M. **Pimenta-do-reino**. São Paulo:EMBRAPA, 2000.
- CUNICO, M. M. et al. Gênero *Ottonia*: uma revisão das principais características botânicas, fitoquímicas e biológicas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 2, p. 17–21, 2005.
- DA SILVA, M. F. R. et al. Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadense* (Miq.) C. DC (Piperaceae). **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 64–70, 2016.
- DE B. F. FERRAZ, A. et al. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 243–248, 2010.
- DEFAVERI, A. C. A. et al. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar. (myrtaceae) essential oils: Composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1531–1538, 2011.
- DIAS, C. N. et al. Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of *syzygium cumini* (L.) skeels from Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 6, p. 1133–1141, 2013.
- DO CARMO, D. F. M. et al. Chemical and biological analyses of the essential oils and main constituents of *Piper* species. **Molecules**, v. 17, n. 2, p. 1819–1829, 2012.
- DOOL, H. V. D.; KRATZ, P. D. A. generalization of retention index system including linear temperature programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p.463-471, 1963.
- DOS SANTOS, W. et al. Eficácia in vitro de óleos essenciais de espécies de Piperaceae no controle do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 12, n. 4, p. 460–469, 2018.
- FACUNDO, V. A. et al. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper*

*tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 733–742, 2008.

FLORA DO BRASIL. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

FLORES, N. et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, p. 621–627, 2009.

GARLINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. Status do *hotspot* Mata Atlântica: uma síntese. In: **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2005. p. 3–11.

GERSHENZON, J.; ENGELBERTH, J. E. Metabólitos secundários e Defesa Vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Eds.). **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 369–399.

GIULIANI, C. et al. *Salvia verticillata*: Linking glandular trichomes, volatiles and pollinators. **Phytochemistry**, v. 155, p. 53–60, 2018.

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

GOGOSZ, A. M. et al. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 405–417, 2012.

GOMES, P. R. B. et al. Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 48, n. 1, p. 112–127, 2019.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. DE M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.

GREIG, N. Regeneration mode in Neotropical *Piper*: habitat and species comparisons. **Ecology**, v. 74, n. 7, p. 2125–2135, 1993.

GUERRINI, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 39–48, 2009.

GUIMÃRAES, E. F. et al. Piperaceae. In: FORZZA, R. C. (Ed.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 1444–1460.

GUIMARÃES, E. F.; VALENTE, M. C. Piperaceae. In: REITZ, R. (Ed.). **Flora ilustrada de Itajaí**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2001. p. 104.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of eugenol: A structure-activity relationship study. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 9, p. 975–985, 2011.

GUO, Y. et al. Iodine-catalyzed oxidative cyclisation for the synthesis of sarisan analogues containing 1,3,4-oxadiazole as insecticidal agents. **RSC Advances**, v. 0, p. 1–7, 2013.

HARBONE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. 3. ed. London: London Academy, 1988.

ISO. Aromatic natural raw materials. In: **International Organization for Statandarization**. ISO. Genebra: [s.n.]. p. 8.

JARAMILLO, M. A. .; MANOS, P. S.; ZIMMER, A. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, v. 165, n. 3, p. 403–416, 2004.

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

JUNIOR, C. R. et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 21, p. 3800–3805, 2012.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciênc. cult. (São Paulo)**, v. 55, n. 1, p. 38–41, 2003.

KUMAR, P.; SINGH, V. K.; SINGH, D. K. Kinetics of enzyme inhibition by active molluscicidal agents ferulic acid, umbelliferone, eugenol and limonene in the nervous tissue of snail *Lymnaea acuminata*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 172–177, 2008.

LAPORTE, E. et al. Neurocognitive effects of kava (*Piper methysticum*): a systematic review. **Human psychopharmacology**, v. 26, p. 102–111, 2011.

LIU, Z. et al. Natural product-based fungicides discovery (II): Semisynthesis and biological activity of sarisan attached 3-phenylisoxazolines as antifungal agents. **Chemistry and Biodiversity**, p. 1–8, 2020.

LOBATO, A. M. et al. Atividade Antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 19, p. 355–363, 1989.

LÓPEZ, K. S. E. et al. Local Anesthetic Activity from Extracts , Fractions and Pure Compounds from the Roots of *Ottonia anisum* Spreng . (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 2229–2237, 2016.

LORENZO, D. et al. Asaricin , the Main Component of *Ocotea opifera* Mart. Essential Oil. **Natural Products Letters**, v. 15, n. 3, p. 163–170, 2000.

MACHADO, D. B. et al. Study of volatile chemical constituents and insect-plant interaction in *Piper mollicomum* Kunth (Piperaceae) from Tijuca Forest, Rio de Janeiro - RJ, Brazil. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 5, p. 1216–1225, 2021.

MAHMOOD, S.; HUSSAIN, S.; MALIK, F. Review : Accentuating the prodigious significance of *Eclipta alba* - An inestimable medicinal plant. **Pakistan journal of**

- pharmaceutical sciences**, v. 27, n. 1, p. 193–202, 2014.
- MAIA, J. G.; ANDRADE, E. H. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 595–622, 2009.
- MAIA, J. G.; GREEN, C. L.; MILCHARD, M. J. New sources of natural safrole. **Perfumer and Flavorist**, v. 18, p. 19–22, 1993.
- MARQUES, A. M. et al. Caracterização de derivado arilbutanoídico em folhas e raízes de *Ottonia anisum* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 709–712, 2008.
- MARQUES, A. M. et al. Chemistry and Biological Activity of Essential Oils from *Piper clausenianum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v. 5, n. 11, p. 1837–1840, 2010.
- MARQUES, A. M. et al. Aristolactams from roots of *Ottonia anisum* (Piperaceae) André. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 939–942, 2011.
- MARQUES, A. M.; KAPLAN, M. A. C. Active metabolites of the genus *Piper* against *Aedes aegypti*: natural alternative sources for dengue vector control. **Universitas Scientiarum**, v. 20, n. 1, p. 61–82, 2015.
- MARTINS, A. P. et al. Essential oils from four *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2019–2023, 2019.
- MELO, A. M. et al. Extração, identificação e estudo do potencial antimicrobiano do óleo essencial de pimenta-preta (*Piper nigrum* L.), biomonitoramento por *Artemia salina* Leach. **Holos**, v. 1, n. e10663, p. 1–16, 2021.
- MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Biodiversidade Brasileira: avaliação e identificação de áreas prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. In: Biodiversidade, n 5. Brasília: MMA, 2002. p. 404.
- MONTEIRO, D. **Delimitação taxonômica de espécies de *Piper* (Piperaceae): uma abordagem integrativa utilizando caracteres morfológicos, moleculares e análise fitogeográfica**. Tese de Doutorado—Rio de Janeiro: Escola Nacional de Botânica Tropical, 2015.
- MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional do Itatiaia - Brasil: *Manekia* e *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 999–1024, 2009.
- MOREIRA, D. D. L. et al. Bioactive Neolignans from the Leaves of *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae) Bioactive Neolignans from the Leaves of *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae). **Rec. Nat. Prod.**, v. 10, n. 4, p. 472–484, 2016.
- MOREIRA, D. DE L. et al. Effects of the essential oil from *Piper solmsianum* C. DC. leaves in mice behavior. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, p. 291–292, 2000.
- MOREIRA, D. DE L. et al. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C. DC. in mice behaviour. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, p. 33–57, 2001.

MOREIRA, D. DE L.; KAPLAN, M. A. C. 1-Butyl-3,4-Methylenedioxybenzene as the major constituent of essential oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). **Jornal of Essencial Oil Research**, v. 9, p. 565–568, 1997.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 786–792, 2000.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NEGREIROS, J. R. S.; MIQUELONI, D. P.; AZEVEDO, J. M. A. **Caracterização fitoquímica de acessos de *Piper aduncum* L. do banco ativo de germoplasma da EMBRAPA, Acre**. Belém, PA: II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos., 2012

NISHIMURA, Y. et al. Ethanol extracts of black pepper or turmeric down-regulated SIRT1 protein expression in Daudi culture cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 4, p. 727–730, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793–810, 2000.

OLIVEIRA, G. L. et al. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 5, p. 743–753, 2013.

OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162–175, 2013.

PARAENSE, W. L. **Histórico do gênero *Biomphalaria*, morfologia e sistemática morfológica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

PEREIRA, L. P. L. A. et al. Essential oils as molluscicidal agents against schistosomiasis transmitting snails - a review. **Acta Tropica**, v. 209, p. 105489, 1 set. 2020.

PEREIRA, R. A. et al. Chemodiversity of Essential Oils in *Piper* L. (Piperaceae) Species from Marambaia Island, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 5, p. 1203–1215, 2021.

POSER, G. L. VON; RORIG, L. R.; HENRIQUES, A. T. Journal of Essential Oil Aromatic Plants from Brazil . III . The Chemical Composition of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. mikanianum* (Kunth) Steudel Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, p. 337–340, 1994.

QUEIROZ, G. A.; DE BARROS, A. A. M.; GUIMARÃES, E. F. *Piper* (Piperaceae) do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Niterói / Maricá, RJ, Brasil. **Rodriguésia**, v. 71, n. e01992918, p. 1–13, 2020.

RAMOS, Y. J. et al. Chemical composition of the essential oils of circadian rhythm and of

different vegetative parts from *Piper mollicomum* Kunth - A medicinal plant from Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 92, n. July, 2020.

RAPADO, L. N. et al. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of Helminthology**, v. 85, p. 66–72, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Composição Molecular das Células. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (Eds.). . **Biologia vegetal**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 18–37.

RIBEIRO, E. C. G. **Atividade moluscicida de óleos essenciais de plantas aromáticas da região amazônica maranhense**. Dissertação de Mestrado—São Luis: Universidade Federal do Maranhão, 2016.

RIBEIRO, I. A. T. A. et al. Acta Tropica Toxic effect of *Croton rudolphianus* leaf essential oil against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni cercariae* and *Artemia salina*. **Acta Tropica**, v. 223, p. 1–8, 2021.

RIBEIRO, R. A. et al. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, v. 106, p. 46–57, 2011.

SANTOS, J. S.; BEZZERA, S.; ALVES, S. A Importância do Inventário Florestal para Fauna e Flora da Região Local. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 101591–101601, 2021.

SANTOS, P. R. et al. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547–551, 2001.

SAUCHA, C. V. V.; SILVA, J. A. M. DA;; AMORIM, L. B. Condições de saneamento básico em áreas hiperendêmicas para esquistossomose no estado de Pernambuco em 2012. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 24, n. 3, p. 497–506, 2015.

SILVA, A. M. **Metabolismo secundário e ligninas de espécie de Piper**. Tese de Doutorado—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SOUSA, R. M. O. F. et al. Larvicidal , molluscicidal and nematicidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. **J Pest Sci**, v. 56, p. 1–14, 2014.

STEFANO, V. D.; PITONZO, R.; SCHILLACI, D. Antimicrobial and antiproliferative activity of *Athamanta sicula* L . (Apiaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n. 25, p. 31–35, 2011.

TEBBS, M. C. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 3. Taxonomy of *Piper* sections Lepianthes and Radula. **Bulletin of the British Museum (Natural History). Botany**, v. 23, p. 1–50, 1993.

TROPICOS.ORG. **Jardim Botânico de Missouri.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/25004473>>. Acesso em: 1 set. 2021.

TROWBRIDGE, A. M.; STOY, P. C. BVOC-Mediated Plant-Herbivore Interactions. In: **Biology, controls and models of tree volatile organic compound emissions.** Springer: Dordrecht, 2013. p. 21–46.

TYRREL, N. Evolution of natural flavor development with the assistance of modern technologies. **Food Technol.**, v. 44, n. 1, p. 68–72, 1990.

VALAREZO, E. et al. Study of Volatile Secondary Metabolites Present in *Piper carpunya* Leaves and in the Traditional Ecuadorian Beverage Guaviduca. **Plants**, v. 10, p. 338, 2021.

VILHENA, C. S. et al. Essential oil of *Piper divaricatum* induces a general anaesthesia-like state and loss of skeletal muscle tonus in juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, v. 510, p. 169–175, 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Field use of molluscicide in schistosomiasis control programmes: na operational manual for programme managers.** Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254641/9789241511995-eng.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2021.