



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

Ygor Jessé Ramos

Estudos Quimiofenético e Farmacognóstico de *Piper gaudichaudianum* Kunth e *Piper multinodum* C. DC. (Piperaceae)

Rio de Janeiro

2021

Ygor Jessé Ramos

**Estudos Quimiofenético e Farmacognóstico de *Piper gaudichaudianum*
Kunth e *Piper multinodum* C. DC. (Piperaceae)**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Plantas medicinais e metabolismo secundário.

Orientador: Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Rio de Janeiro

2021

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

R175 Ramos, Ygor Jessé
Estudos quimiofenético e farmacognóstico de *Piper gaudichaudianum* Kunth
e *Piper multinodum* C. DC. (Piperaceae)/ Ygor Jessé Ramos. – 2021.
283 f. : il.

Orientador: Davyson de Lima Moreira
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Piperaceae - Teses. 2. Farmacologia - Teses. 3. Polimorfismo - Teses. I.
Moreira, Davyson de Lima. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. 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
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Ygor Jessé Ramos

**Estudos Quimiofenético e Farmacognóstico de *Piper gaudichaudianum*
Kunth e *Piper multinodum* C. DC. (Piperaceae)**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de Concentração: Plantas medicinais e metabolismo secundário

Aprovado em 17 de dezembro de 2021.

Orientador:

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira
Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Geórgia Pacheco Peters de Almeida
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Selma Ribeiro Paiva
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Renato Crespo Pereira
Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Luciana Moreira Chedier
Universidade Federal de Juiz de Fora

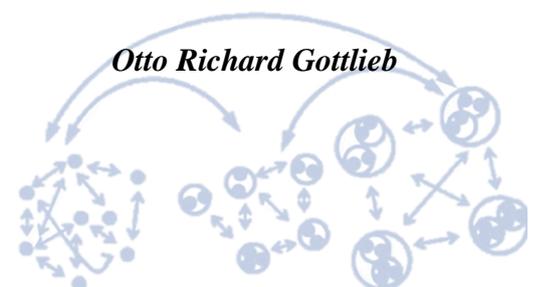
Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira
Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

Vida!

Para nós, vida é resultante da sincronização de complexos de redes engrenadas. Assim, substâncias operam engrenadas entre si formando redes metabólicas que funcionam sincronizadas dentro dos organismos. Por sua vez, cada organismo também não existe independentemente, e integrado com outros organismos formam redes morfológicas dentro dos biomas e estes, por sua vez, operam engrenados originando redes biogeográficas (ecológicas). Até mesmo bioatividade (função) pode ser incorporada a esse complexo. VIDA É QUÍMICA!



AGRADECIMENTOS

Escrevo **sobre os ombros de tantas pessoas**, famosas e anônimas, que contribuíram diretamente para o desenvolvimento da ciência presente nesta Tese, em particular no campo da Química e da Biologia. Igualmente feito por Isaac Newton, esta obra é uma homenagem a quem ousou pensar diferente e entrar nos territórios desconhecidos e dinâmicos da natureza. Agradeço imensamente aos Professores Otto Richard Gottlieb e Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, bem como a todos os professores do ensino fundamental, médio e superior. *Sou quem sou, por conta de vocês!*

“Prepare o seu coração, pras coisas que eu vou contar, eu venho lá do sertão... venho lá do sertão...”. A minha comunidade de origem! Meu gosto pelas plantas nasce nesse lugar, que do tupi guarani é chamado “terra quente”. Tenho minha cidade no coração: Acupe de Santo Amaro da Purificação, Bahia.

Falamos em sonho e paixão! Penso logo em meus pais: A luta da vida difícil que tivemos, resume-se hoje em novas esperanças e aprendizados! Tenho a agradecer aos meus queridos pais, **Geovânia Borges Ramos e José Roque Souza dos Santos**, pelo amor e trabalho árduo de manter, sacrificar-se e gerenciar os sonhos de um filho. Obrigado pela vida!

Para aquela que potencializou meu desejo em ser “Doutor das Plantas”! Minha avó, **Wilma do Sacramento Borges**. Não tenho palavras para dizer o quanto foi importante a senhora ter me ensinado a Ciência do comportamento no mato e os segredos de como falar com as plantas. Dedico cada linha desta Tese a você também.

Caetano Veloso escreveu uma oração que diz: *“...compositor de destinos, tambor de todos os ritmos, tempo, tempo, tempo, tempo... por seres tão inventivo, e pareceres contínuo, tempo, tempo...”* Nesse logo período de vida juntos, eu avalio, orientador. Ao me receber como novo aluno, você me pediu tempo para fazer uma prova. Não sei como o tempo não me fez desistir de você. Eu acho que não estaria aqui, né?! Mas esse tempo foi fundamental para o meu amadurecimento e para compreender melhor as nossas escolhas. Com o tempo, fomos capazes de ver ritmos e conquistar espaços de compreensão que nem imaginava existir. Nessa nossa ciência, medimos e optamos por reconhecer os limites do tempo nas plantas. Por esse motivo, não deixe que as coisas que vêm com o tempo o desmotivem, certifique-se de olhar para a natureza com tantos detalhes. Nisso tudo, eu digo, ao meu querido orientador e professor **Dr. Davyson de Lima Moreira**, obrigado por existir, pelas alegrias e dedicação ao ensino. Pelas discussões nas madrugadas e pela empolgação. Sou eternamente grato. Devo minha formação em todo esse

tempo a você. Vamos observar a natureza e verificar as dinâmicas da vida em uma escala de tempo.

Para você, **Márcio Augusto**, meu agradecimento vem nas palavras de Castro Alves: *“O amor é um carpinteiro, que ri com ar de matreiro, cerrando forte e ligeiro, na tenda do coração... põe pregos de resistência, ferrolhos na consciência, tranca as portas da razão.”* Obrigado por tudo que você é na minha vida. Pela paciência e dedicação! Obrigado.

Alguns filósofos descrevem que a vida é feita de oportunidades. O homem que vai mais longe é quase sempre aquele que tem coragem de arriscar. As oportunidades são como o nascer do sol: se você esperar demais, vai perdê-las. Um homem esperto cria mais oportunidades do que encontra. Você ao acordar (do seu jeito!), leva oportunidade a todos ao seu redor e ensina a filosofia de (auto)oportuniza-se em diferentes ambientes. A **João Carlos** (meu pai carioca) muito obrigado pelo amor, acolhimento e dedicação. Devo a você tudo isso.

Aos meus familiares, minhas avós, meus irmãos, minhas tias, sobrinhos e primos. Obrigado por tudo.

“A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.” (Francis Bacon)

A professora Dra. **Anna Carina Antunes e Defaveri**, Obrigado, OBRIGADO e obrigado. Tenho você como meu SUL para como profissional e amiga. Não achei outra frase que conta tudo que sinto com seu carinho e dedicação.

No caminho de ser uma pessoa melhor, encontrei você. A Professora Dra. **Nina Claudia** obrigado por todo conhecimento, trocas e oportunidades. O destino é um tema curioso nesta tese chamada vida.

“A amizade... nem mesmo a força do tempo irá destruir... Somos verdade...Nem mesmo este samba de amor pode nos resumir.” A rainha **Claudete Oliveira**, pelas noites juntos e trabalho árduo. Você é tudo que pode resumir em uma pessoa boa. Um “HPLC” poderá separar muitas substâncias, mas não tem coluna e nem eluente com tanta força para nós dois! *“Quero continuar chorando do seu choro... quero sorrir seu sorriso... valeu por você existir amiga.”*

A **George Azevedo** tive a felicidade de conhecer você no mato e a vida nos fez fortalecer uma amizade tremenda. Obrigado por tudo.

Clarice Lispector no livro “A hora da estrela” escreve *“(...) e não esquecer que a estrutura do átomo não é vista mas sabe-se dela. Sei de muita coisa que não vi.”* Sobre essas muitas coisas

tenho vocês como estrutura: - **Irene Fonseca** pedra fundamental, quase filosofal!; - **Jéssica Salles Felisberto**, a biologia nos seus olhos é primorosa, obrigado por transformar meus dias com sua ajuda. – **João Gabriel-Gouveia**, inteligência e futuro dinamizam no seu olhar, obrigado por empreender e colaborar.

Meus meninos, **Leonardo Carvalho e Lorryayne Oliveira**. Sem vocês eu não sei como chegaria aqui. Obrigado.

As instituições

À **CAPES** pela bolsa. Nesse mar de incerteza econômica, você era meu porto seguro.

À **Farmanguinhos/FIOCRUZ**, especialmente a Plataforma Analítica pelo suporte para realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pelo acolhimento e carinho.

Aos **meus amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental**, obrigado.

Ao **Laboratório de Bioquímica e Produtos Naturais** do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, meu novo lar. Obrigado!

Ao **Centro de Responsabilidade Socioambiental do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** pela estrutura e apoio. Especialmente aos **Jovens, Julio, Mary, Ulisses, Verônica, Lu, Ruda, Magal e ao Rogério** (pelas noites não dormidas). Obrigado.

To Jodrell Science Laboratory, Royal Botanic Gardens Kew, and especially to **Dsc. Nicholas Sadgrove** for his dedication to readings, discussions on the view of chemophenetics.

A todos os meus, muito obrigado.

Fernando Pessoa descreve na poesia em “Passagem das horas” um trecho que diz:

**“Trago dentro do meu coração,
Como num cofre que se não pode fechar de cheio,
Todos os lugares onde estive,
Todos os portos a que cheguei,
Todas as paisagens que vi através de janelas ou vigias,
Ou de tombadilhos, sonhando,
E tudo isso, que é tanto, é pouco para o que eu quero.”**

RESUMO

RAMOS, Ygor Jessé. **Estudos Quimiofenético e Farmacognóstico de *Piper gaudichaudianum* Kunth e *Piper multinodum* C. DC. (Piperaceae)**. 2021. 283 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Piper gaudichaudianum Kunth e *Piper multinodum* C. DC. são espécies que apresentam padrão de distribuição espacial distintos, sendo aquela de uso medicinal e esta inédita dos pontos de vista químico e farmacológico. Essas espécies foram estudadas com a finalidade de se avaliar como a plasticidade fenotípica química se apresenta e como essa é influenciada pelos fatores espaciais (áreas de distribuição e órgãos vegetativos diferentes) e temporais (ritmo circadiano e sazonalidade), bem como essas alterações podem influenciar nas atividades biológicas. Para entender essa complexa trama biológica, foram realizadas coletas, cultivos, aplicação de técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos, além das atividades antimicrobiana e antifúngica. Foram realizadas avaliações dos padrões quimiofenéticos a partir da composição química dos óleos essenciais (OEs) de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum*. Foi desenvolvida e testada conceitualmente uma metodologia preditiva para avaliação quantitativa da oxidação-redução de misturas complexas de substâncias pelos inéditos Nível de Oxirredução Ponderado (N_{OR}) e Índice Ecológico de Oxirredução (IE_{OR}) (Índice Geral de Oxirredução para Mistura - GM_{OR} , ou índice de Ramos & Moreira), desenvolvidos nesta Tese. Os OEs de *P. gaudichaudianum* apresentaram nas folhas as substâncias majoritárias biclogermacreno, *E*-cariofileno, eudesmadieno, *E*-nerolidol, α -cadinol e espatulenol. As análises quimiométricas e as correlações realizadas permitiram evidenciar que houve alterações na composição química em diferentes estágios fenológicos e, mais evidentemente, entre os dias e as noites do que entre os períodos seco e chuvoso. Determinou-se a existência de nove possíveis quimiotipos para *P. gaudichaudianum*. As análises de N_{OR} e IE_{OR} evidenciaram que existe um direcionamento para um possível equilíbrio redox ao longo do dia para noite. Foi possível demonstrar que a diversificação em número de substâncias por esqueleto de carbonos nos OEs é acompanhada pelo aumento do nível de oxidação ponderada das substâncias. Ainda, registrou-se por análises quimiométricas que as composições voláteis não variaram sob condição de cultivo controlado. Para *P. multinodum* foi possível, pela primeira vez, caracterizar a composição química do OE, e demonstrar diferenças químicas significativas e biossintéticas entre os diferentes órgãos. As partes aéreas (folhas, galhos, inflo- e infrutescência) registraram, majoritariamente, α -pineno e uma predominância dos metabólitos das vias mevalonato ou metileritrose fosfato; e as partes menos aéreas (caules e raízes) exibiram em maior teor percentual *E*-metil-isoeugenol e euasarona, com predominância de substâncias da via do chiquimato. Essas variações de composição química foram importantes para determinação da atividade biológica, pois amostras contendo arilpropanoides demonstraram maior inibição de crescimento bacteriano. Análise dos resultados do IE_{OR} possibilitou inferir sobre um gradiente oxidativo em *P. multinodum*, sendo as misturas mais oxidadas presentes nas folhas e as mais reduzidas nas raízes. Nas variações sazonais e circadiana determinou-se o α -pineno (15 – 60%) como componente majoritário. Foi possível evidenciar para *P. multinodum* que as variações químicas presentes nos OEs estão associadas aos fatores abióticos e a fenologia, bem como associar essas variações químicas à atividade contra *Candida glabrata* resistente fluconazol. Com base em todos os resultados obtidos, descrevemos pela primeira vez a alta plasticidade fenotípica química apresentada em diferentes escalas temporal e espacial e suas implicações para quimiofenética, quimiosistemática e ecologia em duas espécies de Piperaceae que servem de base para estudos futuros com outras espécies dessa família.

Palavras-chave: Substâncias voláteis. Sazonalidade. Polimorfismo químico. Plasticidade fenotípica. Quimiodiversidade. Bioatividade.

ABSTRACT

RAMOS, Ygor Jessé. **Chemophenetic and pharmacognostic studies of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *Piper multinodum* C. DC. (Piperaceae)**. 2021. 283 f. Thesis (PhD in Plant Biology) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Piper gaudichaudianum Kunth and *Piper multinodum* C. DC. are species that show distinct spatial distribution patterns, being the former medicinal and the latter new from the chemical and pharmacological points of view. These species were studied with the purpose of evaluating how the chemical phenotypic plasticity is presented and how it is influenced by spatial (distribution areas and different vegetative organs) and temporal (circadian rhythm and seasonality) factors, as well as how these alterations may influence the biological activities. To understand this complex biological issues, collections, cultivations, application of chromatographic techniques and spectrometric methods, as well as antimicrobial and antifungal activities were performed. Evaluations of chemophenetic patterns from the chemical composition of essential oils (EOs) of *P. gaudichaudianum* and *P. multinodum* were carried out. A predictive methodology was developed and conceptually tested for quantitative evaluation of the oxidation-reduction of complex mixtures of compounds by the unpublished Weighted Average Redox standard (S_{RO}) and Ecological Oxirreduction Index (EI_{RO}) (General Mixture Redox Index - GM_{RO} , or Ramos & Moreira index), developed in this Thesis. The EOs of *P. gaudichaudianum* presented in the leaves the majority compounds bicyclogermacrene, *E*-caryophyllene, eudesmadiene, *E*-nerolidol, α -cadinol and spatulenol. The performed chemometric analyses and the correlations allowed evidencing that there were changes in the chemical composition in different phenological stages and, more evidently, between days and nights than between the dry and rainy periods. The existence of nine possible chemotypes for *P. gaudichaudianum* was determined. The analyses of S_{RO} and EI_{RO} showed that there is a direction for a possible redox balance from day to night. It was possible to demonstrate that the diversification in number of compounds by carbon skeleton in the EOs is followed by the increase of the level of oxidation weighted of the compounds. Furthermore, it was recorded by chemometric analyses that the volatile compositions did not vary under controlled cultivation condition. Considering *P. multinodum*, it was possible for the first time to characterize the chemical composition of the EO, and to demonstrate significant chemical and biosynthetic differences among the different organs. Aerial parts (leaves, branches, inflo- and infructescences) recorded mostly α -pinene and a predominance of metabolites from the mevalonate or methylerythrose phosphate pathways; and the non-aerial parts (stems and roots) showed higher percentage of *E*-methyl-iso Eugenol and eusarone, with a predominance of compounds from the shikimate pathway. These chemical composition variations were important for determination of the biological activity, because samples containing arylpropanoids showed higher inhibition of bacterial growth. Analysis of the results of EI_{RO} made possible to infer about an oxidative gradient in *P. multinodum*, being the most oxidized mixtures present in the leaves and the most reduced ones in the roots. In seasonal and circadian variations, α -pinene (15-60%) was determined as the major component. It was possible to evidence for *P. multinodum* that the chemical variations in the EOs are associated to abiotic factors and phenology, as well as to associate these chemical variations to the activity against fluconazole resistant *Candida glabrata*. Based on all the results obtained, we describe for the first time the high chemical phenotypic plasticity presented in different temporal and spatial scales and its implications for chemophenetics, chemosystematics and ecology in two Piperaceae species that may be used for future studies with other species of this family.

Keywords: Volatile compound. Seasonality. Chemical polymorphism. Phenotypic plasticity. Chemodiversity. Bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Níveis de manifestações do genótipo	30
Figura 2 –	Conceitos básicos de evolução micromolecular.....	33
Figura 3 –	Expressão de metabólitos especiais nos principais pontos de ramificação da filogenia vegetal.....	35
Figura 4 –	Principais fatores que podem afetar a diversidade química de espécies vegetais.....	38
Figura 5 –	Índices de avaliação, tipos de definições químicas e modos de variação espacial e temporal que afetam a seleção natural na quimiodiversidade de plantas em diferentes níveis.....	43
Figura 6 –	Reflexões do funcionamento das interações químicas da vida no status quo (A) em comparação com os dados obtidos da análise do ponto de vista da Quimiosistemática (B) e da Quimiofenética (C).....	47
Figura 7 –	Estruturas de micromoléculas bioativas obtidas a partir de espécies vegetais, como protótipos (1 – 6) e na produção de medicamentos (7 – 9)	51
Figura 8 –	Distribuição de Piperaceae no mundo.....	56
Figura 9 –	Interações ecológicas planta-animal observada em <i>Piper</i> L.....	57
Figura 10 –	Estruturas de micromoléculas bioativas obtidas a partir de espécies do gênero <i>Piper</i> contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	59
Figura 11 –	Fotomicrografia de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth, com detalhe das inflorescências.....	62
Figura 12 –	Fotomicrografia de <i>Piper multinodum</i> C.DC.....	65
Figura 13 –	Fluxograma de atividades desenvolvidas para elaboração dessa Tese....	70
Figura 14 –	Média mensal e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) das cidades de Teresópolis e Rio de Janeiro no período de 1961-1990.....	72
Figura 15 –	Esquema para o preparo das estacas e cultivo de <i>Piper gaudichaudianum</i>	75

Figura 16 –	Exemplo de cálculo de passos oxidativos (PO) a partir da conversão do limoneno para óxido de <i>trans</i> -piperitona ou mentofurano.....	83
Figura 17 –	Exemplo de cálculo de Nível Ponderado de Oxi-redução (NOR) para o β -eudesmol em uma concentração teórica em óleo essencial.....	85
Figura 18 –	Esquema com abordagem realizada nas matrizes com conjuntos de dados de <i>Piper gaudichaudianum</i> e <i>Piper multinodum</i>	88
Figura 19 –	Substâncias majoritárias identificadas nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre: biciclogermacreno (1), E-cariofileno (2), eudesmadieno (3), E-nerolidol (4) e espatulenol (5).	91
Figura 20 –	Médias mensais e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade do Rio de Janeiro/RJ, no período de janeiro 2017 a janeiro de 2018.....	96
Figura 21 –	Comparações das variações dos rendimentos (%) de óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C), no período de janeiro a dezembro de 2017.....	97
Figura 22 –	Variações das classes químicas de óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre no período de janeiro a dezembro de 2017...	99
Figura 23 –	Comparação das variações dos componentes majoritários nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm) e umidade (%), no período de janeiro a dezembro de 2017.....	100
Figura 24 –	Análises de <i>box plot</i> dos componentes majoritários dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> durante janeiro a dezembro de 2017.	101
Figura 25 –	<i>Biplot</i> (ACP) resultante da análise da composição dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre, coletadas de janeiro a dezembro de 2017.....	104
Figura 26 –	Dendrograma representando a relação de similaridade da composição dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre, coletada de janeiro a dezembro de 2017.....	104

Figura 27 –	Médias mensais, diagrama ombrotérmico e médias das coletas das 24h (3 em 3 h) correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%), radiação global (kJ/m ²) e temperatura média (°C) da cidade do Rio de Janeiro/RJ, no período de janeiro 2017 a janeiro de 2018 e nas quinzenas do mês de março e outubro de 2017.....	112
Figura 28 –	Rendimentos dos óleos essenciais (%) obtidos das coletas de três em três horas, comparando suas variações e distribuição diária no ciclo circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais umidade (%) e temperatura média (°C) no acesso do Rio de Janeiro/RJ, nos meses de março e outubro de 2017.	114
Figura 29 –	Distribuições das variações das classes químicas de óleos essenciais de folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre coletadas em março e outubro de 2017, durante 24 h, em intervalos de 3 em 3 h.....	116
Figura 30 –	Comparação das variações dos componentes majoritários de óleos essenciais do ciclo circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais temperatura (°C) e umidade (%) de março de 2017 (chuvoso).....	117
Figura 31 –	Comparação das variações dos componentes majoritários de óleos essenciais do ciclo circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais temperatura (°C) e umidade (%) de outubro de 2017 (seca).....	118
Figura 32 –	Análises de <i>box plot</i> das substâncias majoritárias presentes no óleo essencial das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações chuvosa (março) e seca (outubro).	120
Figura 33 –	<i>Biplot</i> (ACP) resultante da análise da composição dos óleos de folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> durante os períodos chuvoso (C, março) e seco (S, outubro), das 12h às 00h.	122

Figura 34 – Dendrograma representando a relação de similaridade da composição dos óleos das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> durante as estações chuvosa (C, março) e seca (S, setembro), das 12h às 00h.....	123
Figura 35 – Análise de <i>box plot</i> das principais substâncias (%) presentes no óleo essencial das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> no estudo do ritmo circadiano dos dias (9h às 18h) e noturnos (21h às 6h), independentes das estações chuvosa e seca.	124
Figura 36 – Mapa biossintético de tipos de esqueleto de carbonos terpênicos presentes em óleos essenciais dos estudos sazonal e circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre.....	127
Figura 37 – Mapa biossintético de tipos de esqueleto de carbonos terpênicos, com base na análise de óleos essenciais foliares do estudo circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i>	128
Figura 38 – Estruturas dos derivados terpênicos (monoterpenoides e sesquiterpenos) e hidrocarbonetos não terpênicos identificados nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre com seus respectivos números de oxidação (N _{ox}) e os valores dos passos de oxidação (PO) dos precursores químicos do tipo de terpeno.	136
Figura 39 – Proposta de biossíntese da formação de monoterpenos presentes nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.....	142
Figura 40 – Proposta de biossíntese da formação de sesquiterpenos (germacrano, cariofileno, amorfano, elemmano e bourbonano) presentes nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.	143
Figura 41 – Proposta de biossíntese da formação de sesquiterpenos (cadinano e copaano) presentes nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.	144

Figura 42 –	Proposta de biossíntese da formação de sesquiterpenos (eudesmano, eremofilano, biciclogermacrano e aromadandrano) presentes nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.	145
Figura 43 –	Comparações das variações do Índice Ecológico de Oxi-redução (IE _{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira obtido a partir da composição de óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2017.....	147
Figura 44 –	Representação do gráfico de radar do Índice Ecológico de Oxi-redução (IE _{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira obtido para o óleo essencial das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações de março (chuvoso) e outubro (seco)	148
Figura 45 –	Correlação entre número das substâncias para esqueleto de carbono e níveis de oxi-redução ponderada (NOR) para esqueleto de carbono obtido do óleo essencial de folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre nos estudos de ritmo sazonal e circadiano.....	149
Figura 46 –	<i>Triplot</i> (ACP) resultante da análise da composição de 60 óleos essenciais das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> obtida neste estudo e de dados da literatura.....	151
Figura 47 –	Dendrograma representando a relação de similaridade da composição de 60 óleos essenciais de folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> obtidos neste estudo e da literatura.....	152
Figura 48 –	Estruturas químicas das substâncias que definem os quimiotipos de óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre.....	153
Figura 49 –	Distribuição espacial dos quimiotipos de <i>Piper gaudichaudianum</i> no Brasil.....	155
Figura 50 –	Mapa biossintético dos tipos de esqueleto terpênico com base nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> deste estudo e de banco de dados da literatura (Brasil)	156

Figura 51 –	Diagrama de Venn feito a partir dos constituintes do óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i> selvagem e cultivada.....	158
Figura 52 –	Substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> : α – pineno (1), mirceno (2), terpinen-4-ol (3), E-cariofileno (4), α -copaeno (5), germacreno D (6), E-metil-isoeugenol (7), euasarona (8), asaricina (9), miristicina (10), dilapiol (11) e apiol (12).....	163
Figura 53 –	Espectro de massas obtido por CG-EM (A) e proposta de fragmentação para E-metil-isoeugenol (B).	164
Figura 54 –	Espectro de massas obtido por CG-EM (A) e proposta de fragmentação da euasarona (B)	164
Figura 55 –	Gráfico <i>Biplot</i> (ACP) resultante da análise da composição dos óleos essenciais de diferentes partes vegetativas de <i>Piper multinodum</i>	168
Figura 56 –	Dendrograma representando a relação de similaridade da composição dos óleos essenciais de diferentes órgãos de <i>Piper multinodum</i>	168
Figura 57 –	Gráfico <i>Biplot</i> (ACP) resultante da análise dos esqueletos de carbono obtidos a partir dos constituintes dos óleos essenciais de diferentes partes de <i>Piper multinodum</i>	170
Figura 58 –	Dendrograma representando a relação de similaridade dos esqueletos de carbono obtidos a partir dos constituintes dos óleos essenciais de diferentes partes de <i>Piper multinodum</i>	170
Figura 59 –	Médias mensais e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade do Teresópolis/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2019.....	176
Figura 60 –	Diagrama de ordenação produzido pela análise de correspondência canônica relacionando a composição dos óleos essenciais e as variáveis ambientais do estudo sazonal de <i>Piper multinodum</i>	179
Figura 61 –	Comparações das variações dos rendimentos (%) de óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> silvestre e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C), no período de janeiro a dezembro de 2019.	180

Figura 62 –	Variações das classes químicas de óleos essenciais de <i>Piper multidonum</i> silvestre no período de janeiro a dezembro de 2019.....	181
Figura 63 –	Comparação das variações dos componentes majoritários nos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm) e umidade (%), no período de janeiro a dezembro de 2019.	183
Figura 64 –	Dendrograma e gráfico de <i>two-way joining</i> de 12 amostras de óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> silvestre, de janeiro de 2019 a dezembro 2019, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.....	184
Figura 65 –	Gráfico <i>Biplot</i> (ACP) resultante da análise da composição dos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> silvestre, coletadas de janeiro a dezembro de 2019.....	185
Figura 66 –	Médias mensais e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade do Teresópolis/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2020 e janeiro a agosto 2021.....	197
Figura 67 –	Rendimentos dos óleos essenciais (%) obtidos das coletas de três em três horas, comparando suas variações e distribuição diária no ciclo circadiano de <i>Piper multinodum</i> nos meses de fevereiro e outubro de 2017.....	198
Figura 68 –	Distribuições das variações das classes químicas de óleos essenciais de folhas de <i>Piper multinodum</i> silvestre coletadas em fevereiro de 2020 e junho de 2021, durante 24 h, em intervalos de 3 em 3 h.....	200
Figura 69 –	Comparação das variações dos componentes majoritários de óleos essenciais do ciclo circadiano de <i>Piper multinodum</i> com à normal climatológica dos fatores ambientais temperatura (°C) e umidade (%) de fevereiro de 2020 e julho de 2021.....	202
Figura 70 –	Análises de <i>box plot</i> de α -pineno presente no óleo essencial das folhas de <i>Piper multinodum</i> silvestre no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações chuvosa (março) e seca (outubro).....	203

Figura 71 –	Dendrograma das 16 amostras de óleos essenciais do ciclo circadiano de <i>Piper multinodum</i> (PM) nos meses de fevereiro na estação chuvosa (C) e julho de 2021 na estação seca (S), de três em três horas de um dia, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.....	204
Figura 72 –	Gráfico <i>score</i> de 16 amostras de óleos essenciais do ciclo circadiano de <i>Piper multinodum</i> (PM) nos meses de fevereiro na estação chuvosa (C) e julho de 2021 na estação seca (S), de três em três horas de um dia, baseado em análise de componente principal.....	205
Figura 73 –	Mapa biossintético de tipos de esqueleto de carbonos terpênicos presentes em óleos essenciais dos estudos sazonal e circadiano de <i>Piper multinodum</i>	209
Figura 74 –	Comparações das variações do Índice Ecológico de Oxi-redução (IE _{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira obtido a partir da composição de óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) no período de janeiro a dezembro de 2019.....	214
Figura 75 –	Representação do gráfico de radar do Índice Ecológico de Oxi-redução (IE _{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira obtido do óleo essencial das folhas de <i>Piper multinodum</i> no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações de chuvosa (fevereiro) e seca (julho).....	215
Figura 76 –	Inibição do crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ Rv após tratamento com os óleos essenciais de diferentes órgãos de <i>Piper multinodum</i>	216
Figura 77 –	Relação biossintética entre arilpropanoides em <i>Piper multinodum</i> do metabolismo especializados e sua diferenciação nas diferentes partes vegetativas analisadas.....	231

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Piper</i> promissoras contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	58
Tabela 2 –	Descrição de localização e número de registro de herbários de <i>Piper gaudichaudianum</i> (PG) e <i>Piper multinodum</i> (PM) no Estado do Rio de Janeiro.....	71
Tabela 3 –	Atributos do solo de cinco áreas de ocorrência de <i>Piper gaudichaudianum</i> (PG) e <i>Piper multinodum</i> (PM) no Estado do Rio de Janeiro e do substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças [®] utilizado para o cultivo das espécies em casa de vegetação.....	73
Tabela 4 –	Tipos de estudos por coletas de amostras obtidas de <i>Piper gaudichaudianum</i> (PG) e <i>Piper multinodum</i> (PM) em diferentes acessos no Estado do Rio de Janeiro.....	78
Tabela 5 –	Exemplo do cálculo do Número de Oxidação (Nox) do linalol, segundo regras de Cram-Hendrickson-Hammond.....	82
Tabela 6 –	Constituição química, rendimentos (%), esqueleto de carbonos (esqueleto–C) e Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais de folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth silvestre, dos meses de janeiro de 2017 a dezembro de 2017.....	92
Tabela 7 –	Análise da correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre.....	98
Tabela 8 –	Análise de correlação de Pearson entre as substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre do acesso de Rio de Janeiro/ RJ (PMR).....	102
Tabela 9 –	Constituição química, Rendimento (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> no ciclo circadiano (março de 2017).....	106
Tabela 10 –	Constituição química, Rendimentos (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas no ciclo circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i> (outubro de 2017).....	109
Tabela 11 –	Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos (%), substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais do ciclo circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre do acesso de Rio de Janeiro/RJ (PMR), nos meses de março e de outubro de 2017.....	115
Tabela 12 –	Correlação simples entre os constituintes principais da estação chuvosa (março) de óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre.....	119

Tabela 13 –	Correlação simples entre os constituintes principais da estação seca (março) de óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre.....	119
Tabela 14 –	Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbonos dos componentes do óleo essencial de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre no estudo sazonal durante 12 meses (janeiro a dezembro de 2017).....	130
Tabela 15 –	Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbono dos componentes do óleo essencial das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre no estudo circadiano, durante as estações chuvosa (C, março) e seca (S, outubro), das 12h às 00h.....	131
Tabela 16 –	Correlação simples entre os fatores ambientais e os esqueletos de carbono presentes nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre do estudo sazonal.....	132
Tabela 17 –	Correlação simples entre os fatores ambientais e os esqueletos de carbono presentes nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre obtidos da estação chuvosa (março) do estudo circadiano.....	133
Tabela 18 –	Correlação simples entre os fatores ambientais e os esqueletos de carbono presentes nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre obtidos da estação seca (outubro) do estudo circadiano.....	134
Tabela 19 –	Análise da correlação de Pearson entre variáveis ambientais e os valores obtidos dos Índice Ecológicos de Oxi-redução do estudo sazonal (anual) e estudo circadiano (março e outubro) de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre.....	147
Tabela 20 –	Constituição química e rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre e em cultivo de primeira e segunda gerações.....	159
Tabela 21 –	Constituição química, esqueleto de carbono, rendimentos e índice ecológico de oxi-redução dos óleos essenciais de diferentes órgãos de <i>Piper multinodum</i> C.DC.....	165
Tabela 22 –	Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbono dos componentes do óleo essencial dos diferentes órgãos de <i>Piper multinodum</i>	169
Tabela 23 –	Constituição química, rendimentos (%), esqueleto de carbonos (esqueleto–C) e Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais de folhas de <i>Piper multinodum</i> C.DC. silvestre nos meses de janeiro a dezembro de 2019.....	172
Tabela 24 –	Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de <i>Piper multidonum</i>	177
Tabela 25 –	Constituição química, Rendimento (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas de <i>Piper multidonum</i> no ciclo circadiano (fevereiro de 2020).....	187

Tabela 26 –	Constituição química, Rendimento (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas de <i>Piper multidonum</i> no ciclo circadiano (julho de 2021).....	191
Tabela 27 –	Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais do ciclo circadiano de <i>Piper multinodum</i> do acesso de Rio de Janeiro/RJ (PMR), no mês de fevereiro de 2020 e julho de 2021.....	191
Tabela 28 –	Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbonos dos componentes do óleo essencial de <i>Piper multinodum</i> silvestre no estudo sazonal durante 12 meses (janeiro a dezembro de 2019).....	210
Tabela 29 –	Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbono dos componentes do óleo essencial das folhas de <i>Piper multinodum</i> silvestre no estudo circadiano, durante as estações chuvosa (C, março) e seca (S, outubro), das 12h às 00h.....	211
Tabela 30 –	Análise da correlação de Pearson entre variáveis ambientais e os valores obtidos dos Índice Ecológicos de Oxi-redução (IEOR) ou Índice de Ramos & Moreira do estudo sazonal (anual) e estudo circadiano (fevereiro de 2020 e julho de 2021) de <i>Piper multinodum</i>	214
Tabela 31 –	Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ Rv de óleos essenciais de diferentes partes vegetativas de <i>Piper multinodum</i>	216
Tabela 32 –	Análise de correlação de Pearson entre as substâncias majoritárias, classes químicas e esqueleto de carbono dos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> com inibição do crescimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H ₃₇ Rv.....	217
Tabela 33 –	Atividade dos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> do estudo sazonal contra isolado <i>Candida glabrata</i> resistente (ATCC 2001D-5).....	218
Tabela 34 –	Análise de correlação de Pearson entre as substâncias majoritárias, classes químicas e esqueleto de carbono dos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i> contra isolado <i>Candida glabrata</i> resistente (ATCC 2001D-5).....	218

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAH	Análise de Agrupamento Hierárquico
Abr	Abril
ACC	Análise de Correspondência Canônica
ACP	Análise de Componente Principal
Ago	Agosto
Al	Alumínio
Am	Clima Tropical de Monção
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
Axis 1	Eixo 1 do Agrupamento de Componente Principal
Axis 2	Eixo 2 do Agrupamento de Componente Principal
C	Carbono
Ca	Cálcio
CG	Cromatografia com Fase Gasosa
CG-DIC	Cromatografia com Fase Gasosa Acoplada a Detector de Ionização por Chamas
CG-EM	Cromatografia com Fase Gasosa Acoplado à Espectrometria de Massa
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Ctb	Clima Oceânico Temperado
Cu	Cobre
Dez	Dezembro
DMF	Dimetilformamida
DNO	Diterpenos Não Oxigenado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Diterpenos Oxigenados
DP	Desvio Padrão
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Fe	Ferro
Fev	Fevereiro
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FPP	Pirofosfato de Farnesila
GA-3P	Gliceraldeído 3- Fosfato
GGPP	Pirofosfato de Geranilgeranila

GM _{OR}	Índice Geral de Oxirredução para Mistura
GPP	Pirofosfato de Geranila
HD	Hidrodestilação
HRJ	Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
ICM	Inibição do Crescimento Micobacteriano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE _{OR}	Índice Ecológico de Oxirredução
INMT	Instituto Nacional de Meteorologia
Inv	Inverno
IPP	Pirofosfato de Isopentenila
IR	Índice de Retenção
IR _{calc}	Índice de Retenção Calculado
IR _{lit}	Índice de Retenção da Literatura
ISO	International Organization for Standardization
K	Potássio
LPP	Pirofosfato de Linalila
Mg	Manganésio
MVA	Acetato – Mevalonato
MEP	Metileritritol Fosfato
Mn	Manganês
MNO	Monoterpenos Não Oxigenados
MO	Monoterpenos Oxigenados
MTT	Sal de Tetrazol 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol
N	Nitrogênio
Na	Sódio
N _{OR}	Número de Oxidação Ponderada
N _{OX}	Número de Oxidação
O	Oeste
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
Out	Outono
P	Fósforo
PBS	Tampão fosfato salino
PC1	Primeiro Componente Principal
PC2	Segundo Componente Principal
PC2	Terceiro Componente Principal
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
P(mm)	Precipitação
PO	Passos Oxidativos
Prim	Primavera
Q%	Valor de Quantificação da Substância
RB	Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro

RJ	Estado do Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
S	Sul
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Set	Setembro
SNO	Sesquiterpenos não oxigenados
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SO	Sesquiterpenos Oxigenados
T(°C)	Temperatura
tr	Traço
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i> (Método de Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética)
UTO	Unidade Taxonômica Operacional
UV	Ultravioleta
V-S	Valor S
V-T	Valor T
V-V	Valor V
Ver	Verão
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
<	Menor que
°C	Grau Celsius
±	Mais ou Menos
cm	Centímetros
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
eV	Elétron-volt
cmolc.dm ⁻³	Centimol de Carga por Decimetro Cúbico
dag.g ⁻¹	Decagrama por grama
g	Gramas
h	Horas
L	Litro
kJ/m ²	Quilojoules por Metro Quadrado
m	Metro
m(%)	Porcentagem de Saturação por Alumínio
mg	Miligramas
mg.g ⁻¹	Miligramas por Gramas
mg.kg ⁻¹	Miligramas por Quilogramas
mg.L ⁻¹	Miligramas por Litro
ml.min ⁻¹	Mililitro por Minuto
min	Minutos
mm	Milímetro
m/z	Razão Carga-Massa
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
ppm	Parte por Milhão
p/v	Peso/Volume
r ²	Coefficiente de Linearidade
μ l	Microlitro
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	28
1.	REVISÃO DA LITERATURA	30
1.1	Os metabólitos especiais e as modulações metabólicas	30
1.2	Diversificação micromolecular e a plasticidade fenotípica química	31
1.3	Padrões e avaliação da quimiodiversidade	41
1.4	Quimiosistemática versus Quimofenética? – Entre o hirto e a cinesia micromolecular	44
1.5	A importância das análises farmacognósticas	49
1.6	Piperaceae Giseke	53
1.6.1	<u>Diversidade química e atividade biológica no gênero <i>Piper</i> L.</u>	55
1.6.1.1	Atividade antimicobacteriana em <i>Piper</i>	57
1.6.1.2	Atividade antifúngica em <i>Piper</i>	59
1.6.2	<u><i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth</u>	61
1.6.3	<u><i>Piper multinodum</i> C. DC.</u>	64
2	OBJETIVOS	67
2.1	Objetivo Geral	67
2.2	Objetivos Específicos	67
3	MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1	Identificação das espécies e áreas de coletas	69
3.1.2	<u>Análises da composição do solo e dados climáticos</u>	71
3.2	<u>Estabelecimento do cultivo em casa de vegetação</u>	74
3.3	Materiais coletados e colhidos	75
3.3.1	<u>Estudo da variação do perfil químico micromolecular</u>	75
3.3.2	<u>Estudo da variação sazonal</u>	75
3.3.3	<u>Estudo de variações sob a influência de ritmo circadiano</u>	76
3.4	Ações de Transformações Preliminares	76
3.4.1	<u>Materiais frescos</u>	77
3.5	Ações de Transformações Principais - Obtenções de óleos essenciais	77
3.5.1	<u>Hidrodestilação</u>	77
3.5.2	<u>Cálculo de rendimentos e hidrolatos</u>	78
3.6	Caracterização química de óleos essenciais	79

3.7	Atividade Antimicobacteriana	80
3.7.1	<u>Cultivo das micobactérias</u>	80
3.7.2	<u>Ensaio de Inibição do crescimento do <i>Mycobacterium tuberculosis</i></u>	80
3.8	Atividade Antifúngica	81
3.9	Desenvolvimento de abordagem Quimiofenética a partir dos óleos essenciais	82
3.9.1	<u>Número de oxidação (N_{OX})</u>	82
3.9.2	<u>Passos Oxidativo (PO)</u>	83
3.9.3	<u>Nível Ponderado de Oxi-redução (N_{OR})</u>	84
3.9.4	<u>Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR}) ou Índice Geral Redox de Mistura (GM_{OR})</u>	85
3.9.5	<u>Quimiotificação dos Óleos Essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i></u>	86
3.10	Processamentos de Dados	86
3.10.1	<u>Abordagem descritiva dos dados</u>	87
3.10.2	<u>Abordagem sobre a variação</u>	87
3.10.3	<u>Abordagem de correlações</u>	89
3.10.4	<u>Abordagem multivariada</u>	89
4	RESULTADOS	91
4.1	Composição química e rendimentos dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth silvestre e cultivada em casa de vegetação	91
4.1.1	<u>Composição química dos óleos essenciais do estudo sazonal de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre</u>	91
4.1.2	<u>Composição química dos óleos essenciais do estudo circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre</u>	105
4.2	Padrões quimiofenético, quimiodiversidade e quimiogeográficos dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i>	125
4.2.1	<u>Aspectos quimiofenéticos a partir dos esqueletos de carbono nos estudos sazonal e circadiano de <i>Piper gaudichaudianum</i></u>	126
4.2.2	<u>Impacto oxi-redutor em diferentes escalas temporais nos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i></u>	135
4.2.3	<u>Aspectos de quimiodiversidade e quimiogeográfico em <i>Piper</i></u>	

	<i>gaudichaudianum</i> silvestre.....	150
4.3	Composição química dos óleos essenciais de <i>Piper gaudichaudianum</i> silvestre e cultivada	157
4.4	Composição química e rendimentos dos óleos essenciais e voláteis de <i>Piper multinodum</i> C.DC. silvestre	162
4.4.1	<u>Composição química dos diferentes órgãos de <i>Piper multinodum</i></u>	162
4.4.1.1	Variação Quimiofenética espacial em <i>Piper multinodum</i>	167
4.4.2	<u>Composição química dos óleos essenciais do estudo sazonal de <i>Piper multinodum</i> silvestre</u>	171
4.4.3	<u>Composição química dos óleos essenciais do estudo circadiano de <i>Piper multinodum</i> silvestre</u>	186
4.4.4	<u>Tendências Quimiofenéticas e de quimiodiversidade temporais dos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i></u>	206
4.4.4.1	Aspectos Quimiofenéticos a partir dos esqueletos de carbono nos estudos sazonal e circadiano de <i>Piper multinodum</i>	206
4.4.4.2	Impacto oxi-redutor em diferentes escalas temporais nos óleos essenciais de <i>Piper multinodum</i>	213
4.5	Atividades biológicas dos óleos essenciais	216
4.5.1	<u>Atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dos óleos essenciais de diferentes partes vegetativas</u>	216
4.5.2	<u>Atividades antifúngicas dos óleos essenciais do estudo sazonal</u>	217
5	DISCUSSÃO	219
	CONCLUSÃO	241
	REFERÊNCIAS	243
	APÊNDICE A –Dados da literatura da composição química dos óleos essenciais e seus respectivos esqueletos de carbono de <i>Piper gaudichaudianum</i> usados para determinar as variações quimiofenética no Brasil.....	271
	APÊNDICE B - Artigos Publicados.....	281

INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um complexo de ecossistemas de grande importância que abriga uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil e do mundo, além de ser considerada Patrimônio Nacional pela Constituição da República Federativa do Brasil (Art. 225). Entretanto, é um dos biomas mais ameaçados do planeta, mesmo sendo apontado como um dos cinco mais importantes *hotspots* de biodiversidade. Devido ao alto grau de endemismo e acentuado nível de degradação dos seus habitats, diversos animais e plantas encontram-se sob risco de extinção (STEHMANN *et al.* 2009; VARJABEDIAN, 2010).

Na Mata Atlântica estão presentes 216 famílias de angiospermas, distribuídas em 2.066 gêneros e 15.548 espécies. Dentre elas, 289 espécies pertencem à família Piperaceae que inclui o gênero *Piper* L.. Esse gênero detém uma ampla diversidade química juntamente com suas aplicações biológicas. A busca por novos fármacos a partir da biodiversidade, principalmente para antifúngicos (candidíase) e doenças negligenciadas (tuberculose), ainda se apresenta como um desafio. Possivelmente, esse gênero poderá apresentar espécies cujos extratos, frações, óleos essenciais e/ou substâncias isoladas poderão auxiliar no tratamento dessas doenças (OMS, 2006; MOREIRA *et al.*, 2016; MACEDO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; GUIMARÃES, 2020b).

Atualmente, o modelo estratégico mais adequado para o isolamento e identificação de substâncias com potenciais terapêuticos é a partir de estudos farmacognósticos biomonitorados, que correlacionam o conhecimento da estrutura dos constituintes químicos de uma planta com substâncias com atividade biológica ou farmacológica, com ênfase nesta última, e não somente um foco centrado no isolamento e determinação estrutural, como na fitoquímica clássica (PINTO *et al.*, 2002). Associar análises em Quimiofenética aos estudos farmacognósticos poderá contribuir significativamente para essa busca, além de auxiliar na compreensão de padrões (tendências) de quimiodiversidade em Piperaceae, que é um assunto ainda pouco explorado.

Para o desenho dessa Tese buscou-se obter duas espécies com proximidades morfológicas que aduzissem padrões de comportamentos ecológicos e químicos diferentes, com base na hipótese núcleo-satélite (sabe-se que existe um padrão espacial de distribuição de indivíduos nos biomas) (HANSKI 1982; MEHRANVAR; JACKSON, 2001). Tem-se,

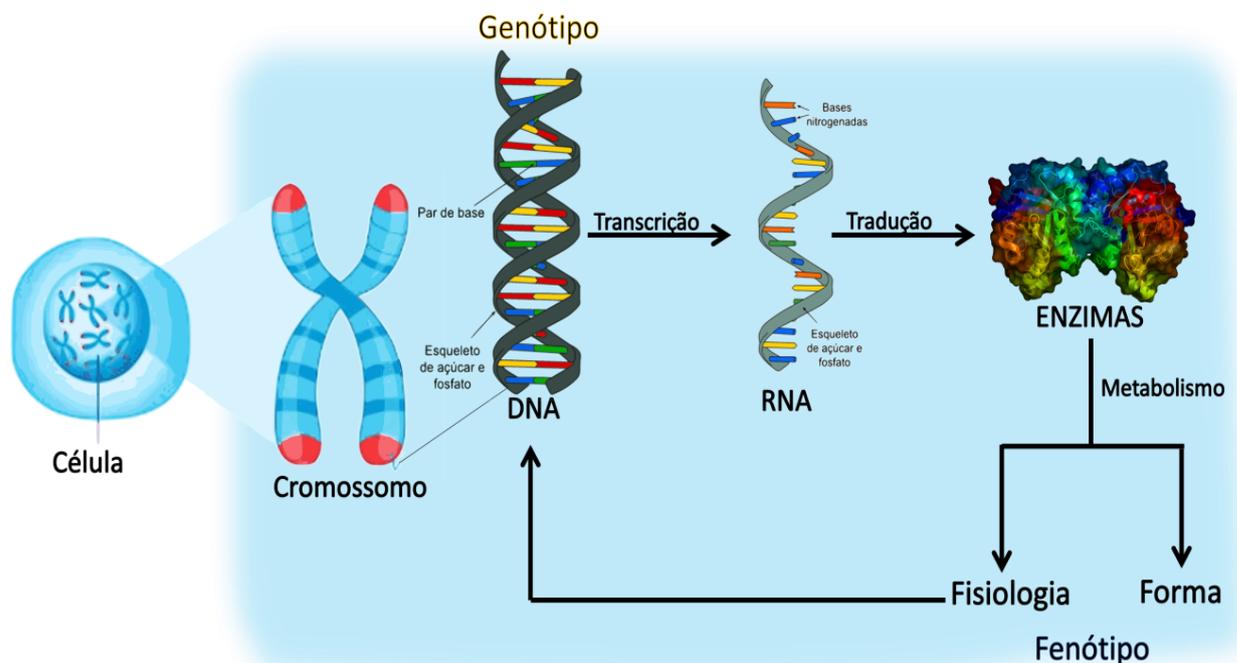
portanto, uma espécie com registro de uso medicinal secular denominada de *Piper gaudichaudianum* Kunth que possui comportamento nuclear (espécies cujos indivíduos são abundantes e amplamente distribuídos espacialmente) e uma espécie inédita dos pontos de vista químico/ farmacológico e com comportamento satélite (espécies cujos indivíduos são raros e/ou pouco distribuídos), denominada de *Piper multinodum* C. DC. Essas duas espécies foram estudadas com a finalidade de se avaliar como a plasticidade fenotípica química se apresenta, bem como essa é influenciada pelos **fatores espaciais** (áreas de distribuição e órgãos vegetais diferentes) e **temporais** (ritmo circadiano e sazonalidade), e qual ligação desses fatores com as atividades biológicas estudadas.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Os metabólitos especiais e as modulações metabólicas

Todas as definições existentes sobre a vida de um organismo envolvem a compreensão do funcionamento molecular. Mesmo os conceitos que aplicam as relações comunicativas como o principal fator de concepção, passando por algo abstrato e filosófico, baseiam-se na idéia de interações causadas por estímulos moleculares. Conceitos bioquímicos fornecem as bases para a vida, que é essencialmente estruturada a partir da idéia da existência de genes (genótipo) que definem trajetórias biossintéticas a partir de uma tradução por transcrições consecutivas de enzimas para a produção metabólica de macromoléculas e micromoléculas, que dão forma e movimento (fisiologia) a vida (Figura 1) (GOTTLIEB, 1992; 2012; PROSS, 2016; KAUFFMAN, 2020).

Figura 1– Níveis de manifestações do genótipo.



Fonte: adaptado de Gottlieb, 1992.

Os caminhos para expressões de formas e fisiologia levam à construção da magnitude da biodiversidade ou diversidade biológica. Esses envolvem diferentes níveis organizacionais, tais como biogeográfico (biomas), morfológico (organismos), metabólico (substâncias) e

funcional (bioatividades). Esses níveis se inter-relacionam de maneira direta e se adaptaram (especializaram) no decorrer da evolução e das condições do entorno (GOTTLIEB *et al.*, 1996; GOTTLIEB; BORIN, 2012).

As respostas na forma e fisiologia são promovidas pelo metabolismo, definido como um conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente nas células por rotas ou vias bioquímicas moduladas por enzimas (unidades catalíticas) na geração de produtos finais que são substâncias orgânicas. O metabolismo geral pode ser subdividido por definição teórica como: **basal** (*i.e.* metabolismo primário) e **especial** (*i.e.* metabolismo secundário) (GOTTLIEB, 1992; GOTTLIEB; BORIN, 2012; SIMÕES *et al.*, 2017; MICHAEL, 2017; NODA-GARCIA *et al.*, 2018).

O metabolismo basal está intimamente ligado à manutenção da vida e à reprodução. As substâncias produzidas por esse metabolismo são denominadas de metabólitos basais (*i.e.* metabolismo primário) ou macromoléculas. Esses têm sua produção em escala elevada e estão presentes em todos os organismos (distribuição universal). Como exemplo tem-se os carboidratos, proteínas e lipídeos (GOTTLIEB; BORIN, 2012; SIMÕES *et al.*, 2017; MICHAEL, 2017; NODA-GARCIA *et al.*, 2018).

O metabolismo especial ou especializado (*i.e.* metabolismo secundário) é encontrado em diversas partes dos organismos vivos. Diferentemente dos metabólitos basais, os metabólitos especiais possuem distribuição restrita a grupos pertencentes a um mesmo gênero, espécie ou linhagem. Quando comparada à sua produção, essa ocorre em pequena escala. Suas estruturas possuem maior diversidade e complexidade, ocasionando muitas vezes um reflexo sobre as funções adaptativas dentro dos táxons que a produzem (GOTTLIEB; BORIN, 2012; SIMÕES *et al.*, 2017). Mas como os metabólitos basais se relacionam com os metabólitos especiais?

1.2 Diversificação micromolecular e a plasticidade fenotípica química

A evolução macro- e micromolecular não foi linear (GOTTLIEB, 1992). Igualmente, a evolução da vida ocorreu em blocos (KIRSCHNING, 2020). Quimicamente, a teoria aceita é

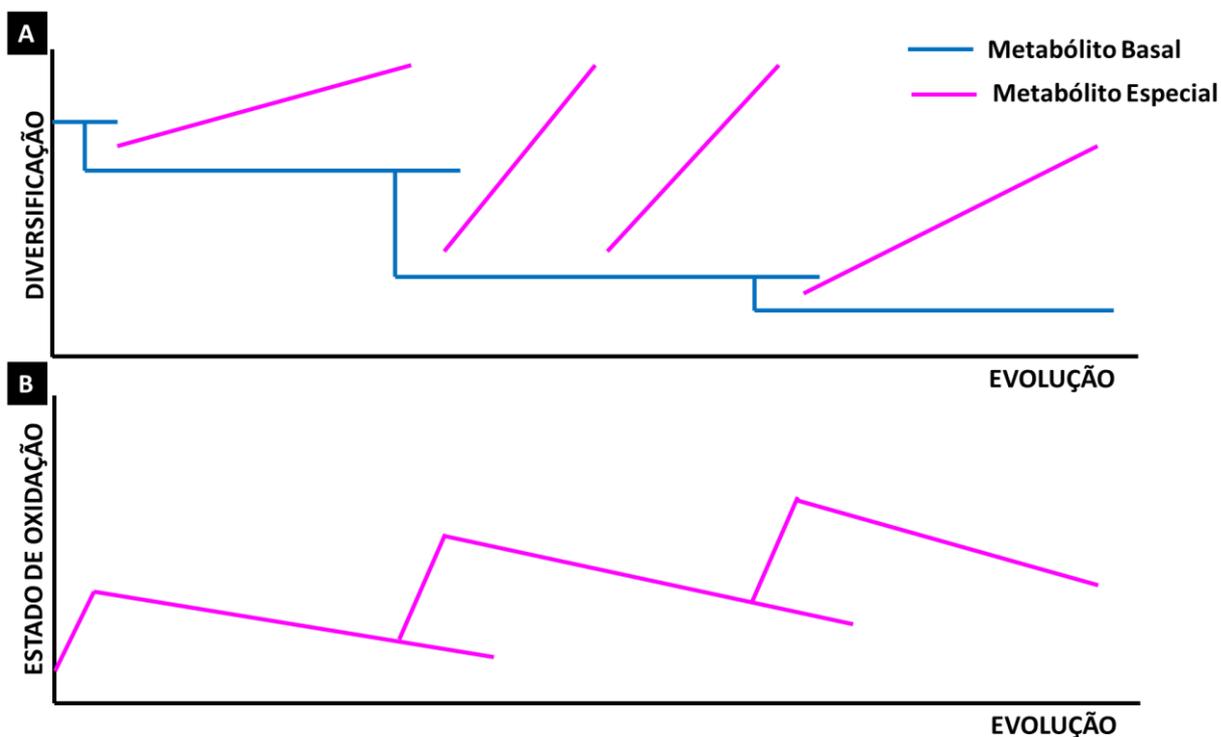
que a formação desses metabólitos foi possível graças à redução do carbono inorgânico para o carbono orgânico. Por sucessivas reações de condensação foram originados os metabólitos primários e por processo de oxidação desses, foi possível formar os metabólitos especiais. É possível compreender que diversos “eventos” biogeoquímicos ocorreram ao longo do tempo, o que permitiu sua formação e diversificação. No entanto, esse fato leva a conclusão que um está intimamente relacionado com o outro (GOTTLIEB, 1992; THEIS; LERDAU, 2003; DUPLAIS *et al.*, 2020).

A teoria empregada para o surgimento dos metabólitos especializados é associada à “construção de membranas”. Acredita-se que essa foi criada, principalmente, para o controle do gradiente iônico/eletrônico gerado, originalmente, por uma vesícula pré-biótica e, posteriormente, por uma membrana biótica. Essa proposta justificaria as diversificações encontradas em diferentes reinos, por exemplo, os números de tipos de membranas que o Reino Vegetal possui são maiores em comparação a outros reinos, por isso também a maior diversificação (GOTTLIEB; BORIN, 2012).

Essa teoria se reforça no modo de diversificação dos metabólitos primários em relação aos especiais. Embora não sejam tão frequentes quanto aqueles do metabolismo especializado, evidências acumuladas indicam que as vias e enzimas do metabolismo primário podem ter se diversificado durante a evolução das plantas. Essas alterações, relativamente raras no metabolismo primário, provavelmente contribuíram para grandes inovações evolutivas no Reino Vegetal, incluindo a evolução de vias metabólicas especializadas, e portanto, a diversidade química das plantas (MAEDA *et al.*, 2019; DUPLAIS *et al.*, 2020).

Pelas funções associadas aos metabólitos primários nas plantas pode-se observar que a chave para sobrevivência das espécies, ao longo da evolução, foi garantir uma tendência a otimização da diversidade, como é demonstrado na figura 2A (GOTTLIEB, 1982a). No entanto, como derivado desse, o metabólito micromolecular apresentou uma maior diversificação, principalmente, pela função plástica catalítica das enzimas derivadas de pressões que levaram a pequenas mutações frequentes no material genético (Figura 2).

Figura 2- Conceitos básicos de evolução micromolecular.



Fonte: GOTTLIEB (1982).

A principal estratégia para essa diversificação dos metabólitos especiais levou Gottlieb (1982) a crer que a evolução dos precursores primários prosseguiu por etapas de reações de bloqueio. Esse bloqueio leva a novas linhagens metabólicas. Dentro de cada linha, a evolução dos metabólitos pertencentes a um grupo biogenético ocorre por diversificação (Figura 2A).

O segundo postulado é que a diversificação tem relação direta com os diferentes padrões de oxidações atmosféricas ao longo da evolução (Figura 2B). Isso foi possível de ser postulado, pois observou-se que as substâncias altamente oxidadas geram novas linhagens químicas. No entanto, dentro de cada linha, a evolução ocorre por desoxigenação. Embora a evolução possa ser racionalizada pela consideração separada do metabolismo primário e secundário, tal distinção é artificial (GOTTLIEB, 1982a,b; 1990; 1992; GOTTLIEB; BORIN, 2012).

Esses postulados geram uma importância significativa para o oxigênio atmosférico na plasticidade fitoquímica. A história evolutiva da vida na Terra é composta de variações nos padrões de oxigenação. Os organismos vivos se desenvolveram na busca por facilitar o suprimento desse elemento químico tão vital para o funcionamento dos sistemas biológicos. Porém, sua forma ativa pode oferecer proteção contra xenobióticos (ex: desintoxicação de

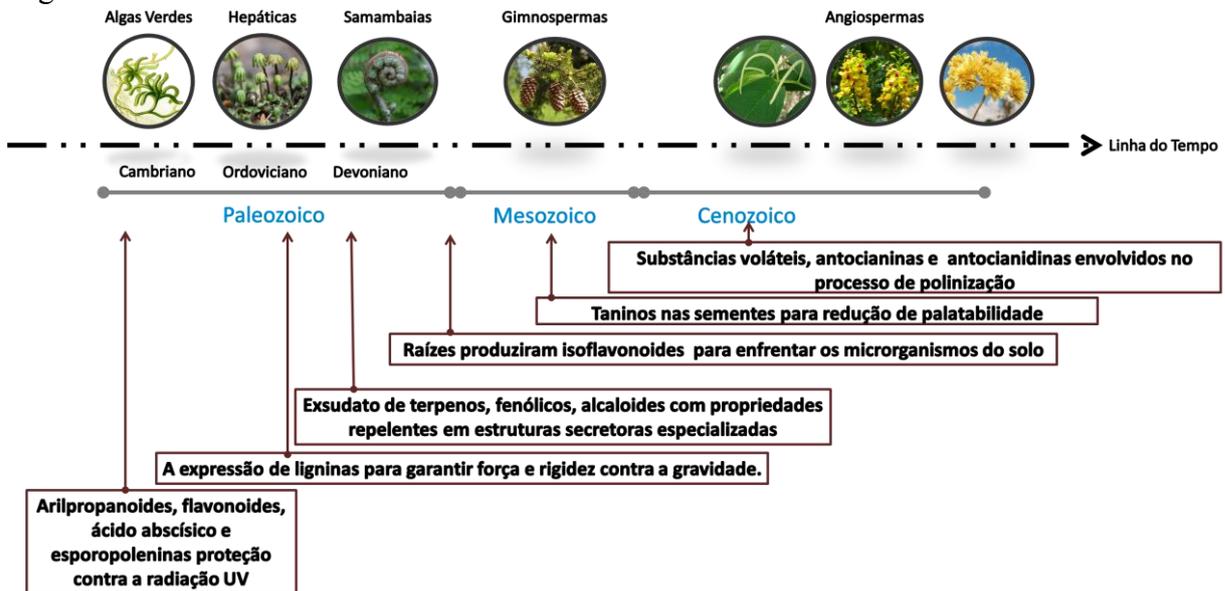
drogas e destruição de microrganismos patogênicos), bem como, pode gerar degradações (ex: oxidação lipídica e envelhecimento). A degradação oxidativa (hidrolítica) causada pelo meio ambiente é um dos principais desafios para a vida e, por isso, os seres vivos, principalmente as plantas, desenvolveram um mecanismo para suportá-la ou contorná-la (GOTTLIEB, 1992).

No Reino Vegetal, conforme mencionado, houve a expansão das vias biossintéticas decorrida de mudanças nos níveis de oxigênio atmosférico. Essa expansão levou ao sucesso na conquista terrestre (Figura 3). Por exemplo, a expansão da via do chiquimato levou à formação de arilpropanoides e flavonoides para proteção contra a radiação ultravioleta (UV). Essas expansões na biossíntese foram uma das mais importantes para a conquista do meio terrestre, principalmente, na proteção contra a exposição ao sol e na captura de radicais livres de oxigênio. Esses metabólitos e a formação de cutículas na defesa contra a dessecação desempenharam um papel crítico na evolução das algas verdes em direção à transição de musgos e hepáticas, hoje diversificados em ambientes terrestres (GOTTLIEB, 1990; DELGODA; MURRAY, 2017; DAVIES *et al.*, 2020).

Após a inovação na proteção contra a radiação UV, quase 40 milhões de anos se passaram. Os avanços oxidativos dos metabólitos especializados da rota do chiquimato em direção à sequência de desidratação e condensação formaram as ligninas, um polímero fenólico complexo que promoveu resistência à força gravitacional e reduziu drasticamente os problemas de dessecação existentes, permitindo a proliferação de espécies em locais mais secos (DELGODA; MURRAY, 2017; DAVIES *et al.*, 2020).

O constante declínio do dióxido de carbono atmosférico no final da era Paleozoica, somado a outros fatores, favoreceu a seleção natural para a formação de folhas verdadeiras. Estas apresentavam estruturas semelhantes aos atuais tricomas com função de defesa mecânica e química. A expansão da via biossintética dos ácidos aminados levou à formação de alcaloides com baixo peso molecular, além da ocorrência de diversificações estruturais de fenólicos e terpenoides de menor peso molecular (GOTTLIEB; BORIN, 2000; DELGODA; MURRAY, 2017; DE-VRIES; ARCHIBALD, 2018; YONEKURA-SAKAKIBARA *et al.*, 2019).

Figura 3- Expressão de metabólitos especiais nos principais pontos de ramificação da filogenia vegetal



Fonte: adaptado de Delgoda; Murray (2017)

A fixação das raízes melhorou a absorção de água no final do Devoniano. Esse passo foi crucial para o surgimento das espécies com sementes nuas precursoras das atuais gimnospermas. Esse processo demandou das espécies um aperfeiçoamento na defesa e nas interações com a biota (principalmente, microrganismos) do solo, levando a maior especialização nos esqueletos dos flavonoides, principalmente isoflavonoides (substâncias com anel B ligado ao carbono 3 do anel C). O estabelecimento de camadas contendo taninos para proteção adicional nas sementes nuas, nas gimnospermas, surgiu associado com o aumento da oxigenação atmosférica levando à efetividade da propagação dessas espécies pela diminuição do consumo desses recursos (GOTTLIEB; BORIN, 2000; DELGODA; MURRAY, 2017; DEVRIES; ARCHIBALD, 2018; YONEKURA-SAKAKIBARA *et al.*, 2019).

A redução dos níveis de oxigênio levou a uma retração oxidativa, que do ponto de vista biogenético, levou a uma maior diversificação nos esqueletos de metabólitos especiais, aumentando a variedade de espectros de cores e odores a partir de metabólitos especiais (GOTTLIEB, 1992; GOTTLIEB; BORIN, 2000; DELGODA; MURRAY, 2017). Antocianinas, antocianidinas, terpenoides (principalmente, monoterpenos e carotenoides), flavonas e flavonóis foram a principal inovação que permitiu o sucesso evolutivo para as espécies de angiospermas. Um metabolismo com substâncias reduzidas também levou a redução das transformações enzimáticas, corroborante com a tese de diversificação oxidativa

nas angiospermas (GOTTLIEB, 1992; DELGODA; MURRAY, 2017; DE-VRIES; ARCHIBALD, 2018; DUPLAIS *et al.*, 2020).

As diversificações caminham de fato para substâncias capazes de garantir a sobrevivência (reprodução e energética), como os metabólitos basais, e para garantir uma melhor comunicação atrativa, retrativa ou mortífera, como os metabólitos especiais, entre os diferentes organismos (DUPLAIS *et al.*, 2020).

Michael (2017) descreveu que as enzimas que catalisam a mesma reação evoluíram independente das diferentes dobraduras de proteínas. A mesma dobra pode produzir enzimas que reconhecem substratos diferentes e enzimas que executam químicas diferentes. Genes que codificam enzimas úteis podem ser transferidos entre organismos e até mesmo entre os principais domínios da vida (fungos endofíticos e plantas hospedeiras).

Os metabólitos especializados em nível funcional podem ser vistos apenas como vocábulos linguísticos (informação), ecológicos e evolutivos. A partir dele pode-se compreender os fenômenos naturais envolvendo as interações dos ecossistemas com sua sincronização, modulação, organização e o *status quo* da existência (GOTTLIEB; BORIN, 2000; KESSLER; KALSKE, 2018).

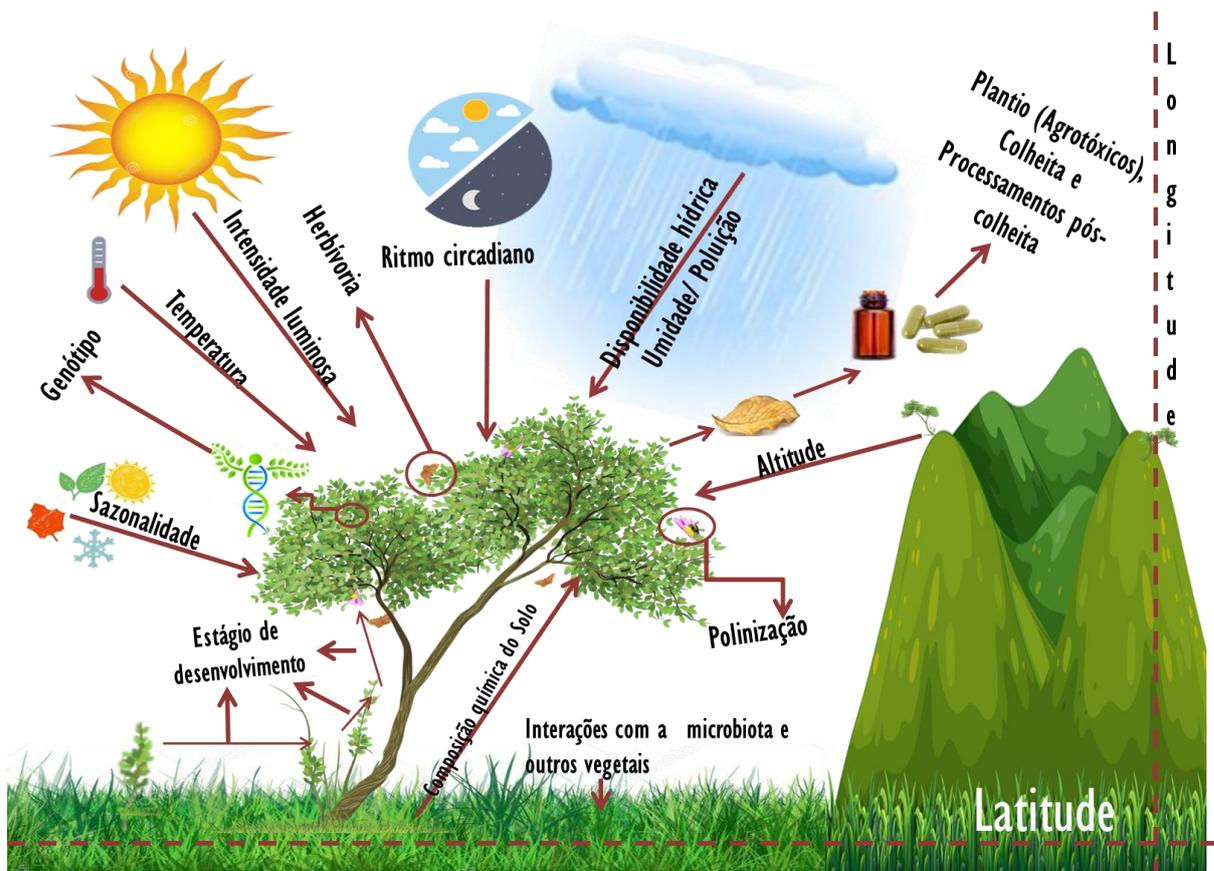
Essa diversidade química, aqui entendida como quimiodiversidade, pode ser compreendida por cinco fatos que se justificam juntos ou separados para multiplicidades biossintéticas:

- 1) Metabólitos especializados são produzidos a partir de precursores quimicamente simples derivados do metabolismo primário. Esse fato possibilita uma variedade de combinações possíveis. Por exemplo, terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos) são derivados de unidades isoprênicas (C₅) ou lignanas são derivadas do ácido chiquímico (DUDAREVA *et al.* 2004; KESSLER; KALSKE, 2018).
- 2) Os genes que codificam proteínas e enzimas biossintéticas são oriundos de grandes famílias de genes, e diversos genes, geralmente, geram enzimas de um tipo semelhante (KESSLER; KALSKE, 2018).
- 3) Pequenas alterações no sítio ou até mesmo em termos de enzimas biossintéticas, como as terpeno-sintases, podem produzir vários produtos do mesmo precursor, afetando a composição proporcional do produto final (KÖLLNER *et al.* 2004; KESSLER; KALSKE, 2018).

- 4) As enzimas modificadoras, como carboxil-metil-transferases e acetiltransferases, apresentam uma baixa especificidade ao substrato, o que explica a rápida divergência funcional na indução ambiental no metabolismo (NEGRE *et al.* 2003; PICHERSKY *et al.* 2006; KESSLER; KALSKE, 2018).
- 5) As expressões espaciais e temporalmente diferenciais e específicas dos genes nos órgãos biossintéticos podem afetar a diversidade de substâncias que são extraídas de uma planta (DUDAREVA *et al.* 2013; PICHERSKY *et al.* 2006). Diferentes órgãos vegetais podem apresentar composições distintas. Desse modo, a expressão diferencial específica do tecido na produção de metabólitos pode ser adaptativa, permitindo que as plantas superem os efeitos conflitantes de transferência de informações químicas, como “*interações com antagonistas e mutualistas medido pelas mesmas unidades de informação*” (KESSLER; HALITSCHKE, 2009; KESSLER; KALSKE, 2018).

Esses fatos sugerem que fatores ecológicos impulsionam a diversificação dos metabólitos especiais das plantas. Sabe-se que em nível ecológico, diversos fatores afetam a diversidade química nos produtos finais, portanto, têm-se (Figura 4): fase fenológica; variações no genótipo; herbívoro/patogênese; atração de polinizadores; disponibilidade hídrica; intensidade luminosa; umidade; estágio de desenvolvimento vegetativo (ontogenia); poluição atmosférica; temperatura; variações na composição química do solo; altitude, latitude; longitude; e ações antrópicas (ex: plantio (uso de agrotóxicos e manejos diferenciados), colheita e processamento pós-colheita) (RAMOS *et al.*, 2020). Essas funções diversas criam paradigmas que questionam a verdadeira função individual de cada metabólito especializado, em termos de lidar com estresses abióticos (por exemplo, temperatura, radiação e baixa umidade) ou para mediar interações antagônicas (por exemplo, patógenos, herbívoros e plantas vizinhas) e mutualistas (por exemplo, polinizadores, fungos micorrízicos e predadores/ parasitos herbívoros) (KESSLER; HALITSCHKE, 2007; KESSLER; KALSKE, 2018).

Figura 4 - Principais fatores que podem afetar a diversidade química de espécies vegetais.



Fonte: próprio autor (2019)

Os avanços nos estudos com metabólitos especiais mostram as interações no ecossistema como um fato crucial para sua diversificação e que as interações desempenham um papel desde o nível celular até o nível da população e da comunidade, com isso, os resultados e a dinâmica se refletem no processo evolutivo (KESSLER; BALDWIN, 2002; KESSLER; KALSKE, 2018). A seleção que leva às mudanças microevolutivas na produção desses metabólitos, assim como na diversidade, pode ocorrer ao longo de apenas algumas gerações em escalas de tempo relevantes para interações ecológicas (AGRAWAL *et al.*, 2012, GERVASI; SCHIESTL, 2017, UESUGI; KESSLER, 2013; KESSLER; KALSKE, 2018)

Dessa forma, fatores ecológicos elevam o sentido da quimiodiversidade registrada nesses níveis, pela diversidade química oriunda das diversas variações proveniente das relações

entre- e intra- ecossistemas existentes, por meio da *plasticidade fenotípica* (GUO *et al.*, 2008; WENG *et al.*, 2012).

A plasticidade fenotípica (*i.e.* fenoplasticidade) é definida como a capacidade de um único genótipo em exibir um amplo espectro de fisiologia e forma, em resposta às mudanças nas condições ambientais (SCHLICHTING; SMITH, 2002; FORDYCE, 2006; PIMPINELLI; PIACENTINI, 2020). Por si só, a capacidade de um genótipo de produzir diferentes padrões de expressão fenotípica em diferentes condições ambientais descreve sua norma de reação (PIMPINELLI; PIACENTINI, 2020). Características de desenvolvimento e flutuações ambientais podem existir para cada genótipo, e diferentes normas de reação tornam as interações genótipo-ambiente complexas e funcionalmente integradas (PIMPINELLI; PIACENTINI, 2020). Embora o conceito de plasticidade fenotípica tenha sido aplicado pela primeira vez a características morfológicas, agora está claro que os organismos respondem às perturbações ambientais com um conjunto de características morfológicas, fisiológicas, de desenvolvimento e comportamentais plásticas, que afetam coletivamente o sucesso ecológico e a dinâmica evolutiva de populações e espécies dentro de seus contextos naturais (PIMPINELLI; PIACENTINI, 2020). Os *geotipos*, *quimiotipos* e *ecotipos* são classificações teóricas a partir dos achados químicos que servem de exemplo para essas mudanças plásticas (plasticidade fenotípica química), a partir de micromoléculas na produção de misturas complexas, como óleos essenciais e extratos.

Os *geotipos* (*i.e.* respostas ambientais; variações químicas) são variações intraespecíficas descontínuas expressas nas alterações da substância química predominantes de uma espécie, derivadas, exclusivamente, das pressões associadas aos fatores abióticos e bióticos, sem inviabilizar o sucesso do cruzamento com outro membro da mesma espécie. Estes polimorfismos químicos estão associados aos processos de aclimatização, tendo como requisito ter uma expressão fenotípica química e morfológica igual, mesmo quando cultivado em ambiente diferente do habitat, com a existência de uma mesma espécie com elevado grau de concordância no genótipo (KURLOVICH, 1998; GUO *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2018; RAMOS, 2018; RAMOS *et al.*, 2020).

Os *quimiotipos* (*i.e.* raça química) são variações intraespecíficas contínuas expressas na alteração da substância química majoritária predominante de um espécime, que são derivadas de pequenas alterações genéticas, que proporcionam pouco ou nenhum efeito na morfologia e grande mudança no fenótipo químico, sem inviabilizar o sucesso no cruzamento com outro

membro da mesma espécie e podendo, assim, garantir a transferência da modificação hereditariamente. Tem como requisito uma expressão fenotípica química diferente, mesmo quando cultivado em ambiente diferente do habitat, com a existência de uma mesma espécie com elevado grau de concordância no genótipo (GUO *et al.*, 2008; HILAN *et al.*, 2011; POLATOGLU, 2013; TRINDADE *et al.*, 2018; RAMOS, 2018; RAMOS *et al.*, 2020)

Os *ecotipos* (*i.e.* raça ecológica) são variações intraespecíficas contínuas expressas na alteração da substância química majoritária predominante de um espécime, derivadas de alterações genéticas, com modificações morfológicas significativas e sem inviabilizar o sucesso do cruzamento com outro membro da mesma espécie. Tem como requisito a possibilidade de ter uma expressão fenotípica química e morfológica diferente, mesmo quando cultivado em ambientes diferentes do habitat, com a existência de uma mesma espécie com elevado grau de concordância no genótipo (GUO *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2018; RAMOS, 2018; RAMOS *et al.*, 2020).

Esses exemplos de plasticidade fenotípica são respostas diretas de adaptações fisiológicas às condições ambientais em diferentes escalas temporais. Atualmente, sabe-se que a plasticidade fenotípica é geralmente explicada como o resultado de mecanismos epigenéticos que modificam a expressão gênica em resposta a mudanças nas condições ambientais. Esse, introduz um fator complexo na tentativa de compreender a naturalização da variação individual (PIMPINELLI; PIACENTINI, 2020).

Outro exemplo de modulação da plasticidade fenotípica química de espécies é a formação de *cronotipos*, dado pelas alterações preferenciais entre dia ou noite na produção química de uma micromolécula, determinada em parte pela genética e modificada pela idade, atividade e ambiente (SHAWA *et al.*, 2018; HOTTA, 2021). Esses tipos de alterações plásticas são largamente conhecidos. As espécies vegetais contam o tempo com o relógio endógeno sincronizado por sinais externos como as variações ambientais, principalmente as de luz e temperatura. Esse acontecimento é chamado de ritmo circadiano (*circa* = cerca, *dies* = dia) que apresenta um período de aproximadamente, mas não exatamente, 24h. Muitas das vezes a plasticidade química apresentada no ritmo circadiano pode ser ultradiano (significativamente menor que 24h ou com mais de um ciclo a cada 24h), infradiano (significativamente maior que 24h ou com menos de um ciclo a cada 24h), sazonal ou anual (KIM *et al.*, 2017; JIMÉNEZ *et al.*, 2021; HOTTA, 2021).

Essas variações interespecíficas são importantes para a compreensão das espécies nos seus respectivos habitats; auxiliam a definir padrões gerais para espécies; e para melhor compreensão da quimiodiversidade.

1.3 Padrões e avaliação da quimiodiversidade

As classificações de padrões da diversidade de espécies (Figura 5), introduzida por Robert Harding Whittaker, levou os ecólogos a grandes avanços na compreensão da natureza, principalmente, a compreensão sobre a distribuição de espécies vegetais na atualidade. Até então, poucas eram as abordagens que associavam essa classificação aos achados químicos. Em parte esse fator se deteve por limitações analíticas.

No ano de 2018, André Kessler e Aino Kalske com base nos conceitos de transferência de informação química como mediador de interações antagônicas e mutualísticas, para interpretar estudos funcionais e microevolutivos, propuseram que a quimiodiversidade seja um fator que impulsiona os processos ecológicos em três níveis α , β e γ :

1. Quimiodiversidade α : É vista como a variação da função das propriedades bioquímicas de um espécime. No entanto, associado com a multifuncionalidade e a complexidade da comunidade ecológica ao seu redor (KESSLER; KALSKE, 2018);
2. Quimiodiversidade β : Definida como a variação química (fenótipos) em diferentes escalas temporais e espaciais dos genótipos de uma espécie (KESSLER; KALSKE, 2018);
3. Quimiodiversidade γ : Compreendida pela heterogeneidade química da comunidade em diferentes escalas temporais e espaciais (KESSLER; KALSKE, 2018).

As avaliações individuais entendidas pela quimiodiversidade α em escala espacial não possuem significado científico, feita apenas em uma análise pontual. Essa, necessita diretamente, de uma avaliação conjunta com as variações temporais. Nesse quesito, as condições de indução dos fatores bióticos e abióticos são cruciais para definição desse padrão. Além disso, o desenvolvimento da espécie *per si* e das respectivas partes do vegetal (ontogênicas), fatores fenológicos e de interações, associados, também, às variações ditadas pelos ritmos do relógio genético (circadiano e sazonal). Por definições químicas, entende-se que é possível mensurar o fenótipo dessa espécie e possivelmente aferir variações de geotipos

para os extratos ou óleos essenciais de acordo com a indução do ambiente (KESSLER; KALSKE, 2018).

As compreensões de quimiodiversidade α em um espectro espacial e temporal maior para diferentes espécies é vista como quimiodiversidade β . Essa permite inferir sobre a heterogeneidade temporal e espacial do ambiente sobre as diferentes respostas plásticas fenotípicas químicas das espécies. Essas mudanças são definidas claramente pelas variações diferenciais dos distintos fenótipos na promoção da manutenção de alta diversidade genética por meio de interações dos genótipos com o ambiente. É possível evidenciar, nesse nível, a existência de quimiotipos e ecotipos. A quimiodiversidade β vai refletir, diretamente, covariações entre ambientes com diferentes agentes de seleção (por exemplo, herbívoros) pelo grau de maior atividade de substâncias na mistura (KESSLER; KALSKE, 2018).

A quimiodiversidade γ exige maior complexidade de dados e análises para várias espécies em uma mesma comunidade ou para diferentes níveis de sucessão. É definida sobre a hipótese da variação química heteroespecífica. Esse conceito determina que o espaço de informação específico ocupado por uma planta individual ou uma população de plantas determina as interações dessas no ambiente. No entanto, o produto químico sobreposto (mais ou menos) no espaço de informação de espécies vizinhas compõem o ruído ambiental biótico que pode afetar o resultado das interações, de forma positiva quanto negativa. Tal como acontece com a quimiodiversidade β , a γ permite que as plantas anunciem suas qualidades para potenciais interatores ou permaneçam relativamente indetectáveis no meio do ruído de um ambiente diverso (KESSLER; KALSKE, 2018).

Figura 5 - Índices de avaliação, tipos de definições químicas e modos de variação espacial e temporal que afetam a seleção natural na quimiodiversidade de plantas em diferentes níveis.

Níveis de quimiodiversidade	α	β	γ
Definições químicas	Fenótipo/Geotipo	Quimiotipo/Ecotipo	Heteroespecificidade
			
Escala de variação	Espacial	<ul style="list-style-type: none"> • Variações individuais entre populações na comunidade • Variação química entre a população; • Adaptação local de herbívoros ou polinizadores 	<ul style="list-style-type: none"> • Variação entre populações na composição da comunidade de plantas
	Temporal	<ul style="list-style-type: none"> • Indução biótica e abiótica • Ontogenia • Fenologia • Variação sazonal • Variação circadiana 	<ul style="list-style-type: none"> • Seleção flutuante devido à variação no tamanho da população de herbívoros (surto de insetos ou colonização) • Flutuação na adaptação local
Índices para avaliação da quimiodiversidade	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de Shannon • Índice de diversidade Simpson • Índice de uniformidade Pielou 	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de Sorensen • Índice Jaccard • Índice de Cody 	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de Similaridade Química • Índice de Rao

Fonte: Próprio autor (2021)

O desafio atual é o desenvolvimento de ferramentas/metodologias para avaliar e garantir a interpretação dos fenômenos em torno da diversidade química e da plasticidade fenotípica e química em interações com esses fatores (BRÜCKNER; HEETHOFF, 2017; KESSLER; KALSKE, 2018; ZIDORN, 2019). Existem alguns métodos para avaliação das plasticidades e quimiotipificação em diferentes escalas espaciais, como por exemplo: **Índices para quimiodiversidade α** – índice de Shannon (SHANNON, 1948; GOUYON *et al.*, 1986; MÁRTONFI *et al.*, 1994; FENG *et al.*, 2020), índice de diversidade Simpson's (SIMPSON, 1949; KFOURY *et al.*, 2019; FENG *et al.*, 2021), índice de uniformidade Pielou (PIELOU, 1966; FENG *et al.*, 2020) e índice de quimiodiversidade de Iason's (Iason *et al.*, 2005; KFOURY *et al.*, 2019); **Índices para quimiodiversidade β** – índice de Sorensen (SØRENSEN, 1948; FENG *et al.*, 2020), índice de Jaccard (JACCARD, 1901; FENG *et al.*, 2020); e índice de Cody (CODY, 1975; FENG *et al.*, 2020); **Índices para quimiodiversidade γ** - índice de similaridade química (SALAZAR *et al.*, 2016a); e para diferença química na

abundância relativa o índice de Rao (SALAZAR *et al.*, 2016b). Todos esses parâmetros têm como principal meio de resposta a ausência ou presença das substâncias qualitativamente. É notável que essas equações não expressam medidas para prever o comportamento físico-químico e estrutural dessas substâncias em misturas complexas, com o intuito de medir a influência desses fatores excitatórios e proporcionar descrição fenética dos táxons *in loco*. No entanto, **avaliar padrões oxidativos** nesses níveis pode contribuir muito para compreender a quimiodiversidade. O caminho poderia ser utilizando conhecimentos e técnicas desenvolvidas a partir de abordagens sobre fenoplasticidade química e a sistemática micromolecular, como será abordado nessa Tese.

1.4 Quimiosistemática *versus* Quimofenética? – Entre o hirtó e a cinesia micromolecular

A necessidade de classificações de objetos, lugares e espécies faz parte das premências humanas. Claramente, essas tentativas são baseadas na observação de usos alimentares, medicinais, olfativos, dentre outros. No final do Século XVII, Grew categorizou as plantas a partir de uso terapêutico. Pativer (1699) e Camerarius (1699) correlacionaram características organolépticas (odor e sabor) e morfologia. O desenvolvimento dos estudos de produtos naturais a partir do Século XIX trouxe consequências significativas para as classificações das espécies vegetais. Candolle (1832) percebeu que era possível agrupar espécies pela atratividade de insetos. A partir do conhecimento inicial gerado por esse achado, surgiu a “*ecologia bioquímica*” que impulsionou os trabalhos de Hellen Abbot (1886), trazendo a importância química na taxonomia. O aumento no isolamentos de substâncias naturais levou à diversas tentativas de classificações com base em alcaloides por Eykman (1888); derivados fenólicos por Van Romburgh (1890); taninos, alcaloides e derivados terpênicos por Greshoff (1909); assim como derivados de ácidos graxos por Mcnair (1917-1945) (SIMÕES *et al.*, 2017).

A sistematização dos dados fenéticos químicos (*i.e.* similaridade fenotípica química) se concretizou no trabalho de Hegnauer (1962-1994) denominado de “*Chemotaxonomie der Pflanzen*”. Isso foi seguido mais tarde por “*The Chemotaxonomy of Plants*” (SMITH, 1976) em que o aspecto sistemático foi enfatizado. Logo em seguida foi pontuado na publicação “*Plant Chemosystematics*” de Harborne e Turner (1984) (REYNOLDS, 2007; SIMÕES *et al.*, 2017).

O sistema desenvolvido por Arthur Cronquist denominado “*An Integrated System of Classification of Flowering Plants*” (1981) e “*The Evolution and Classification of Flowering*

Plants” (1968; segunda edição, 1988) levou, superficialmente, informações químicas para as classificações de espécies com flores. Os trabalhos de classificação de Rolf Martin Theodor Dahlgren (1975-1980) e Gertrud Dahlgren (1989) foram os mais importantes para o desenvolvimento e associação dos dados químicos na definição de classificações de Angiospermas. Estudos a partir da Década de 1980 do Professor Otto R. Gottlieb lançaram luz para a necessidade das análises estruturais e quantitativas por utilização de índices de avanço evolutivo entre os táxons (Índice Morfológico, Índice Químico-Morfológico, Índices Químicos, Similaridade Química) (GOTTLIEB, 1982a; 1989; 1990; GOTTLIEB; BORIN, 2000; 2006; SANTOS *et al.*, 2010).

As Décadas de 1980 a 1990 foram consideradas os anos dourados para o desenvolvimento da Quimiosistemática (*i.e.* quimiotaxonomia ou taxonomia química), uma cadeira científica já considerada na época como uma ferramenta usada para inferir relações taxonômicas e posições evolutivas entre táxons de plantas (GOTTLIEB, 1982a; SANTOS *et al.*, 2010). Essa estratégia de determinar gradientes químicos de afinidade entre grupos de plantas ajuda a direcionar os estudos fitoquímicos até os dias atuais. No entanto, no período denominado de era da sistemática molecular, onde a filogenética utiliza o sequenciamento de DNA, o uso de informações químicas do metabolismo especial foi amplamente marginalizada (SADGROVE *et al.*, 2020).

Mutações adaptativas e fenoplasticidade sempre foram grandes lacunas que poderiam ser preenchidas (positivas) ou deixadas vazias (negativas) pela Quimiosistemática. Positivamente, para grupos que apresentam divergências, paralelismo ou convergências morfológicas, esta ferramenta mostra-se intimamente importante. Negativamente, para grupos que apresentam divergências químicas, devido ao bloqueio em alguma rota biossintética, isso apresenta uma contradição (SIMÕES *et al.*, 2017).

A fenoplasticidade química surge como uma das principais contradições nos estudos quimiosistemáticos. Sadgrove e colaboradores (2020a e b) consideram que o advento da filogenética e da plasticidade química tem levado muitos estudiosos a propor mecanismos para controlar essa variabilidade e garantir a reprodutibilidade dos perfis químicos micromoleculares. Este processo envolveu o controle do tempo de amostragem (dia e noite); Definição de estação para eliminar influências de temperatura e chuva e; Avaliações de métodos de armazenamento para eliminar artefatos de processamento pós-colheita. No entanto, os esforços para controlar os fatores que criavam a variabilidade foram derrotados pela expansão

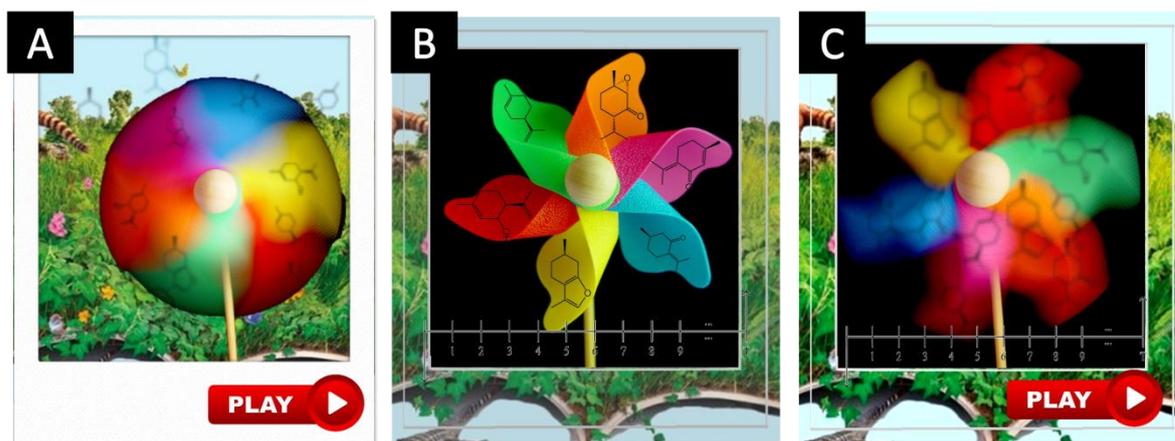
do estudo em outros táxons, e com o tempo a cadeira científica de Quimiotaxonomia perdeu peso, devido à improdutibilidade em alguns grupos de pesquisa, que possui muitos estudos não publicados. No entanto, no paradigma moderno, a caracterização química continua a ser considerada uma ferramenta informativa, porém, não é mais considerada um critério taxonômico absoluto.

A divergência no uso da terminologia entre os pesquisadores levou a uma necessidade de substituição. Obviamente que a crítica será sempre baseada na ciência (REYNOLDS, 2007; LARSSON, 2007; ZIDORN, 2019; LAWSON; PATEL, 2020; EVERGETIS; HAROUTOUNIAN, 2020; SADGROVE *et al.*, 2020). Neste paradigma moderno, *a exploração química nos táxons, ou agregados heterogêneos e seções em diferentes escalas espaciais e temporais, é conhecida como Quimiofenética*. A terminologia Quimiofenética (ou plasticidade fenotípica química) foi usada pela primeira vez por Christian Zidorn em 2019. Este descreve que o novo termo relata um estudo Quimiossistemático que visa explorar uma matriz de metabólitos especiais em um determinado clado, contribuindo para a caracterização de táxons e a busca racional de bioativos naturais (ZIDORN, 2019). Essa perspectiva apresenta uma imagem integradora entre as cadeiras científicas.

Na figura 6 há três imagens que refletem o metabolismo das plantas e sua relação com seu habitat. Cabe ressaltar que o metabolismo é um vídeo contínuo guiado por forças atrativas, síncronas, assíncronas e antagônicas, que não para até sua finalização (morte). Essa dinâmica pode ser avaliada por análises de micromoléculas com auxílio de técnicas espectrofotométricas. Metaforicamente, o primeiro (Figura 6A) representa o metabolismo de uma planta em seu ambiente natural. Cada amostra obtida é estática e representa, especificamente, o momento de obtenção do material. Santos e colaboradores (2010) descrevem que a Quimiossistemática é baseada em dados da literatura que permitem uma avaliação de grande parte da química do táxon em questão. A análise desses dados possibilita a escolha de marcadores quimiossistemáticos que se caracterizam pela ampla ocorrência e diversidade estrutural de diferentes classes químicas. Essa metodologia demonstra, claramente, que esta cadeira científica tem em suas entranhas filosóficas a análise de uma **fotografia** das substâncias no quadro biossintético **estático**, usando suas próprias métricas ecológicas que auxiliam nas classificações e entendimentos evolutivos dos táxons. No entanto, eles não podem representar totalmente o funcionamento do metabolismo natural, por avaliar um momento, uma **foto instantânea**. Além disso, a Quimiossistemática tem sido aplicada com bastante sucesso a

grupos taxonômicos superiores, e tem falhado no estudo de correlações químicas intraespecíficas de uma mesma população ou de populações diferentes.

Figura 6 – Reflexões do funcionamento das interações químicas da vida no *status quo* (A) em comparação com os dados obtidos da análise do ponto de vista da Quimiosistemática (B) e da Quimiofenética (C).



Fonte: próprio autor (2021)

Contra esse processo está a figura 6C. Isso reflete que a Quimiofenética têm como princípio analisar os padrões de quimiodiversidades nos níveis α , β e γ . Portanto, a análise é feita no **movimento** que ocorre por meio da *plasticidade fenotípica química*. Essa sequência de amostragem (fotografias) gera a **construção de um vídeo**. No entanto, este breve vídeo ainda não reflete totalmente o movimento semelhante ao natural (Figura 6A), mas prevê comportamentos complexos que até então o campo de análise da Quimiosistemática não alcançava. Essa lacuna ainda existe para a Quimiofenética. Em nosso ponto de vista, em futuro próximo, será contemplada com o aprofundamento e aplicação do uso da metabolômica e/ou técnicas de imageamento *in loco* para acompanhar os processos fisiológicos de uma substâncias ou de uma classe (CANUTO *et al.*, 2018; PILON *et al.*, 2020).

Sadgrove e colaboradores (2020a) lançam luz sobre a abordagem filosófica da Quimiofenética. Esse feito foi uma etapa importante que define sua complexidade nas diferentes escalas temporais e espaciais. Essa proposta delimita a necessidade do cruzamento com o conceito de quimiodiversidade proposto por Kessler e Kalske (2018). Ao analisar as abordagens Quimiofenéticas, muitas vezes são incrementadas por associações sobre os padrões morfológicos, geográficos ou moleculares observados. Como complemento a outras linhas de

evidência na definição de uma espécie, os dados químicos devem ser identificados como representando os quatro cenários possíveis:

- 1 – Variabilidades intraespecíficas ditas pelos agrupamentos químicos distintos dentro de um único táxon, que são denotados como quimiotipos (SADGROVE *et al.*, 2020a);
- 2 - Variabilidades intraespecíficas ditas pelos aglomerados químicos distintos em táxons que caracterizam a distinção de espécies (SADGROVE *et al.*, 2020a);
- 3 – Divergência intraespecíficas ditas pelos não agrupados dentro de um único táxon que é denotado como as diferenças de expressão química entre espécimes (SADGROVE *et al.*, 2020a); e
- 4 - Convergências intraespecíficas ditas pelos aglomerados químicos convergentes distintos que compreendem dois ou mais táxons, que podem ser uma consequência da expressão química conservadora em táxons relacionados, ou convergência de táxons distantemente relacionados ou não relacionados (SADGROVE *et al.*, 2020a).

Esses pressupostos da Quimiofenética levam a crer que não é o fim da Quimiosistemática. É apenas um novo olhar gerado e direcionado para a plasticidade fenotípica química derivada de uma análise integrativa, sem bases apenas em sistemas de classificação de táxons, mas na observação dos fatores condicionantes para determinar os níveis de quimiodiversidade. Não há de se desconsiderar que essa nova ferramenta se integrará para construir novos conceitos com análises de metabolômica e para a variabilidade das atividades biológicas das plantas medicinais em estudos farmacognósticos. A análise Quimiofenética precisa ser amplamente discutida para não gerar interpretações errôneas ou aplicações destoantes da filosofia de origem da Quimiosistemática.

Outro ponto que deve ser contextualizado, durante anos a Quimiosistemática usou dados obtidos das estruturas químicas de micromoléculas por meio de índices de progresso evolutivo para estabelecer tendências evolutivas e filogenéticas (GOTTLIEB; BORIN, 2012; REYNOLDS, 2007). Gottlieb e colaboradores (1980-2000) desenvolveram uma metodologia para correlacionar o grau de oxidação de metabólitos especiais e as transformações biogénicas de seus esqueletos micromoleculares para desvendar as funções, biogeografia e questões sistemáticas relacionadas às substâncias para espécies no Reino Vegetal. Emerenciano e

colaboradores (1998), com base no conhecimento sobre biossíntese e ferramentas desenvolvidas por Gottlieb, desenvolveram um método para avaliar as etapas (passos) oxidativas das reações com terpenoides, o qual foi aplicado a óleos essenciais por Sayuri e colaboradores (2010). No entanto, apesar dos dados obtidos terem uma característica quantitativa, todo seu processamento foi baseado em dados qualitativos, na premissa da **presença ou ausência** da variedade de substâncias nos táxons. Obviamente, isso foi devido ao fato de que naquela época não havia grande disponibilidade de dados e técnicas de quantificação com maior exatidão e precisão para avaliação dos metabólitos especiais. Portanto, ferramentas de avaliação em Quimiofenética são um passo significativo para a compreensão dos fenômenos ecofisiológicos que devem revelar, principalmente, problemas ambientais (como aquecimento global) e auxiliar na descoberta de novos medicamentos a partir de espécies vegetais.

1.5 A importância das análises farmacognósticas

Os estudos farmacognósticos encaram a fenoplasticidade como ferramenta para o descobrimento de novos fármacos. A Farmacognosia (*Pharmako* – drogas, remédio e veneno; *Gnosis* – conhecimento) nasce como uma ciência interdisciplinar na interface da química e da biologia, encarregada em transladar a pesquisa de produtos naturais à medicina. Como tal, ela incorpora elementos de química analítica, físico-química, bioquímica, ecologia, microbiologia, biologia molecular, química orgânica, taxonomia e outras disciplinas relacionadas (ROBBERS *et al.*, 1997; KINGHORN, 2001; JONES *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2017; CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2020).

A Farmacognosia agrupa técnicas de diferentes ciências que possibilitam as identificações (macro- e microscópicas) e análise de pureza das plantas com importância medicinal (Farmacobotânica); Seleção, coleta, plantio, colheita, preparação e conservação, preparo de extratos e correlatos, isolamento, fracionamento, identificação e quantificação de substâncias (Fitoquímica); Otimização e processamento de matérias-primas biogênicas, controle de qualidade dos derivados vegetais, isolamento de substâncias em escala industrial (Tecnologia de fitoterápico); Uso e aplicações medicinais (Etnobiologia); Características dos

efeitos biológicos e tóxicos de substâncias recentemente isoladas (Farmacologia e Toxicologia) (OLIVEIRA *et al.*, 2014; BASSANI *et al.*, 2014; CAHLÍKOVÁ *et al.*, 2020)

As integrações dessas técnicas levaram ao desenvolvimento de diversos medicamentos. Como exemplo, os primeiros protótipos de medicamentos a partir de micromoléculas puras de plantas vasculares isolados foram a morfina (1), digitoxina (2), ácido salicílico (3), efedrina (4), atropina (5), e quinina (6). Além disso, as plantas continuam a ser fontes importantes de novos medicamentos como, por exemplo, galantamina (7), paclitaxel (8) e artemisinina (9) (Figura 7) (ROBBERS *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 2006).

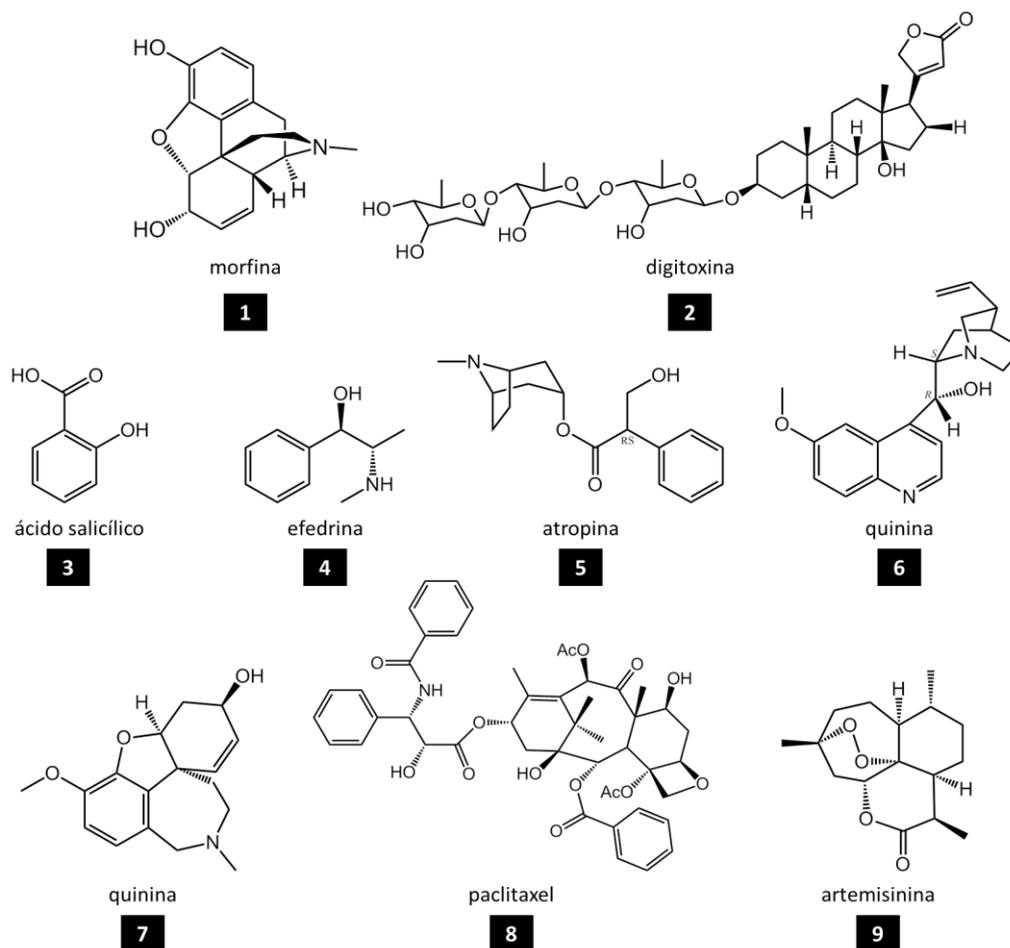
As ações de transformações são os principais mecanismos para obtenção de metabólitos especializados em qualidade amostral para estudos que relacionam tanto a compreensão da plasticidade fenotípica, quanto à aplicação farmacológica para uso humano. Essas podem ser divididas em preliminares (técnicas de preparação do material para a extração), principais (técnicas extrativas, fracionamento, purificação e isolamento) e as finais (técnicas de acondicionamentos e embalagens). A aplicação de diferentes técnicas condiciona a obtenção de diferentes padrões micromoleculares. A avaliação dessas técnicas agrupam condições suficientes para aferir e responder hipóteses químico – ecológicas (SIMÕES *et al.*, 2017).

A coleta e a obtenção de plantas de interesse é uma etapa crucial para as análises farmacognósticas. A depender da abordagem e da função utilizada, assim como da especificidade da planta, esses materiais vegetais coletados podem ser aplicados nas formas secas ou frescas (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Para entender o metabolismo e sua complexidade no *status quo* é preciso obter esse material na sua forma fresca. Para de fato expressar as condições naturais pela qual essa planta está condicionada, no entanto, é empregada a criopreservação (refrigeração do material) como técnica de estabilização temporária ou extração simultânea em campo. Para garantir a estabilização do metabolismo a longo prazo (aumento do tempo de armazenamento) é empregada técnicas de termoestabilização (redução da água por secagem). Após o processo de secagem esse material vegetal recebe o nome de droga vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2014; SIMÕES *et al.*, 2017; BRASIL, 2019a).

Conceitualmente, o termo droga vegetal é empregado para plantas medicinais, ou suas partes, que contenham as substâncias de interesse, ou classes de substâncias químicas que são responsáveis pela ação terapêutica, após terem passado por processos de coleta, estabilização, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (OLIVEIRA *et*

al., 2014). Durante anos foi discutido o emprego da terminologia droga vegetal ou planta medicinal. Entende-se que o uso está condicionado a aplicação e o destino final desse produto (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Figura 7- Estruturas de micromoléculas bioativas obtidas a partir de espécies vegetais, como protótipos (1 – 6) e na produção de medicamentos (7 – 9).



A preparação das amostras é um passo crucial na análise de plantas, pois é necessário extrair as substâncias desejadas para posterior separação e caracterização de misturas de substâncias micromoleculares. Técnicas diferentes podem gerar alterações drásticas nas composições químicas de mesmo material químico obtido. Recentemente, protocolos de metabolômica foram estabelecidos para os processos extrativos (FUNARI *et al.*, 2013; PILON *et al.*, 2020). Métodos tradicionais, como maceração e extração por Soxhlet são comumente usados. Métodos mais modernos vêm sendo estudados desenvolvidos em termos de rendimento

e preservação das micromoléculas, tais como extração assistida por micro-ondas (MAE), extração assistida por ultrassom (UAE) e extração por fluido supercrítico (SFE). Além disso, modificações nos métodos são continuamente desenvolvidas. Com esse leque de possibilidades a seleção do método de extração adequado precisa de uma avaliação meticulosa (HUEI, 2002; SIMÕES *et al.*, 2017).

Os produtos da extração são denominados de extratos vegetais. Esses são misturas complexas de substâncias que poderão apresentar consistência líquida, sólida ou viscosa. Sua composição pode apresentar padrões diferentes de volatilidade a depender do método empregado. Alguns extratos recebem nomes específicos de acordo com a sua forma de obtenção. Por exemplo, extração por fluido supercrítico, a depender das condições estabelecidas, os produtos poderão ser conhecidos como óleos voláteis (SIMÕES *et al.*, 2017), enquanto que o mesmo material extraído pelo processo de hidrodestilação é denominado óleo essencial. As classificações teóricas ficam mais estreitas em alguns casos específicos, apesar de ser uma mistura complexa de substâncias, os óleos essenciais (*i.e.* óleos etéreos) são distanciados pela maioria dos autores do termo extrato (GUENTHER, 2014; SIMÕES *et al.*, 2017).

A origem da terminologia “óleo essencial” é derivada da compreensão da filosofia grega sobre a matéria absoluta, que divide em quatro porções: fogo, terra, água e ar. Nessa divisão existia ânima, a alma, que seria a quinta *essência* (elemento) do ser vivo, que a olho nu não poderia ser visto. O uso do termo *óleo* foi construído pelas características líquidas viscosas (oleaginosas) apresentadas em temperatura ambiente. Esse termo continua sendo empregado até os dias atuais (GUENTHER, 2014).

Os óleos essenciais (OEs) são voláteis, termolábeis, lipofílicos, solúveis em solventes não polares e em alcoóis. Suas características físico-químicas são importantíssimas para diferenciações das propriedades de óleos fixos (derivados de ácidos graxos). A *International Organization for Standardization* (ISO, n. 9235 de 2013) descreve que as únicas formas de obtenção dos óleos essenciais de diferentes órgãos vegetais são por técnicas de hidrodestilação, destilação a seco ou arraste a vapor. Somente o caso específico dos pericarpos dos frutos cítricos poderá ser obtido por expressão (SIMÕES *et al.*, 2017).

Os óleos essenciais (OEs) são constituídos por substâncias, principalmente, da classe dos terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos e raramente diterpenos) e os derivados de arilalcanos, tais como os arilpropanoides (C₆-C₃), além de C₆-C₁, C₆-C₂, e C₆-C₄, entre outros).

Os terpenoides são derivados de difosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de *E,E*-dimetilalila (DMAPP), que são unidades prenílicas de cinco carbonos. A partir dos precursores ativados, haverá condensação sequencial gerando o *2E*-difosfato de geranila (GPP, C₁₀), *2E,6E*-difosfato de farnesila (*E,E*-FPP, C₁₅), *2E,6E,10E*-difosfato de geranilgeranila (*E,E,E*-GGPP, C₂₀). Reações subsequentes catalisadas pela enzima terpeno sintase (TPS) geram os esqueletos olefinicos dos monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀), respectivamente. A condensação em pares de FPP e GGPP ou GFPP, geram as classes de triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀) e sesterterpenos (C₂₅), respectivamente, não encontrados em OEs (DEWICK, 2002; YU; UTSUMI, 2009; ABBAS *et al.*, 2017; BERGMAN *et al.*, 2019; NAGEGOWDA; GUPTA, 2020; LI; GUSTAFSON, 2021).

Nas plantas superiores tem sido descritas duas vias independentes para produção de terpenoides, localizadas em diferentes compartimentos intracelulares (citossol, peroxissomo, retículo endoplasmático e plastídeos). Essas duas vias independentes para produção de terpenoides são divididas em: via clássica de acetato-mevalonato (MVA), que se inicia a partir da condensação da acetil-CoA (citossol e retículo endoplasmático); via do fosfato de metileritritol (MEP), que origina-se a partir de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato (GA-3P), presente nos plastídeos (CHENG *et al.*, 2007; ABBAS *et al.*, 2017; NAGEGOWDA; GUPTA, 2020; LI; GUSTAFSON, 2021). Para o fornecimento de IPP para a biossíntese de terpenoides, as duas vias cooperam entre si (ABBAS *et al.*, 2017; NAGEGOWDA; GUPTA, 2020).

Diversas espécies aromáticas são ricas em OEs e possuem extratos com potencial para busca por novos fármacos, para o desenvolvimento de fitoterápicos e para a padronização de princípios ativos em insumos e drogas vegetais. A análise farmacognóstica é um caminho que auxiliará nesse desenvolvimento. A família Piperaceae vêm despertando os olhares e recebendo atenção especial pela sua alta plasticidade fenotípica, atividades biológicas e importância ecológica. Por esse motivo, as espécies dessa família são apontadas como fortes candidatos para descobertas de novas aplicações e atividades farmacológicas (CRAGG; NEWMAN, 1997; RAMOS; MOREIRA, 2018; RAMOS *et al.*, 2020).

1.6 Piperaceae Giseke

As espécies da família Piperaceae apresentam ampla utilização medicinal, com cerca de 3.600-3.700 espécies ao redor do mundo, distribuídas em 4 gêneros que variam de acordo com

o sistema de classificação: *Manekia* Trel., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Piper* L. e *Verhuellia* Miq. (CHASE *et al.*, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2021;). Seus representantes apresentam distribuição pantropical, sendo encontrados na América Central e na América do Sul (JARAMILLO; MANOS, 2001). Morfologicamente são ervas, subarbustos, arbustos ou arvoretas, além de lianas/volúveis/trepadeiras com hábitos rupícola, terrícola e epífita (YUNCKER, 1972).

No Brasil, registram-se 459 espécies com ampla dispersão, sendo a maior ocorrência na região Sudeste, em segundo lugar a região Norte (Amazonas, Rondônia, Tocantins), seguida do Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco) e Centro-Oeste. Os seguintes domínios fitogeográficos possuem registro de ocorrência de espécies: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (GUIMARÃES *et al.*, 2021).

Os representantes dessa família são utilizados há Séculos como aromatizantes, ornamentais, condimentos, inseticidas, na medicina, em rituais, entre outros. As grandes navegações, período assim denominado devido às grandes expedições marítimas realizadas por europeus entre os Séculos XV e XVI, levou à busca desenfreada por especiarias. Entre as mais procuradas encontrava-se a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) considerado artigo de luxo até o Século XVII. Era usada como moeda constituindo heranças, dotes e reservas de capital, além das diversas propriedades medicinais que lhe possibilitaram estar presente nas diversas farmacopeias mundiais. Dessa *P. nigrum* foi isolada, no ano de 1918, a primeira micromolécula de Piperaceae, a piperina (PARMAR *et al.*, 1997).

Até os dias atuais, os trabalhos em produtos naturais com Piperaceae têm levado à descoberta de substâncias pertencentes a diferentes classes, com destaque para alcaloides, amidas, arilpropanoides, derivados de ácido benzóico, lignanas, neolignanas, α -pironas, terpenos e flavonoides (SENGUPTA; RAY 1987; PARMAR *et al.*, 1997; MEDEIROS; GUIMARÃES 2007; Scott *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2012; FACUNDO *et al.*, 2012; GUTIERREZ *et al.*, 2013; PARRA *et al.*, 2013; CHANDRA *et al.*, 2015; MACEDO *et al.*, 2017; MONZOTE *et al.*, 2017; SALEHI *et al.*, 2019). No Brasil, o gênero *Piper* merece destaque pela riqueza de espécies medicinais e ritualísticas.

1.6.1 Diversidade química e atividade biológica no gênero *Piper* L.

Piper L. está distribuído por toda a região Pantropical (Figura 8) e possui cerca de 2.000 espécies (QUIJANO-ABRIL *et al.*, 2006), que podem ser encontradas nas Américas (cerca de 700 espécies), Sul da Ásia (cerca de 300 espécies), Pacífico Sul (cerca de 40 espécies) e África (cerca de 15 espécies) (MONZOTE *et al.*, 2010). *Piper* é constituído por 292 espécies nativas, das quais 184 são endêmicas do Brasil com ampla distribuição e ocorrência em todos os biomas e regiões do país (GUIMARÃES *et al.* 2021). Em todo o mundo, este gênero é utilizado para diversos fins, principalmente medicinal, aromatizante e tempero.

Figura 8 - Distribuição de Piperaceae no mundo.



Fonte: MOBOT (2020)

As características que diferenciam *Piper* de outros gêneros em Piperaceae, entre outros, é o hábito arbóreo-arbustivo (MEDEIROS; GUIMARÃES, 2007). Ecologicamente, *Piper* apresenta um papel importante nas diversas relações de mutualismo planta-planta e planta-inseto. A dispersão das sementes de *Piper* é realizada por pássaros e morcegos, e a polinização é feita por abelhas, insetos dípteros, entre outras espécies (Figura 9) (DYER; PALMER, 2004; CÁCERES; KATO, 2014).

Os registros de uso etnofarmacológico de *Piper* no Brasil datam de 1827 na “Flora Fluminense” de Velloso e na “Flora Brasiliensis” de Miquel (1852). *Piper aduncum* L., *Piper callosum* Ruiz & Pavon, *Piper gaudichaudianum* Kunh, *Piper divaricatum* G. Mey. e *Piper*

umbellatum L. são as espécies mais importantes utilizadas para muitos fins terapêuticos, como doenças associadas ao trato intestinal, respiratório, doenças do sangue e para o tratamento de feridas (SALEHI *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2017).

As espécies de *Piper* apresentam uma diversidade química bioativa significativa, incluindo alcaloides, amidas, aristolactamas, cromenos, derivados do ácido benzóico, flavonoides, lignoides (neolignanos e lignanos) e terpenoides (SENGUPTA; RAY 1987; KATO; FURLAN, 2007; SCOTT *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2016; GUTIERREZ *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2019; SALEHI *et al.*, 2019).

Figura 9 - Interações ecológicas planta-animal observada em *Piper* L.



Legenda: A, B e C - morcego; D – pássaro; E e F – insetos.

Fonte: A – C (NYBG, 2021); D (WOEHL-JUNIOR, 2021); E e F (RAMOS, 2006).

Os diferentes órgãos de *Piper* apresentam um potencial multialvo para uma alta gama de atividades biológicas associadas aos extratos, frações, OEs e substâncias puras. Muitas dessas atividades estão relacionadas a estudos *in vitro*; no entanto, existem poucos relatórios sobre estudos *in vivo* e toxicológicos (DYER; PALMER, 2004; SALEHI *et al.*, 2019). Em relação as substâncias de grande ocorrência no gênero, há extensos estudos associados à amida piplartina, devido às suas propriedades anticâncer, contra a neuroinflamação (relacionada às

doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington) e seus benefícios no tratamento de parasitoses, como esquistossomose, malária e leishmaniose (DYER; PALMER, 2004; FELIPE *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2015; CAMPELO *et al.*, 2018; SOUZA-OLIVEIRA *et al.*, 2018; RAJAMAZLAN *et al.*, 2018; SALEHI *et al.*, 2019).

1.6.1.1 Atividade antimicobacteriana em *Piper*

Diversas espécies do gênero *Piper* apresentam uso popular para doenças associadas ao trato respiratório e aplicações sobre infecções em diferentes partes do corpo (BORGES; BAUTISTA, 2010; BORGES, 2016; LEAL *et al.*, 2019).

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo o *M. tuberculosis* o mais frequente, resultando em um problema de saúde global. É a nona doença em causa de mortes, sendo ainda um problema relevante, principalmente nos países em desenvolvimento. Do ponto de vista epidemiológico, estima-se que cerca de 23% da população mundial tenha a TB na sua forma latente. Somente em 2017, estimava-se que 10 milhões de novos casos de TB seriam registrados em todo o mundo, com aproximadamente 1,3 milhões de óbitos. Entre essas mortes, aproximadamente 300.000 foram relacionadas a pessoas positivas para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (OMS, 2020).

O aumento dos casos de desenvolvimento de resistência aos medicamentos no tratamento da TB contribuiu para o agravamento desse quadro em todo o mundo, com a ocorrência de *M. tuberculosis* multirresistente, extensivamente resistente e, atualmente, totalmente resistente, sendo uma ameaça para o controle da doença, o que exige o desenvolvimento urgente de novos e mais eficazes medicamentos. No ano de 2017 foram notificados 558.000 novos pacientes com resistência à rifampicina, quase metade deles ocorrendo na Índia, China e Federação Russa (OMS, 2017).

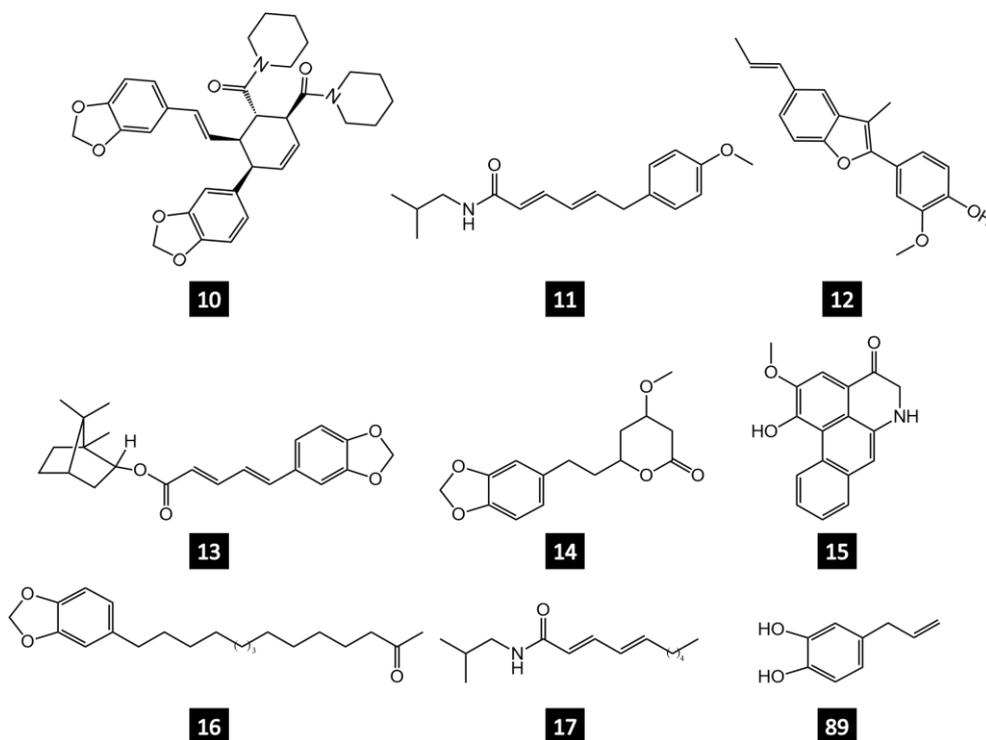
Os OEs e extratos são conhecidos por sua ação antimicrobiana contra uma ampla gama de cepas bacterianas (FERNANDEZ *et al.*, 2019; BOREN *et al.*, 2020). Verificou-se que produtos naturais e seus derivados possuem atividade inibitória contra o crescimento de *M. tuberculosis*, enquanto alguns foram selecionados como moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos agentes anti-TB (TRIPATHI *et al.*, 2005; NAYYAR; JAIN, 2005).

No gênero *Piper* algumas espécies apresentam-se promissoras contra o *M. tuberculosis*. Exemplos são apresentados na tabela 1 e figura 10.

Tabela 1 – Substâncias isoladas de espécies do gênero *Piper* promissoras contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Espécies	Substâncias Isolados	CIM (µg/mL)	Referência
<i>Piper chaba</i> Hunter	Chabamida (10)	12,5	RUKACHAISIRIKUL <i>et al.</i> , 2002
<i>Piper corcovadensis</i> (Miq.) C. DC.	Piperovatina (11)	7,8	FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2019
<i>Piper regnellii</i> (Miq.) C. DC.	Eupomatenoide-5 (12)	1,9	SCODRO <i>et al.</i> , 2013
<i>Piper pedicellatum</i> C. DC.	(+)-Propionato de bornila (13)	25,0	RUKACHAISIRIKUL <i>et al.</i> , 2004a
	5,6-Diidro-7,8-diidrometisticina (14)	4,0	
<i>Piper sanctum</i> Miq.	Piperolactama A (15)	8,0	MATA <i>et al.</i> , 2004
	2-Oxo-16-(3',4'-metilenodioxifenil) hexadecano (16)	6,25	
<i>Piper sarmentosum</i> Roxb.	Pellitorina (17)	25,0	RUKACHAISIRIKUL <i>et al.</i> , 2004b
<i>Piper taiwanense</i> Lin & Lu	4-(Prop-2-enil) l-catecol (18)	27,6	CHEN <i>et al.</i> , 2014

Figura 10 - Estruturas de micromoléculas bioativas obtidas a partir de espécies do gênero *Piper* contra *Mycobacterium tuberculosis*.



1.6.1.2 Atividade antifúngica em *Piper*

Os fungos do gênero *Candida* são as leveduras mais associadas às infecções humanas, sendo considerada uma das infecções fúngicas oportunista mais perigosa. O gênero *Candida* compreende mais de 150 espécies heterogêneas, no entanto, apenas cerca de 20 são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em humanos e animais (MASSA *et al.*, 2018). É descrito na literatura que durante as últimas três décadas, o número de infecções fúngicas causadas por leveduras de *Candida* spp. aumentou dramaticamente, principalmente devido ao aumento no número de pacientes imunocomprometidos (SZWEDA *et al.*, 2015). Atualmente, sabe-se que a candidíase representa a quarta causa principal de infecções hospitalares, com 8–10%, e a mortalidade por candidíase sistêmica permanece alta, variando de 15 a 35% dependendo da espécie infectante de *Candida* (HENRIQUE; WILLIAMS, 2020). Essa infecção possui implicações graves que podem ser explicadas por fatores de virulência intrínsecos ao microrganismo, em particular, *C. albicans* e *C. glabrata* que desenvolveram um extraordinário conjunto de estratégias para tais fins, incluindo a formação de biofilme e a conversão morfológica ou dimorfismo, além de resistência aos fármacos de escolha para o tratamento

(KUMAR *et al.*, 2020). *C. glabrata*, atualmente, ocupa o segundo ou terceiro lugar como agente causador de infecções superficiais orais, esofágicas, vaginais ou urinárias (KUMAR *et al.*, 2020).

Os agentes antifúngicos usados atualmente possuem uma elevada toxicidade e baixa biodisponibilidade. Por exemplo, as equinocandinas como a caspofungina só podem ser administradas por via intravenosa, os polienos como a anfotericina B são tóxicos e caracterizados por baixa solubilidade em água. O tratamento com azóis, por exemplo, fluconazol ou voriconazol, frequentemente, resultam na aquisição de resistência entre os agentes fúngicos etiológicos (SZWEDA *et al.*, 2015; MASSA *et al.*, 2018). Além disso, as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* são intrinsicamente resistentes ao fluconazol e outros azóis, e a frequência de isolamentos de cepas resistentes dessas duas espécies aumentou significativamente. Assim, é urgente a busca por novos antifúngicos que possam ser utilizados tanto no tratamento como na prevenção de infecções por leveduras do gênero *Candida*. A alternativa mais promissora para o tratamento convencional são substâncias derivadas de plantas e várias espécies do gênero *Piper* possuem indicativo de uso popular para tratamento de infecções urinárias e orais.

Os OEs foliares de algumas espécies de *Piper* já apresentaram atividades promissoras. Pode-se citar aqueles que apresentaram inibição de crescimento de *Candida albicans* e *C. tropicalis* quando avaliados pelo ensaio de difusão em ágar, nos quais, os OEs são ricos em sesquiterpenos, como o de *P. cernuum* (biciclogermacreno (21,9%), β -cariofileno (20,7%) e α -pineno (20,2%)); e *P. diospyrifolium* seus OE foliares ricos em *cis*-eudesma-6,11-dieno (21,1%), β -cariofileno (16,8%) e γ -muuroleno (10,6%) (SILVA *et al.*, 2017). Como também com monoterpenos de *P. regnelli* (mirceno (52,6%), linalol (15,9%) e β -cariofileno (8,5%)) (SILVA *et al.*, 2017; SALEHI *et al.*, 2019). No entanto, ainda é incipiente os estudos sob cepas resistentes aos fármacos de escolha.

1.6.2 *Piper gaudichaudianum* Kunth

Piper gaudichaudianum Kunth (Sin. *Artanthe gaudichaudiana* (Kunth) Miq.; *Piper obscurum* C.DC.) (Figura 11) é uma espécie da família Piperaceae, nativa da América do Sul (GUIMARÃES, 2020; QUEIROZ; GUIMARÃES, 2020) e definida como nuclear por ser amplamente distribuída no Brasil, principalmente, na Floresta de Mata Atlântica. Seu nome foi dado em homenagem a Charles Gaudichaud-Beaupré (1789-1854) naturalista francês e circunavegador do mundo, como “*pharmacien em chef de la Marine*” (GUIMARÃES, 2020; QUEIROZ; GUIMARÃES, 2020).

Essa espécie é um arbusto pubescente que chega até 4 m altura. Possui ramos com muitos tricomas retrorsos. Suas folhas são largamente elípticas, ovadoelípticas a lanceoladas, com ápice acuminado a falcado, base assimétrica, aguda a obtusa, com perfilo em capuz, caduco, face adaxial fortemente escabrosa, face abaxial escabriúscula a pubescente, com numerosos tricomas adpressos nas nervuras; nervação camptódroma na base, acródroma no ápice, com 4-5 nervuras secundárias de cada (BARDELLI, 2008; ALBIERO *et al.*, 2005). Em nível de importância ecológica essa espécie exerce papel significativo dentro de seu habitat natural como fonte nutricional ou como participantes de diferentes interações bióticas (RAMOS *et al.*, 2009; SALAZAR *et al.*, 2016; RICHARDS *et al.*, 2016). Em nichos ecológicos ocorrentes em florestas úmidas suas folhas e frutos são alimentos para diferentes insetos (LAROCA; LAUER, 1973; PENZ; ARAÚJO, 1990; BRAGA *et al.*, 2001; FIGUEIREDO; SAZIMA, 2000; PEREIRA *et al.*, 2019) e outros animais (MIKICH *et al.*, 2003; BIEBER *et al.*, 2004; PARRINI *et al.*, 2017). Na literatura existem estudos que correlacionam essa espécie e sua importância na alimentação, reprodução e o efeito populacional de várias espécies de morcegos da Floresta de Mata Atlântica brasileira (MARINHO-FILHO, 1991; ALMEIDA, 2005; LEINER; SILVA, 2007; BARRO *et al.*, 2013; SILEISER-MILLER *et al.*, 2020; MIKICH, 2002; MIKICH *et al.*, 2003; LIMA; REIS, 2004; BIANCONI *et al.*, 2007; MELLO *et al.*, 2008; BIANCONI *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2013).

Figura 11 - Fotomacrografia de *Piper gaudichaudianum* Kunth, com detalhe das inflorescências.



Fonte: o autor (2020)

P. gaudichaudianum é conhecida popularmente no Brasil como “Jaborandi”, “Falso-jaborandi” e “Pariparoba”. É descrita como espécie medicinal desde o século XIX (VON MARTIUS, 1859). Estudos etnobotânicos apontam que as infusões e a mastigação das folhas frescas são empregadas para aliviar dores dentárias (DI STASI *et al.*, 2002a; 2022b). O chá das folhas é empregado como colagogo, digestivo (SOMAVILLA; CANTO-DOROW, 1996), contra tumor (ZUCHIWSCHI *et al.*, 2010), dores articulares e para o tratamento de doenças musculoesqueléticas (BOLSON *et al.*, 2015). As tinturas são utilizadas para tratamento de doenças da pele, ouvido, nariz e orofaringe (BOLSON *et al.*, 2015). *P. gaudichaudianum* é conhecida popularmente como aromática e é um dos principais adulterantes da espécie medicinal comercial *Pilocarpus jaborandi* Holmes (Rutaceae) (BRANDÃO *et al.*, 2013).

No compêndio de Florais de Saint Germain, a essência de *P. gaudichaudianum* (Figura 12) é indicada para “relaxamento” e diminuição da “rigidez mental” (MARGONARI, 1999). Essa espécie também é ritualística, conhecida como “Ìyèyé” nas religiões de matriz afro-brasileiras (BARROS, 2015). É empregada na defumação e preparações dos banhos e bebidas fermentadas para iniciação à divindade, orixá Xangô (GUEDES *et al.*, 1985; BARROS, 2015). Para os rituais nessa religião existe um elevado rigor no que tange a hora e a forma de

coleta/colheita das folhas (BARROS, 2015). Por exemplo, para o orixá Xangô, folhas podem ser obtidas entre 12 às 18 h (RUANDA, 1954). No entanto, poucos são os estudos que avaliam as variações em escala temporal no ambiente de cultivo ou selvagem para essa espécie.

Estudos fitoquímicos descrevem para essa espécie substâncias voláteis, principalmente, OEs. Nos seus extratos foi possível identificar álcool terpênicos (PERÉS *et al.*, 2006a; PERÉS *et al.*, 2006b), fitoesteroides (PERÉS *et al.*, 2006a; PERÉS *et al.*, 2006b), vitamina E (tocoferol) (PERÉS *et al.*, 2006a; PERÉS *et al.*, 2006b), ácidos graxos (PERÉS *et al.*, 2006a; PERÉS *et al.*, 2006b), triterpenos (RORIG; VON POSER, 1991), flavonoides (RORIG; VON POSER, 1991), alcaloides (RORIG; VON POSER, 1991), cromenos (RAMOS *et al.*, 2009; BATISTA, 2008) e derivados prenilados de isômeros do ácido benzóico (LAGOS *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2011). Os dados farmacológicos mencionados na literatura incluem atividades antifúngica, antibacteriana, inseticida, larvicida, analgésica, antiinflamatória, antileishmania e antituberculose (PARMAR *et al.*, 1997; MOREIRA *et al.*, 2001, DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LAGO *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2007; PUHL *et al.*, 2011; BERNUNCI *et al.*, 2016; CHAABAN *et al.*, 2018; FINATO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2020).

Os OEs dessa espécie contêm teores elevados de monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanoides (VON POSER *et al.*, 1994; ANDRADE *et al.*, 1998; MORAIS *et al.*, 2007; PÉRES *et al.*, 2009; SPEROTTO *et al.*, 2013; KRINSKI; FOERSTER, 2016; SCHINDLER; HEINZMANN, 2017; CHAABAN *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020). No entanto, existem poucas abordagens com a finalidade de analisar a plasticidade fenotípica química em *P. gaudichaudianum*. Observando a importância medicinal, ritualística, ecológica e a ampla distribuição espacial no Brasil, faz-se necessário lançar luz sobre padrões de quimiodiversidade e fatores envolvendo a quimiogeografia para essa espécie de Piperaceae. Ressalta-se que não existe até o presente momento descrições sobre as variações químicas dos OEs das folhas dessa espécie sob influência do ritmo circadiano, além de não haver registros dessas abordagens em Floresta de Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro (Brasil).

1.6.3 *Piper multinodum* C. DC.

Piper multinodum C. DC. (Figura 12), conhecida popularmente como jaborandi-manso, é uma planta com incidência na Região Sudeste, especificamente, em biomas brasileiros como Cerrado e Mata Atlântica. Possui ocorrência restrita, mas não consta no livro vermelho da flora do Brasil (CNCFLORA, 2021). A espécie tem forma de arbusto com caule em crescimento ereto, e ausência de tricomas. As folhas possuem pecíolo com bainha canaliculada, superfície lisa, glândulas inconspícuas/translúcidas, limbo com formato lanceolado, ápice acuminado/falcado acuminado, base simétrica, tricoma glabra na face adaxial e abaxial e nervação eucamptódroma. Possui nervura até a porção mediana/ acima da porção mediana. A inflorescência é ereta em espiga. Flor com forma das brácteas florais triangulares/subpeltadas; margens das brácteas florais glabras. Fruto com formatos e superfícies obpiramidais trigonais; ápice convexo; estiletos inconspícuos/ausentes/estiletos sésseis com 3 estigmas; com ausência de tricomas. Essa espécie pertence ao grupo taxonômico IV, mesmo de *P. gaudichaudianum*, o que aproxima morfologicamente as duas espécies escolhidas para esse estudo (GUIMARÃES *et al.*, 1994; GUIMARÃES, 2020b).

Até o momento não há nenhum estudo científico botânico, químico, farmacológico e/ou toxicológico sobre esta espécie. Por ser de ocorrência restrita, *P. multinodum* podem contribuir para a resiliência dos ecossistemas, pois suas funções sobrepostas aumentam a confiabilidade de uma função diante de mudanças ambientais (KUBITZKI; GOTTLIEB, 1984). Segundo Gottlieb e colaboradores (1996), os metabólitos especiais avaliados na perspectiva de linguagem química tendem a modular-se e diversificar-se em espécies satélites (espécies de ocorrências restritas), principalmente, em ambientes com elevadas pressões ecológicas, como é o caso do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO), que apresenta padrões de altitude elevada.

Figura 12 - Fotomacrografia de *Piper multinodum* C.DC.



Fonte: o autor (2020)

Com base no exposto na **Introdução** e na **Revisão da Literatura**, aprofundar na questão sobre quimiodiversidade em Piperaceae torna-se extremamente relevante. Definir padrões a partir da composição química dos OEs de *P. gaudichaudianum* e de *P. multinodum* poderá contribuir para o entendimento da variabilidade fenotípica química dessas duas espécies, bem como apresentar novas idéias em relação ao gênero *Piper*.

A escolha dessas duas plantas não foi aleatória, tendo sido pautada na distinção referente ao comportamento ecológico (nuclear vs. satélite) e semelhanças em padrões morfológicos. Ainda, embora *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* pertençam a fragmentos de Mata Atlântica, a primeira foi coletada em região de baixa altitude e a segunda em região de grande altitude. Validar modelos de estudos em Quimiofenética para uma planta de uso consagrado medicinal e ritualístico, e para outra ainda intocada dos pontos de vista químico e/ ou farmacológico também contempla uma proposta mais ampla e que tem sido discutida sobre estudos em plantas medicinais vs. plantas ainda não descobertas pela população para uso medicinal. Trata-se da velha discussão do estudo químico/ biológico com abordagem em similaridades quimiotaxonômicas e do estudo com base em etnopharmacologia. Qual seria a abordagem mais interessante? Usar esses conceitos isolados ou combinados para escolha do material vegetal? Não nos preocupamos com isso, desde que espécies vegetais de um mesmo clado possam servir de modelo para validar hipóteses em ecofisiologia; permitir a compreensão do uso em rituais religiosos; e trazer benefícios terapêuticos para a humanidade. Em se tratando desse último tópico, os modelos de estudos com bactérias foi escolhido por serem de fácil

execução, por termos parceiros que desenvolvem esses estudos e pelas bactérias escolhidas causarem enormes prejuízos à saúde, sendo as doenças que causam consideradas negligenciadas. Mais uma vez, escolhemos trabalhar com tema de saúde relevante para o Brasil, um país em desenvolvimento.

Portanto, este trabalho está centrado em três frentes principais: (1) *Estudos em ecofisiologia com base na química*; (2) *Estudos em Quimiofenética*; (3) *Estudos biológicos 'in vitro'*. Dessa forma, estão contempados os preceitos *lato senso* da Farmacognosia ou poderíamos chamar de *Neofarmacognosia*, termo que precisa ser discutido e que poderá gerar muitos debates. Convidamos a todos para essa incrível viagem que é o estudo de duas espécies de Angiosperma basal, portanto, modelo ideal para aplicação de novos e modernos conceitos de estudo em Química de Produtos Naturais, pautados no tripé **importância social, bioeconômica e ambiental**.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar as composições químicas voláteis de *Piper gaudichaudianum* L. e de *Piper multinodum* C. DC. coletadas de espécimes silvestres em diferentes acessos no Estado do Rio de Janeiro e cultivadas em casa de vegetação, com finalidade de determinar aspectos Quimiofenéticos e Farmacognósticos.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Realizar coleta de folhas, caules e raízes de *P. gaudichaudianum* no Parque Nacional da Tijuca - Rio de Janeiro/ RJ;
- II. Realizar coletas de raízes, caule (caule principal), galhos (caule secundário), folhas, inflorescência e infrutescência de *P. multinodum* no Parque Nacional da Serra dos Órgãos – Teresópolis/RJ;
- III. Realizar coletas mensais de folhas de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* no Parque Nacional da Tijuca - Rio de Janeiro/ RJ e Parque Nacional da Serra dos Órgãos – Teresópolis/RJ, respectivamente, em trezes meses do ano (estudo sazonal);
- IV. Realizar coletas de folhas de 3 em 3 h por 24 h de folhas nas estações chuvosa e seca de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* no Parque Nacional da Tijuca - Rio de Janeiro/ RJ e Parque Nacional da Serra dos Órgãos – Teresópolis/RJ, respectivamente, de acordo com o ritmo circadiano;
- V. Cultivar os espécimes silvestres de *P. gaudichaudianum* coletadas a campo em casa de vegetação pelo método de estaquia, com finalidade de obter primeira e segunda geração;
- VI. Realizar a extração dos óleos essenciais por hidrodestilação das amostras de folhas dos estudos sazonais e circadianos coletados em campo dos diferentes órgãos vegetais e dos cultivados em casa de vegetação (1ª e 2ª gerações) de *P. gaudichaudianum*;
- VII. Verificar variações na composição química dos óleos essenciais dos materiais dos diferentes estudos com os espécimes, correlacionando-as estatisticamente com os fatores edafo-climáticos;

- VIII. Determinar possíveis quimiotipos para *P. gaudichaudianum* a partir de correlações estatísticas entre os resultados obtidos neste trabalho e dados publicados na literatura;
- IX. Desenvolver e colocar à prova de conceito metodologia preditiva e índices para determinar padrões de quimiodiversidade α e β e Quimiofenéticos a partir dos óleos essenciais de *P. gaudichaudianum* e de *P. multinodum*.
- X. Avaliar *in vitro* a atividade dos óleos essenciais de diferentes órgãos vegetais de *P. multinodum* contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC, 25618).
- XI. Avaliar *in vitro* a atividade de óleos essenciais de folhas de *P. multinodum* dos estudos sazonais contra isolado *Candida glabrata* resistente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

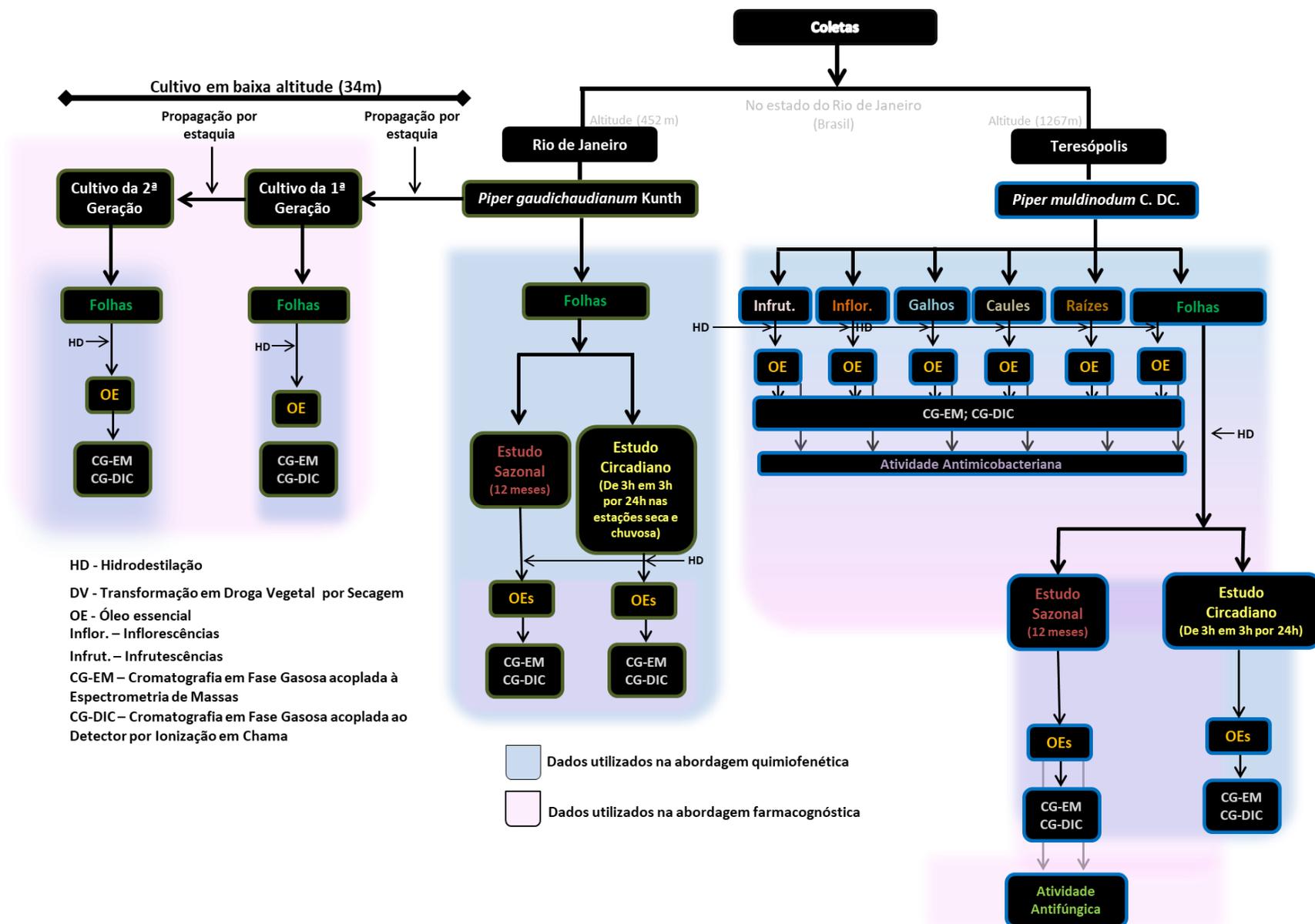
Esse estudo é delimitado por duas abordagens principais: (1) Quimiofenética e (2) Farmacognóstica. Essas envolvem as realizações de coletas, cultivos, aplicação de técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos, atividades antimicrobiana e antifúngica e identificação química das substâncias presentes em misturas voláteis. As etapas estão graficamente representadas no fluxograma da figura 13.

3.1 Identificação das espécies e áreas de coletas

Diferentes órgãos vegetais foram coletados de espécimes adultos de *Piper gaudichaudianum* Kunth (estacas caulinares, folhas, caules e raízes) e de *Piper multinodum* C. DC¹ (estacas caulinares, folhas, caules (caules principais), galhos (caules secundários), raízes, inflorescências e infrutescências). Os espécimes apresentaram-se entre 1 a 4 m de altura em regiões de Floresta de Mata Atlântica nas cidades do Rio de Janeiro e Teresópolis, no Estado do Rio de Janeiro, respectivamente. As coletas foram feitas sob licenças concedidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (número 57296-4 - código de autenticação 47749568); A licença para acesso ao Patrimônio Genético para pesquisa e desenvolvimento tecnológico foi concedida pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob os números AE20045 (*P. gaudichaudianum*) e A001E32 (*P. multinodum*). As identificações botânicas foram realizadas pela Dr^a Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) e amostras herborizadas foram depositadas no Herbário RB/JBRJ e no Herbário da UERJ (HRJ), localizações e número de registro descritos na Tabela 2.

¹ Esta espécie nunca foi estudada. Por esse motivo optou-se por submetê-la a diferentes metodologias de investigação. Esse fato justifica os diferentes padrões de coletas em comparação com *P. gaudichaudianum*.

Figura 13 - Fluxograma de atividades desenvolvidas para elaboração dessa Tese.



As coletas foram realizadas de outubro de 2018 até junho de 2021. Durante as coletas foi realizado o registro se o vegetal estava no estado vegetativo (sem a presença de órgãos reprodutores) ou em período de reprodução (constatação da presença de inflorescências e infrutescências) (RAMOS, 2020). O estado de herbivoria, bem como a presença de alterações incomuns nas diferentes partes vegetativas também foram registrados.

Tabela 2 – Descrição de localização e número de registro de herbários de *Piper gaudichaudianum* (PG) e *Piper multinodum* (PM) no Estado do Rio de Janeiro.

Cidade	Localização	Espécie	Latitude / Longitude	Altitude	Registro nos Herbários	
Teresópolis	Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Ao lado da casa dos pesquisadores, direcionada ao Caminho para o Órgão do Sino.	PM	22°27'0" S/ 42°59'20" O	1.267m	JBRJ	RB01426180
					UERJ	HRJ13541
Rio de Janeiro	Parque Nacional da Tijuca. Trilha para o Parque Municipal do Rio de Janeiro.	PG	22°58'12" S/ 43°14'30" O	452 m	JBRJ	RB01319723
					UERJ	HRJ13450

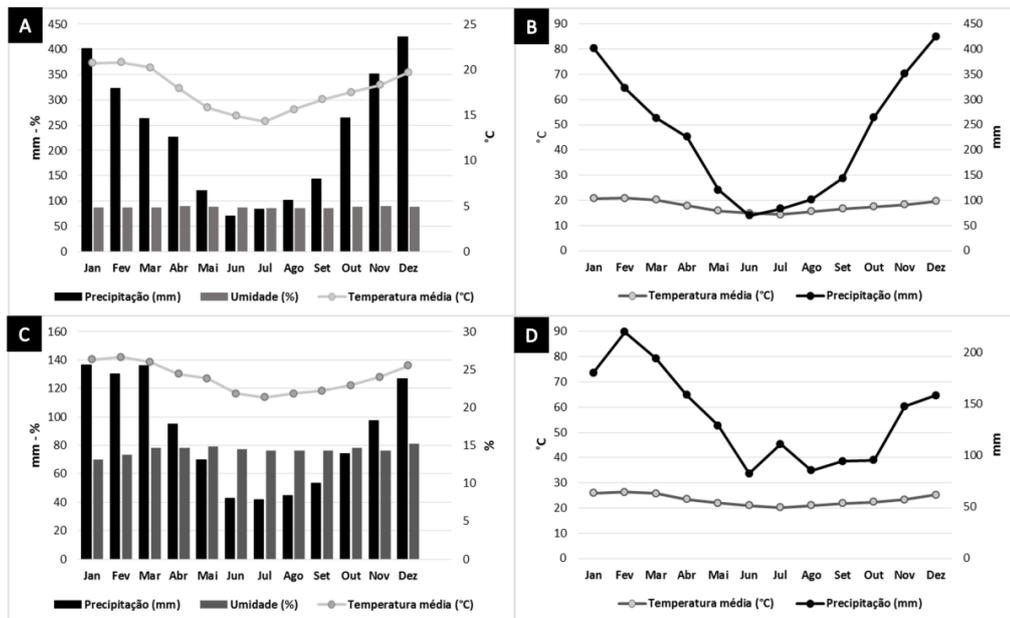
3.1.2 Análises da composição do solo e dados climáticos

Para análise da composição química dos macro- e micronutrientes dos solos das regiões de coletas foram amostrados cinco pontos próximos ao acesso de cada espécime, em ambas áreas de coletas (Rio de Janeiro e de Teresópolis), conforme descrito por Arruda *et al.* (2014). Foram realizadas uma (01) e treze (13) coletas de solo, em janeiro de 2017 e janeiro de 2019 a janeiro de 2020 para *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum*, respectivamente. Análises químicas do solo foram realizadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Divisão de Solos (EMBRAPA – SOLOS) de acordo com Donagema *et al.* (2011). Os dados obtidos estão descritos na tabela 3.

Os dados climáticos das regiões de Teresópolis/RJ e do Rio de Janeiro/RJ foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia para o período das coletas (INMT, 2017; 2020). O diagrama ombrotérmico de Gaussen-Gagnouls referentes às médias mensais no período 1961-1990, para as duas áreas, estão representados na figura 14, e demonstram que não ocorreram

estações do ano definidas nas cidades do estudo. É possível observar apenas períodos mais secos e mais chuvosos. Na cidade do Rio de Janeiro, a região de acesso de *P. gaudichaudianum*, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, possui tipo Am, com clima tropical de monção (PEEL *et al.*, 2016). O clima apresenta pelo menos um mês seco bem definido com precipitação menor que 60 mm, equivalente a mais de 4% da precipitação anual total. No acesso de *P. multinodum*, na cidade de Teresópolis, a precipitação média anual é aproximadamente três vezes maior que no Rio de Janeiro, mesmo em períodos mais secos (junho e julho) o nível de pluviosidade é alto (40 – 150 mm). Essa região possui clima subtropical úmido, com uma temperatura anual média de 17 °C corresponde ao tipo Cfb (Clima oceânico temperado) na classificação climática.

Figura 14 – Média mensal e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) das cidades de Teresópolis e Rio de Janeiro no período de 1961-1990.



Fonte: INMET, 2021.

Legenda: Média mensal (A e C) e diagrama ombrotérmico (B e D) correspondentes à normal climatológica das cidades de Teresópolis (A e B) e Rio de Janeiro (C e D).

Tabela 3– Atributos do solo de cinco áreas de ocorrência de *Piper gaudichaudianum* (PG) e *Piper multinodum* (PM) no Estado do Rio de Janeiro e do substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças[®] utilizado para o cultivo das espécies em casa de vegetação.

Amostras	pH em água	Acidez Total cmolc/dm ³	Al	Ca cmolc/dm ³	Mg	Na	K	P	Cu	Fe	Mn	Zn	C g/kg	N g/kg	Valor S cmolc/dm ³	Valor T	Valor V %	
PG	Janeiro (2017)	4,90	11,88	0,10	2,30	1,30	18,40	276,90	7,54	2,04	29,70	83,50	4,43	44,00	4,30	8,05	19,93	40,39
	Janeiro (2019)	5,90	4,46	1,20	1,60	1,40	20,70	22,40	54,29	0,20	40,70	34,40	3,59	11,00	1,20	3,22	7,57	42,49
	Fevereiro (2019)	6,40	5,46	0,80	2,40	1,20	18,20	42,00	20,21	0,14	46,64	11,40	1,08	14,10	1,20	3,90	9,27	42,08
	Março (2019)	5,70	14,69	1,30	2,60	2,40	17,60	78,00	112,80	0,18	31,10	33,40	2,96	11,00	1,30	5,48	20,08	27,29
	Abril (2019)	4,30	1,32	0,90	2,20	0,50	19,20	28,00	49,55	0,20	43,30	24,30	11,50	14,90	0,50	2,94	4,16	70,58
	Mai (2019)	5,00	2,88	0,90	2,30	0,30	13,00	54,60	5,88	0,56	53,90	21,50	3,93	27,10	2,80	2,94	5,75	51,07
	Junho (2019)	4,30	2,63	0,10	3,40	1,60	29,20	20,90	19,91	0,84	95,00	66,30	11,40	13,20	3,40	5,25	7,73	67,88
PM	Julho (2019)	4,10	2,34	0,10	3,20	0,70	29,90	18,24	73,37	0,78	99,50	22,40	1,76	19,00	2,00	4,14	6,33	65,40
	Agosto (2019)	5,20	3,14	0,30	2,20	0,30	11,50	23,40	38,30	0,65	21,30	10,00	6,21	17,70	1,70	2,67	5,75	46,50
	Setembro (2019)	5,60	2,97	0,20	2,10	0,20	16,90	39,00	2,51	0,11	34,40	18,40	12,40	16,60	0,30	2,58	5,47	47,20
	Outubro (2019)	5,40	2,97	0,00	2,40	0,30	16,10	39,00	3,37	0,17	27,70	23,00	14,40	17,30	0,30	2,98	5,87	50,73
	Novembro (2019)	6,90	1,82	0,90	2,10	0,40	14,60	75,00	26,47	0,11	34,50	37,00	3,84	17,90	0,60	2,95	4,69	62,86
	Dezembro (2019)	5,80	3,47	1,20	1,20	0,50	27,60	50,70	103,80	0,13	66,40	15,80	3,18	10,10	1,00	2,09	5,42	38,60
	Janeiro (2020)	5,80	4,79	0,30	1,00	0,40	20,70	70,20	49,26	0,13	68,40	15,80	3,18	37,40	0,80	1,85	6,54	28,37
	Substrato	5,80	8,91	0,00	14,40	6,90	27,60	557,70	25,33	0,26	23,60	13,70	3,46	107,50	4,20	4,15	6,30	65,93

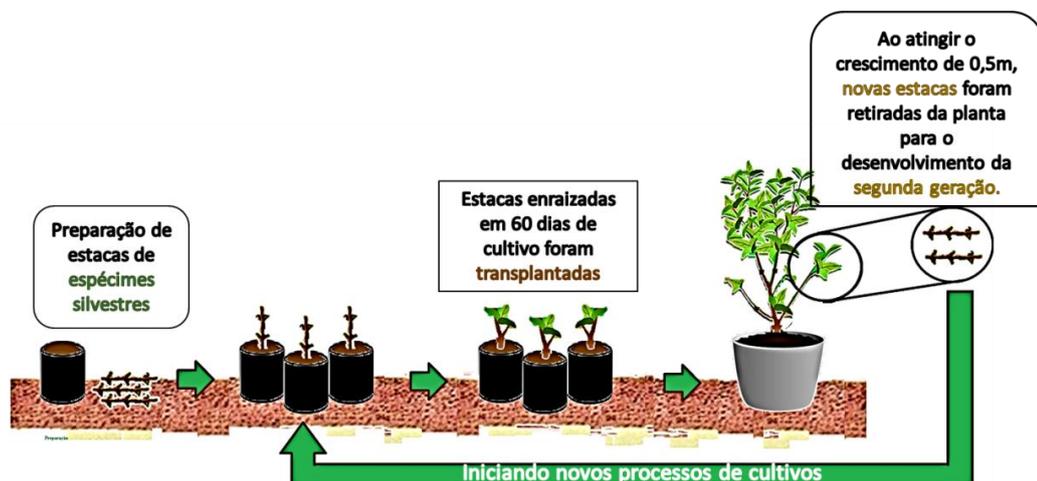
3.2 Estabelecimento do cultivo em casa de vegetação

Os desenhos investigativos sobre o cultivo foram realizados na casa de vegetação do Centro de Responsabilidade Socioambiental do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, localizada nas coordenadas geográficas latitude 22°58'00.7"S e longitude 43°13'43.3"O, em uma altitude de 34m.

As estacas de *P. gaudichaudianum* foram coletadas nos diferentes acessos nos meses de fevereiro de 2017, desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio em concentração de 0,5% (p/v) por 5 min e lavadas com água corrente. Logo após foram secas em jornal à sombra, para retirada do excesso de umidade. As estacas foram enraizadas a 5 cm de profundidade nos tubos de plástico de 1L, com substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças®, por um período de 60 dias. O material foi mantido sob irrigação automática e 70% de sombreamento, até que o sistema radicular estivesse formado, possibilitando o transplântio.

As estacas enraizadas foram transplantadas para vasos de 10 L. Ao atingir 0,5 m novas estacas foram retiradas da planta para o plantio da segunda geração, repetindo o mesmo procedimento, como descrito na figura 15.

Figura 15 – Esquema para o preparo das estacas e cultivo de *Piper gaudichaudianum*.



O delineamento foi casualizado, com doze repetições por espécie, em triplicata, em janeiro de 2018 com os espécimes de *P. gaudichaudianum* e suas gerações sobreviventes, para os cultivos que atingiram altura constante. Nesse momento foram realizadas colheitas dos

diferentes órgãos do vegetal para preparo de extratos e OEs para avaliar as respostas plásticas químicas desses indivíduos fora dos seus habitats (RAMOS, 2020). As análises da composição macro- e micronutrientes do substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças[®] estão apresentadas na tabela 3.

3.3 Materiais coletados e colhidos

Para facilitar o entendimento, as coletas de amostras dos diferentes órgãos vegetais dos espécimes silvestres e cultivadas foram divididas em três tipos de estudos: (1) Estudo do perfil químico micromolecular de diferentes partes vegetativas; (2) Estudo sazonal a partir dos OEs; (3) Estudo circadiano sazonal a partir dos OEs. Esses estudos foram sendo realizados para as duas espécies (Tabela 4).

3.3.1 Estudo da variação do perfil químico micromolecular

Para estudar as variações nos perfis químicos micromoleculares dos OEs: 1) Espécimes em cultivo e silvestre de *P. gaudichaudianum* foram colhidas em cultivo e coletadas em campo de diferentes órgãos; 2) Espécime silvestre de *P. multidonum* coletadas em campo de diferentes órgãos.

Para obtenção de OEs de *P. gaudichaudianum* de folhas frescas procedeu-se com coletas em campo (100 g) e cultivadas da primeira (100 g) e segunda geração (100 g).

Para determinar o perfil químico dos OEs de *P. multidonum* foram coletadas raízes, caules (caules primários), galhos (caules secundários), folhas, inflorescências e infrutescências no mês de dezembro de 2018.

3.3.2 Estudo da variação sazonal

Para análise da influência da sazonalidade na produção e composição química dos OEs de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* foram coletadas 100 g de folhas durante doze (12) meses, de um mesmo indivíduo, no período de janeiro a dezembro de 2017 e janeiro a dezembro de 2019, respectivamente (09:00 e 10:00h) (RAMOS *et. al.*, 2020). As amostras foram

aconditionadas temporariamente em sacos herméticos *zip lock* e transportadas em gelo seco desde o momento da coleta até o momento da aplicação de ações de transformações preliminares, realizado no Laboratório de Produtos Naturais PN5, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

3.3.3 Estudo de variações sob a influência de ritmo circadiano

Para análise da influência do ritmo circadiano na produção e composição química dos OEs de folhas frescas de indivíduos de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* foram coletados de 70 a 100 g a cada 3 h durante um período de 24 h, nos horários de 06:00 h, 09:00 h, 12:00 h, 15:00 h, 18:00 h, 21:00 h, 00:00 h e 03:00 h (RAMOS *et al.*, 2020). Para *P. gaudichaudianum* foram realizados dois experimentos, nas estações chuvosa (14 e 15 de março de 2017) e seca (14 a 15 de outubro de 2017). Para *P. multinodum* foram realizadas coletas entre 14 e 15 de fevereiro de 2020 (Período mais chuvoso) e entre 13 e 14 de julho de 2021 (Período mais seco). As amostras foram acondicionadas temporariamente em sacos herméticos *zip lock* e transportadas em gelo seco desde o momento da coleta até aplicações de ações de transformações preliminares no Laboratório de Produtos Naturais PN5, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

3.4. Ações de Transformações Preliminares

Todas as partes vegetativas das espécies amostradas passaram por processos de ações de transformações preliminares de limpeza por triagem e separação.

3.4.1. Materiais frescos

Para obtenção dos materiais frescos limpos utilizados nos estudos de perfil químico, sazonal e circadiano, as amostras (folhas, caules, galhos, raízes, inflorescências e infrutescências) foram rasuradas com utilização de tesouras no Laboratório de Produtos Naturais PN5, Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. A tabela 4 apresenta as amostras frescas empregadas em cada estudo.

3.5 Ações de Transformações Principais - Obtenções de óleos essenciais

3.5.1 Hidrodestilação

As extrações de OEs de *P. gaudichaudianum* e de *P. multinodum* referentes aos estudos de perfil químico, sazonal e circadiano foram realizadas por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado, conforme Wasicky (1963), por 2h. Amostras de diferentes órgãos (Tabela 5) foram pesadas, rasuradas e inseridas em balão de vidro de 1L contendo 700 mL água destilada. Após finalização do processo, os OEs puros foram separados da fase aquosa, submetidos à secagem com sulfato de sódio anidro e armazenados em frascos escuros âmbar fechados em freezer a -20 °C até o momento das análises (OLIVEIRA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2020). Esse método foi empregado para os estudos com abordagem Quimiofenética pela disseminação de dados dos grupos disponíveis (OLIVEIRA *et al.*, 2018; RAMOS; MOREIRA, 2019; RAMOS *et al.*, 2020).

Tabela 4 – Tipos de estudos por coletas de amostras obtidas de *Piper gaudichaudianum* (PG) e *Piper multinodum* (PM) em diferentes acessos no Estado do Rio de Janeiro.

Tipo de Estudo	Esp.	Produtos Obtidos	Órgãos Vegetais	Pesos [#]	Período de Coleta	Horário de Coleta(entre/de)
1 Perfil químico	PG	Óleos Essenciais ^{C,S}	Folhas ^(F)	200g ^{HD1}	janeiro de 2018	9:00 às 10:00
			Raízes ^(F)	200g ^{HD1}		
	PM	Óleos Essenciais ^S	Caules ^(F)	200g ^{HD1}	dezembro de 2018	9:00 às 10:00
			Galhos ^(F)	200g ^{HD1}		
			Folhas ^(F)	200g ^{HD1}		
		Inflorescências ^(F)	50g ^{HD1}			
		Infrutescências ^(F)	50g ^{HD1}			
2 Estudo Sazonal	PG	Óleos Essenciais ^S	Folhas ^(F)	100g ^{HD1}	janeiro de 2017 a dezembro de 2017	9:00 às 10:00
	PM	Óleos Essenciais ^S	Folhas ^(F)	70g ^{HD1}	janeiro de 2019 a dezembro de 2019	9:00 às 10:00
3 Estudo Circadiano	PG	Óleos Essenciais ^S	Folhas ^(F)	100g ^{HD1} (800g)	14 a 15 de março de 2017 (Estação Chuvosa)	3 em 3h de 6:00h (14) até 3:00h (15), total de 24h
				100g ^{HD1} (800g)	13 a 14 de outubro de 2017 (Estação Seca)	3 em 3h de 6:00h (13) até 3:00h (14), total de 24h
		Óleos Essenciais ^S		70g ^{HD1} (560g total)	14 a 15 de fevereiro de 2020 (Período Chuvoso)	3 em 3h de 6:00 (14) até 3:00 (15), total de 24h
	PM	Óleos Essenciais ^S	Folhas ^(F)	70g ^{HD1} (560g total)	25 a 26 de junho de 2021 (Período Seco)	3 em 3h de 6:00h (25) até 3:00h (26), total de 24h

Legenda: (1) Peso para uma análise; Esp.- Espécies; # Peso fresco; C- Obtido de espécimes cultivados; S – Obtido de espécimes silvestres; (F)- Frescas; HD – Hidrodestilação;

3.5.2 Cálculo de rendimentos e hidrolatos

Os rendimentos foram calculados pela razão do volume em mL de OE e o peso em g do material vegetal fresco utilizado na extração, multiplicado por 100, para expressar em teor porcentual (RAMOS; MOREIRA, 2019). Os OEs que não se separaram dos hidrolatos foram extraídos com clorofórmio P.A. (Tedia, Brasil) em funil de separação e acondicionados conforme descrito em 3.5.1 para análise posterior (RAMOS, 2020).

3.6 Caracterização química de óleos essenciais

Os OEs foram solubilizados em diclorometano P.A. (Tedia, Brasil) até concentração final de aproximadamente 1000 ppm e submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em equipamento HP Agilent GC 6890 – MS 5973, para obtenção dos espectros de massas. Para quantificação dos constituintes presentes nas amostras e determinação do índice de retenção (IR) foram feitas análises por CG acoplada ao detector por ionização em chama (DIC) em equipamento HP-Agilent 6890. Ambas as análises foram realizadas na Plataforma Analítica de Farmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

As condições para análises por CG-EM foram: coluna HP-5MS (30m x 0,32mm i.d. x 0,25µm espessura de filme), programação de temperatura de 60 °C a 240 °C, com incremento de 3 °C/min e uso de hélio (~99,99%) como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min, varredura entre m/z 40- 600 u.m.a., com energia de impacto de 70 eV (modo positivo). O volume injetado foi de 1µL da solução de cada amostra (1.000 ppm), com temperatura de injetor de 270 °C, sem divisão de fluxo (*splitless*) (OLIVEIRA *et al.*, 2013b).

As condições de análises por CG-DIC foram: coluna HP-5MS (30m x 0,32mm i.d. x 0,25µm), programação de temperatura de 60 °C a 240 °C, com incremento de 3 °C/min e usado hidrogênio e ar sintético como gases de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min. Foi injetado 1µL da solução de amostra (1.000 ppm), com temperatura de injetor de 270 °C, sem divisão de fluxo (*splitless*) (OLIVEIRA *et al.*, 2013b).

Os IR foram determinados a partir do tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C₈-C₂₈, Sigma-Aldrich) obtidos por CG-DIC, nas mesmas condições de análises das amostras. As substâncias presentes nos OEs e óleos voláteis foram identificadas por comparação de seus espectros de massas com registros de banco de dados (WILEY 7n) e por comparação dos IR calculados (DOLL; KRATZ, 1963) com aqueles da literatura (ADAMS, 2007; 2017).

3.7 Atividade Antimicrobacteriana

3.7.1. Cultivo das micobactérias

A cepa virulenta padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC, 25618) foi cultivada em meio de cultura 7H9 (BACTO), suplementado com 10% de albumina, dextrose, catalase (ADC) (BC[®]) e 0,05% de tween 80% e mantida em estufa (Forma Scientific - water-jacketed incubator) em 37 °C e 5% de CO₂, até o início da fase de crescimento. Esta parte do estudo foi realizada no Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), utilizando ambiente com nível de biossegurança adequado para os ensaios e sob a responsabilidade da Dr^a. Michelle Muzitano.

3.7.2 Ensaio de Inibição do crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*

As amostras de OEs de diferentes partes vegetativas e dos extratos e frações foliares foram avaliadas quanto à atividade antimicrobacteriana utilizando o ensaio com sal de tetrazol em microplaca de 96 poços, nas concentrações de 16, 32, 64 e 128 µg/mL. Para esse ensaio foi preparada uma suspensão com *M. tuberculosis* H₃₇Rv (300 µL de micobactéria em 7,2 de meio de cultura 7H9 suplementado com 10% de ADC, aproximadamente 3x10⁷ Unidade Formadoras de Colônia - UFC/mL) e mantida em estufa em 37°C e 5% de CO₂ até início da fase log (fase de crescimento exponencial). A dosagem das UFCs por turbidez foi padronizada e acompanhada em espectrofotômetro (Hitachi - Modelo U-1100) em densidade óptica (D.O.) de 600 nm. Posteriormente, na fase logarítmica de crescimento, foram plaqueadas em microplaca de 96 poços, 50 µL dessa suspensão (1x10⁶ UFC/poço). As amostras dos OEs (50 µL/poço) foram diluídas previamente em 7H9 suplementado com ADC em concentração 2 vezes maior do que a concentração final desejada e adicionados na microplaca onde já continha a micobactéria. A placa selada foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 5 dias. Após esse período, adicionou-se 10 µL por poço de uma solução 5 mg/mL de sal de tetrazol 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazol (MTT) em tampão fosfato salino (PBS) estéril. Três horas depois, 100

μL do tampão de lise foi adicionado (20% p/v de dodecil sulfato de sódio (SDS)/ 50% de dimetilformamida (DMF) em água destilada – pH 4.7). A leitura da microplaca foi realizada em espectrofotômetro em 570 nm (GOMES-FLOREZ *et al.*, 1995). Como controle positivo de atividade antimicobacteriana foi utilizado o tratamento com rifampicina (0,032; 0,08; 0,2 e 1 $\mu\text{g/mL}$) nos poços contendo apenas os bacilos. O controle negativo foi dado a partir de poços contendo os bacilos e sem tratamento. Para calcular o percentual de inibição do crescimento micobacteriano (ICM) foi utilizado à equação (1).

$$\text{ICM} = \frac{100 - (D.O.\text{amostra} - D.O.C+)}{(D.O.C - D.O.C+)} \times 100 \quad \text{eq. (1)}$$

3.8 Atividade Antifúngica

Quatro amostras do estudo sazonal (janeiro, maio, agosto e outubro) de *P. multinodum* tiveram suas atividades testadas e a concentração inibitória mínima (CIM) dos OE para a cepa *Candida glabrata* (código 109) resistente a fluconazol foi determinado de acordo com o protocolo do CLSI (*The Clinical and Laboratory Standards Institute*). As leveduras foram inoculadas em placas estéreis de 96 poços em 200 μL de meio RPMI a fim de se atingir uma concentração de 5×10^2 células por poço na presença de diluições 1: 2 de cada amostra. As placas de 96 poços foram incubadas a 37 °C durante 48 h com agitação. O crescimento celular foi avaliado usando um leitor de microplaca (iMark, Bio-Rad, CA, EUA.). O aparelho foi programado de forma que considerou a coluna 1 como branco dos reagentes. Considerou-se como controle positivo, com 100% de crescimento, o valor da densidade ótica obtida no orifício número 12. A CIM para cada OE foi determinada com 50% de inibição do crescimento. A CIM 50% foi determinada como a menor concentração de OE, com valor de absorbância menor, ou igual, ao orifício 12, ou seja 50% do crescimento encontrado no orifício do controle positivo (PEREIRA *et al.*, 2017). Esta parte do estudo foi realizada no Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Geral sob a responsabilidade do Dr. Levy Domingos.

3.9 Desenvolvimento de abordagem Quimiofenética a partir dos óleos essenciais

Para os estudos com abordagem em Quimiofenética desta Tese, para cada substância dos OEs foram realizadas análises em relação aos seus *números de oxidação* (N_{OX}) (HENDRICKSON *et al.*, 1970), *passos oxidativos* (PO) (EMERENCIANO *et al.*, 1998), *análise estrutural das substâncias*, com base nas estruturas e complexidade dos esqueletos, bem como **novos índices quimiofenéticos foram propostos e validados**.

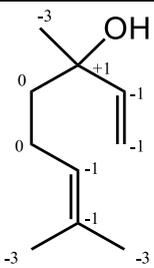
3.9.1 Número de oxidação (N_{OX})

A oxidação é a transferência de elétrons da espécie oxidada para a espécie oxidante. O Número de oxidação ou Grau de oxidação (N_{OX}) é a soma dos estados de oxidação de cada átomo na molécula. Essas regras podem ser resumidas em uma equação (2):

$$N_{OX} = \sum n_i C - B \quad \text{eq. (2)}$$

Onde n_i é o número de ligações entre o átomo C e o átomo B. Nessa equação, B corresponde a H (Hidrogênio), C (Carbono) ou heteroátomo X, isto é, as ligações resultantes são respectivamente C-, C-C e C-X. A soma dos estados de oxidação dos carbonos = -4, de acordo com a Regra de Cram-Hendrickson-Hammond (Hendrickson *et al.*, 1970), que define como valores de estado de oxidação de carbono ligado covalentemente a C, C-C = 0, C-H = -1; C-Heteroátomo (O, S, N e Halogênio) = +1. Na Tabela 5 é apresentado um exemplo de cálculo de N_{OX} a partir do linalol.

Tabela 5 – Exemplo do cálculo do Número de Oxidação (N_{OX}) do linalol, segundo regras de Cram-Hendrickson-Hammond.

Linalol	Atributos	Valor experimental	Número	Oxidação
	Número de hidrogênios ligados em carbonos	-1	17	-17
	Número de ligação (π e σ) entre carbonos e O, S, N e Halogênio	1	1	1
Grau de oxidação total			-16	

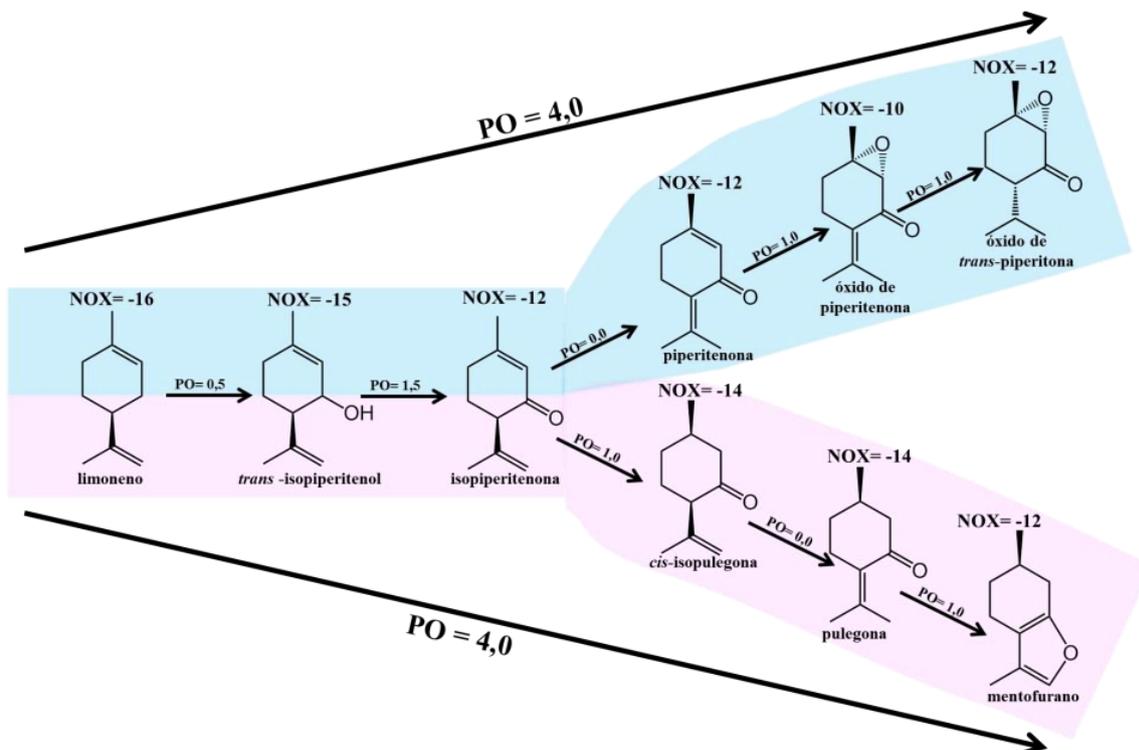
3.9.2 Passos Oxidativo (PO)

O N_{OX} não permite a comparação entre diferentes classes químicas, pois o número de átomos de C entre as classes químicas é geralmente diferente. Para facilitar essa comparação foram desenvolvidos passos oxidativos (*oxidative step* – OS) que são obtidos das subtrações dos N_{OX} das substâncias de interesse pelo N_{OX} do precursor biossintético comum àquele esqueleto dividido por dois (EMERENCIANO *et al.*, 1998), de acordo com a equação (3).

$$PO = \frac{(N_{OX\text{precursor}} - N_{OX\text{substância}})}{2} \quad \text{eq. (3)}$$

Entendem-se como passo oxidativo as mudanças oxidativas em relação a um precursor considerado como marco zero na escala. Cada passo oxidativo representa uma insaturação ou uma ligação carbono-heteroátomo presente na dada substância, quando comparada ao seu precursor. Para cada diferença de dois pontos no N_{OX} é considerado um passo oxidativo (PO), tem-se um exemplo na figura 16.

Figura 16– Exemplo de cálculo de passos oxidativos (PO) a partir da conversão do limoneno para óxido de *trans*-piperitona ou mentofurano.



O estudo de passos oxidativos é uma metodologia quantitativa importante na correlação evolutiva para Quimiosistemática (GOTTLIEB, 1989). Na avaliação Quimiofenética o PO pode prever os avanços oxidativos que uma planta pode expressar qualitativamente em *escala temporal* diferente ou em estudos de quimiogeografia, no intuito de levar a compreensão da distribuição das expressões fenotípicas em *escala espacial*.

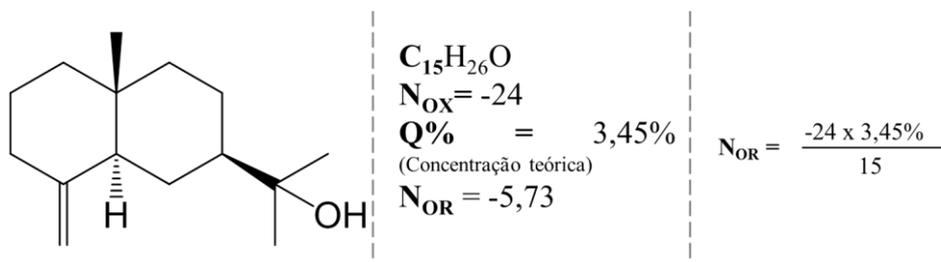
3.9.3 Nível Ponderado de Oxi-redução (N_{OR})

Os passos oxidativos (PO) e os níveis de oxidação (índice de Oxidação) utilizados na Quimiosistemática não respondem aos estímulos quantitativos dos metabólitos especializados. Na figura 16 ao aumentar o teor de óxido de *trans*-piperitona ou mentofurano, os valores de oxidação não respondem proporcionalmente ao precursor comum. Sabe-se que as reações Redução-Oxidação (redox) fazem parte do ciclo metabólico das plantas, principalmente, nos processos fisiológicos de respostas plásticas as variações sazonais e sob comando do relógio circadiano (DIETZ; PFAMMSCHMIDT, 2011). Normalmente, esse processo envolve mecanismos químicos complexos. Avaliar esses padrões de oxidação molecular a partir de misturas faz-se necessário para a melhor compreensão do mecanismo redox em escala temporal fluída e baseada em modelo não-estático. Lançar luz sobre a quantificação do metabólito em uma mistura é o primeiro passo para ponderar essa oxidação. Por isso, desenvolvemos o **Nível Ponderado de Oxi-redução** ou **N_{OR}**, obtido pelo número de oxidação da substância de interesse (N_{OX}) multiplicado pelo valor de quantificação da substância obtida na amostra analisada (Q%) e dividido pelo número de átomos de carbono do esqueleto molecular (n), de acordo com a equação (4):

$$N_{OR} = \frac{N_{ox\ compaud} \times Q\%}{n} \quad \text{eq. (4)}$$

Isso significa que um valor médio ponderado das oxidações dos átomos de carbono das substâncias (N_{OR}) em mistura é obtido. Tem-se um exemplo na figura 17.

Figura 17 - Exemplo de cálculo de Nível Ponderado de Oxi-redução (N_{OR}) para o β -eudesmol em uma concentração teórica em óleo essencial.



3.9.4 Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR}) ou Índice Geral Redox de Mistura (GM_{OR})

Os valores do N_{OR} predizem sobre uma determinada substância na mistura. Para a avaliação da mistura e o quanto ela se encontra mais oxidada ou reduzida desenvolvemos o **Índice Geral de Oxi-redução de Mistura** (GM_{RO} , ou Índice para misturas Ramos & Moreira). Quando este novo índice é aplicado a estudos químico-ecológicos, propomos chamá-lo de **Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR})**. Os valores referentes ao IE_{OR} da mistura complexa de substâncias serão obtidos pela razão do somatório dos N_{OR} de todas as substâncias pelo número de substâncias identificadas na amostra (N_{SI}) de acordo com a equação (5):

$$IE_{OR} = \frac{\sum N_{OR}}{N_{SI}} \quad \text{eq. (5)}$$

Em relação a esta equação, deve-se prestar atenção à necessidade de padronização da técnica de identificação e quantificação aplicada à mistura (por exemplo, CG-EM/ CG-DIC), no sentido de possibilitar a comparação dos dados e garantir a melhor forma de quantificação para diminuir os interferentes nos resultados, bem como possibilitar comparação com dados da literatura. Portanto, não se deve comparar dados obtidos de quantificação por CG-DIC com dados obtidos de quantificação por CG acoplado a detector por espalhamento de luz (CG-DEL); ou cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria de massas por *eletronspray* com detector quadrupolo (CLAE-IES-Q) com CLAE-IES acoplado a

iontrap, por exemplo. Esse índice é explicado por quanto maior o valor obtido, maior a oxidação da mistura de substância e maior é a redução. quanto mais distante um valor está do zero.

3.9.5 Quimiotificação dos Óleos Essenciais de *Piper gaudichaudianum*

Para determinação de quimiotipos a partir dos OEs de *P. gaudichaudianum* foram usados os resultados dessa Tese, bem como informações sobre a composição química obtida a partir da literatura, em fonte primária e secundária. Alguns atributos para seleção de informações da literatura foram considerados: I – O OE ter sido obtido das folhas; e II- Ter sido extraído por método de hidrodestilação. Como critério de análise do documento foram obtidos: I – Localização da coleta; II – Coordenadas geográfica; e III – Total de substâncias identificadas e quantificadas. Quando as coordenadas geográficas não foram informadas, tomou-se como verdadeiro os valores relativos para a cidade de coleta. De posse das informações da literatura foram realizadas análises entre: I – Padrões de latitudes (grau) e produção no metabolismo especial; II- Distribuição geográfica e produção no metabolismo especial; III- Produção metabólica e diversidade vegetal nas áreas de coleta (GOTTLIEB *et al.*, 1996).

3.10 **Processamentos de Dados**

Análises estatísticas foram realizadas para examinar inter-relações, correlações, correspondências e análise de variâncias nos OEs nos diferentes estudos. Foram avaliados: I - variações entre as composições químicas dos táxons; II - Composição química entre os diferentes métodos de extração; III - Variação edafoclimática (umidade, temperatura, radiação, precipitação macro- e micro-nutrientes do solo); IV - Variação da influência sazonal e do ritmo circadiano; V- Qualidade e composição química dos OEs entre as coletadas de espécies silvestres e cultivadas; VI – Definição de quimiotipos a partir dos OEs de *P. gaudichaudianum* e; V – Variações nas atividades biológicas. Por apresentar diferentes conjuntos de dados entre *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* foram aplicadas abordagens estatísticas diferentes para cada espécie que estão apresentadas na figura 18.

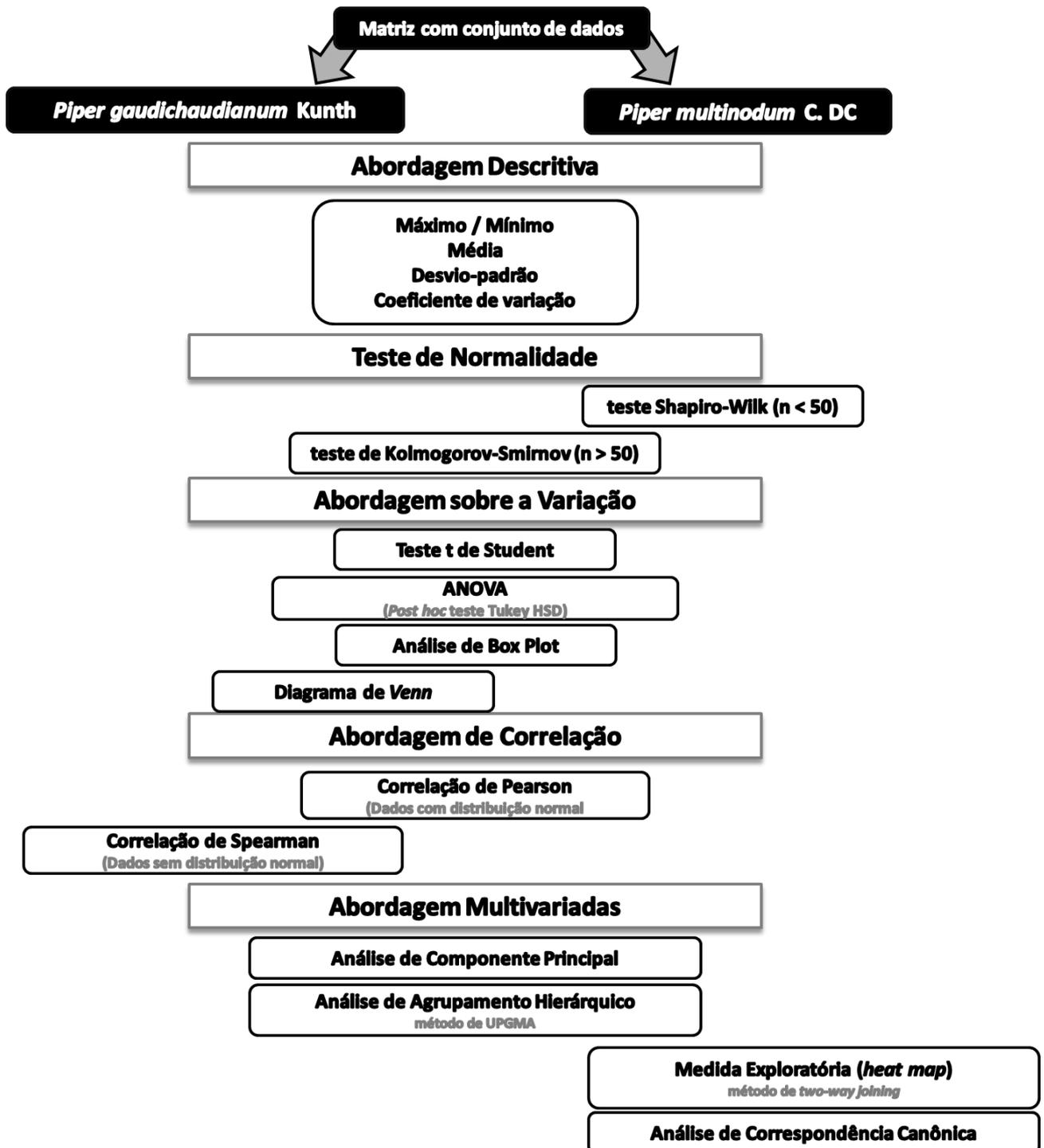
3.10.1 Abordagem descritiva dos dados

Os dados em triplicatas são apresentados pela média \pm desvio padrão. Outras análises descritivas foram empregadas, como coeficiente de variação, máximo e mínimo. Para análise de normalidade foram empregados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para amostras maiores e menores que 50, respectivamente.

3.10.2 Abordagem sobre a variação

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando o Programa *software Statistica* versão 13 (StartSoft Inc., Tulsa, EUA). Para comparação das médias obtidas nos resultados de: I - Rendimentos dos OEs; II - Componentes majoritários dos OEs; III –Números de substâncias identificadas; e IV – Valores de correlações; empregou-se o teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade. O diagrama de Venn foi usado para análise qualitativa com o software Venny 2.0 (JOSE *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004; OLIVEROS, 2020).

Figura 18 - Esquema com abordagem realizada nas matrizes com conjuntos de dados de *Piper gaudichaudianum* e *Piper multinodum*.



3.10.3 Abordagem de correlações

Para verificar a possível inter-relação entre variáveis edafoclimáticas (umidade, temperatura, radiação, precipitação e solo), variação espacial (latitude e longitude), Índice Ecológico de Oxi-redução, Nível Ponderado de Oxi-redução e os componentes dos OEs selecionados, foi utilizada a análise de correlação de Pearson ou Spearman, a depender do padrão de normalidade do conjunto de dados (SÁ *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2013b; CALLEGARI-JACQUES, 2003). O coeficiente de correlação de Pearson e Spearman foram interpretados de acordo com os critérios sugeridos por Jannuzzi e colaboradores (2010) como a seguir: 0,00 a 0,19 (*bem fraca*); 0,20 a 0,39 (*fraca*); 0,40 a 0,69 (*moderada*); 0,70 a 0,89 (*forte*); e de 0,90 a 1,00 (*muito forte*). A significância do conjunto de dados foi testada por *t* de Student.

3.10.4 Abordagem multivariada

A Análise de Componentes Principais (ACP) e a Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH) foram realizadas utilizando o *software Statistica* versão 13 (StartSoft Inc., Tulsa, EUA).

As matrizes foram construídas com a composição química dos OEs e voláteis. Esses foram tratados como unidades taxonômicas operacionais (UTO). Para construção de gráficos de ACP e AAH foram utilizados os valores de porcentagem (% área) transformados para 100% área, extraído dos dados obtidos por CG-DIC, convertidos em uma matriz, excluindo as substâncias que não foram identificadas ou com teor menor que 5% (SADGROVE *et al.*, 2014; LEGENDRE; LEGENDRE, 1998).

Análises de Agrupamento Hierárquico (AAH) foram realizadas para verificar semelhanças entre as UTO, com base na distribuição dos atributos dos solos, substâncias e classes químicas dos OEs. Para obtenção do dendrograma foram utilizadas as distâncias Euclidianas com o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e como medida exploratória de aprofundamento foi usado o *heat map*, construídos pelo método *two-way joining* (SADGROVE *et al.*, 2014).

Análise de correspondência canônica (ACC) entre os fatores edafo-climáticos e a composição química dos OEs foram realizadas utilizando o *software* CANOCO versão 4.5 (*Canonical Community Ordination*), junto com o programa CanoDraw versão 4.1. Antes de realizar a ACC, os dados químicos foram transformados pela fórmula descrita na Eq. (6), de modo que x é o valor da área do sinal para cada substância expressa em teor percentual relativo. Os dados ambientais expressos em porcentagem, como porcentagem de saturação de base (BS) e umidade relativa, foram transformados de acordo com a equação (6). Para as outras variáveis ambientais não expressas em porcentagem, de modo que x é o valor das observações individuais para cada variável e seguiu conforme a equação (7). Para o pH do solo foram usados dados não processados. Todos os dados das variáveis químicas e ambientais foram centrados na média. Todas as etapas anteriores foram realizadas para dimensionar os dados anteriores à análise multivariada.

$$\hat{x}_n = \arcsin\left(\sqrt{\frac{x_n}{100}}\right) \quad \text{eq. (6)}$$

Transformação da variável para o método de arcsin.

$$\hat{x}_n = \log_{10}(x_n + 1) \quad \text{eq. (7)}$$

Transformação logarítmica para as variáveis.

4 RESULTADOS

4.1 Composição química e rendimentos dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* Kunth silvestre e cultivada em casa de vegetação

4.1.1 Composição química dos óleos essenciais do estudo sazonal de *Piper gaudichaudianum* silvestre

Os OEs extraídos de *P. gaudichaudianum* silvestre do acesso de Rio de Janeiro/RJ obtidos nos meses de janeiro a dezembro de 2017 apresentaram coloração levemente amarelada, com rendimentos apresentando variações de 0,09 a 0,23%. As composições químicas são descritas na tabela 6 (12 amostras). Foi possível identificar 98 substâncias diferentes que variaram entre 26 a 49 entre as amostras de OEs referentes ao estudo sazonal. O total de substâncias quantificadas nos OEs ficou entre 91,5 e 99,8%. As fases reprodutivas se deram entre os meses de janeiro a fevereiro e novembro a dezembro de 2017. As frações dos OEs apresentaram-se ricas em sesquiterpenos não oxigenados (48,3-78,0%), seguido por sesquiterpenos oxigenados (16,2-44,8%) e monoterpenos oxigenados (0,0-3,4%). As substâncias principais registradas foram os sesquiterpenos não oxigenados bicilogermacreno (10,2-28,5%), *E*-cariofileno (1,3-22,7%) e eudesmadieno (*Z*-eudesma-6,11-dieno) (1,4-21,7%). Os sesquiterpenos oxigenados *E*-nerolidol (0,3-15,4%), α -cadinol (0,2-19,4%) e espatulenol (1,39-15,9%) também foram registrados em teor percentual relevante. As estruturas químicas dos majoritários são apresentadas na figura 19.

Figura 19 - Substâncias majoritárias identificadas nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre: bicilogermacreno (1), *E*-cariofileno (2), eudesmadieno (3), *E*-nerolidol (4) e espatulenol (5).

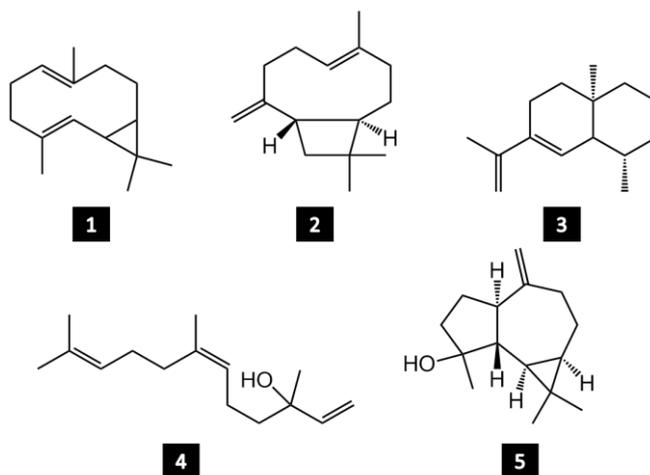


Tabela 6 - Constituição química, rendimentos (%), esqueleto de carbonos (esqueleto-C) e Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais de folhas de *Piper gaudichaudianum* Kunth silvestre, dos meses de janeiro de 2017 a dezembro de 2017.

Esqueleto -C	Substâncias ^a	IRcalc	IRlit	Área Percentual Relativa (%) ± Desvio Padrão (DP)											
				Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Hexano	3E-hexenol	844	844	-			tr			-	-	-	-	-	-
Pinano	α-pineno	932	932	-	0,2±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0			-	-	-	-	-	-
Canfano	canfeno	954	954	-						-	-	-	-	-	-
Pinano	β-pineno	979	979	0,6±0,2	0,5±0,0	0,5±0,0	0,1±0,0			-	-	-	-	-	-
Mircano	mirceno	988	988	-	-	-	0,3±0,0			-	-	-	-	-	-
Mentano	limoneno	1024	1024	-	-	-				-	-	-	-	-	-
Mircano	óxido de Z-linalol	1067	1067	0,8±0,1	-	-	1,2±0,2			-	-	-	-	-	-
Mircano	linalol	1095	1095	5,4±0,0	-	1,2±0,0	4,3±0,0	1,2±0,0		-	-	-	-	-	-
	não identificado (m/z154)	1098		0,4±0,0	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Nonano	n-nonanal	1100	1100		0,1±0,0	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Mentano	1-terpineol	1130	1130	0,3±0,0	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Canfano	cânfora	1141	1141	0,1±0,0	0,1±0,0	4,6±0,0	3,5±0,0	4,8±0,2		-	-	-	-	-	-
Canfano	hidreto de canfeno	1145	1145		-	0,4±0,0	1,4±0,0	0,3±0,1		-	-	-	-	-	tr
Mentano	α-terpineol	1186	1186	0,2±0,0	-	1,2±0,0	6,3±0,0	2,1±0,0	tr	-	-	-	-	-	tr
Canfano	borneol	1165	1165	-	-			-		-	-	-	-	-	-
Canfano	acetato de bornila	1285	1285	-	-	tr	0,3±0,0	-		-	-	-	-	-	-
Undecano	undecanal	1305	1305	-	-	-	-	-		-	-	tr	-	-	-
Elemano	bicicloelemeno	1325		0,7±0,0	tr	-	-	0,5±0,0	0,3±0,1	2,3±0,2	2,9±0,2	3,4±0,3	tr	-	-
Elemano	δ-elemeno	1335	1335	-	0,5±0,0	3,2±0,0	3,2±0,0	5,7±0,0	4,6±0,0	3,5±0,2	6,5±0,4			2,6±0,7	3,4±0,2
Cubebano	α-cubebeno	1348	1348	-	0,3±0,0	tr	-	1,2±0,0	-	-	0,4±0,0	5,6±0,5	3,4±0,2	1,2±0,2	2,8±0,3
Mircano	acetato de nerila	1359	1359	-		-	-	1,3±0,1	-	-	-	-	-	0,3±0,2	
Copaano	α-ylangeno	1373	1373	-	0,3±0,0	-	-	-		-	-	-	-		
Copaano	α-copaeno	1374	1374	-	0,4±0,0	1,6±0,0	-	3,8±0,1		6,3±0,0	5,3±0,0	4,9±0,0	5,9±0,0	-	3,2±0,0
	não identificado (m/z 202)	1376		1,2±0,2	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-
Mircano	acetato de geranila	1379	1379	-	-	-	-	0,3±0,0	tr	0,4±0,0				-	-

Bourbonano	β -bourboneno	1387	1387	-	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	tr		-	-	-	0,1 \pm 0,0	-	-	
	não identificado (<i>m/z</i> 206)	1388		-	0,3 \pm 0,0			1,2 \pm 0,0	-	-	-		2,3 \pm 0,5	-	
Elemeno	β -elemeno	1389	1389	1,7 \pm 0,2	0,7 \pm 0,0	4,6 \pm 0,1	2,3 \pm 0,0	2,3 \pm 0,0	5,7 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	1,9 \pm 0,4	2,0 \pm 0,1	3,2 \pm 0,2	2,6 \pm 0,7	3,4 \pm 0,4
Aromadendrano	α -gurjuneno	1409	1409	-	0,2 \pm 0,0	-	-	-		2,3 \pm 0,0	1,1 \pm 0,2	3,2 \pm 0,1	4,1 \pm 0,2		4,6 \pm 0,5
Cariofilano	<i>iso</i> -cariofileno	1409	1409	-	-	-	-	tr	0,3 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	tr				
Cariofilano	<i>E</i>-cariofileno	1419	1419	3,3\pm0,2	8,7\pm0,1	9,0\pm0,8	6,9\pm0,3	7,6\pm0,5	10,2\pm0,7	11,2\pm1,8	5,4\pm0,3	7,3\pm0,5	9,3\pm0,5	4,8\pm0,7	3,1\pm0,4
Copaano	β -copaeno	1430	1430		1,2 \pm 0,1			1,9 \pm 0,0		3,2 \pm 0,0	3,2 \pm 0,0	2,3 \pm 0,0	2,4 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2
Aromadendrano	β -gurjuneno	1434	1434		0,9 \pm 0,0						1,2 \pm 0,0			2,0 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1
Humulano	γ -elemeno	1437	1437	0,8 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0		1,8 \pm 0,0			1,1 \pm 0,0			1,2 \pm 0,2	2,7 \pm 0,5
Elemeno	β -humuleno	1436	1436							2,3 \pm 0,2					
Aromadendrano	aromadendreno	1438	1438	1,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2	4,2 \pm 0,5	1,9 \pm 0,0	1,6 \pm 0,0	2,1 \pm 0,0	2,2 \pm 0,2	2,3 \pm 0,0	3,2 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	1,6 \pm 0,3
Farnesano	<i>Z</i> - β -farneseno	1440	1440												
Humulano	α-humuleno	1452	1452	1,2 \pm 0,1	4,0 \pm 0,0	7,2 \pm 0,2	3,9 \pm 0,0	2,3 \pm 0,0	6,4 \pm 0,3	4,32 \pm 0,4	4,3 \pm 0,8	5,5 \pm 0,9	7,5 \pm 0,6	0,3 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Farnesano	<i>E</i> - β -farneseno	1454	1454												1,2 \pm 0,0
Aromadendrano	<i>allo</i> -aromadendreno	1458	1458	0,4 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0			0,2 \pm 0,0					0,9 \pm 0,1		
Aromadendrano	dehidro-aromadendrano	1460	1460					2,3 \pm 0,0							
Cadinano	<i>Z</i> -cadina-1(6),4-dieno	1461	1461			1,2 \pm 0,0									
Cariofilano	9- <i>epi-E</i> -cariofileno	1464	1464												
	γ -gurjuneno	1475	1475	0,2 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0						1,6 \pm 0,2			2,1 \pm 0,0	3,2 \pm 0,4
Cadinano	γ -muuroloeno	1478	1478		1,3 \pm 0,0			0,1 \pm 0,0			0,1 \pm 0,0				
Cadinano	amorfa-4,7(11)-dieno	1479	1479		1,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0								
Germacrano	germacreno D	1480	1480	0,5 \pm 0,0	7,5 \pm 0,0	4,7 \pm 0,2	5,7 \pm 0,2	5,3 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3	7,8 \pm 0,5	1,2 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	4,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,0	4,2 \pm 0,2
Cadinano	α -amorfenos	1483	1483		1,9 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0		tr		0,3 \pm 0,0		0,1 \pm 0,0	tr	1,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0
Eremofilano	aristolocheno	1487	1487							tr	tr	tr			
Eudesmano	<i>Z</i>-eudesma-6,11-dieno (eudesmadieno)	1489	1489	3,1\pm0,1	4,7\pm0,2	8,4\pm0,5	10,2\pm0,4	14,3\pm0,7	15,3\pm0,9	11,2\pm0,5	9,3\pm0,3	10,2\pm0,7	7,3\pm0,0	2,3\pm0,2	4,2\pm0,2
Eudesmano	β -selineno	1492	1492	0,7 \pm 0,0	1,9 \pm 0,0			1,5 \pm 0,0		tr	0,1 \pm 0,0	tr	tr	0,1 \pm 0,0	2,3 \pm 0,2
Cadinano	γ -amorfenos	1495	1495	0,4 \pm 0,0		tr		1,0 \pm 0,0			0,9 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0			3,4 \pm 0,0
Eremofilano	valenceno	1496	1496		2,8 \pm 0,0		0,4 \pm 0,0								
Eudesmano	α -selineno	1498	1498					0,3 \pm 0,0		0,9 \pm 0,0	1,8 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,8 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	2,0 \pm 0,2
Biciclogermacrano	biciclogermacreno	1500	1500	12,2\pm0,9	17,0\pm1,2	16,9\pm0,3	18,1\pm0,4	20,3\pm0,9	19,3\pm1,3	15,3\pm0,2	12,3\pm0,8	11,2\pm0,7	20,2\pm1,5	23,2\pm0,0	12,1\pm0,4
Cadinano	<i>E,E</i> - α -farneseno	1505	1505					tr							

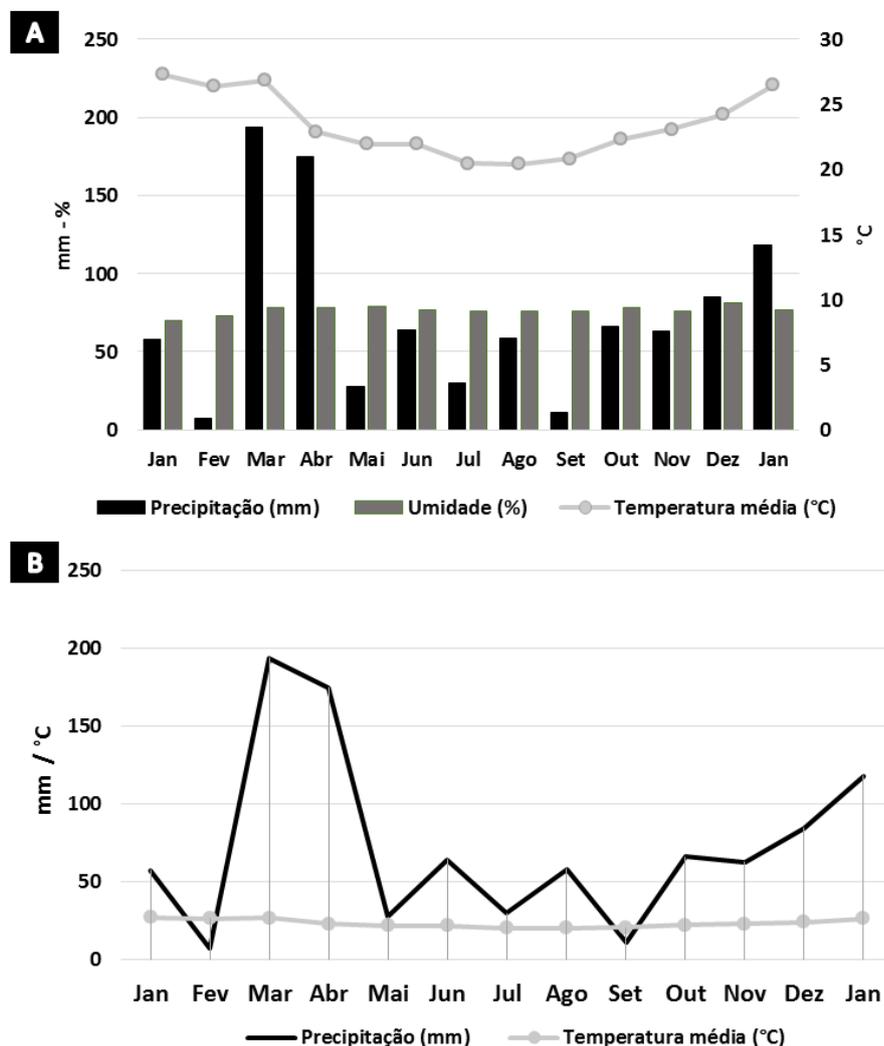
Farnesano	α -muuroloeno	1500	1500		0,5 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0				tr		0,1 \pm 0,0	tr		
Bisabolano	β -bisaboleno	1505	1505			0,2 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0			tr			tr	0,1 \pm 0,0	
Cadinano	γ -cadineno	1513	1513	0,5 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1		0,1 \pm 0,0		tr	1,2 \pm 0,0	4,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,0	1,0 \pm 0,2	
Eudesmano	7- <i>epi</i> - α -selineno	1520	1520							tr					1,2 \pm 0,1
Cadinano	δ -cadineno	1522	1522	1,6 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0			tr				3,3 \pm 0,4	1,3 \pm 0,3
Cadinano	zonareno	1528	1528												tr
Cadinano	Z-cadina-1,4-dieno	1533	1533	1,2 \pm 0,0		0,3 \pm 0,0	tr	tr		tr		1,6 \pm 0,4	0,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0
Cadinano	α -cadineno	1537	1537	2,3 \pm 0,0			tr	0,5 \pm 0,0	tr	tr		1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0	2,2 \pm 0,4	
Eudesmano	selina-3,7(11)-dieno	1545	1545			0,1 \pm 0,0				tr				2,6 \pm 0,4	0,2 \pm 0,2
Elemano	elemol	1548	1548	0,4 \pm 0,0							0,3 \pm 0,2				0,3 \pm 0,1
Germacrano	germacreno B	1559	1559		2,1 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	2,3 \pm 0,2	5,67 \pm 0,00	1,2 \pm 0,4	1,2 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	2,3 \pm 0,3	7,0 \pm 0,9	5,4 \pm 0,0	2,3 \pm 0,0
Cadinano	β -calacoreno	1564	1564												
Farnesano	E-nerolidol	1561	1561	17,6\pm0,4	22,9\pm0,7	6,3\pm0,2	5,8\pm0,2	4,3\pm0,2	4,2\pm0,3	3,8\pm0,2	4,6\pm0,4	4,3\pm0,3	5,3\pm0,1	10,3\pm0,3	15,9\pm0,4
Farnesano	Z-nerolidol	1531	1531	0,3 \pm 0,0				tr					tr	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2
Aromadendrano	espatulenol	1577	1577	1,4 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	3,3 \pm 0,1			2,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,4	2,3 \pm 0,5	1,2 \pm 0,2	tr	2,1 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2
Cariofilano	óxido de cariofileno	1582	1582	1,4 \pm 0,0	1,5 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0			1,2 \pm 0,1			1,3 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3	2,3 \pm 0,1
Aromadendrano	viridiflorol	1592	1592	1,8 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	3,2 \pm 0,0	4,4 \pm 0,0		5,8 \pm 0,4	tr	2,2 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	0,3 \pm 0,0	3,5 \pm 0,0	3,6 \pm 0,0
Eudesmano	ledol	1602	1602	5,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,0	4,0 \pm 0,2	1,2 \pm 0,0		3,5 \pm 0,0	tr	4,1 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	0,5 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0	2,7 \pm 0,2
Aromadendrano	rosifoliol	1600	1600	1,8 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0								0,2 \pm 0,0		
Eudesmano	5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1607	1607	0,3 \pm 0,0						tr					
Humulano	epóxido de humuleno II	1608	1608	3,9 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0				0,1 \pm 0,0		0,1 \pm 0,0			1,1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2
Cadinano	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	1618	1618	1,0 \pm 0,0		tr			0,1 \pm 0,0		0,4 \pm 0,0			0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Cadinano	α -corocaleno	1622	1622	2,4 \pm 0,0										0,1 \pm 0,0	
Eudesmano	10- <i>epi</i> - γ -eudesmol	1622	1622								2,3 \pm 0,0				
Cadinano	muurolo-4,10(14)-dien-1- β -ol	1630	1630									1,2 \pm 0,0			
Eudesmano	γ -eudesmol	1630	1630										0,3 \pm 0,0		
Cadinano	<i>epi</i> - α -muurolol	1640	1640	1,0 \pm 0,0	1,2 \pm 0,1	tr		tr	tr		tr	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0		
Eudesmano	selina-3,11-dien-6- α -ol	1642	1642											0,5 \pm 0,0	
Cadinano	α -muurolol	1644	1644		0,7 \pm 0,0	1,7 \pm 0,0				tr	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	2,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1
Eudesmano	α -eudesmol	1652	1652	0,4 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	2,4 \pm 0,0	3,5 \pm 0,3	tr		1,0 \pm 0,1	tr	2,9 \pm 0,1		tr	1,0 \pm 0,1
Cadinano	α-cadinol	1652	1652	6,5\pm0,2	2,3\pm0,0	2,3\pm0,2	1,4\pm0,2	5,8\pm0,2	6,9\pm0,8	9,4\pm0,2	11,2\pm0,6	8,3\pm0,5	9,2\pm0,2	2,3\pm0,1	1,2\pm0,2

Cadinano	Z-calamenen-10-ol	1660	1660									tr			
Eudesmano	7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1662	1662	5,6 \pm 0,3					1,0 \pm 0,2	2,9 \pm 0,3			0,1 \pm 0,0		
Cariofilano	cariofila-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	1639	1639		0,2 \pm 0,0		tr								
Cariofilano	14-hidroxi-Z-cariofileno	1666	1666	1,5 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0			tr	0,1 \pm 0,0	tr	0,7 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	tr		
Cariofilano	14-hidroxi-9- <i>epi</i> -E-cariofileno	1668	1668									2,9 \pm 0,2	tr		
Cadinano	cadaleno	1675	1675	1,7 \pm 0,0					1,0 \pm 0,2						
	não identificado (M ⁺ 264)	1677	1677	0,4 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0			0,1 \pm 0,0	1,2 \pm 0,2						
Cadinano	amorfa-4,9-dien-2-ol	1700	1700		0,2 \pm 0,0				0,4 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0					
Cariofilano	acetato de cariofileno	1701	1701							0,9 \pm 0,2					
Cadinano	amorfa-4,9-dien-14-al	1704	1704										0,2 \pm 0,0		
Octadecano	<i>n</i> -octadecano	1800	1800						tr			0,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0		
Monoterpenos não oxigenados				0,6	0,6	0,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Monoterpenos oxigenados				7,9	0,1	7,5	17,0	9,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1
Sesquiterpenos não oxigenados				37,9	64,1	64,4	60,5	79,1	67,3	80,4	68,2	69,0	81,5	67,6	67,5
Sesquiterpenos oxigenados				50,5	33,6	24,3	16,3	10,5	24,1	15,7	30,2	29,4	18,3	27,0	29,6
Outras substâncias				0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,2
Número de substâncias identificadas				44	49	41	32	38	26	36	42	37	36	43	43
Total de substâncias quantificadas no óleo essencial (%)				96,3	98,5	96,9	94,5	99,2	91,5	96,0	98,5	98,5	99,8	95,3	97,4
Rendimento de OE (%)				0,12 \pm 0,04	0,09 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01
IE_{OR}^a				-3,4	-3,2	-3,7	-4,7	-4,1	-5,6	-4,3	-3,7	-4,2	-4,4	-3,4	-3,6

Legenda: IR_{calc} = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IR_{lit} = índice de retenção de literatura (Adams, 2007; 2017); Principais constituintes em negrito. DP = desvio-padrão. ^aTodos as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. ^bÍndice Ecológico de Oxi-redução. OE – Óleo Essencial; tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%). Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Ago- agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro.

A figura 20 apresenta os resultados das médias mensais e o diagrama ombrotérmico correspondente à normal climatológica dos fatores ambientais de precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade do Rio de Janeiro/RJ. A partir da análise do diagrama ombrotérmico, verifica-se a existência de duas estações mais secas (fevereiro e setembro) e duas mais chuvosas (março e abril) (Figura 20B).

Figura 20 - Médias mensais e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade do Rio de Janeiro/RJ, no período de janeiro 2017 a janeiro de 2018.



Legenda: Médias mensais (A) e diagrama ombrotérmico (B) para a cidade do Rio de Janeiro (A e B). Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Ago-agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; Jan-janeiro de 2018.

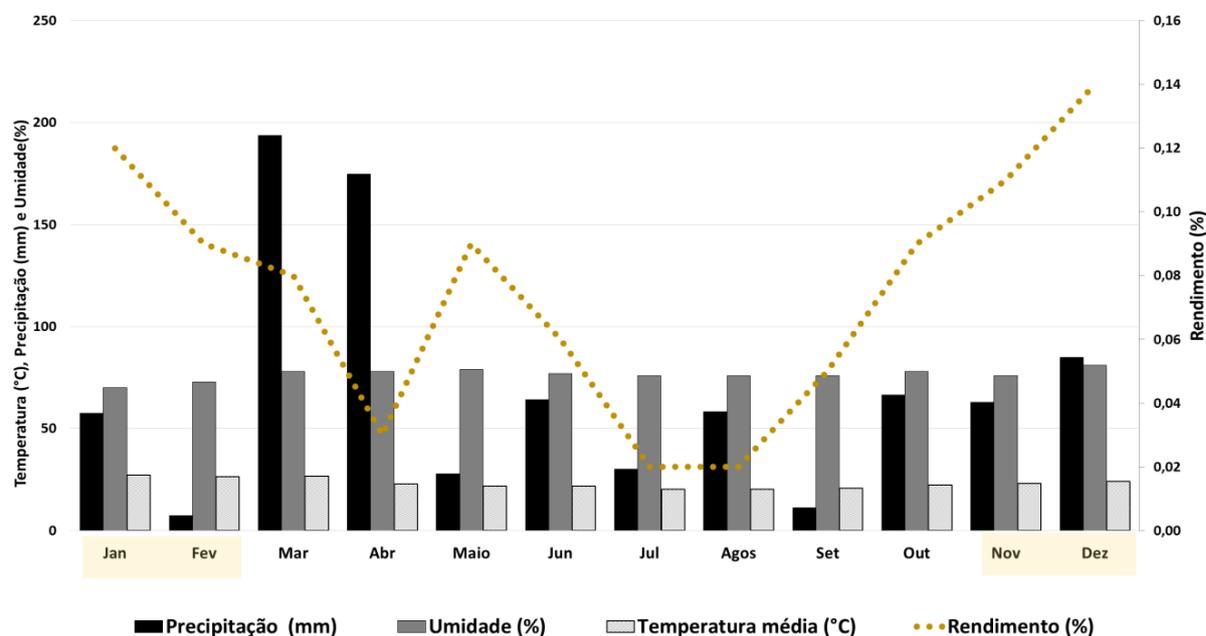
Fonte: INMET, 2018.

A figura 21 apresenta as variações nos rendimentos dos OEs em correlação com as médias mensais dos fatores ambientais (precipitação, umidade e temperatura) e a fase reprodutiva no período avaliado.

As análises de Pearson que correlacionam as classes químicas, rendimentos e as substâncias majoritárias presentes nos OEs com os fatores ambientais (precipitação, umidade e temperatura) encontram-se na Tabela 7 e as análises entre as substâncias e as classes químicas na tabela 8.

Pode-se observar (figura 21) que os maiores teores foram para as amostras obtidas nos meses de dezembro (0,14%), janeiro (0,12%) e novembro (0,11%). As médias dos rendimentos dos OEs apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,0002$). Cabe destacar que os maiores teores percentuais foram registrados no mesmo período da fase reprodutiva da espécie. Os rendimentos não apresentaram correlação com os fatores ambientais.

Figura 21 – Comparações das variações dos rendimentos (%) de óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C), no período de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul – julho; Ago- agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; #Área hachurada em amarelo representa os meses de ocorrência das fases reprodutivas.

Tabela 7 - Análise da correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre.

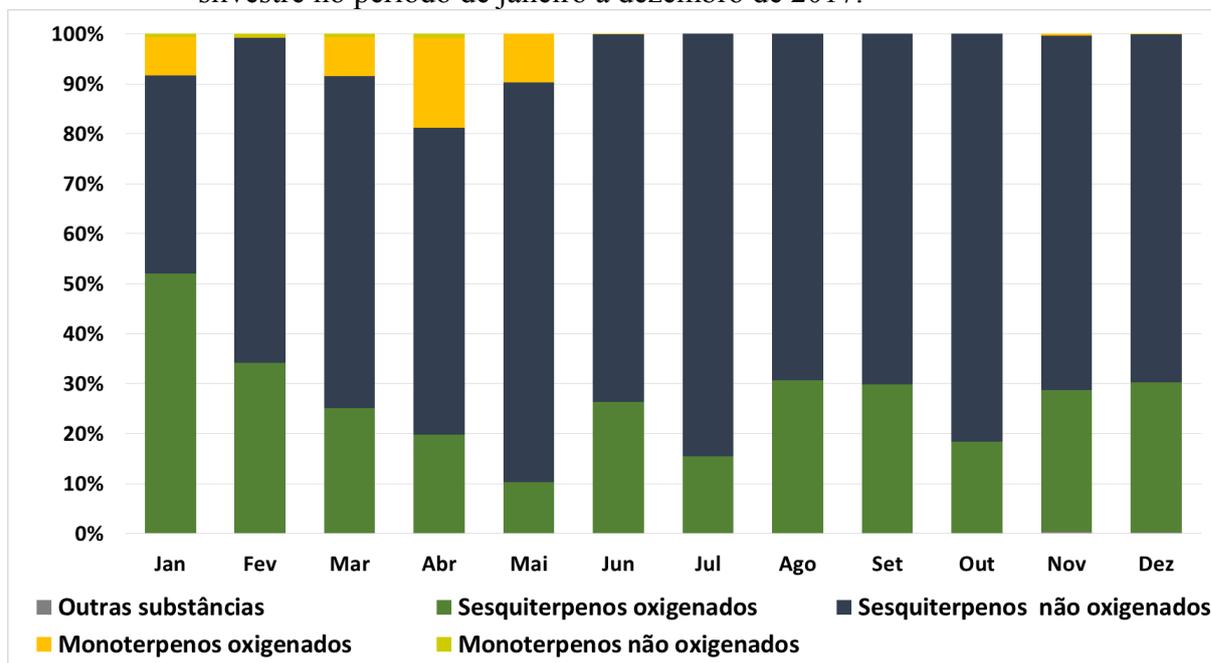
Variáveis analisadas		r^2		
		Umidade (%)	Temperatura (°C)	Precipitação (mm)
Rendimentos		0,361	0,084	-0,350
Substâncias majoritárias no OE	biciclogermacreno	-0,035	0,228	-0,057
	eudesmadieno	-0,631*	0,366	-0,716**
	<i>E</i> -cariofileno	-0,432	0,119	-0,463
	α -cadinol	-0,751*	-0,209	-0,749**
	espatulenol	0,031	-0,097	0,110
	<i>E</i> -nerolidol	0,791**	-0,472	0,769**
Classes químicas	Monoterpenos não oxigenados	0,735*	-0,388	0,701*
	Monoterpenos oxigenados	0,358	0,072	0,296
	Sesquiterpenos não oxigenados	-0,593*	0,625*	-0,591*
	Sesquiterpenos oxigenados	0,480	-0,721**	0,506
	Outras substâncias	0,240	0,075	0,300

Legenda - *Significativo a $p < 0,05$ ** Significativo a $p < 0,01$; +OE – Óleo Essencial

A figura 22 apresenta as variações das diferentes classes químicas que compõe os OEs no estudo sazonal. Todas as amostras foram ricas em sesquiterpenos (76,7 – 99,8%), com destaque para os não oxigenados, exceto para o mês de janeiro, com um leve aumento dos oxigenados.

Observa-se na correlação de Pearson que houve aumento de monoterpenos não oxigenado nos períodos com maiores precipitações ($r^2 = 0,701$; $p = 0,011$;) e umidade relativa ($r^2 = 0,735$; $p = 0,006$). Os sesquiterpenos não oxigenados apresentaram correlação inversamente proporcional com a precipitação ($r^2 = -0,591$, $p = 0,043$) e diretamente proporcional com a temperatura ($r^2 = 0,625$, $p = 0,030$). Salienta-se que as diminuições dos não oxigenados, decorrente do aumento mensal médio pluviométrico, levaram ao aumento da concentração de sesquiterpenos oxigenados, fato esperado e confirmado pelo valor significativo encontrado nas correlações ($r^2 = -0,828$; $p = 0,001$) (Tabela 7).

Figura 22 – Variações das classes químicas de óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre no período de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Da esquerda para direita = Jan– janeiro de 2017; Fev –fevereiro; Mar–março; Abr – abril; Mai –maio; Jun –junho; Jul – julho; Ago- agosto; Set – setembro; Out – outubro; Nov–novembro; Dez– dezembro;

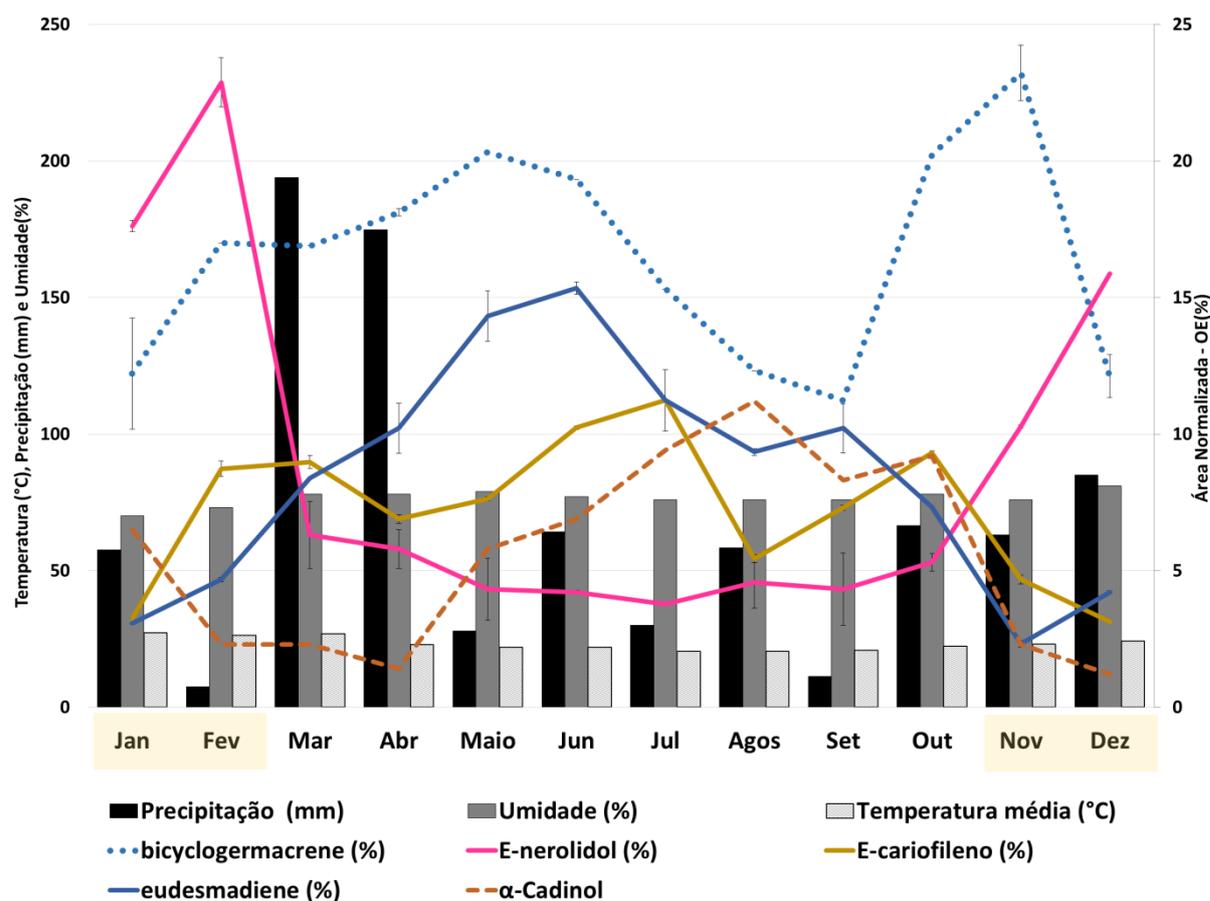
A figura 23 apresenta as comparações entre as variações dos componentes majoritários dos OEs de *P. gaudichaudianum* silvestre em relação à normal climatológica dos fatores ambientais (precipitação e umidade). Na figura 24 apresenta-se o gráfico *box plot* com as variações dos majoritários. Nela pode-se observar que as médias dos teores das substâncias majoritárias biciclogermacreno, *E*-cariofileno, eudesmadieno, *E*-nerolidol e α -cadinol apresentaram variações significativas ao longo do ano ($p > 0,01$). No entanto, observou-se que mesmo apresentando elevada variação anual, a média da variação do biciclogermacreno difere das demais substâncias majoritárias ($p > 0,01$) (Figura 24). O sesquiterpeno oxigenado *E*-nerolidol apresentou a maior variação de teor percentual entre os co-majoritários (Figura 28 e 29).

Na figura 23 observa-se que os teores de biciclogermacreno se encontraram com níveis acima de 10% durante todo ano. O maior teor (23,2%) foi registrado no início da floração e o menor teor (11,2%) no período mais seco do ano (setembro). O sesquiterpeno *E*-nerolidol, diferentemente, tem seu aumento nos períodos de floração, passando os teores de biciclogermacreno no período que compreende janeiro e fevereiro. Curiosamente, os teores de *E*-nerolidol aumentam em até quatro vezes em períodos com maior incidência de chuvas, logo após o período seco. Ao testar a hipótese, observam-se valores diretamente proporcionais

(significativo) na correlação de Pearson, entre precipitação ($r^2=0,769$; $p=0,003$) e umidade relativa ($r^2=0,791$; $p=0,002$) (Tabela 7).

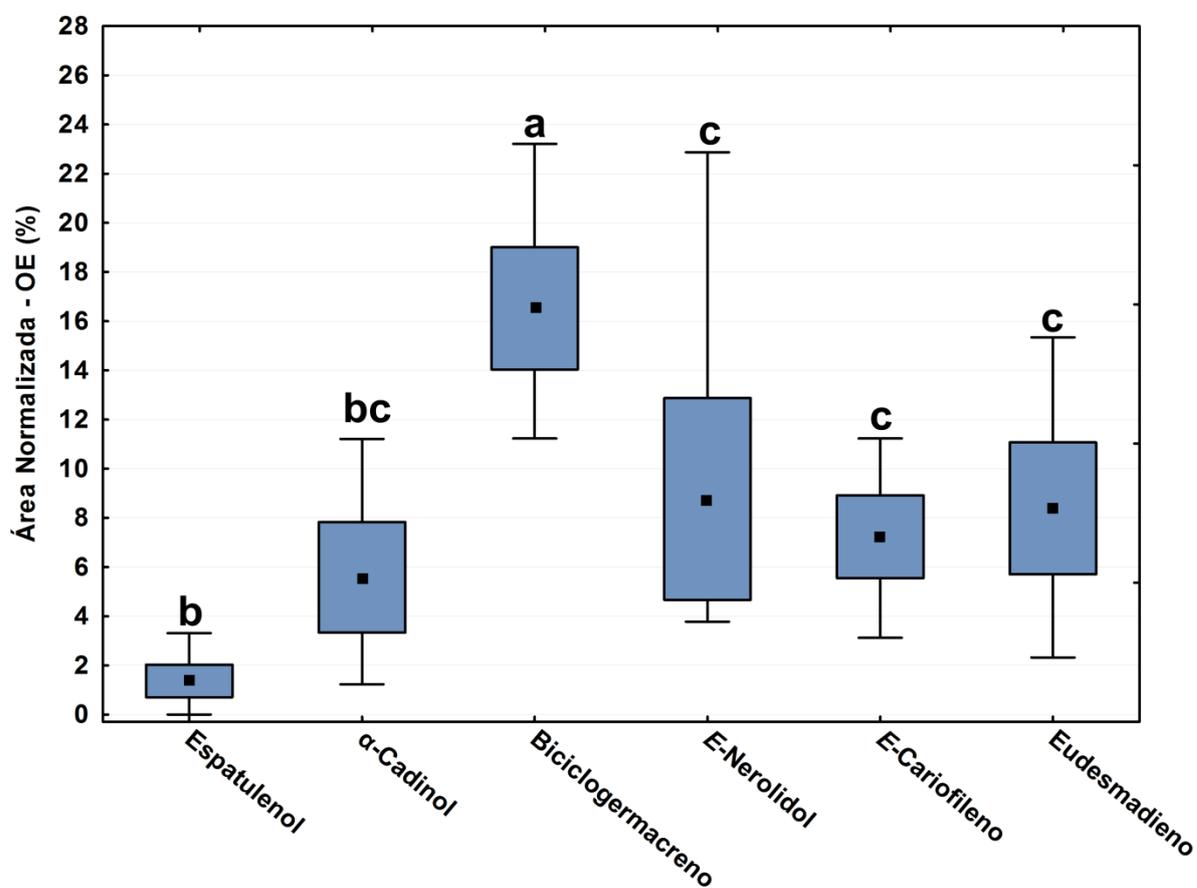
Comportamento inverso ao *E-nerolidol* foi observado para o sesquiterpeno não oxigenado eudesmadieno ($r^2= -0,746$; $p= 0,005$, tabela 13), sendo os menores teores registrados na floração, e após esse período, houve um aumento de até três vezes no teor. Foi possível observar correlações inversamente proporcionais e significativas entre umidade ($r^2= -0,631$; $p= 0,028$) e precipitação ($r^2=-0,716$; $p=0,009$) para o eudesmadieno (Tabela 7).

Figura 23 – Comparação das variações dos componentes majoritários nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm) e umidade (%), no período de janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Ago-agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; #Área hachurada em amarelo representa os meses de ocorrência das fases reprodutivas.

Figura 24 - Análises de *box plot* dos componentes majoritários dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* durante janeiro a dezembro de 2017.



Legenda: Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes usando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Análise de correlação de Pearson entre as substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre do acesso de Rio de Janeiro/ RJ (PMR).

Substância	α - Cadinol	Biciclogermacreno	<i>E</i> - Nerolidol	<i>E</i> -Cariofileno	Eudesmadieno	Monoterpenos não oxigenados	Monoterpenos oxigenados	Sesquiterpenos não oxigenados	Sesquiterpenos oxigenados
Biciclogermacreno	-0,269								
<i>E</i> -Nerolidol	-0,508	-0,192							
<i>E</i> -Cariofileno	0,294	0,340	-0,454						
Eudesmadieno	0,396	0,125	-0,746*	0,635*					
Monoterpenos não oxigenados	-0,536	-0,057	0,457	-0,036	-0,278				
Monoterpenos oxigenados	-0,402	0,152	-0,111	-0,115	0,179	0,6137*			
Sesquiterpenos não oxigenados	0,318	0,353	-0,540	0,571	0,453	-0,653*	-0,380		
Sesquiterpenos oxigenados	-0,066	-0,532	0,679*	-0,598*	-0,644*	0,350	-0,165	-0,828**	
Outras substâncias	-0,515	0,330	0,391	-0,492	-0,632*	-0,160	-0,268	-0,026	0,145

Legenda - *Significativo a $p < 0,05$ ** Significativo a $p < 0,01$.

A Análise de Componente Principal (ACP) foi realizada com as substâncias cujos teores foram superiores a 5%. Pela análise estatística por ACP 83,6 % da variância total dos dados foram representados pelos dois principais componentes (PC) 1 (62,1%) e PC2 (21,5%), como demonstrado na figura 25. O biciclogermacreno no PC1 (-8,6) apresentou carga negativa e carga positiva com baixa influência no PC2 (+0,7). Para *E*-nerolidol foram observadas cargas positivas no PC2 (+5,1) para as amostras coletadas nos meses de janeiro, fevereiro, novembro e dezembro e cargas negativas no PC1 (-1,7) para as amostras coletadas de março a outubro. Como Justificativa para as variações em menores escalas tem-se as substâncias eudesmadieno, α -cadinol e *E*-cariofileno, que apresentaram cargas negativas moderadas a baixas, nos dois eixos. As amostras coletadas nos meses de abril, março e outubro, considerados meses de transição climática, apresentaram mais cargas positivas influenciadas pelos teores de *E*-nerolidol.

A partir da análise de ACP, tem-se: **Grupo I** (janeiro, fevereiro, novembro e dezembro) formado com os constituintes dos OEs ricos em biciclogermacreno e *E*-nerolidol; **Grupo II** (março a outubro) resultante do agrupamento das amostras ricas em biciclogermacreno, seguido de *E*-cariofileno > eudesmadieno > α -cadinol.

O agrupamento hierárquico (AAH) para o estudo sazonal é mostrado na figura 26. Os agrupamentos no dendograma são formados a partir dos ramos que correspondem as distâncias euclidianas das amostras em relação às amostras mais próximas. Corroborando os resultados encontrados na ACP, as amostras foram agrupadas em dois *clusters* (**Grupos I e II**), levando a afirmação que cada grupo de amostra possui uma composição química diferente entre si. Notadamente, essa separação respeitou os meses (**Grupo I**) onde a espécie encontrava-se em estado reprodutivo e refletiu a importância do *E*-nerolidol nessa separação.

Figura 25 - *Biplot* (ACP) resultante da análise da composição dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre, coletadas de janeiro a dezembro de 2017.

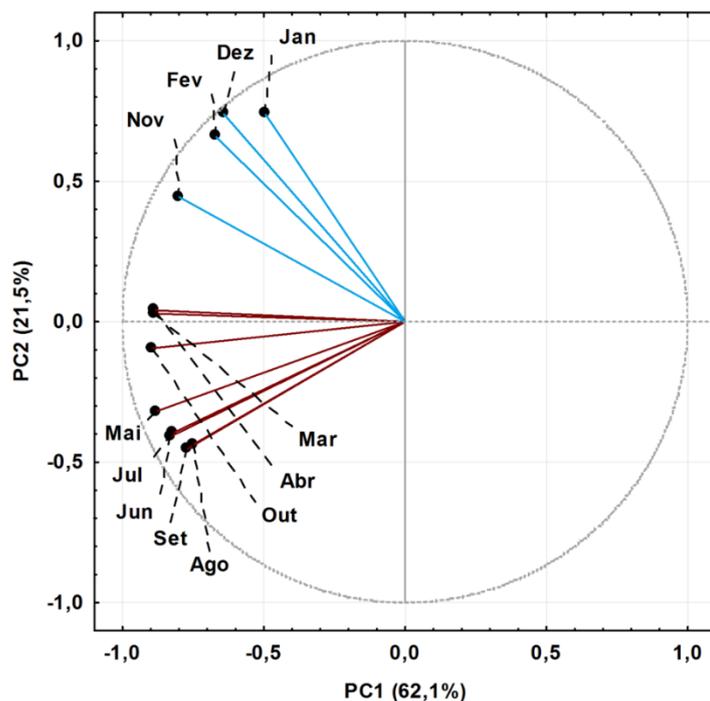
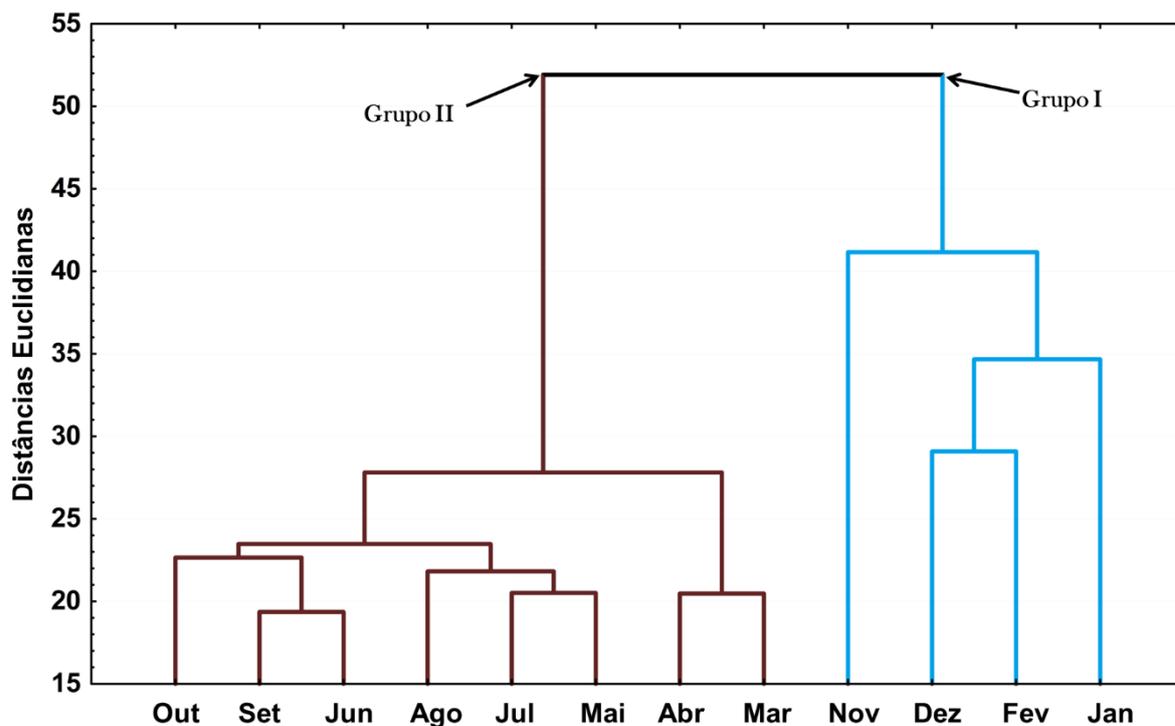


Figura 26- Dendrograma representando a relação de similaridade da composição dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre, coletada de janeiro a dezembro de 2017.



4.1.2 Composição química dos óleos essenciais do estudo circadiano de *Piper gaudichaudianum* silvestre

A composição química do OE de um indivíduo de *P. gaudichaudianum* foi avaliada ao longo de 24h, nos meses de março (período chuvoso) e de outubro (período seco) e estão representadas nas tabelas 9 e 10, respectivamente. Os OEs de ambos os períodos se apresentaram levemente amarelados.

Para o período chuvoso (março) foi possível identificar 53 substâncias, com variações entre 28 e 43 nos OEs analisados. O total de substâncias identificadas ficou acima de 83% (84,5 a 99,4%), portanto, bastante adequado. Os rendimentos variaram entre 0,09 a 0,23%. Para o período chuvoso o espécime apresentou-se com composição rica em sesquiterpenos não oxigenados *E*-cariofileno (1,3 - 22,7%), eudesmadieno (1,5 - 21,7%) e biciclogermacreno (13,3 - 19,7%). Dos sesquiterpenos oxigenados, tem-se o α -cadinol (0,2 - 15,4%), *E*-nerolidol (0,0 - 15,4%) e espatulenol (3,3 - 15,4%) como principais (Tabela 9).

Para o período seco (outubro) foi possível identificar menos substâncias (n = 48), com uma menor variação, entre 24 a 41, nos OEs analisados. O total de substâncias identificadas ficou entre 86,2 a 97,5%. Os rendimentos variaram entre 0,09 a 0,16%, portanto, menor do que no período chuvoso. A composição química dos OEs também foi rica em sesquiterpenos não oxigenados biciclogermacreno (10,2 - 28,6%), *E*-cariofileno (4,2 - 20,2%) e eudesmadieno (2,3 - 12,7%), além de sesquiterpenos oxigenados α -cadinol (1,2 - 19,4%), espatulenol (1,4 - 15,9%) e *E*-nerolidol (1,2 - 15,3%) (Tabela 10).

Tabela 9 - Constituição química, Rendimento (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas de *Piper gaudichaudianum* no ciclo circadiano (março de 2017).

Esqueleto-C	Substâncias	IRcal	IRlit	Área Percentual Relativa (%) ± DP							
				Estação Chuvosa (março)							
				6:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h	00:00h	3:00h
Mircano	linalol	1095	1095							tr	tr
Mentano	limoneno	1024	1024	tr				0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	
Mentano	cânfora	1141	1141	0,1±0,0				0,8±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	
Mentano	α -terpineol	1186	1186	0,1±0,0				1,0±0,0	1,4±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0
Elemeno	δ -elemeno	1335	1335	0,6±0,0	3,7±0,2	3,5±0,1	3,1±0,1	0,5±0,0	0,3±0,0		6,0±0,2
Cubebano	α -cubebeno	1348	1348	tr		0,3±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0	0,7±0,0	0,1±0,0	0,3±0,0
Mircano	acetato de nerila	1359	1359		1,6±0,2	2,3±0,1	3,4±0,0	0,4±0,0			0,4±0,0
Copaano	α -copaeno	1374	1374	2,2±0,2	1,6±0,1	2,1±0,1	4,1±0,2	4,4±0,1	1,3±0,1	1,6±0,2	4,3±0,1
	não identificado (<i>m/z</i> 202)	1379		tr	2,1±0,0	1,2±0,2	0,2±0,0				
Elemeno	β -elemeno	1389	1389	2,1±0,2	1,2±0,1	0,3±0,0	0,3±0,0	0,9±0,1	0,6±0,0	1,2±0,0	1,1±0,1
Cariofilano	<i>iso</i> -cariofileno	1409	1409	0,2±0,0	0,3±0,0	0,4±0,0	1,2±0,0	1,5±0,0	0,1±0,0	tr	0,6±0,0
Cariofilano	<i>E</i>-cariofileno	1419	1419	4,2±0,7	9,1±1,0	13,3±0,4	12,2±1,3	22,7±3,4	4,7±1,21	1,3±0,3	3,9±0,1
Copaano	β -copaeno	1430	1430	0,7±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,7±0,1	0,8±0,1	1,5±0,1
Aromadendrano	β -gurjuneno	1434	1434	0,5±0,1			0,3±0,0	0,1±0,0			2,0±0,0
Elemeno	γ -elemeno	1437	1437	1,2±0,0	1,0±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	tr	tr	0,4±0,0	0,4±0,0
Humulano	β -humuleno	1436	1436	1,2±0,2	2,3±0,0	3,2±0,1	3,9±0,1	4,2±0,0	0,1±0,0	tr	0,5±0,1
Aromadendrano	aromadendreno	1438	1438	2,3±0,1	1,3±0,2	1,6±0,2	2,3±0,3	3,5±0,2	1,5±0,2	0,1±0,0	tr
Humulano	α-humuleno	1452	1452	4,0±0,4	5,2±0,5	5,0±0,1	4,7±0,1	5,4±0,3	1,3±0,2	0,6±0,8	3,4±0,4
Aromadendrano	<i>allo</i> -aromadendreno	1458	1458	1,9±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0	0,5±0,1	0,4±0,1	1,2±0,1	1,3±0,0	1,9±0,1
Cadinano	amorfa-4,7(11)-diene	1479	1479					0,3±0,0			0,1±0,1
Germacrano	germacreno D	1480	1480	1,5±0,0	5,6±0,1	6,0±0,2	5,3±0,4	6,7±0,5	1,1±0,0	0,5±0,1	2,1±0,2
Eudesmano	Z-eudesma-6,11-diene (eudesmadieno)	1489	1489	18,5±4,1	4,9±0,1	1,5±0,2	3,4±0,5	4,8±0,1	19,3±3,2	21,7±4,3	16,1±1,3

Eudesmano	β -selineno	1492	1492			0,2±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0			
Cadinano	γ -amorfeno	1495	1495			0,4±0,0	tr	0,1±0,0			
Eudesmano	α -selineno	1498	1498					0,2±0,0			
Biciclogermacrano	biciclogermacreno	1500	1500	15,7±1,3	19,6±2,4	19,4±1,3	19,67±1,4	19,1±1,5	13,3±1,2	14,0±2,1	14,9±1,1
Cadinano	α -muuroloeno	1500	1500					tr	0,9±0,0	0,9±0,0	0,2±0,0
Cadinano	γ -cadineno	1513	1513			tr	tr	0,1±0,0			
Eudesmano	7- <i>epi</i> - α -selineno	1520	1520	0,1±0,0		0,8±0,1	0,3±0,0	0,1±0,0			tr
Cadinano	δ -cadineno	1522	1522	2,3±0,2	0,2±0,1	0,3±0,0	3,2±0,6	2,2±0,2	1,0±0,1	1,4±0,2	6,0±0,4
Cadinano	zonareno	1528	1528	0,5±0,0				0,2±0,0			0,4±0,0
Eremofilano	γ -vetiveneno	1531	1531	tr				tr			0,2±0,0
Cadinano	<i>E</i> -cadinina-1,4-dieno	1533	1533	tr				tr			0,8±0,0
Germacrano	germacreno B	1559	1559	0,7±0,1				0,2±0,0			0,1±0,0
Cadinano	β -calacoreno	1564	1564	tr	tr	tr	tr	tr			0,8±0,1
Farnesano	<i>E</i>-nerolidol	1561	1561	0,6±0,0	10,3±0,6	14,2±0,4	10,3±0,6	6,1±0,2	0,3±0,2		0,5±0,0
Aromadendrano	espatulenol	1577	1577	7,1±0,2	3,3±0,1	4,4±0,2	4,9±0,2	4,3±0,8	8,3±0,1	10,9±0,8	5,0±0,4
Cariofilano	óxido de cariofileno	1582	1582	2,7±0,2	1,1±0,1	1,1±0,1	1,3±0,1	1,3±0,2	2,1±0,3	2,2±0,1	
Aromadendrano	viridiflorol	1592	1592	4,3±0,1		1,7±0,2	2,0±0,1	1,0±0,1	0,4±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1
Aromadendrano	ledol	1602	1602	1,4±0,1						0,2±0,0	2,0±0,1
Eudesmano	rosifoliol	1600	1600	tr	tr				1,0±0,1	2,0±0,3	0,8±0,1
Eudesmano	5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1607	1607						0,6±0,0		0,7±0,2
Humulano	epóxido de humoleno II	1608	1608	tr					2,3±0,2	1,2±0,2	1,0±0,2
Cadinano	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	1618	1618						1,3±0,0	1,5±0,0	1,0±0,1
Cadinano	α -corocaleno	1622	1622		0,3±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,0	2,6±0,1	
Cadinano	<i>epi</i> - α -muurolol	1640	1640		0,4±0,0	0,3±0,0	0,1±0,0		2,3±0,0	2,3±0,2	
Cadinano	α -muurolol	1644	1644						1,0±0,2	0,9±0,1	0,8±0,1
Eudesmano	β -eudesmol	1650	1650	1,3±0,2	3,0±0,1	4,0±0,2	4,6±0,2	0,8±0,1	0,4±0,0	0,8±0,1	
Eudesmano	α -eudesmol	1652	1652						0,6±0,0	1,0±0,1	2,3±0,2

Cadinano	α-cadinol	1652	1652	12,1±0,1	2,3±0,1	1,2±0,1	0,2±0,0	2,3±0,2	14,1±0,1	15,4±0,8	14,0±0,9
Cadinano	Z-calamenen-10-ol	1660	1660					tr	tr	0,1±0,0	0,3±0,0
Cariofilano	14-hidroxi-Z-cariofileno	1666	1666	1,9±0,1	1,6±0,1	1,2±0,2	1,0±0,2	0,2±0,1	2,3±0,2	2,4±0,1	0,8±0,2
Cadinano	cadaleno	1675	1675	0,2±0,0	2,0±0,0	1,3±0,0	0,4±0,0	0,3±0,0			0,3±0,0
Cadinano	amorfa-4,9-dien-2-ol	1700	1700	0,3±0,0					2,2±0,0	2,3±0,0	0,1±0,0
	não identificado (<i>m/z</i> 220)	1720	1720	1,2±0,0					1,1±0,0	0,3±0,0	
Monoterpenos não oxigenados				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Monoterpenos oxigenados				0,2	1,6	2,3	3,4	2,4	1,8	0,4	0,6
Sesquiterpenos não oxigenados				60,1	57,7	57,9	63,2	78,1	48,3	48,7	63,0
Sesquiterpenos oxigenados				33,1	22,1	28,2	24,5	16,2	40,5	44,8	31,0
Outras substâncias				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Número de substâncias identificadas				40	28	33	34	43	38	38	43
Total de substâncias quantificadas no óleo essencial (%)				93,9	84,5	91,9	94,3	97,0	90,9	93,9	99,4
Rendimento do OE (%)				0.23±0,03	0.09±0,02	0.10±0,01	0.14±0,02	0.13±0,02	0.17±0,01	0.12±0,02	0.10±0,02
IEOR^b				-3,9	-4,8	-4,5	-4,5	-3,6	-3,7	-3,9	-3,7

Legenda: IRcal = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IRLit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007;2017); Principais constituintes em negrito. DP = desvio-padrão. ^aTodas as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. ^bÍndice Ecológico de Oxi-redução. OE – Óleo essencial; tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%).

Tabela 10 - Constituição química, Rendimentos (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas no ciclo circadiano de *Piper gaudichaudianum* (outubro de 2017).

Esqueleto-C	Substâncias ^a	IRc	IRlit	Área Relativa (%) ± DP							
				Estação Seca (Outubro)							
				6:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h	00:00h	3:00h
Elemmano	δ-elemeno	1335	1335	0,6±0,1	3,2±0,1	3,5±0,2	3,1±0,2	0,5±0,1	0,3±0,0	9,9±0,1	6,0±0,2
Cubebano	α-cubebeno	1348	1348	0,1±0,0	0,5±0,1		0,2±0,1		tr	tr	tr
Mircano	acetato de nerila	1359	1359	2,3±0,0	3,2±0,0	1,2±0,0	0,1±0,0				1,2±0,0
Copaano	α-copaeno	1374	1374	5,1±0,3	6,3±0,1	6,8±0,1	7,1±0,5	5,4±0,1	4,3±0,2	4,2±0,1	4,3±0,1
	não identificado (<i>m/z</i> 202)	1379			0,2±0,0	0,6±0,0	0,3±0,0	tr			
Elemmano	β-elemeno	1389	1389	0,3±0,0	tr	0,1±0,0	0,1±0,0	0,4±0,0	0,3±0,0	0,6±0,0	1,3±0,0
Cariofilano	<i>iso</i> -cariofileno	1409	1409	0,5±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0	1,0±0,1	1,7±0,0	0,7±0,0	0,1±0,0	0,8±0,0
Cariofilano	<i>E</i>-cariofileno	1419	1419	4,4±0,8	8,2±0,1	9,3±0,2	19,2±0,4	20,2±1,6	4,8±0,7	4,4±0,9	4,2±0,1
Copaano	β-copaeno	1430	1430	1,0±0,1	0,9±0,1	0,8±0,1	0,4±0,1	0,3±0,0	1,2±0,1	1,0±0,1	1,2±0,1
Aromadendrano	β-gurjuneno	1434	1434				0,2±0,0	0,1±0,0			0,3±0,0
Elemmano	γ-elemeno	1437	1437	tr					tr	tr	tr
Humulano	β-humuleno	1436	1436	3,4±0,0	3,6±0,0	4,1±0,1	4,3±0,1	3,6±0,1	tr	tr	3,7±0,1
Aromadendrano	aromadendreno	1438	1438	3,2±0,1	3,1±0,2	2,3±0,0	1,3±0,0	2,3±0,0	1,9±0,0	1,0±0,1	1,2±0,1
Humulano	α-humuleno	1452	1452	4,3±0,7	6,6±0,87	6,0±0,8	7,2±0,3	5,6±0,2	0,4±0,0	0,1±0,0	3,2±0,0
Farnesano	<i>E</i> -β-farneseno	1454	1454	1,0±0,0							1,2±0,0
Aromadendrano	<i>allo</i> -aromadendreno	1458	1458	1,2±0,0	1,8±0,0	2,0±0,2	2,1±0,1	2,2±0,3	0,2±0,0	0,3±0,1	2,3±0,1
Cadinano	amorfa-4,7(11)-diene	1479	1479	0,3±0,1	0,1±0,1				0,1±0,1	0,2±0,1	tr
Germacrano	germacreno D	1480	1480	2,3±0,0	8,3±0,2	9,3±0,2	6,3±0,3	5,3±0,5	3,1±0,1	3,5±0,2	2,3±0,0
Cadinano	α-amorfeno	1483	1483	0,3±0,0	tr		tr	0,1±0,0	2,1±0,0	1,3±0,0	1,2±0,0
Eudesmano	Z-eudesma-6,11-dieno (eudesmadieno)	1489	1489	6,5±0,2	2,3±0,4	2,5±0,1	4,5±0,1	3,5±0,1	8,3±0,1	12,7±2,2	5,2±0,8
Eudesmano	β-selineno	1492	1492	tr					3,2±0,7	3,6±0,1	2,3±0,1

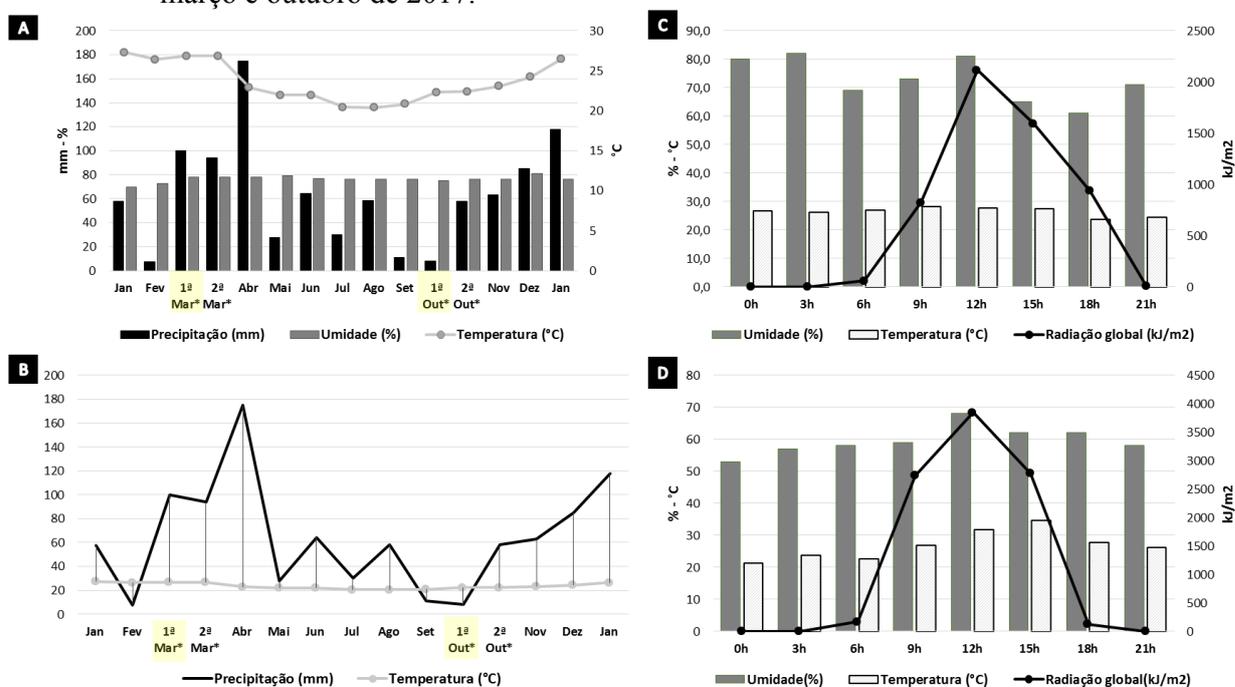
Cadinano	γ -amorfenó	1495	1495	0,4±0,0	tr		tr		0,9±0,2	1,23±0,2	4,0±0,1
Eudesmano	α -selineno	1498	1498	0,1±0,0					0,8±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1
Biciclogermacrano	biciclogermacreno	1500	1500	13,2±1,3	28,6±3,3	26,8±4,3	18,3±2,4	18,2±1,8	11,8±1,2	10,2±2,3	12,9±2,2
Cadinano	α -muuroleno	1500	1500						0,2±0,0	tr	tr
Cadinano	γ -cadineno	1513	1513						0,4±0,0		
Eudesmano	7- <i>epi</i> - α -selineno	1520	1520						tr	tr	tr
Cadinano	δ -cadineno	1522	1522	4,3±0,1	0,3±0,2	0,5±0,1	0,3±0,0	1,3±0,1	4,6±0,0	4,9±0,0	5,5±0,1
Cadinano	α -cadineno	1537	1537	0,3±0,0							0,2±0,0
Eudesmano	selina-3,7(11)-dieno	1545	1545			0,4±0,0	0,1±0,0			0,1±0,0	
Germacrano	germacreno B	1559	1559	0,2±0,0							0,2±0,0
Cadinano	β -calacoreno	1564	1564	0,2±0,0							0,1±0,0
Farnesano	E-nerolidol	1561	1561	4,9±0,0	10,3±0,4	15,3±0,6	12,3±0,7	8,4±0,5	3,2±0,2	1,2±0,0	4,2±0,1
Farnesano	Z-nerolidol	1531	1531	0,3±0,0	0,1±0,0	0,7±0,0	0,2±0,0				
Aromadendrano	espatulenol	1577	1577	9,1±0,7	2,3±0,2	1,4±0,1	1,9±0,2	3,3±0,1	10,3±0,7	15,9±0,1	9,0±0,2
Aromadendrano	viridiflorol	1592	1592	1,4±0,0	1,6±0,1	1,8±0,2	1,9±0,2	1,1±0,2	1,8±0,2	2,1±0,3	1,2±0,1
Aromadendrano	ledol	1602	1602			0,3±0,0	0,2±0,0	0,3±0,2			
Eudesmano	5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1607	1607	0,9±0,1							tr
Humulano	epóxido de humuleno II	1608	1608	2,3±0,2							1,3±0,1
Cadinano	α -corocaleno	1622	1622								tr
Cadinano	<i>epi</i> - α -muurolol	1640	1640								0,1±0,1
Cadinano	α -muurolol	1644	1644	0,1±0,0							
Eudesmano	β -eudesmol	1650	1650	0,9±0,1							
Eudesmano	α -eudesmol	1652	1652	0,3±0,0							
Cadinano	α-cadinol	1652	1652	9,3±0,3	2,2±0,3	1,2±0,3	4,3±0,0	6,1±0,1	19,4±0,2	10,2±0,2	9,1±0,2
Cadinano	Z-calamenen-10-ol	1660	1660	0,3±0,0					tr	tr	0,8±0,1
Cariofilano	14-hidroxi-Z-Cariofileno	1666	1666	tr	tr	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0	0,6±0,1	0,4±0,0	tr
Cadinano	cadaleno	1675	1675							0,1±0,0	0,3±0,0

Cadinano	amorfa-4,9-dien-2-ol não identificado (<i>m/z</i> 220)	1700	1700						
		1720	1720	0,4±0,0		1,2±0,0	1,3±0,0	1,9±0,0	0,9±0,0
	Monoterpenos não oxigenados	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Monoterpenos oxigenados	2,3	3,2	1,2	0,1	0,0	0,0	0,0	1,2
	Sesquiterpenos não oxigenados	53,0	71,2	71,5	73,3	70,1	49,6	51,0	60,0
	Sesquiterpenos oxigenados	30,4	16,6	20,9	21,0	20,8	36,8	31,9	26,6
	Outras substâncias	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Número de substâncias identificadas	39	26	24	28	24	32	33	41
	Total de substâncias quantificadas no óleo essencial (%)	86,2	94,2	97,1	97,5	91,1	86,7	92,8	93,8
	Rendimento do OE (%)	0.14±0,02	0.11±0,01	0.09±0,03	0.11±0,02	0.12±0,01	0.15±0,02	0.16±0,02	0.13±0,2
	IE_{OR} ^b	-3,6	-5,7	-6,4	-6,0	-6,0	-4,2	-4,3	-3,6

Legenda: IR_{calc} = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IR_{lit} = índice de retenção de literatura (Adams, 2007; 2017); Principais constituintes em negrito. DP = desvio padrão. ^aTodas as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. ^bÍndice Ecológico de Oxi-redução. tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%).

As médias mensais, o diagrama ombrotérmico e médias das 24 h de coleta (representadas por intervalos de 3 em 3 h), correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais para o acesso do Rio de Janeiro/RJ, estão representados na figura 27. Os dados evidenciaram que o espécime de *P. gaudichaudianum* se encontrava nos períodos chuvoso e seco no intervalo selecionado para o estudo do ciclo circadiano, nos meses de março e outubro de 2017, respectivamente.

Figura 27 – Médias mensais, diagrama ombrotérmico e médias das coletas das 24h (3 em 3 h) correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%), radiação global (kJ/m²) e temperatura média (°C) da cidade do Rio de Janeiro/RJ, no período de janeiro 2017 a janeiro de 2018 e nas quinzenas do mês de março e outubro de 2017.



Legenda: (A) Médias mensais; (B) Diagrama ombrotérmico; (C e D) média de três em três horas das 24 horas de coleta, referente às 24 h na quinzena dos meses de (C) março e (D) outubro; #Área hachurada em amarelo representa a média dos dias até a quinzena (transição do dia 14 a 15) da coleta em cada mês.

As variações nos rendimentos dos OEs das folhas dos dois períodos de coletas são apresentadas na figura 28, que também demonstra uma comparação entre esses rendimentos com à normal climatológica durante as 24 h de coleta nos meses de março e outubro.

Os resultados referentes às análises de Pearson estão descritos nas tabelas 11, 12 e 13. A tabela 11 demonstra as correlações entre as classes químicas, rendimentos e as substâncias majoritárias presentes nos OE com os fatores ambientais (radiação, umidade e temperatura)

para o espécime nas duas estações estudadas. Na tabela 12 e 13 estão apresentadas as correlações entre as substâncias dos OEs das estações chuvosa e seca, respectivamente.

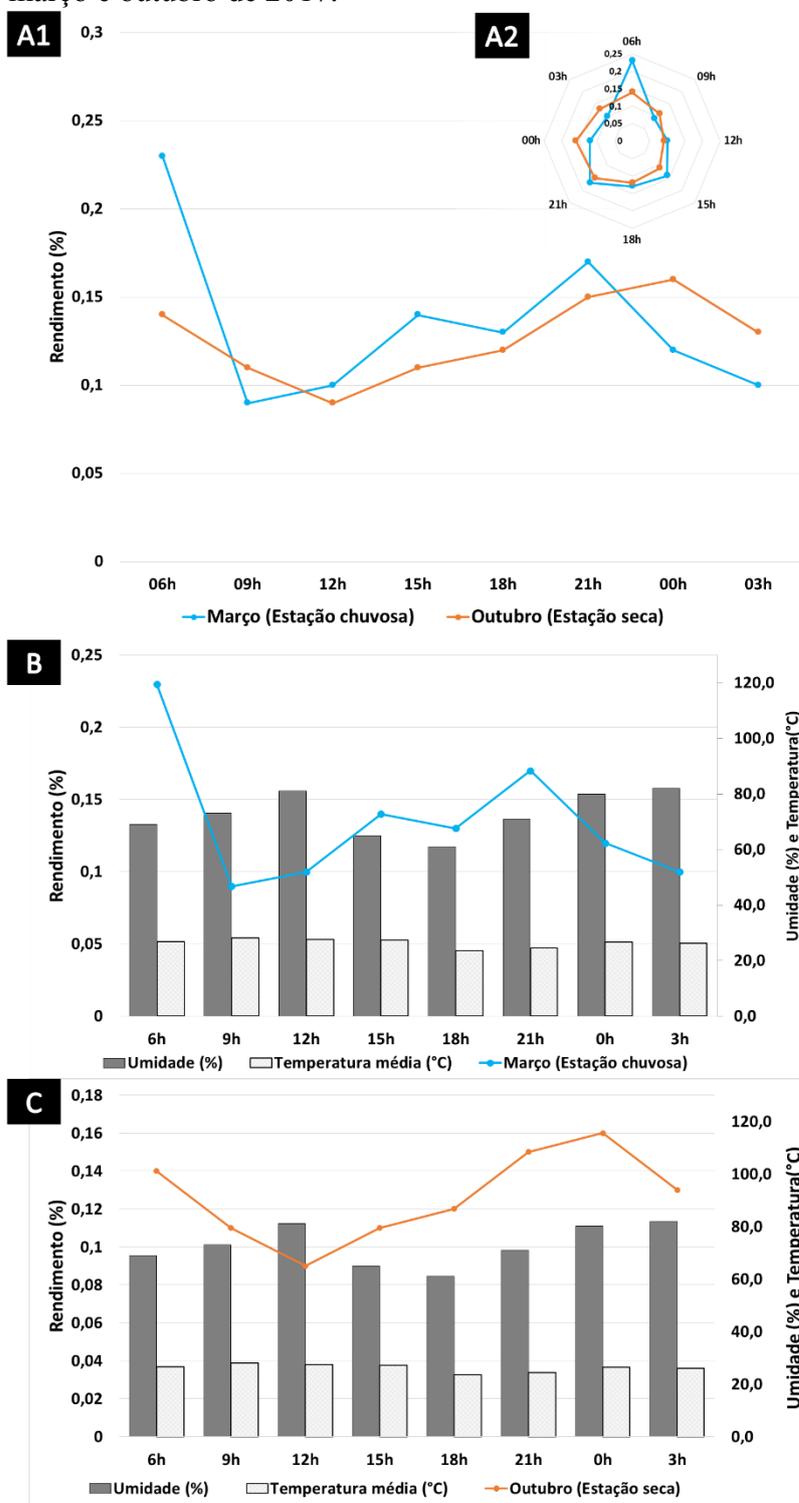
O estudo do ritmo circadiano apresentou maiores rendimentos às 6h (0,23%) no mês da estação chuvosa (C) (Figura 28B) e às 00h (0,16%) no mês da estação seca (S) (Figura 28C). Houve diferença estatística entre as médias durante o transcurso do dia para cada estação analisada (C: $p < 0.0001$; S: $p < 0.0001$), no entanto, comparando as médias dos rendimentos entre as estações seca e chuvosa, não existiu diferença significativa ($p = 0.4833$). Na figura 28A2 é possível observar um padrão de rendimento entre as amostras, e entre essas e as estações analisadas. Para ambas as estações o período da noite (21h a 6h) demonstrou os maiores teores de OE. Verificou-se que as médias dos rendimentos entre dia e noite, nas duas estações, tiveram diferenças significativas ($p = 0.0351$).

Nas análises de correlações de Pearson (rendimentos *versus* fatores ambientais), houve forte correlação inversamente proporcional na estação seca com a umidade relativa ($r^2 = -0.887$; $p = 0.003$), temperatura ($r^2 = -0.787$; $p = 0.020$) e radiação ($r^2 = -0,862$; $p = 0,006$).

A figura 29 evidencia a distribuição, ao longo de 24 h, das classes químicas presentes nos OEs de *P. gaudichaudianum* em área normalizada (Figura 34A-B) e em porcentagem (Figura 29C-D) para os meses de março (Figura 29A e C) e outubro (Figura 29B e D).

Para o mês de março e outubro foi observado que, no período do dia (9:00h às 18:00 h), existiu a predominância de sesquiterpenos não oxigenados, enquanto para o período de 21:00h às 9:00h (noite), existiu um aumento significativo de sesquiterpenos oxigenados (Figura 34 C). Nota-se que as duas estações destoam na proporção de monoterpenos, no qual há um aumento desses terpenos das 9h às 21h em março (estação chuvosa) e de 3h às 21h em outubro (estação seca). Nas correlações de Pearson observou-se que os valores tiveram maiores influência dos fatores ambientais na estação seca. Os sesquiterpenos não oxigenados apresentaram valores diretamente proporcionais em relação à umidade ($r^2 = 0,735$; $p = 0,038$), temperatura ($r^2 = 0,791$; $p = 0,019$) e radiação ($r^2 = 0,7624$; $p = 0,028$) (Tabela 11).

Figura 28 – Rendimentos dos óleos essenciais (%) obtidos das coletas de três em três horas, comparando suas variações e distribuição diária no ciclo circadiano de *Piper gaudichaudianum* silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais umidade (%) e temperatura média (°C) no acesso do Rio de Janeiro/RJ, nos meses de março e outubro de 2017.



Legenda: (A1) Comparativo das variações durante 24h; (A2) distribuição do rendimento durante 24h; Comparação da variação dos óleos essenciais com os fatores ambientais nos meses de (B) março e (C) outubro.

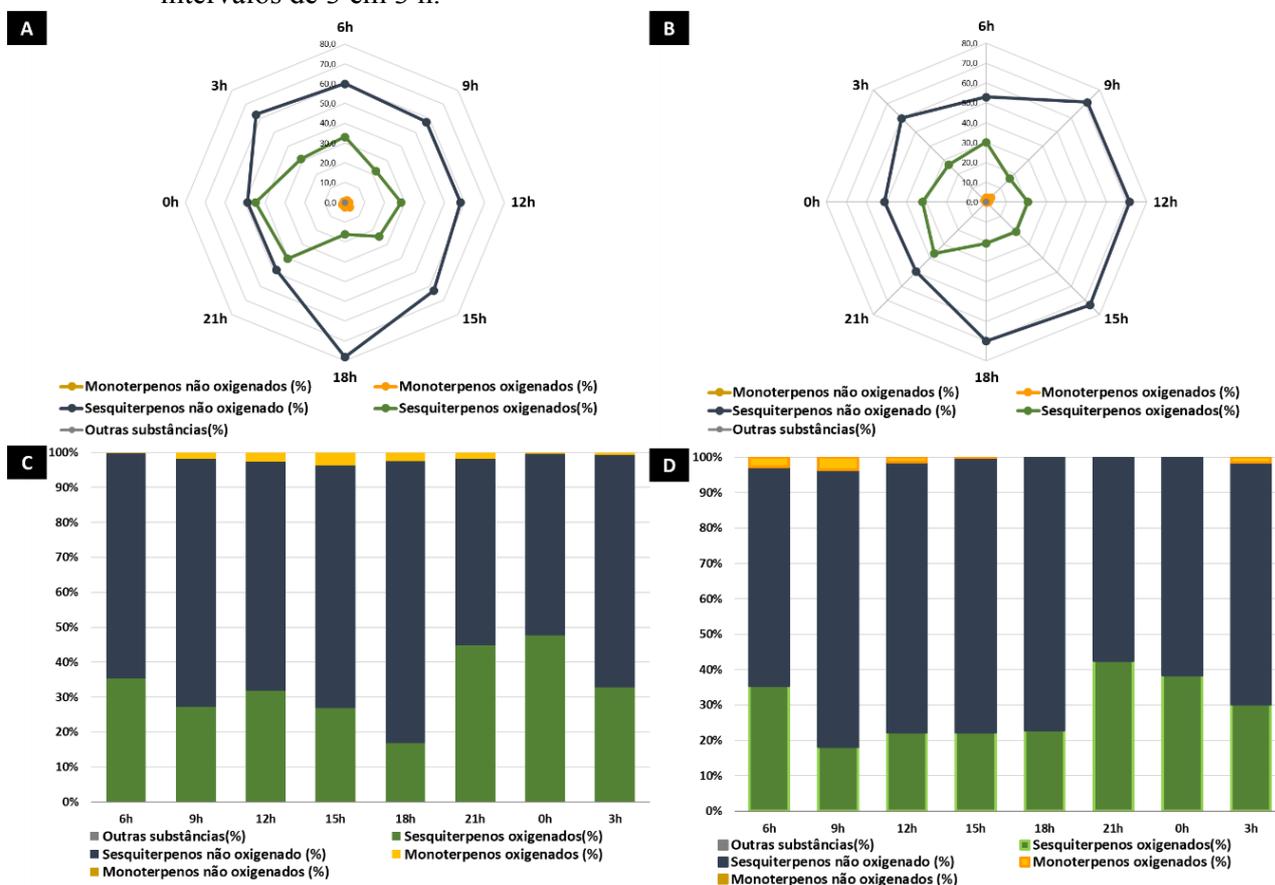
Os resultados dispostos nas tabelas 11 e 12 asseveram que os teores percentuais de sesquiterpenos não oxigenados apresentam nas duas estações uma correlação muito forte e inversamente proporcional entre esses e sesquiterpenos oxigenados (C: $r^2 = -0.854$; $p = 0,070$; S: $r^2 = 0,9543$; $p = 0,0001$). Esse resultado é esperado pelo fato de serem precursores biossintético um do outro. Esses resultados caminham para a compreensão da produção biossintética de conversão do pirofosfato de farnesila (FPP) estimulada pelos fatores abióticos. A interconversão dos sesquiterpenos oxigenados pode ser medida de controle desta via.

Tabela 11 - Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos (%), substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais do ciclo circadiano de *Piper gaudichaudianum* silvestre do acesso de Rio de Janeiro/RJ (PMR), nos meses de março e de outubro de 2017.

Variáveis analisadas		r^2					
		Umidade (%)		Temperatura (°C)		Radiação (KJm ⁻²)	
		Março	Outubro	Março	Outubro	Março	Outubro
Rendimento		0,478	-0,887**	-0,154	-0,787**	-0,394	-0,862**
Substâncias majoritárias no OE	Biciclogermacreno	-0,373	0,703*	0,347	0,588	0,855**	0,861**
	Eudesmadieno	0,292	-0,775*	-0,260	-0,629	-0,916**	-0,635
	<i>E</i> -Cariofileno	-0,598	0,535	-0,311	0,724*	0,676	0,324
	α -Cadinol	0,419	-0,581	-0,276	-0,509	-0,896**	-0,756*
	Espatulenol	0,235	-0,850**	-0,213	-0,826**	-0,619	-0,766*
	<i>E</i> -Nerolidol	-0,097	0,911**	0,474	0,871**	0,956**	0,915**
Classes químicas	Monoterpenos oxigenados	-0,490	0,038	-0,029	-0,177	0,796**	0,313
	Sesquiterpenos não oxigenados	-0,566	0,735*	-0,334	0,791*	0,328	0,762*
	Sesquiterpenos oxigenados	0,533	-0,588	0,008	-0,589	-0,588	-0,706*

Legenda: *Significativo a $p < 0,05$; **Significativo a $p < 0,01$; +OE – Óleo Essencial.

Figura 29 – Distribuições das variações das classes químicas de óleos essenciais de folhas de *Piper gaudichaudianum* silvestre coletadas em março e outubro de 2017, durante 24 h, em intervalos de 3 em 3 h.

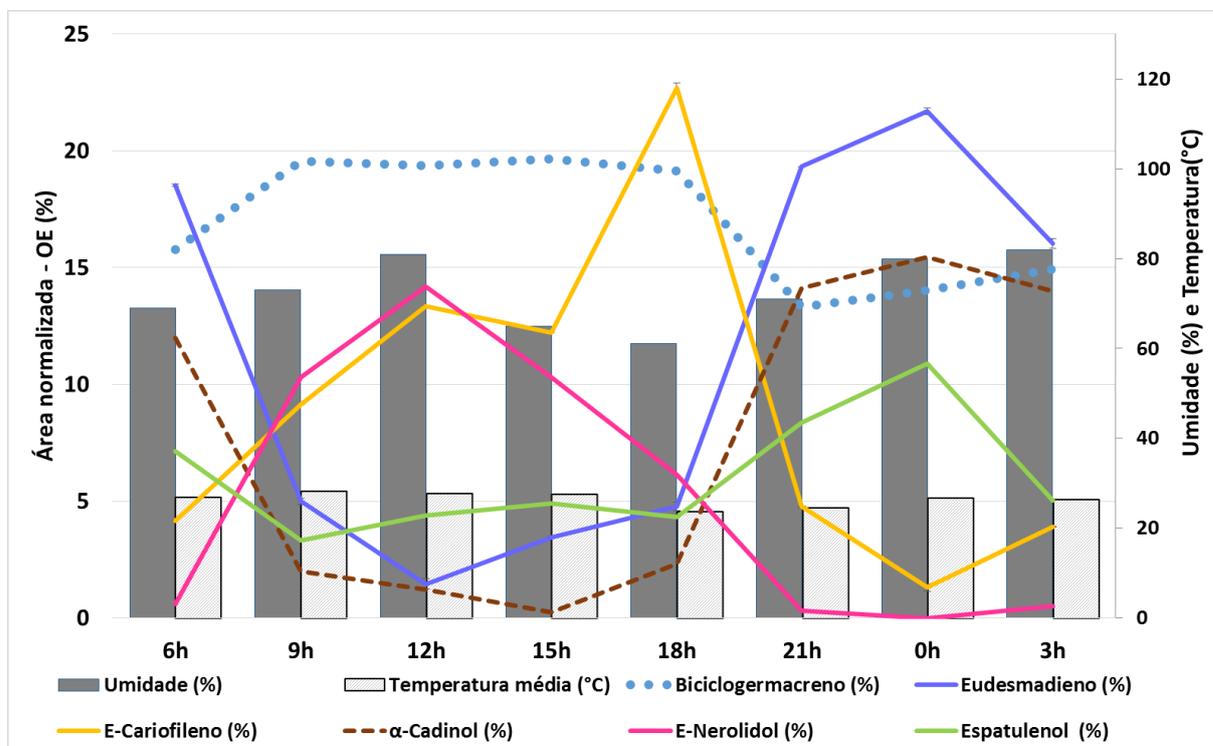


Legenda: Variações das classes químicas de óleos essenciais em (A e B) área normalizada e (C e D) porcentagem. Coletas realizadas em março (A e C) e outubro (B e D) de 2017.

Nas figuras 30 e 31 são apresentadas as comparações das variações dos componentes majoritários dos OEs do espécime no ciclo circadiano, em comparação com a normal climatológica nas 24 h das quinzenas dos meses de março e outubro de 2017, respectivamente.

No mês de março (chuvoso) (Figura 30), em relação aos OEs obtidos nos horários entre 9h a 15h, é possível observar o aumento dos teores de biciclogermacreno e *E*-nerolidol. Às 15h os teores de *E*-cariofileno aumentam e os de *E*-nerolidol diminuem. No período da noite (21h – 6h) é possível observar que eudesmadieno, α -cadinol e espatulenol registraram um aumento pronunciado, inversamente proporcional (forte e significativo) entre si (Tabelas 12 e 13). No entanto, a substância majoritária no OE é o eudesmadieno.

Figura 30 – Comparação das variações dos componentes majoritários de óleos essenciais do ciclo circadiano de *Piper gaudichaudianum* silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais temperatura (°C) e umidade (%) de março de 2017 (chuvoso).

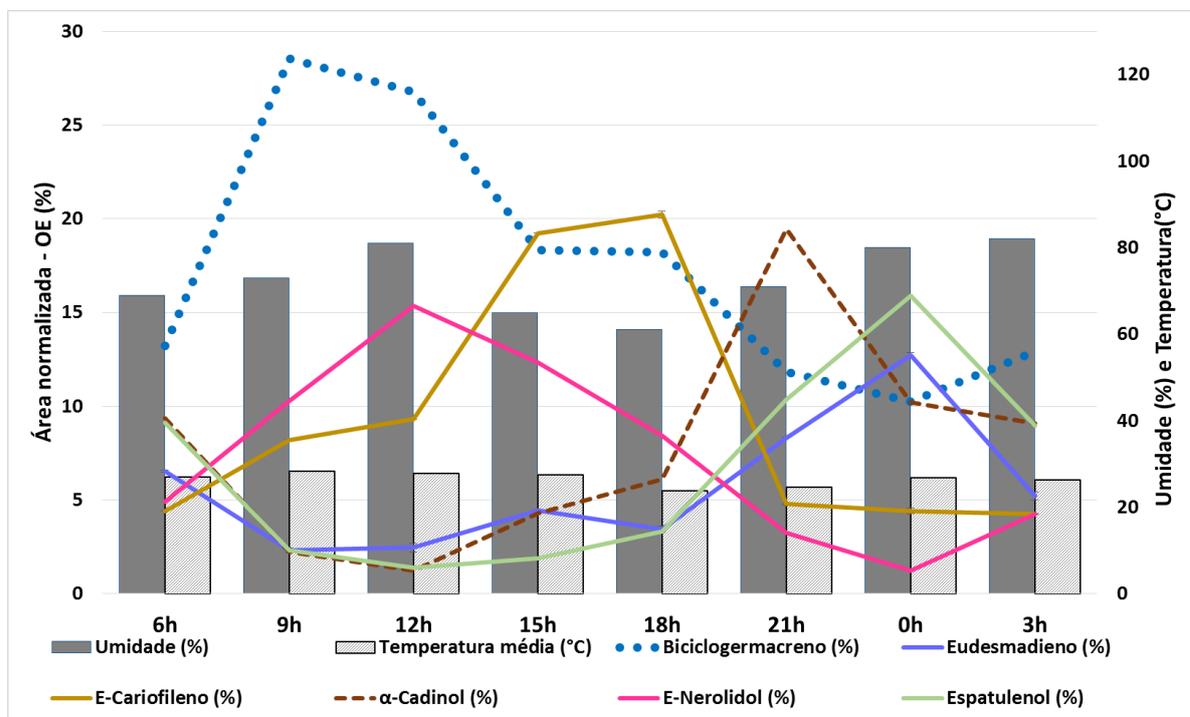


Legenda: OE – Óleo Essencial.

No mês da estação mais seca, outubro (Figura 31), o biciclogermacreno e *E*-nerolidol apresentaram o mesmo padrão de teor percentual da estação chuvosa (março), no entanto, os teores de biciclogermacreno foram mais altos entre 6h -15h, decaindo logo em seguida. Os teores de *E*-cariofileno na estação chuvosa apresentaram aumento quando comparado a estação seca para o horário das 15h, ocorrendo um decaimento após às 18h, com a diminuição da temperatura. O α -cadinol apresentou seu pico de teor percentual no horário de 00h e 21h, nos períodos chuvoso e seco, respectivamente. O espatulenol e eudesmadieno apresentaram picos de teor às 00h, em ambas as estações.

A figura 32 apresenta o gráfico de *Box plot* comparativo entre as substâncias majoritárias nas estações chuvosa e seca. As médias dos teores no período mais seco foram maiores que no chuvoso. No entanto, os efeitos entre período seco vs chuvoso, sob a composição, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 31 – Comparação das variações dos componentes majoritários de óleos essenciais do ciclo circadiano de *Piper gaudichaudianum* silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais temperatura (°C) e umidade (%) de outubro de 2017 (seca).



Legenda: OE – Óleo Essencial.

Tabela 12 - Correlação simples entre os constituintes principais da estação chuvosa (março) de óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre.

	Monoterpenos oxigenados	Sesquiterpenos não oxigenado	Sesquiterpenos oxigenados	Biciclogermacreno	Eudesmadieno	<i>E</i> -Cariofileno	α -Cadinol	Espatuleno
Sesquiterpenos não oxigenados	0,366							
Sesquiterpenos Oxigenados	-0,582	-0,854**						
Biciclogermacreno	0,698	0,594	-0,870*					
Eudesmadieno	-0,798*	-0,554	0,843*	-0,963**				
<i>E</i> -Cariofileno	0,723*	0,800*	-0,850*	0,774*	-0,810*			
α -Cadinol	-0,808*	-0,536	0,836*	-0,981**	0,980**	-0,806*		
Espatuleno	-0,531	-0,654	0,906**	-0,817*	0,843*	-0,656	0,787*	
<i>E</i> -Nerolidol	0,736*	0,277	-0,646	0,907*	-0,946**	0,628	-0,932**	-0,716*

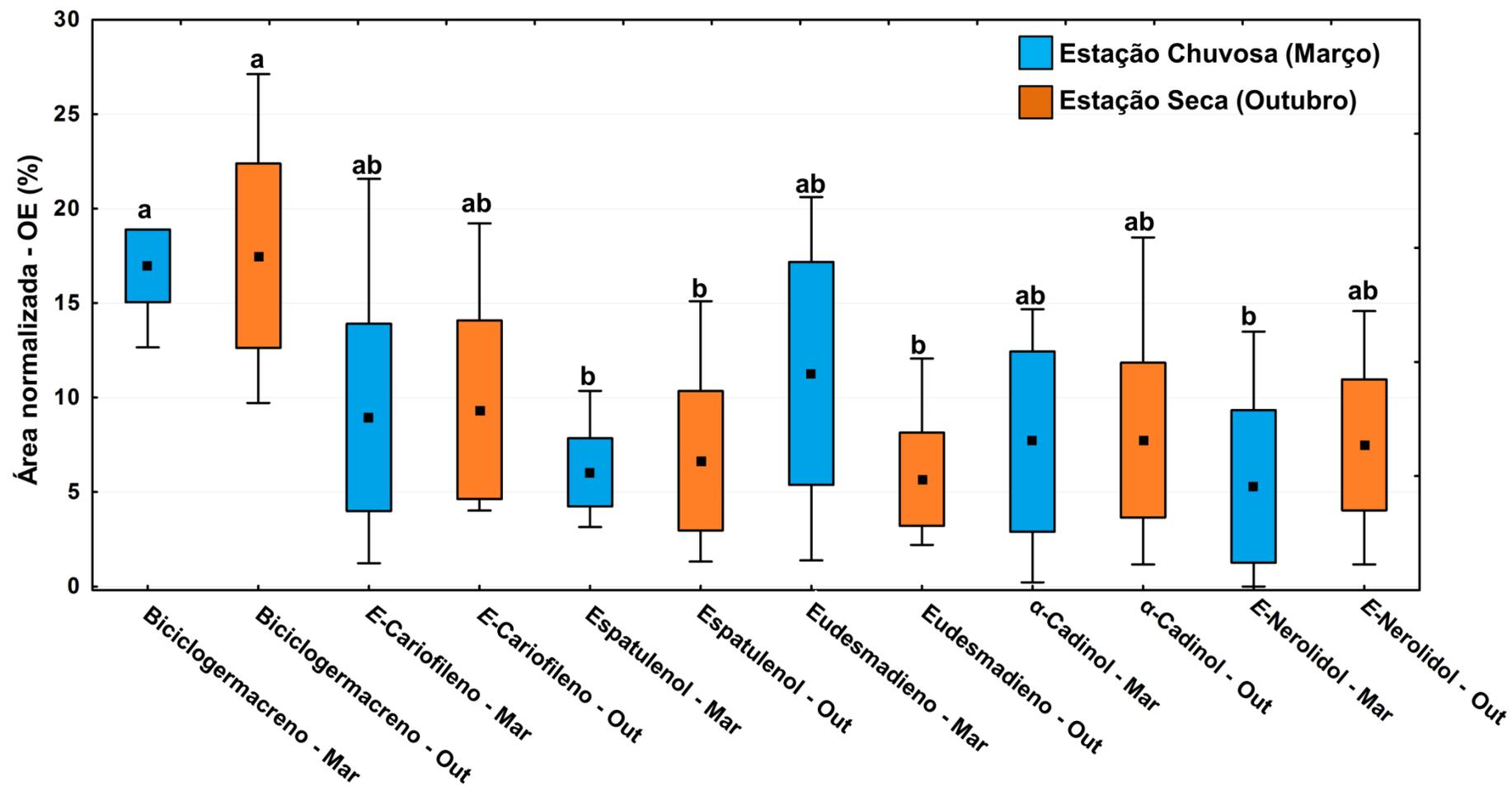
Legenda: * Significante $p < 0.05$ ** Significante $p < 0.01$

Tabela 13 - Correlação simples entre os constituintes principais da estação seca (março) de óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre

Dry Season (October)								
Compound	Monoterpenos oxigenados	Sesquiterpenos não oxigenados	Sesquiterpenos oxigenados	Biciclogermacreno	Eudesmadieno	<i>E</i> -Cariofileno	α -Cadinol	Espatuleno
Sesquiterpenos não oxigenados	0,168							
Sesquiterpenos Oxigenados	-0,381	-0,954**						
Biciclogermacreno	0,524	0,818*	-0,850**					
Eudesmadieno	-0,446	-0,843*	0,822*	-0,812*				
<i>E</i> -Cariofileno	-0,360	0,744*	-0,610	0,337	-0,495			
α -Cadinol	-0,413	-0,857*	0,923**	-0,795*	0,680	-0,463		
Espatuleno	-0,271	-0,926**	0,851*	-0,842*	0,944**	-0,673	0,723*	
<i>E</i> -Nerolidol	0,211	0,898**	-0,806*	0,861**	-0,823**	0,584	-0,797*	-0,932**

Legenda: * Significante $p < 0.05$ ** Significante $p < 0.01$

Figura 32- Análises de *box plot* das substâncias majoritárias presentes no óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* silvestre no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações chuvosa (março) e seca (outubro).



Legenda: Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes usando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os estudos de ACP e AAH foram aplicados às substâncias das amostras de OEs do estudo circadiano nos períodos chuvoso e seco (Figuras 33 e 34). O ACP apresentou variância total de 90,8% e os componentes principais (PC1 e PC2) tiveram valores proporcionais entre si, 45,8% e 41,1%, respectivamente. O sistema axial bidimensional gerado pelo ACP (Figura 32) evidencia claramente a discriminação de dois grupos resultantes da variabilidade química: **Grupo I** – rico em biciclogermacreno, eudesmadieno, α -cadinol e espatulenol; **Grupo II** - rico em biciclogermacreno, *E*-nerolidol e *E*-cariofileno. A AAH corroborou novamente com os resultados do ACP, demonstrando a formação desses dois grupos (distância euclidiana de 51.0), correlacionando essa diferença entre o dia (9h às 18h) e a noite (21h às 6h) (Figura 38). Analisando as variações em menor distância euclidiana (26,1) foi possível observar que no período da noite (21h às 6h) houve distinção entre os períodos chuvoso (C) e seco (S), por aumento dos teores de eudesmadieno no período seco.

Ao testar a hipótese observada na análise multivariada foram apreciadas diferenças entre os valores de variância do dia *vs* noite (ANOVA pareada, $F_{11,77}=25,22$, $p<0,001$), constatando que esse conjunto de fatores (temperatura, umidade e radiação), que definem parâmetros dia e noite, exerceram mais efeito sob a composição química dos OEs do que as variações das estações seca *vs* chuvosa.

As substâncias não apresentaram diferenças significativas entre as duas estações. Foi construído um gráfico *box plot* com os valores encontrados ao longo da noite e do dia, independente da estação do ano. Todas as substâncias separadas quando comparadas entre si, seguindo essa lógica (dia *vs* noite), apresentaram diferenças significativas ($p<0,001$). A partir dessa premissa pode-se observar padrões que estão representados na figura 40.

Em ambas as estações, a substância biciclogermacreno exibiu constância nos teores percentuais, com baixa amplitude de variação ao longo do dia ou da noite, valores esses diferentes entre si. O período diurno, em princípio, elevou a média do teor (~21%) para essa substância (Tabelas 11 e 12, Figura 35).

No período da noite (21h às 6h), as substâncias eudesmadieno, α -cadinol e espatulenol apresentaram um aumento de até quatro vezes em relação aos teores encontrados de dia, com uma relação diretamente proporcional entre si (Tabelas 12 e 13; Figura 35). No período do dia (9h às 18h.) as substâncias *E*-cariofileno e *E*-nerolidol tem seus teores acentuados, oposto ao comportamento noturno. Curiosamente, a última substância citada tem seu pico de teor percentual no horário de 00h. (Tabelas 11 e 12; Figuras 30 e 31)

Figura 33 - *Biplot* (ACP) resultante da análise da composição dos óleos de folhas de *Piper gaudichaudianum* durante os períodos chuvoso (C, março) e seco (S, outubro), das 12h às 00h.

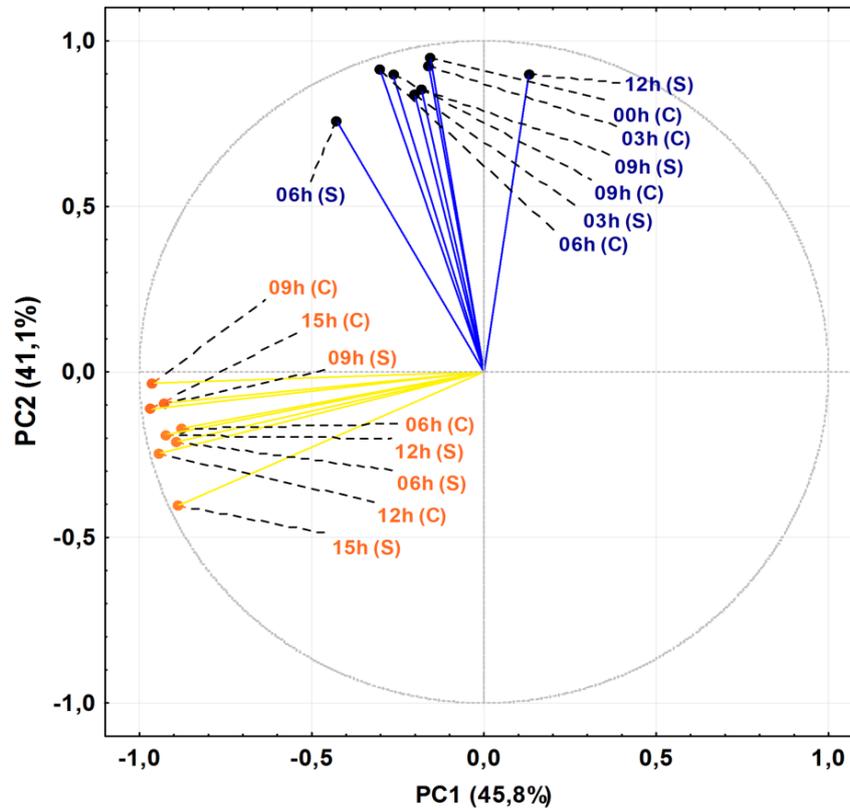


Figura 34 - Dendrograma representando a relação de similaridade da composição dos óleos das folhas de *Piper gaudichaudianum* durante as estações chuvosa (C, março) e seca (S, setembro), das 12h às 00h.

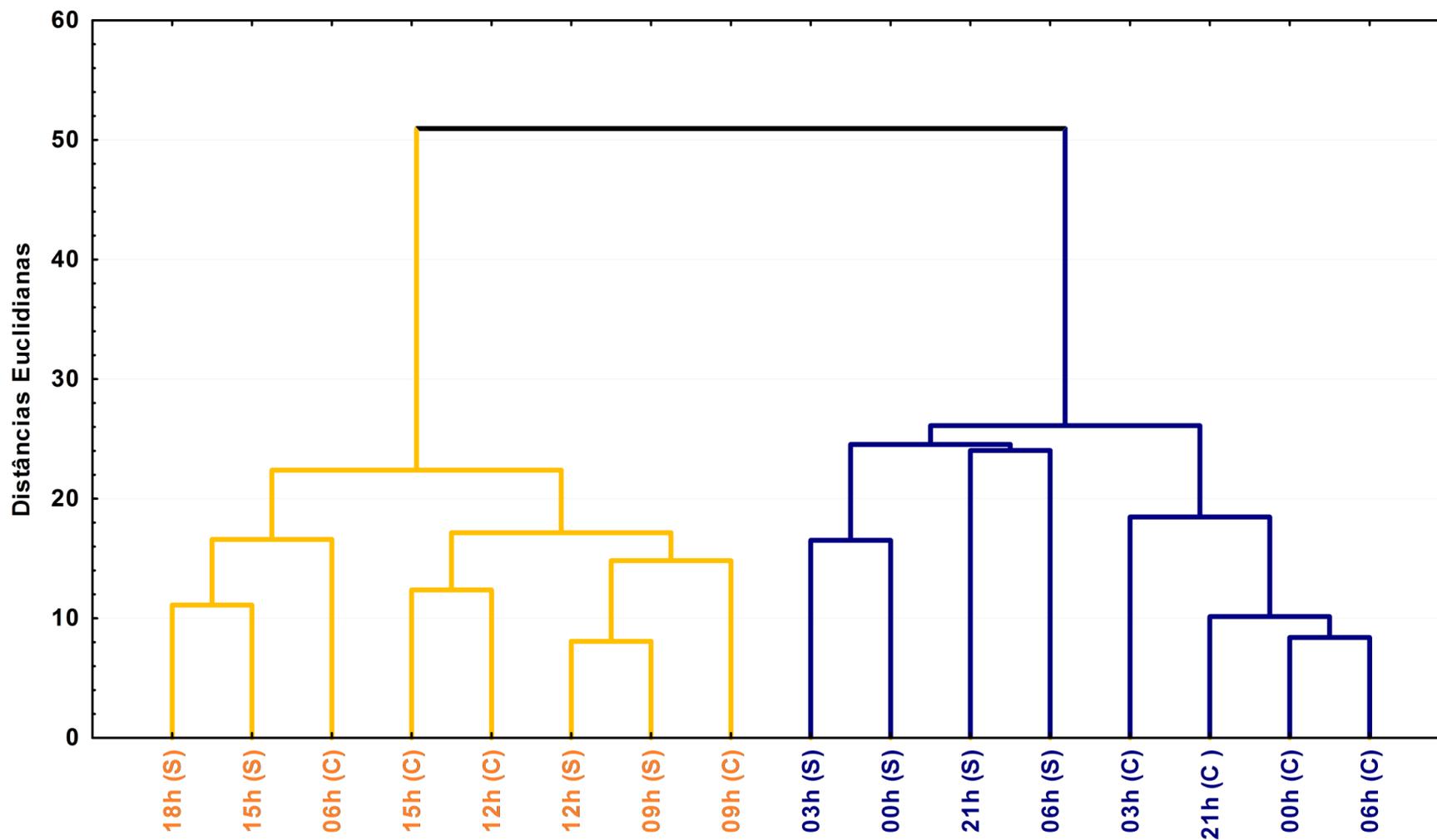
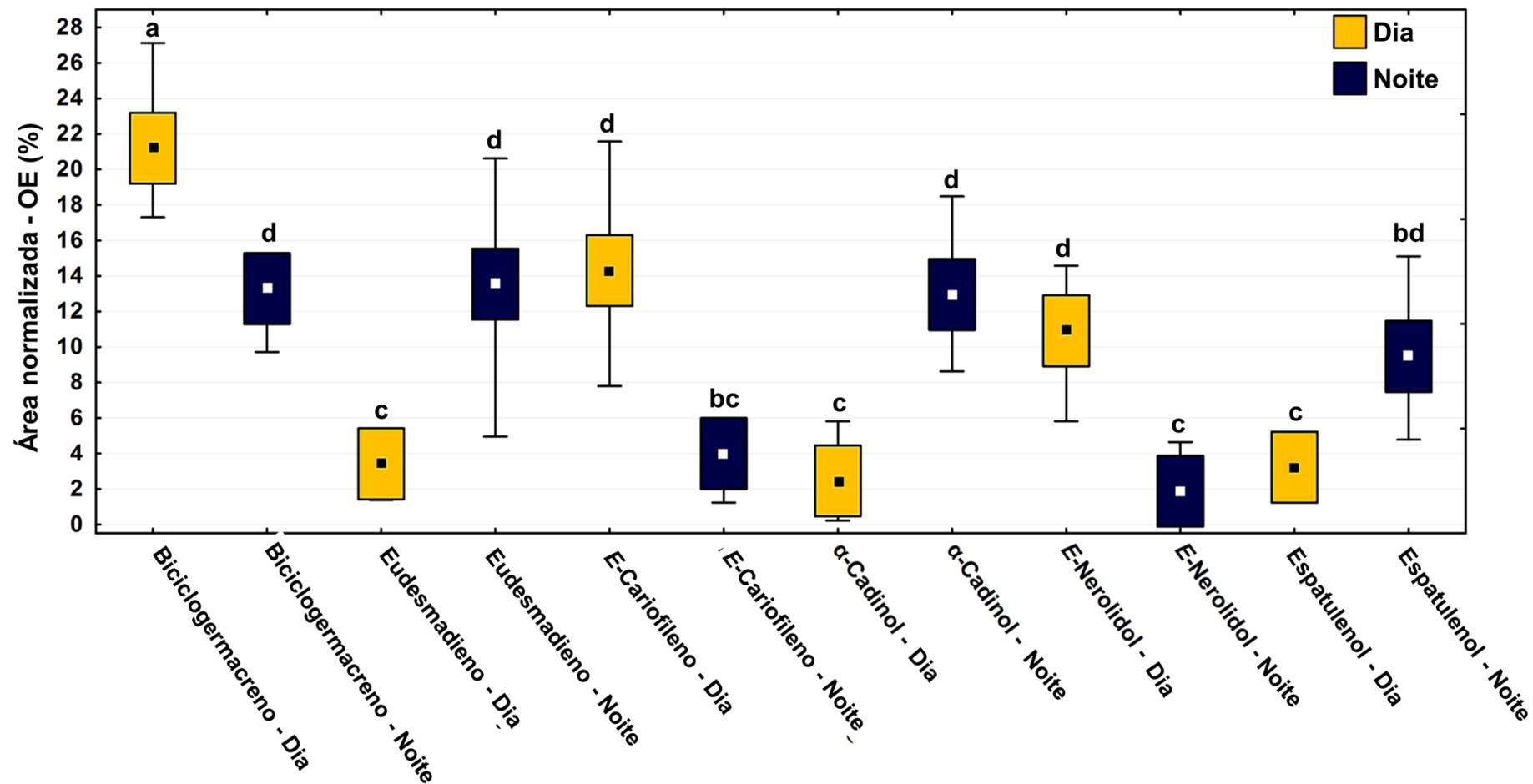


Figura 35 - Análise de *box plot* das principais substâncias (%) presentes no óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* no estudo do ritmo circadiano dos dias (9h às 18h) e noturnos (21h às 6h), independentes das estações chuvosa e seca.



Legenda: Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes usando o teste de Tukey ($p < 0,05$). OE – óleo essencial;

4.2 Padrões quimiofenético, quimiodiversidade e quimiogeográficos dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum*.

4.2.1 Aspectos quimiofenéticos a partir dos esqueletos de carbono nos estudos sazonal e circadiano de *Piper gaudichaudianum*

Nos estudos sazonal (Sz) e circadiano (Cc) as substâncias identificadas e seus respectivos teores percentuais foram agrupadas de acordo com seus respectivos esqueletos de carbono (Tabelas 14 e 15). A partir de uma proposta biossintética foi possível encontrar um total de 19 esqueletos de carbono (Sz: 19; Cc: 15), sendo quatro (n=4) de monoterpenos e quinze (n=15) de sesquiterpenos, que estão relacionados nas figuras 36 e 37. Ademais, foi construído outro mapa com os esqueletos do estudo do ritmo circadiano (Figura 37).

No estudo sazonal e circadiano observou-se, pelos percentuais médios, que os principais esqueletos de carbono foram bicilogermacrano (Sz: 11,2 – 23,2%; Cc: 10,2 – 28,6%) > aromadendrano (Sz: 2,1 – 19,3%; Cc: 5,0 – 19,3%) > eudesmano (Sz: 5,8 – 16,2%; Cc: 2,3 – 25,4%) > cadinano (Sz: 2,2 – 14,6%; Cc: 1,7 – 27,8%) e > farnesano (Sz: 3,3 – 22,9%; Cc: 0,0 – 16,1%). Os esqueletos com maior diversificação (maior número de substâncias) foram cadinano (Sz: 22; Cc: 18) > eudesmano (Sz: 12; Cc: 9) > aromadendrano (Sz: 8; Cc: 6) > cariofilano (Sz: 8; Cc: 4). Foram feitas correlações entre fatores ambientais vs esqueletos e entre esqueletos vs esqueletos, que são apresentados na tabela 16 para estudo sazonal e 17 e 18 para o estudo circadiano (estações chuvosa e seca, respectivamente).

Foram observadas dinâmicas biossintéticas na construção de esqueletos de carbono ao longo do ano (estudo sazonal) (Tabela 14 e Figura 36). Os esqueletos precursores pirofosfato de geranila (monoterpenos) permaneceram em baixas porcentagens durante todo o ano. Constata-se que a biossíntese de esqueletos de carbono a partir desse precursor foi privilegiada apenas nos períodos de floração e de aumento da precipitação, após período de seca ($r^2=0,613$, $p=0,01$). No geral, existe desvio biossintético para formação de substâncias a partir de esqueletos das rotas interligadas ao precursor dos sesquiterpenos, ou seja, pirofosfato de farnesila ($r^2=-0,898$, $p=0,0001$).

Durante todo o ano, os derivados de germacrano apresentaram-se em altos teores percentuais, sugerindo-se que o pirofosfato de farnesila desloca-se com tendência para formar substâncias do esqueleto central (germacrano), em relação ao esqueleto de carbono que difere

do esqueleto precursor (farnesano). No período reprodutivo (janeiro, fevereiro, novembro e dezembro), a via biossintética em maior evidência foi à mesma do esqueleto precursor farnesano, em alta teor percentual. Esse fato pode sugerir a hipótese de que o metabolismo esteja direcionado para produções de metabólitos basais, principalmente açúcares, disponibilizado como recurso de recompensa na polinização, pois teoricamente esses metabólitos, com esqueletos acíclicos, demandam menores gastos energéticos para sua produção. Essa evidência será discutida na seção Discussão, juntamente com as hipóteses sugeridas anteriormente relativas à função de *E*-nerolidol em *P. gaudichaudianum*.

Comparando os percentuais entre os esqueletos de carbono, constata-se que os de substâncias do tipo biciclogermacrano encontraram-se em alta durante o ano, sugerindo que o precursor central germacrano leva a produção desse sesquiterpeno. O aumento de aromadendrano está ligado a diminuição de germacrano ($r^2=-0,6852$; $p=0,020$), sugerindo que a produção de substâncias com esqueletos de carbono do tipo aromadendrano, que tem como precursor o biciclogermacrano, fica condicionado ao deslocamento por consequência do consumo, quase que total, de substratos com esqueleto de germacrano.

Outro resultado relevante foi observado que nos meses de agosto e setembro a rota que leva a formação do biciclogermacrano foi atenuada quando a rota de cadinano foi favorecida. Ao contrário, o favorecimento da rota para formação do biciclogermacrano desfavorece em até duas vezes a rota para formação de cadinano (que agrupa os esqueletos muurolano e amorfano). As percentagens de esqueleto de cariofilano foram baixas em comparação as variações dos outros esqueletos. No entanto, existe uma constância para conversão a partir do precursor pirofosfato de farnesila durante o ano. O aumento do percentual do esqueleto tipo humulano ($r^2=0,698$; $p=0,012$) está condicionado ao aumento de esqueleto de cariofilano. Esse achado é facilmente comprovado pelo fato deste encontrar-se em uma mesma sequência química de transformação. Substâncias com os esqueletos do tipo elemano foram favorecidas nos meses de maio a agosto (índices pluviométricos intermediários).

Figura 36 - Mapa biossintético de tipos de esqueleto de carbonos terpênicos presentes em óleos essenciais dos estudos sazonal e circadiano de *Piper gaudichaudianum* silvestre

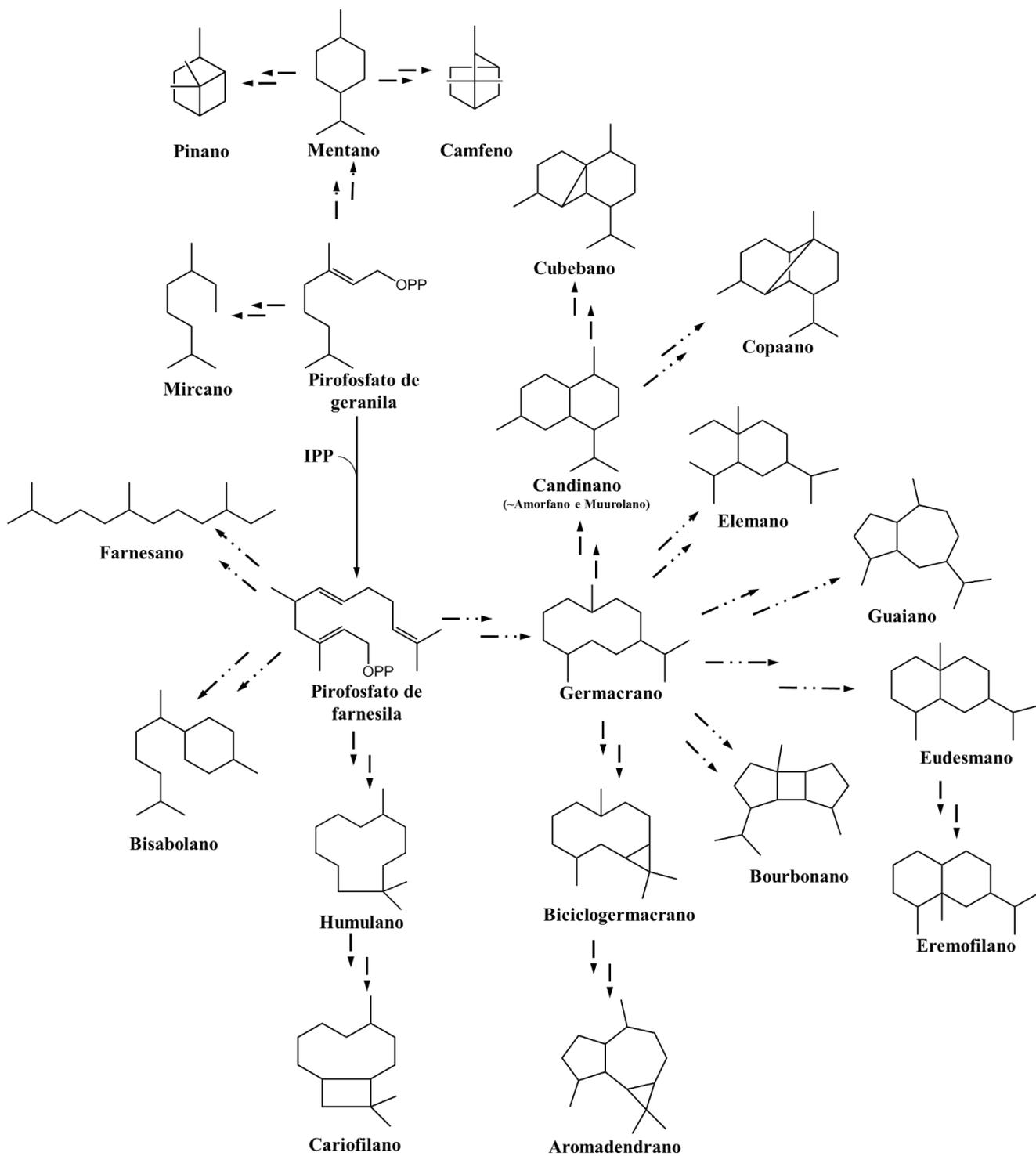
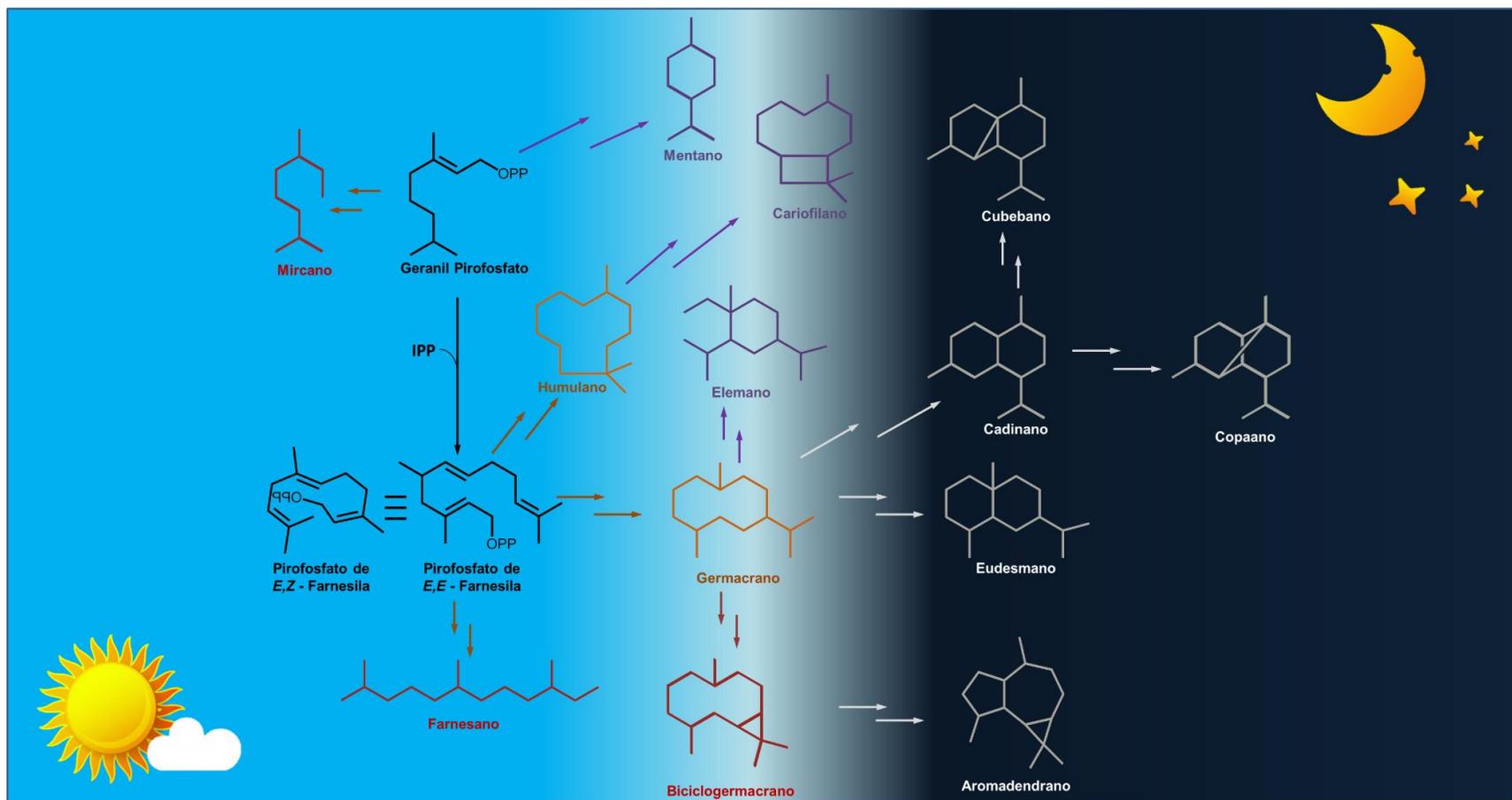


Figura 37 - Mapa biossintético de tipos de esqueleto de carbonos terpênicos, com base na análise de óleos essenciais foliares do estudo circadiano de *Piper gaudichaudianum*



No estudo circadiano foi observado que as dinâmicas relacionadas à produção das substâncias, a partir dos esqueletos de carbono, foram marcadas pelo mesmo padrão entre dia e noite nas duas estações (Tabela 15, Figura 37).

Nas estações seca e chuvosa foi possível registrar 12 e 15 esqueletos de carbono, respectivamente. Os derivados de pirofosfato de geranila foram favorecidos na estação chuvosa. Nesta, apenas as substâncias predecessoras de esqueleto de carbono de mircano foram favorecidas no período da noite. Opostamente, na estação chuvosa foi observado que esse era favorecido para o período do dia, pois no período da noite houve um desvio de rota biossintética para mentano e canfano.

No período do dia, independentes das estações seca (S) ou chuvosa (C), para os derivados de pirofosfato de farnesila, houve favorecimento das 9h às 03h para a formação de substâncias com esqueletos semelhantes ao do precursor (farneseno), que demanda menor energia para que a planta os produza. Esse fato pode ser justificado pela radiação incidente sobre a planta (C: $r^2=0,956$, $p=0,001$; S: $r^2=0,904$, $p=0,002$). Nesse mesmo período o deslocamento para produção do esqueleto majoritário bicilogermacrano é constante e relativamente maior na estação seca, sendo que essa rota biossintética é comumente ativa na planta. Nos horários das 03h às 04h houve deslocamento exclusivo para produção de esqueleto cariofilano (inclusive em relação ao esqueleto de carbono do majoritário bicilogermacrano).

Nos períodos noturnos (21h às 6h) houve desvio de rota biossintética do germacrano para as rotas dos esqueletos de carbono do tipo cadinano e eudesmano. Além disso, foi favorecido o deslocamento de bicilogermacrano para produção de substâncias de esqueletos de carbono a partir de aromadendrano. Ambos os desvios biossintéticos justificam as reduções significativas dos percentuais do majoritário bicilogermacrano na composição dos OEs.

Com base nos resultados mencionados acima, *é possível postular que existe um favorecimento diurno para biossíntese de esqueletos acíclicos e monocíclicos, que pleiteia menores gastos energéticos para a construção e especialização estrutural de produção. A noite observou-se comportamento oposto, com favorecimento para a produção de esqueletos bicíclicos e tricíclicos, que demandam maiores gastos energéticos na construção e especialização estrutural de produção.*

Tabela 14 - Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbonos dos componentes do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* silvestre no estudo sazonal durante 12 meses (janeiro a dezembro de 2017).

Esqueleto-C	Porcentagem de Ocorrência (%)											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Aromadendrano	10,9	6,4	12,9	12,1	2,1	13,1	5,7	14,8	10,1	9,0	13,3	19,3
Biciclogermacrano	12,2	17,0	16,9	18,1	20,3	19,3	15,3	12,3	11,2	20,2	23,2	12,1
Bisabolano	-	0,2	0,9	-	-	-	tr	-	-	tr	0,1	-
Bourbonano	-	0,1	0,1	tr	-	-	-	-	0,1	-	-	-
Cadinano	18,5	11,5	7,2	2,2	7,0	7,0	10,0	15,3	19,7	12,1	11,4	6,5
Cariofilano	6,1	10,8	10,1	6,9	7,7	11,8	12,5	5,6	8,7	10,4	7,0	5,5
Canfano	0,1	0,1	5,0	5,2	5,1	-	-	-	-	-	-	tr
Copaano	-	1,9	1,6	-	5,7	-	9,6	8,5	7,2	8,2	2,7	5,3
Cubebano	-	0,2	tr	-	1,2	-	-	0,4	5,6	3,4	1,2	2,9
Elemmano	3,6	1,3	9,0	5,6	10,2	10,5	10,6	12,4	5,4	3,2	6,3	9,9
Eremofilano	tr	2,8	tr	0,4	-	-	tr	tr	tr	-	-	-
Eudesmano	11,9	7,6	10,8	13,7	16,1	15,4	12,1	14,5	16,2	8,6	5,8	11,0
Farnesano	17,9	22,9	6,3	5,8	4,3	4,2	3,8	4,6	4,3	5,3	10,3	17,3
Germacrano	0,5	9,9	5,9	8,01	11,0	3,6	9,0	4,2	3,4	11,6	6,7	6,5
Guaiane	0,2	0,5	-	-	-	-	-	1,6	-	-	2,1	3,2
Humulano	5,1	4,2	7,2	3,9	2,3	6,5	6,6	4,4	5,5	7,6	1,4	0,8
Mentano	0,6	-	1,2	6,3	2,1	tr	-	-	-	-	-	tr
Mircano	6,3	-	1,2	5,8	2,8	tr	0,5	-	-	-	0,3	-
Pinano	0,6	0,7	0,7	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Agos-agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%).

Tabela 15 - Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbono dos componentes do óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* silvestre no estudo circadiano, durante as estações chuvosa (C, março) e seca (S, outubro), das 12h às 00h.

Esqueleto-C	Porcentagem de Ocorrência (%)															
	Estação chuvosa (Março)						Estação Seca (Outubro)									
	06h	09h	12 h	15 h	18h	21h	00h	03h	06h	09h	12h	15 h	18h	21h	00h	03h
Aromadendrano	17,4	5,0	7,9	10,1	9,3	11,5	13,8	12,1	15,0	8,8	7,8	7,7	9,4	14,2	19,3	14,0
Biciclogermacrano	15,8	19,6	19,4	19,7	19,1	13,3	14,0	14,9	13,2	28,6	26,8	18,3	18,2	11,8	10,2	12,9
Cadinano	15,5	5,3	3,8	4,2	5,7	23,3	27,5	25,0	15,7	2,7	1,7	4,7	7,5	27,8	18,1	21,4
Canfano	0,1	-	-	-	0,8	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cariofilano	9,1	12,2	16,0	15,8	25,7	9,3	6,0	5,3	4,9	8,6	9,6	20,4	22,0	6,0	5,0	5,1
Copaano	2,9	2,0	2,2	4,3	4,5	1,9	2,3	5,8	6,1	7,2	7,5	7,6	5,8	5,6	5,2	5,6
Cubebano	0,0		0,3	0,3	0,2	0,7	0,1	0,3	0,1	0,5		0,2		0,0	0,0	0,0
Elemano	3,9	5,4	3,9	3,5	1,4	1,0	1,7	7,6	0,9	3,2	3,6	3,2	0,9	0,7	10,4	7,4
Eremofilano	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Eudesmano	19,9	8,0	6,5	8,7	6,1	21,9	25,4	19,8	8,7	2,3	2,9	4,6	3,5	12,3	17,8	9,2
Farnesano	0,6	10,3	14,2	10,3	6,1	0,3	0,0	0,5	6,2	10,4	16,1	12,5	8,4	3,2	1,2	5,5
Germacrano	2,1	5,7	6,0	5,3	6,9	1,1	0,5	2,2	2,6	8,3	9,3	6,3	5,3	3,1	3,5	2,5
Humulano	5,3	7,5	8,2	8,5	9,6	3,8	1,9	5,0	10,1	10,2	10,1	11,6	8,9	0,5	0,1	8,2
Mentano	0,2	-	-	-	1,9	1,8	0,3	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Mircano	0,0	1,6	2,3	3,5	0,4	0,0	0,0	0,5	2,3	3,2	1,2	0,1	-	-	-	1,2

Tabela 16 - Correlação simples entre os fatores ambientais e os esqueletos de carbono presentes nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre do estudo sazonal.

	Aromadendrano	Biciclogermacrano	Cadinano	Cariofilano	Elemmano	Eudesmano	Farnesano	Germacrano	Humulano	Derivados de FPP	Derivados de GPP
Biciclogermacrano	-0,315										
Cadinano	-0,067	-0,495									
Cariofilano	-0,393	0,299	-0,124								
Elemmano	0,200	-0,113	-0,294	-0,080							
Eudesmano	-0,047	-0,388	0,011	-0,071	0,506						
Farnesano	0,070	-0,211	0,142	-0,234	-0,540	-0,546					
Germacrano	-0,581*	0,557	-0,485	0,333	-0,121	-0,301	-0,097				
Humulano	-0,077	-0,057	0,198	0,698**	-0,105	0,138	-0,397	-0,065			
Derivados de pirofosfato de farnesila	-0,046	-0,295	0,481	0,269	0,039	-0,158	0,089	0,125	0,178		
Derivados de pirofosfato de geranila	-0,100	0,154	-0,476	-0,270	-0,097	0,256	-0,106	0,075	-0,086	-0,898**	
Precipitação (mm)	0,534	0,136	-0,574	-0,159	0,120	-0,065	-0,177	-0,064	0,120	-0,599*	0,613*
Temperatura (°C)	0,140	-0,043	-0,031	-0,105	-0,503	-0,476	0,742**	-0,180	-0,042	-0,261	0,277
Umidade (%)	0,202	0,228	-0,652*	-0,053	0,509	0,178	-0,439	0,450	-0,232	0,039	0,065

Legenda: FPP = pirofosfato de farnesila; GPP = pirofosfato de geranila; * Significante $p < 0,05$ ** Significante $p < 0,01$

Tabela 17 - Correlação simples entre os fatores ambientais e os esqueletos de carbono presentes nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre obtidos da estação chuvosa (março) do estudo circadiano.

	Aromadendrano	Biciclogermacrano	Cadinano	Cariofilano	Elemmano	Eudesmano	Farnesano	Germacrano	Humulano	Derivados de FPP	Derivados de GPP
Biciclogermacrano	-0,682										
Cadinano	0,630	-0,967**									
Cariofilano	-0,478	0,742*	-0,784*								
Elemmano	-0,144	0,169	-0,039	-0,361							
Eudesmano	0,754*	-0,965**	0,960**	-0,826**	-0,106						
Farnesano	-0,771*	0,907**	-0,898**	0,592	0,142	-0,900**					
Germacrano	-0,724*	0,959**	-0,943**	0,856**	0,096	-0,994**	0,859**				
Humulano	-0,603	0,926**	-0,934**	0,858**	0,117	-0,967**	0,791*	0,972**			
Derivados de pirofosfato de farnesila	0,610	-0,381	0,466	-0,101	0,088	0,371	-0,535	-0,303	-0,203		
Derivados de pirofosfato de geranila	-0,567	0,673	-0,736*	0,837**	-0,439	-0,749*	0,666	0,727*	0,741*	-0,295	
Umidade (%)	0,028	-0,373	0,474	-0,679	0,465	0,395	-0,098	-0,419	-0,526	0,078	-0,634
Temperatura (°C)	-0,211	0,348	-0,277	-0,341	0,558	-0,165	0,475	0,109	0,044	-0,458	-0,194
Radiação (KJ/m ²)	-0,623	0,855**	-0,860**	0,649	0,022	-0,858**	0,956**	0,822**	0,786*	-0,335	0,734*

Legenda: FPP = pirofosfato de farnesila; GPP = pirofosfato de geranila; * Significante $p < 0,05$ ** Significante $p < 0,01$

Tabela 18 - Correlação simples entre os fatores ambientais e os esqueletos de carbono presentes nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre obtidos da estação seca (outubro) do estudo circadiano.

	Aromadendr ano	Biciclogermacr ano	Cadina no	Cariofila no	Copaa no	Elema no	Eudesma no	Farnesa no	Germacra no	Humula no	Derivados de FPP	Derivados de GPP
Biciclogermacrano	-0,820**											
Cadinano	0,791*	-0,857**										
Cariofilano	-0,681	0,299	-0,572									
Copaano	-0,832**	0,815**	-	0,378								
Elemmano	0,519	-0,274	0,168	-0,373	-0,307							
Eudesmano	0,948**	-0,839**	0,800**	-0,582	-0,765*	0,557						
Farnesano	-0,913**	0,845**	-	0,497	0,920*	-0,344	-0,875**					
Germacrano	-0,803*	0,948**	-	0,390	0,836*	-0,168	-0,738**	0,863**				
Humulano	-0,755*	0,628	0,880**	0,462	*	-0,372	-0,866**	0,791**	0,506			
Derivados de pirofosfato de farnesila	-0,559	0,471	-0,744*	0,480	0,603	0,364	-0,392	0,641	0,630	0,382		
Derivados de pirofosfato de geranila	-0,175	0,524	-0,319	-0,393	0,364	-0,153	-0,403	0,263	0,279	0,498	-0,207	
Umidade (%)	-0,855**	0,703	-0,683	0,513	0,736*	-0,496	-0,797*	0,915**	0,747*	0,620	0,483	0,038
Temperatura (°C)	-0,875**	0,588	-0,658	0,705	0,823*	-0,374	-0,692	0,840**	0,706	0,546	0,707*	-0,178
Radiação (KJ/m ²)	-0,771*	0,862**	-	0,279	0,954*	-0,123	-0,679	0,904**	0,924**	0,578	0,693	0,313
			0,818**		*							

Legenda: FPP = pirofosfato de farnesila; GPP = pirofosfato de geranila; * Significante $p < 0,05$ ** Significante $p < 0,01$

4.2.2 Impacto oxi-redutor em diferentes escalas temporais nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum*

Nos estudos circadiano e sazonal, as substâncias foram analisadas em relação aos seus números de oxidação (N_{OX}), seguindo as regras de Hendrickson-Cram-Hammond e passos oxidativos (PO). As estruturas com os respectivos N_{OX} e PO estão representadas na figura 38. As propostas de biossíntese para os cálculos de PO estão apresentadas para os monoterpenos na figura 39; para os sesquiterpenos derivados de esqueletos de germacrano, cariofileno, amorfano, elemano e bourbonano na figura 40; para os derivados de esqueletos de cadinano e copaano na figura 41; e para os derivados de esqueletos de eudesmano, eremofilano, biciclogermacrano e aromadandrano na figura 42.

As substâncias apresentaram N_{OX} que variaram entre **-10** a **-38**. Os monoterpenos registraram N_{OX} entre **-16** e **-10**. Apenas o monoterpene bicíclico cânfora apresentou o maior N_{OX} de -10, entre os resultados dos estudos circadiano e sazonal. Com relação aos sesquiterpenos, os valores de N_{OX} encontram-se entre **-24** e **-16**. Nesse tipo de terpeno o maior N_{OX} foi registrado para o cadaleno (-16). No entanto, a maioria das substâncias terpênicas com maiores valores de N_{OX} encontram-se em teores percentuais diminutos.

Na construção das propostas de biossínteses para monoterpenos e sesquiterpenos (Figuras 39 a 42) dos OEs, os passos oxidativos foram evidenciados e é possível de registrar a *não existência de avanços oxidativos progressivos*, quando se compara precursor e produtos. Portanto, a comparação dos valores de N_{OX} e de PO do precursor e dos produtos, tanto no estudo sazonal quanto no ciclo circadiano, mostrou que não há alteração relevante, pois esse modelo de análise não leva em consideração a quantidade das substâncias em estudo. Esse modelo estático de análise não é *per se* aplicável ao estudo de misturas complexas. No entanto, algumas rotas oxidativas são favorecidas para formação de óxidos e cetonas. Essas substâncias (epóxido de humoleno, cânfora e outros) apresentam-se em menores teores percentuais, portanto, não contribuem para o passo oxidativo total da rota biossintética.

Figura 38 - Estruturas dos derivados terpênicos (monoterpenoides e sesquiterpenos) e hidrocarbonetos não terpênicos identificados nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre com seus respectivos números de oxidação (N_{ox}) e os valores dos passos de oxidação (PO) dos precursores químicos do tipo de terpeno. (Continua)

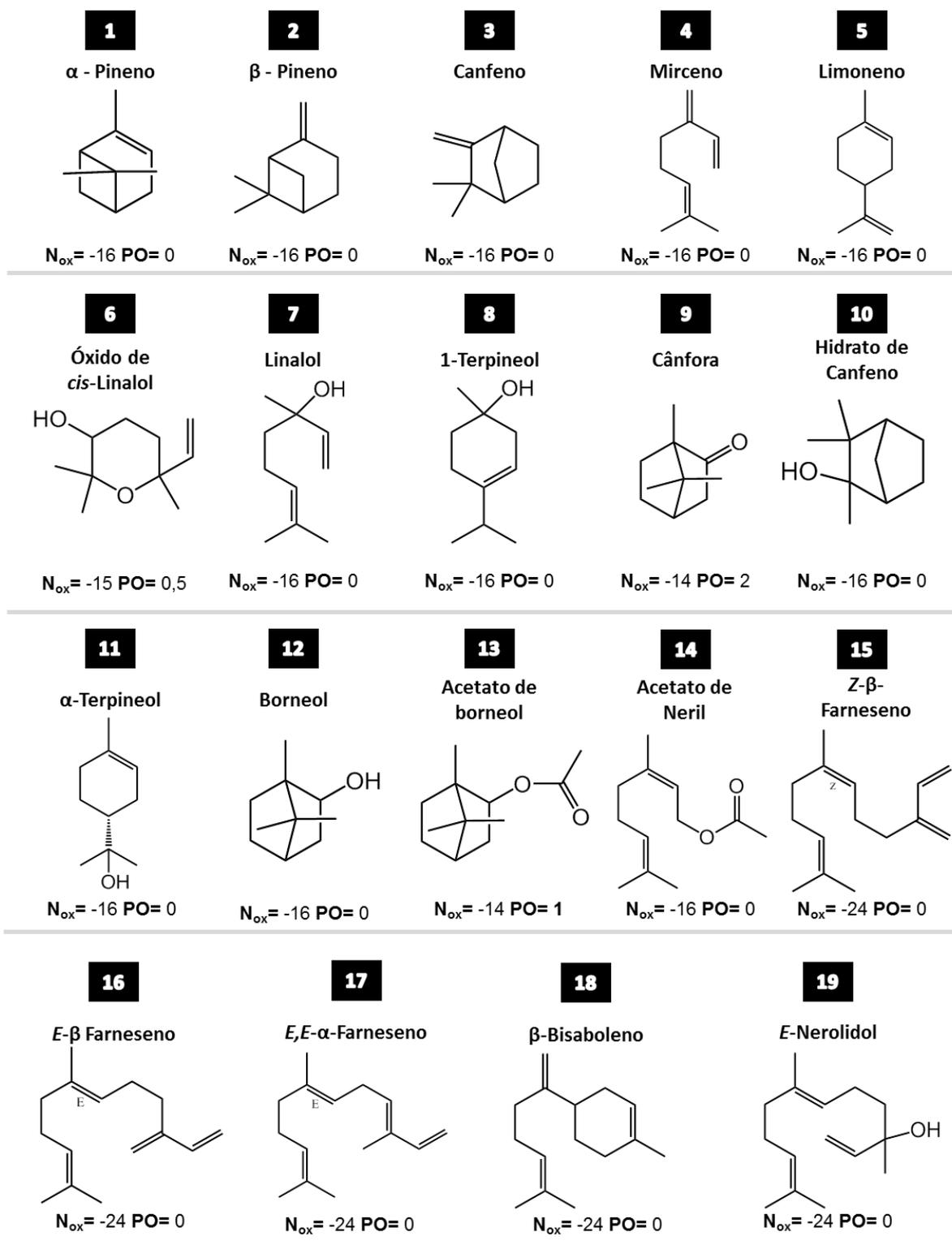


Figura 38 – Continuação

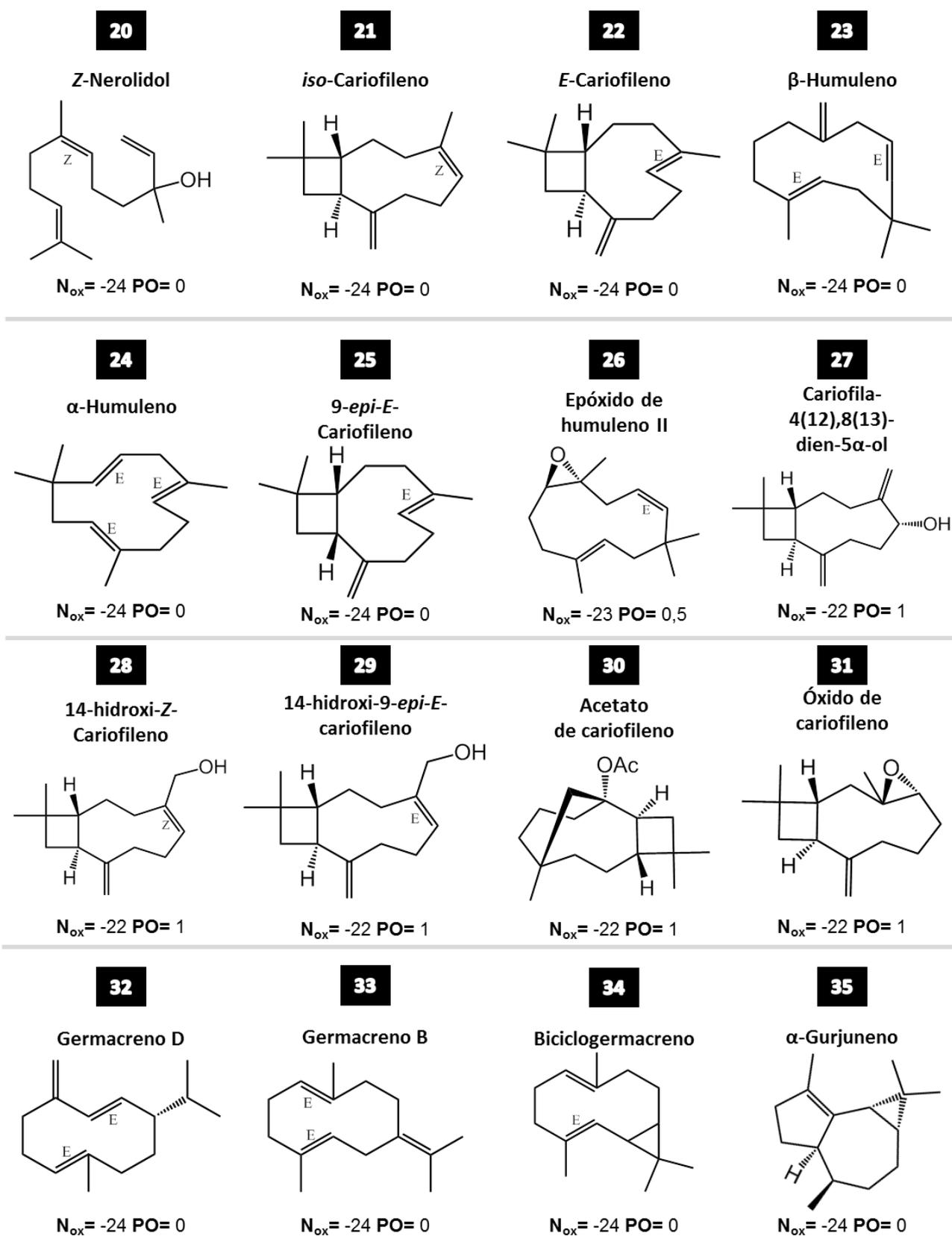


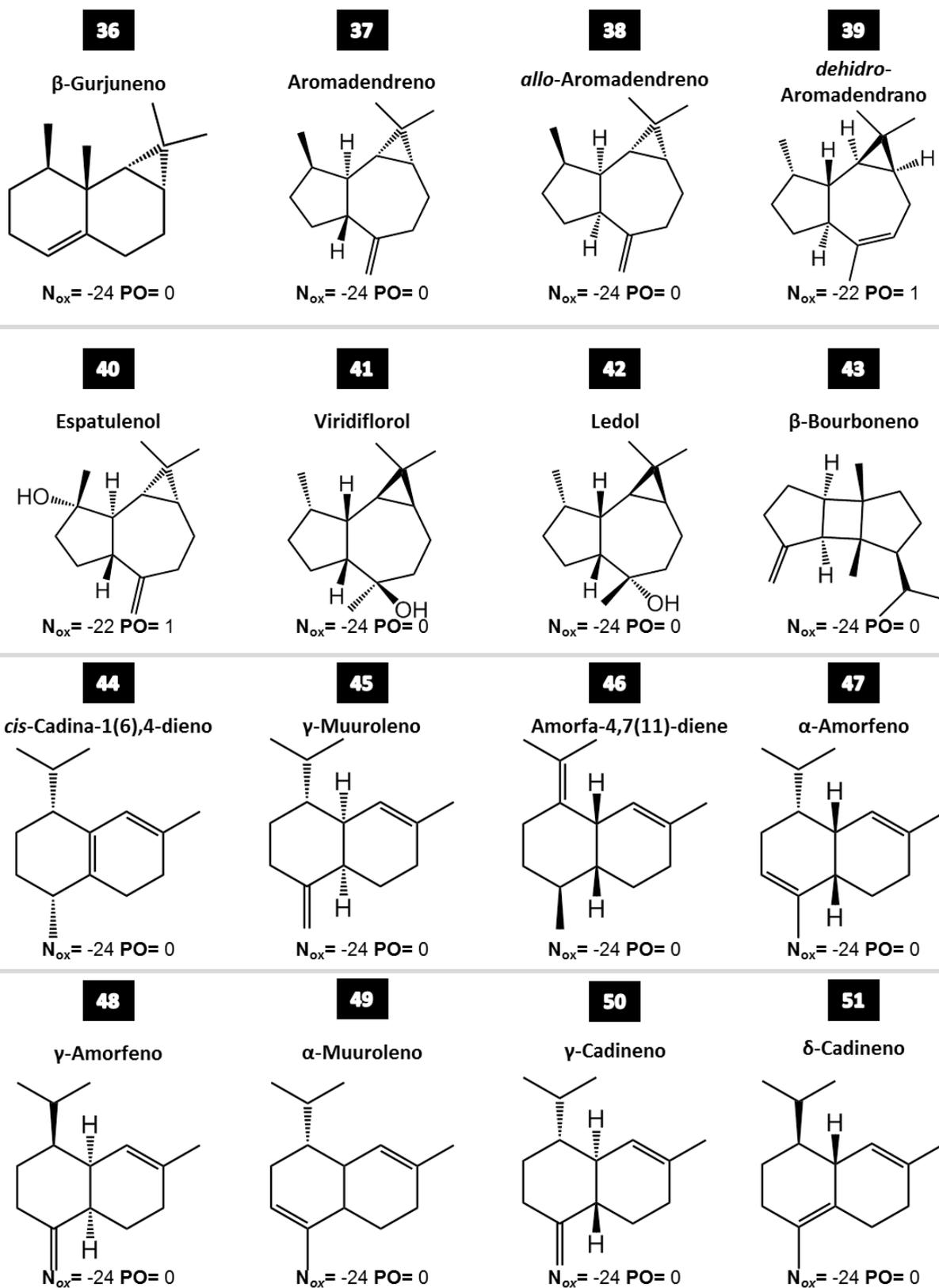
Figura 38 – *Continuação*

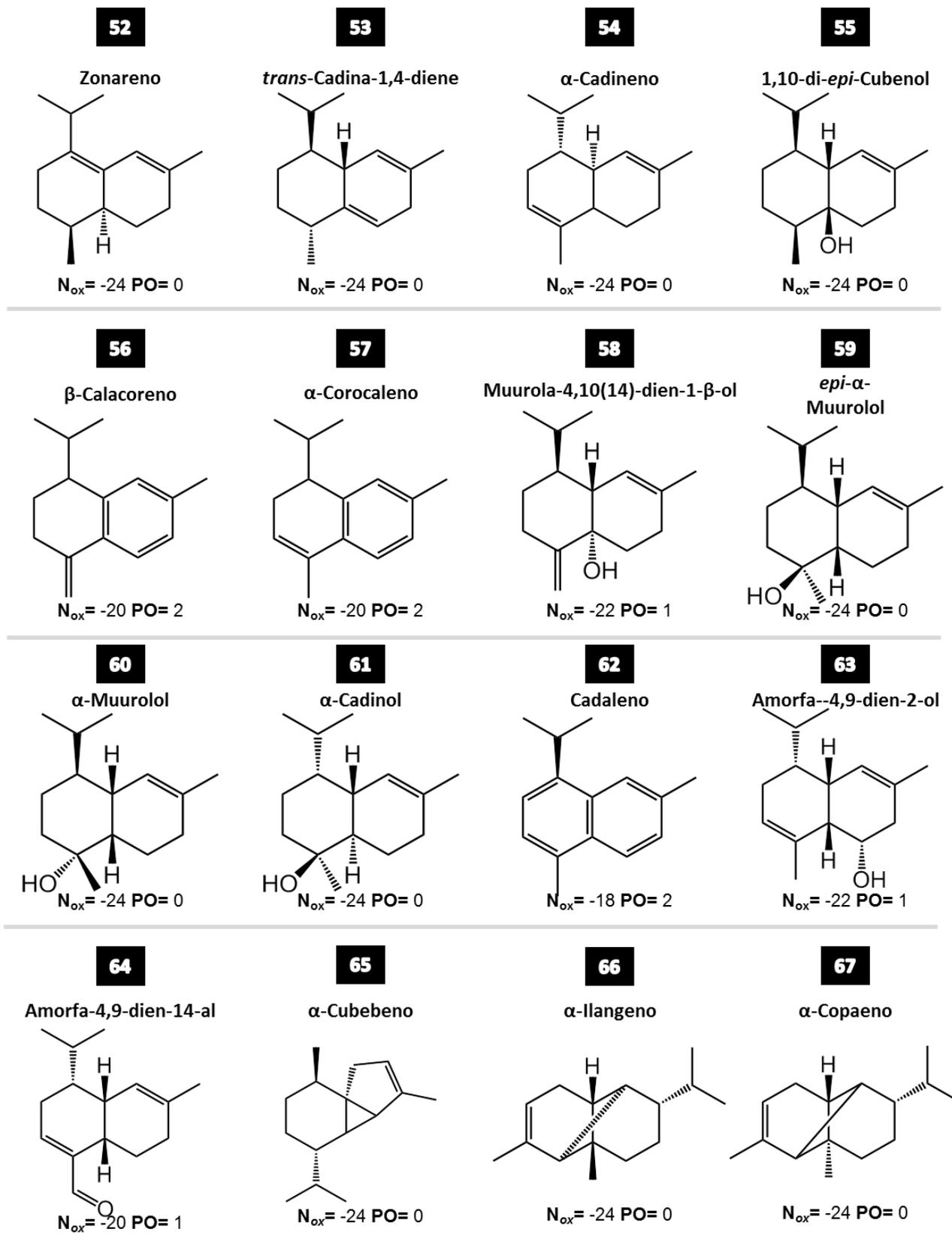
Figura 38 – *Continuação*

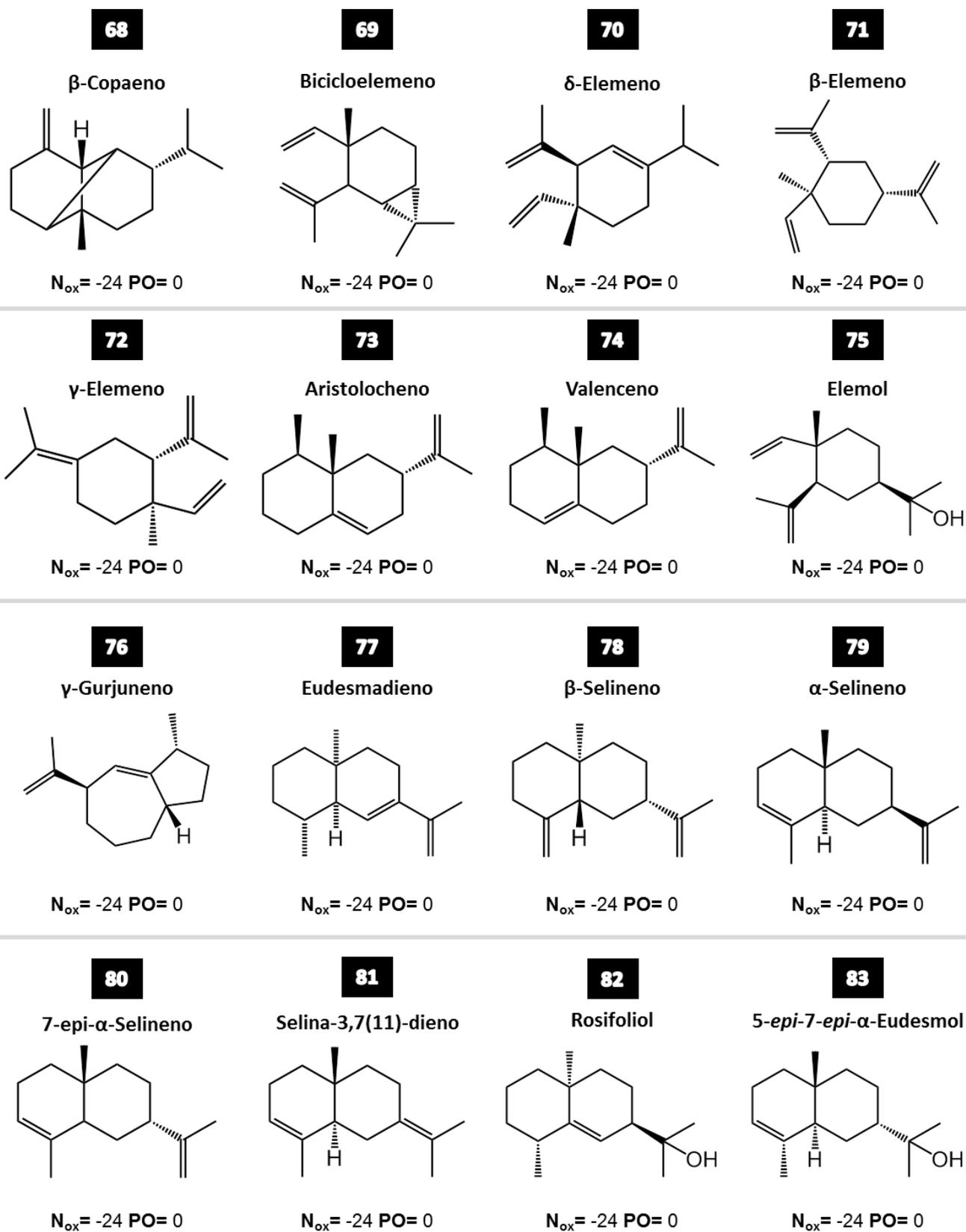
Figura 38 – *Continuação*

Figura 38 – Continuação

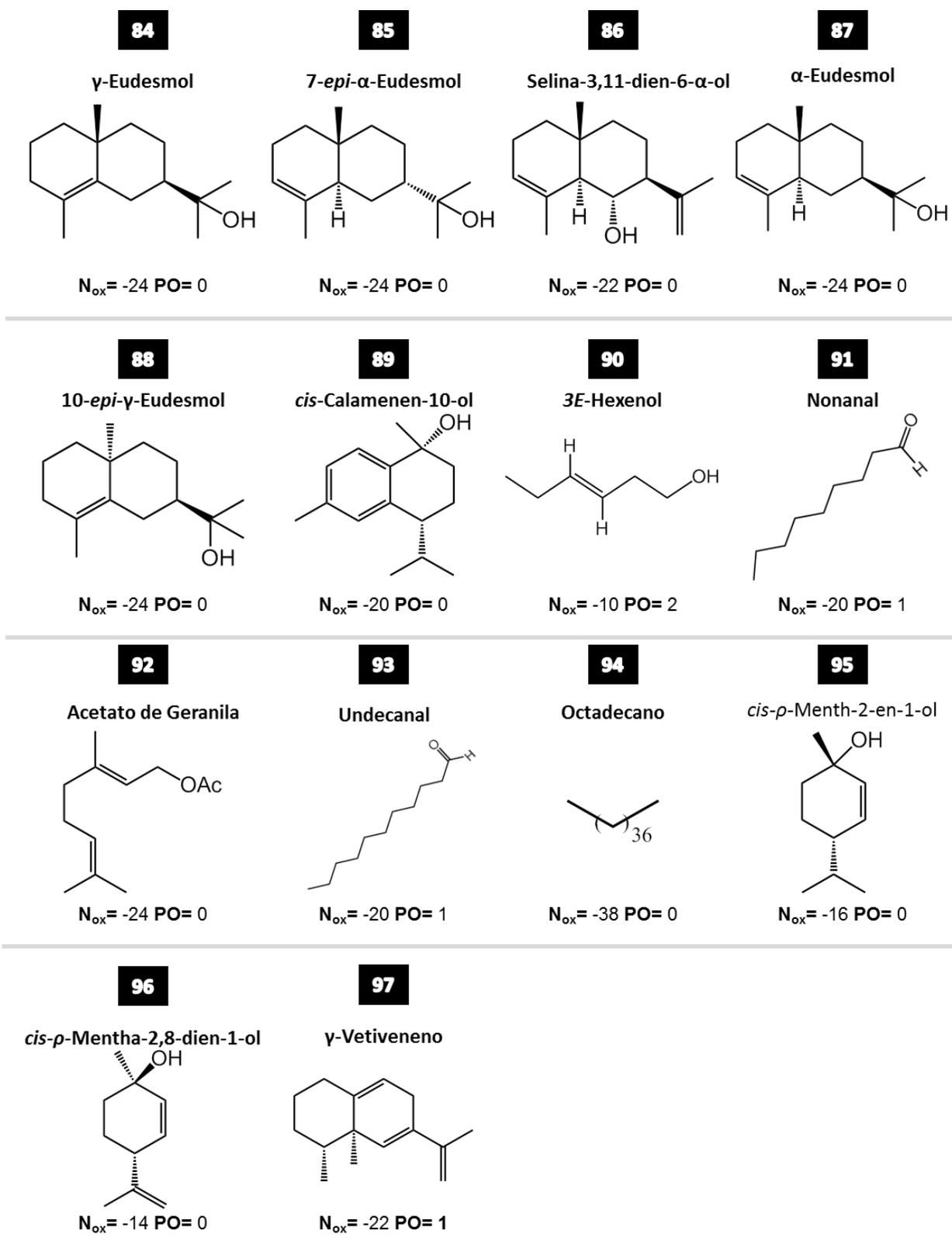


Figura 39 - Proposta de biossíntese da formação de monoterpenos presentes nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.

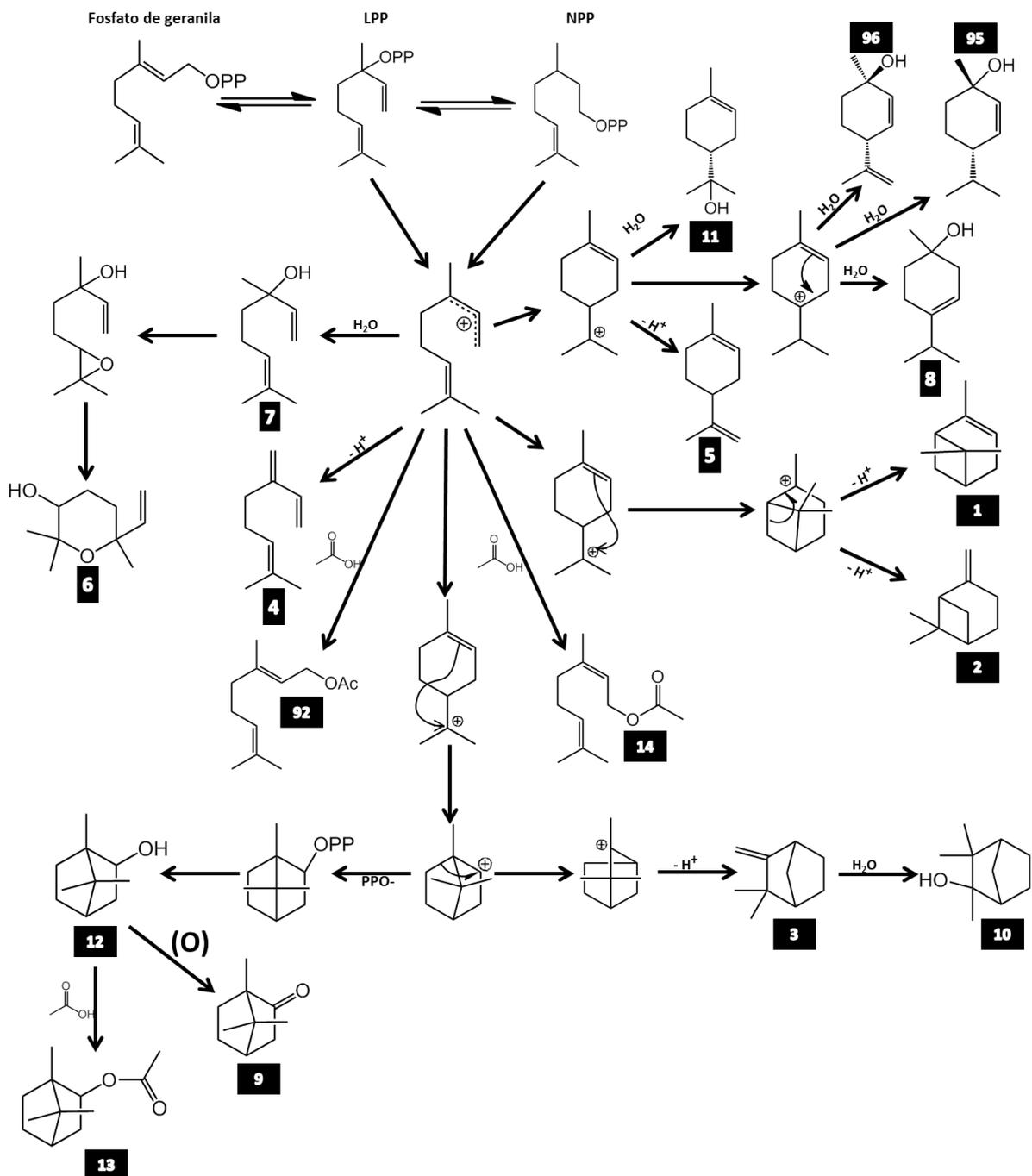


Figura 40 - Proposta de biossíntese da formação de sesquiterpenos (germacrano, cariofileno, amorfano, elemano e bourbonano) presentes nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.

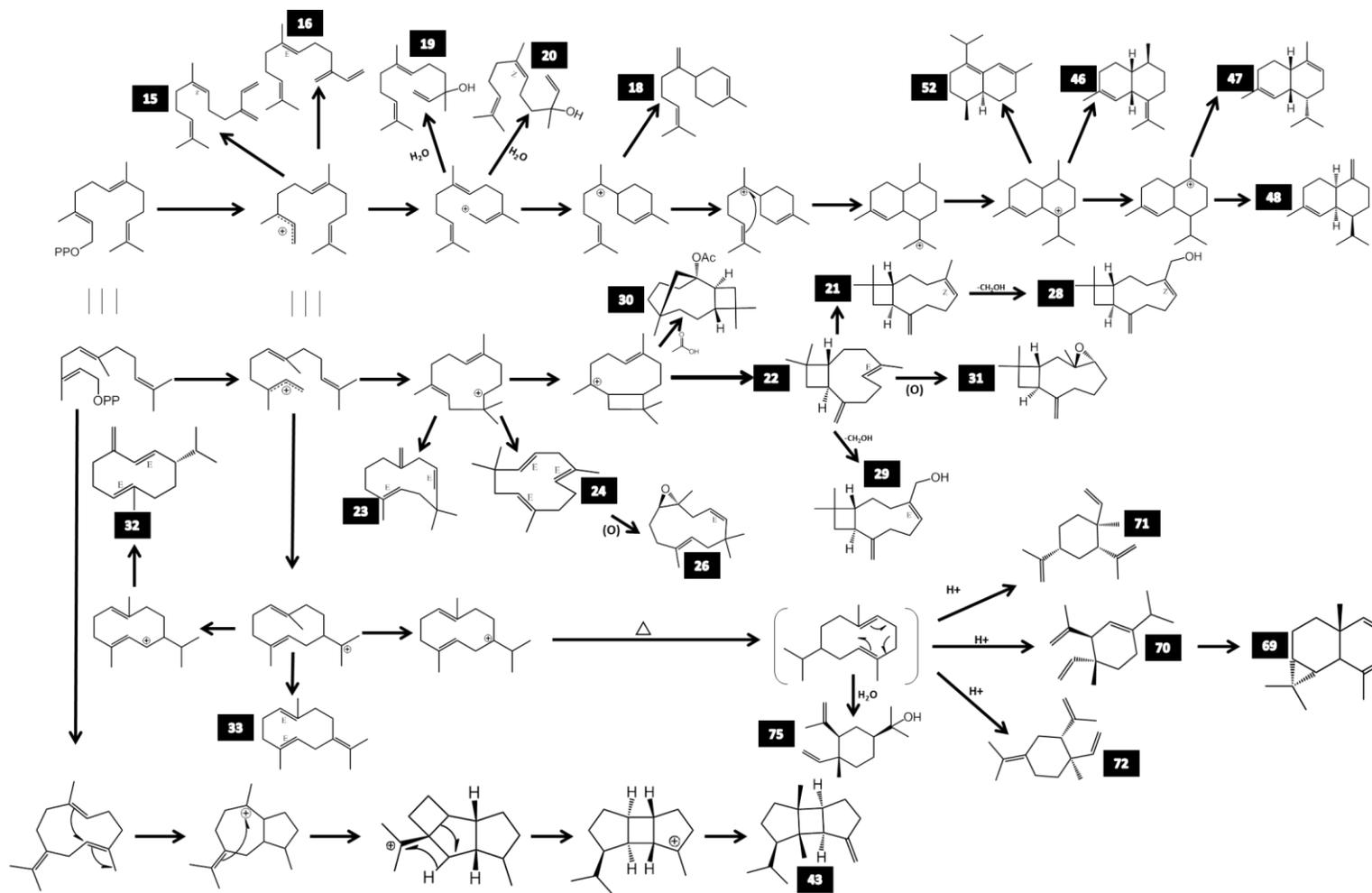


Figura 41 - Proposta de biossíntese da formação de sesquiterpenos (cadinano e copaano) presentes nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.

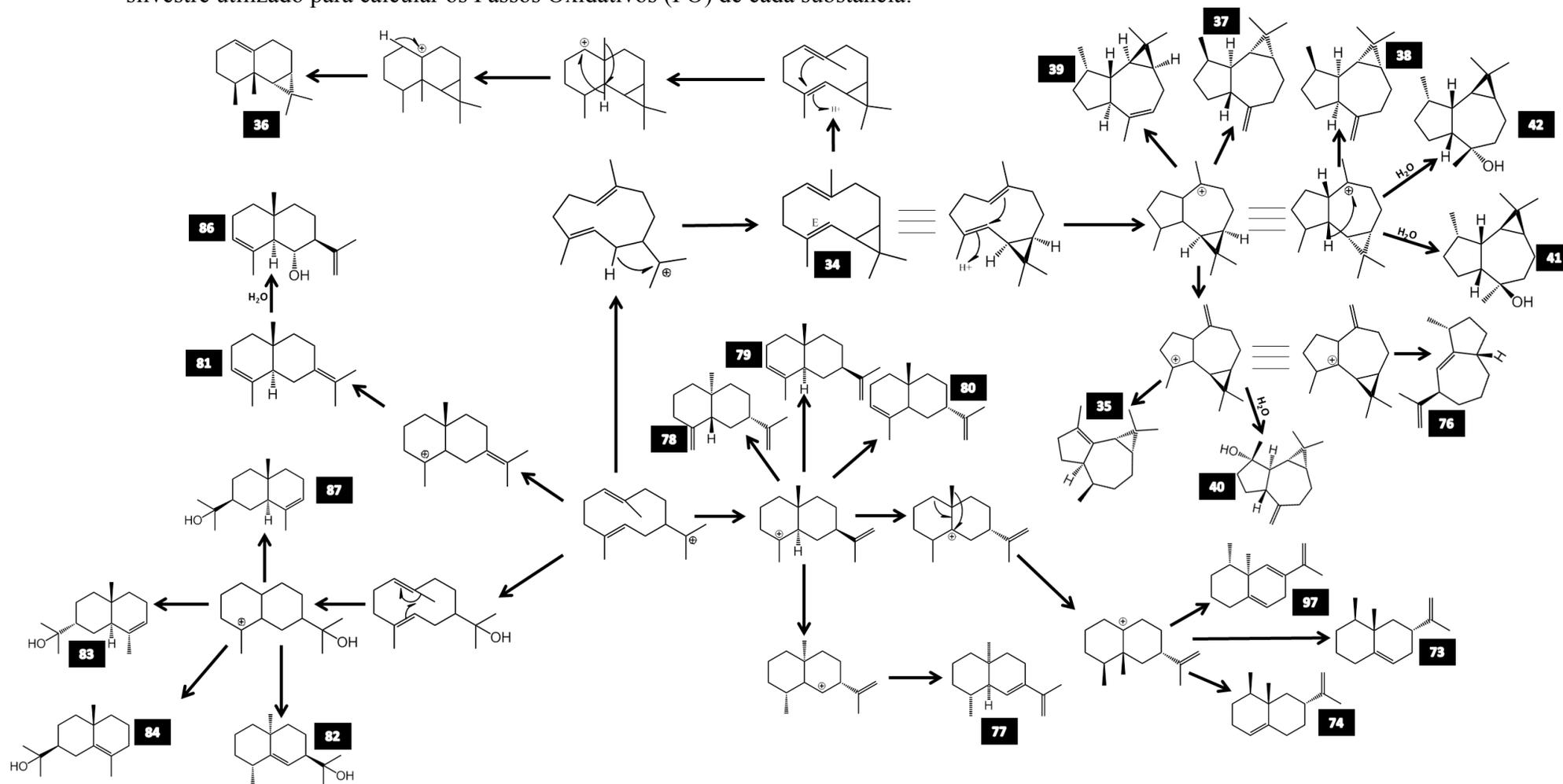
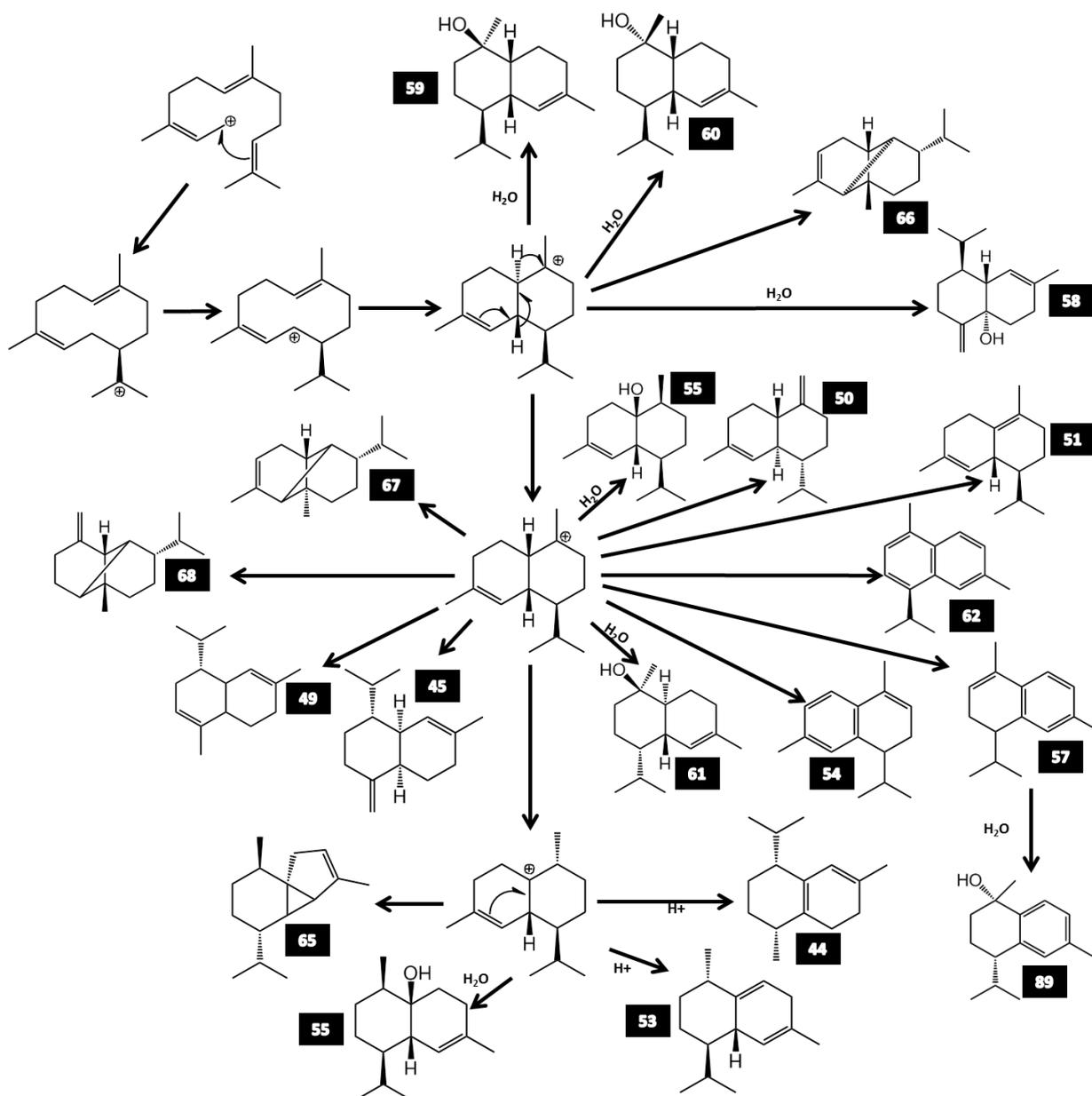


Figura 42 - Proposta de biossíntese da formação de sesquiterpenos (eudesmano, eremofilano, biciclogermacrano e aromadandrano) presentes nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre utilizado para calcular os Passos Oxidativos (PO) de cada substância.

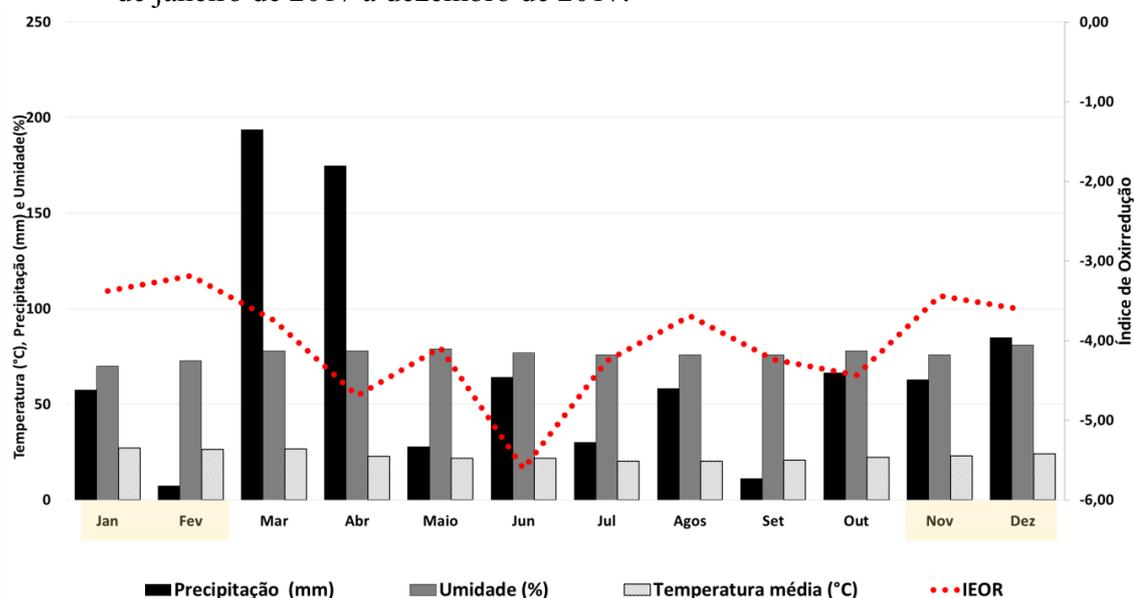


Os resultados dos cálculos de Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira dos estudos sazonal e circadiano a partir dos OEs de *P. gaudichaudianum* estão apresentados nas tabelas 6, 9 e 10. Na tabela 19 estão apresentadas as correlações de Pearson entre os fatores ambientais e os valores do IE_{OR} obtidos das misturas dos OEs dos estudos sazonal e circadiano.

Foi possível observar variações entre **-6,4** a **-3,6** nos estudos (Sazonal: -5,6 a -3,6; Circadiano: -6,4 a -3,6). A variação anual de IE_{OR} (janeiro a dezembro de 2017) comparada com os fatores ambientais (precipitação, umidade e temperatura média) está apresentada na Figura 43. A variação de IE_{OR} ao longo do ano apresentou diferença significativa ($p > 0,01$). Nota-se que o período reprodutivo (janeiro, fevereiro, novembro e dezembro) coincidiu com os maiores valores de IE_{OR} (maior oxidação). Após os períodos com elevados níveis pluviométricos os valores IE_{OR} apresentam uma redução relevante (maior redução). Nesse mesmo período ocorreram oxidação na diversidade de substâncias presente nos OE nas amostras (Tabela 6). No entanto, os resultados da correlação de Pearson para a variação anual não apresentaram valores significativos ($p > 0,05$), mas denotam tendências adaptativas do espécime no espaço.

Na Figura 44 (gráfico Radar) é apresentada a variação dos valores do IE_{OR} obtidos para os OEs do estudo circadiano. Ao analisar os resultados foram observados que os valores médios apresentaram diferença significativa durante os dias (em outubro e março) e entre os períodos ($p = 0,05$). A média do período seco (outubro) (S: -6,4 a -3,6) foi maior que o chuvoso (março) (C: -4,8 a -3,6). As misturas das substâncias presentes nos OE apresentaram uma **maior redução durante os dias** (C: -4,8 a -3,7; S: -6,4 a -4,2) e **maior oxidação a noite** (C: -3,9 a -3,7; S: -4,3 a -3,6). Na análise de Pearson foi possível observar correlações significativas fortes entre o IE_{OR} e umidade relativa, precipitação e radiação.

Figura 43 - Comparações das variações do Índice Ecológico de Oxi-redução (IEOR) ou Índice de Ramos & Moreira obtido a partir da composição de óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2017.



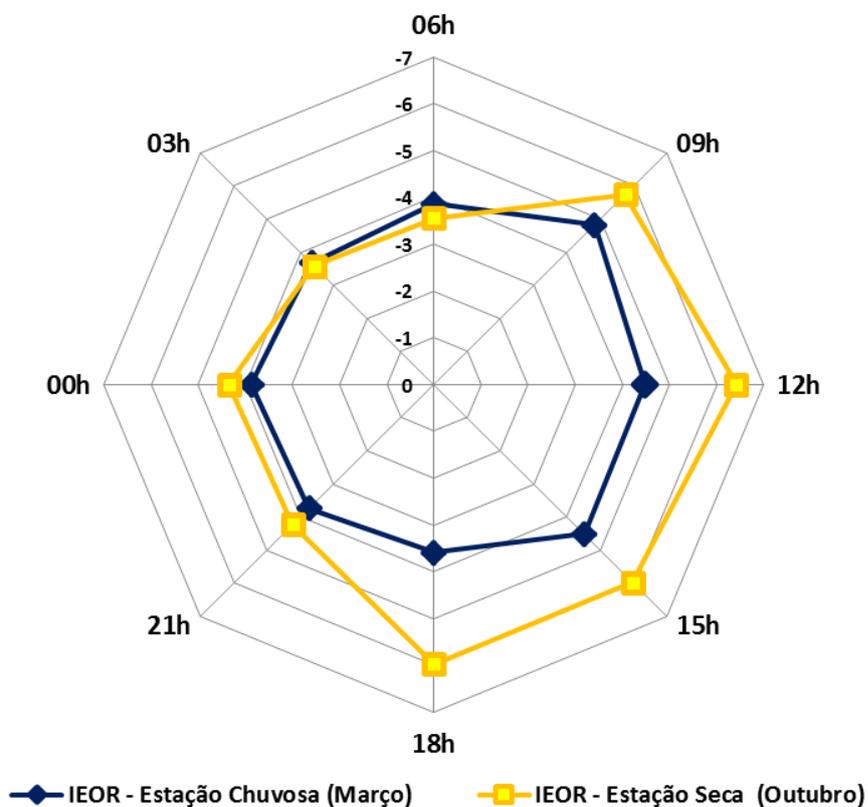
Legenda: Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Agos-agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; #Área hachurada em amarelo representa os meses de ocorrência da fase reprodutivas.

Tabela 19 – Análise da correlação de Pearson entre variáveis ambientais e os valores obtidos dos Índice Ecológicos de Oxi-redução do estudo sazonal (anual) e estudo circadiano (março e outubro) de *Piper gaudichaudianum* silvestre.

Variável	Período	Índice Ecológico de Oxi-redução
Umidade (%)	Anual	-0,362
	março	-0,080
	outubro	-0,762**
Temperatura (°C)	Anual	0,520
	março	-0,823**
	outubro	-0,809**
Radiação (KJm ⁻²)	março	-0,649*
	outubro	-0,776**
Precipitações (mm)	Anual	-0,143

Legenda - *Significativo a $p < 0,05$; **Significativo a $p < 0,01$;

Figura 44 - Representação do gráfico de radar do Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira obtido para o óleo essencial das folhas de *Piper gaudichaudianum* silvestre no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações de março (chuvoso) e outubro (seco).

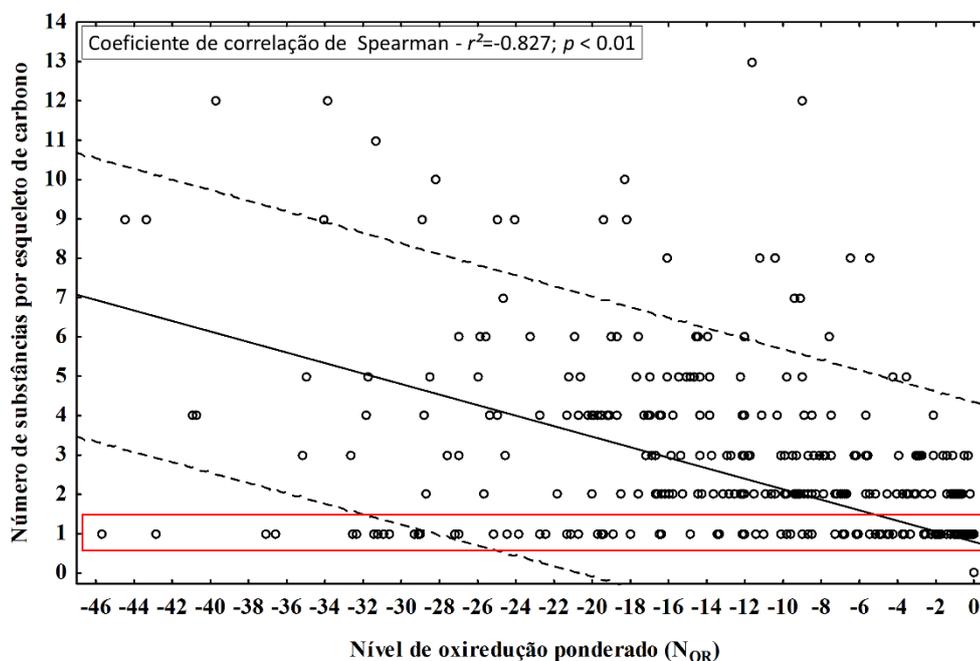


Essas mudanças oxidativas levam a alterações nas estruturas químicas dos esqueletos de carbono? O oposto será verdade? Ou seja, será que as diversificações em número de substâncias por esqueletos de carbono durante os períodos analisados (estudo sazonal e circadiano) levam ao aumento da oxidação ou redução das substâncias dos OEs foliares de *Piper gaudichaudianum*?

Os números de substâncias em cada esqueleto de carbono e os valores de N_{OR}, obtidos dos estudos sazonais e circadianos não produziram distribuições normais (teste de Kolmogorov-Smimov). Assim, para a correlação entre esses foi aplicado o teste não paramétrico de Spearman. O gráfico de correlação (dispersão) está apresentado na figura 45. Foi possível observar uma correlação inversamente proporcional significativa entre os parâmetros testados, sugerindo que a diversificação em esqueleto é acompanhada pelo aumento do nível de oxidação ponderado (N_{OR}) das substâncias. No entanto, o gráfico de dispersão (Figura 45) mostra

claramente que a diversificação/aumento da oxidação não acontece de maneira homogênea. Essa influência está diretamente ligada a rota biossintética. Por exemplo, o biciclogermacrano só possui uma substância membro, sendo assim, as variações quantitativas ponderadas levam ao seu aumento oxidativo. No entanto, essa substância é intermediária biogênica para as substâncias presentes no esqueleto aromadendrano. Conseqüentemente, esse último apresentou maior padrão de diversificação de maneira compensatória. Mesmo fato foi observado para germacrano em relação ao cadinano e eudesmano.

Figura 45 - Correlação entre número das substâncias para esqueleto de carbono e níveis de oxidação ponderada (N_{OR}) para esqueleto de carbono obtido do óleo essencial de folhas de *Piper gaudichaudianum* silvestre nos estudos de ritmo sazonal e circadiano.



Legenda: área marcada em vermelho demonstra a oxidação ponderada do biciclogermacrano.

4.2.3 Aspectos de quimiodiversidade e quimiogeográfico em *Piper gaudichaudianum* silvestre

Com base nos dados obtidos neste estudo e nos disponíveis na literatura foi compilado um total de 60 composições (Apêndice A) de OEs de folhas de *P. gaudichaudianum*. Os dados foram processados e analisados por ACP e AAH e estão apresentados na Figuras 46 e 47, respectivamente.

Para comportar de maneira mais ajustada o conjunto de dados, o ACP foi dimensionado em três eixos, com uma variância total de 69,6%, no PC1 (32,0 %), PC2 (26,3 %) e no PC3 (11,3%). A partir desses dados foi possível observar a separação inicial de dois grupos (Figura 46): **Grupo I** – Com menor variabilidade e com predominância da **via do chiquimato** com carga positiva no eixos PC1 e PC3 e negativa no PC2 (dilapiol); e **Grupo II** – Com maior variabilidade e com predominância das **vias do acetato-mevalonato** (MEV) e **metileritritol-fosfato** (MEP), principalmente, derivados de pirofosfato de farnesila, com cargas distribuídas opostamente ao grupo anterior (α -humuleno, *E*-cariofileno, δ -cadineno, 1-*epi*-cubenol, longipinanol, viridiflorol, germacreno B e biciclogermacreno). As substâncias que mais contribuíram para a separação dos grupos no PC1 e PC2 com carga negativa foram biciclogermacreno (-20,3) e dilapiol (-23,4), respectivamente. Apesar de a análise indicar os quimiotipos, o PC3 foi responsável pelas variações menores entre as amostras, mas por si só não justifica a existência de todos os componentes principais das amostras. Os valores encontrados foram muito próximos entre si. Análise por AAH (Figura 47) evidenciou maiores taxas de similaridade, confirmando a separação dos grupos determinados no ACP. A partir da análise do ACP e AAH, juntas, foi possível definir **nove** (n=9) possíveis **quimiotipos** diferentes para *P. gaudichaudianum*. O **quimiotipo I** - δ -cadineno, com uma amostra (PR2) (BERNUCI *et al.*, 2016); O **quimiotipo II** - 1-*epi*-cubenol, com duas amostras (PR3 – 1; PR6) (KRINSKI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2020); O **quimiotipo III** - longipinanol, com uma amostra (PR2) (KRINSKI *et al.*, 2016); O **quimiotipo IV** - viridiflorol, com uma amostra (RO) (MORAIS *et al.*, 2007); O **quimiotipo V** - α -humuleno, com três amostras (SP1-1 e 2 e RS2) (VON POSER *et al.*, 1994; ANDRADE *et al.*, 1998); O **quimiotipo VI** - *E*-carofileno, com três amostras (PR3 – 2 e PR5 – 1 a 2) (KRINSKI *et al.*, 2018; QUIQUI *et al.*, 2019); O **quimiotipo VII** - germacreno B, com três amostras (PR4, PR7 e SC) (CHAABAN *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020); O **quimiotipo VIII** dilapiol, dezesseis amostras (RS1 – 1 a 16)

(SCHINDLER; HEINZMANN, 2017) e; O **quimiotipo IX** – biciclogermacreno com trinta amostras (RS3, RS4 e deste estudo (RJ1- 1 a 28)). A estrutura química das substâncias que definem cada quimiotipo está apresentada na Figura 48. As amostras RS3 e RS4 apresentaram elevados teores de *E*-nerolidol (22,6 – 24,4%) e α -humuleno (21,3-21,3%) e baixos teores de biciclogermacreno (7,4-13,2%). Esse fato levou ao agrupamento da amostra nesse quimiotipo (biciclogermacreno). Embora não possamos descartar os vieses negativos em torno dos erros de coletas (horários, estação do ano, fenologia, entre outros), transportes, identificações, quantificações ou detecção de substâncias, é improvável que afete significativamente o *cluster* do dilapiol, biciclogermacreno, germacreno B e *E*-cariofileno por ser identificado por grupos de pesquisas diferentes e desenho investigativo diferente. Esse fato demonstra claramente a alta capacidade de resposta plástica química observada para OEs de *P. gaudichaudianum* aos fatores edafoclimáticos e bióticos.

Figura 46 - *Triplot* (ACP) resultante da análise da composição de 60 óleos essenciais das folhas de *Piper gaudichaudianum* obtida neste estudo e de dados da literatura.

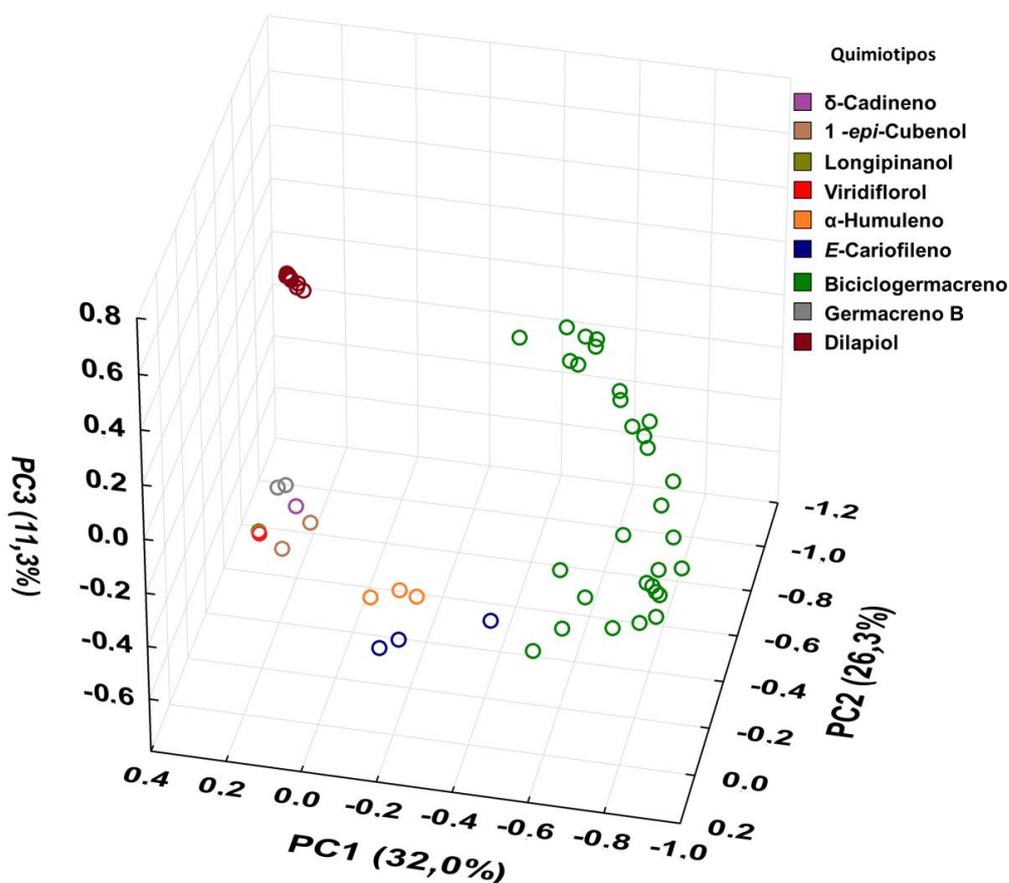
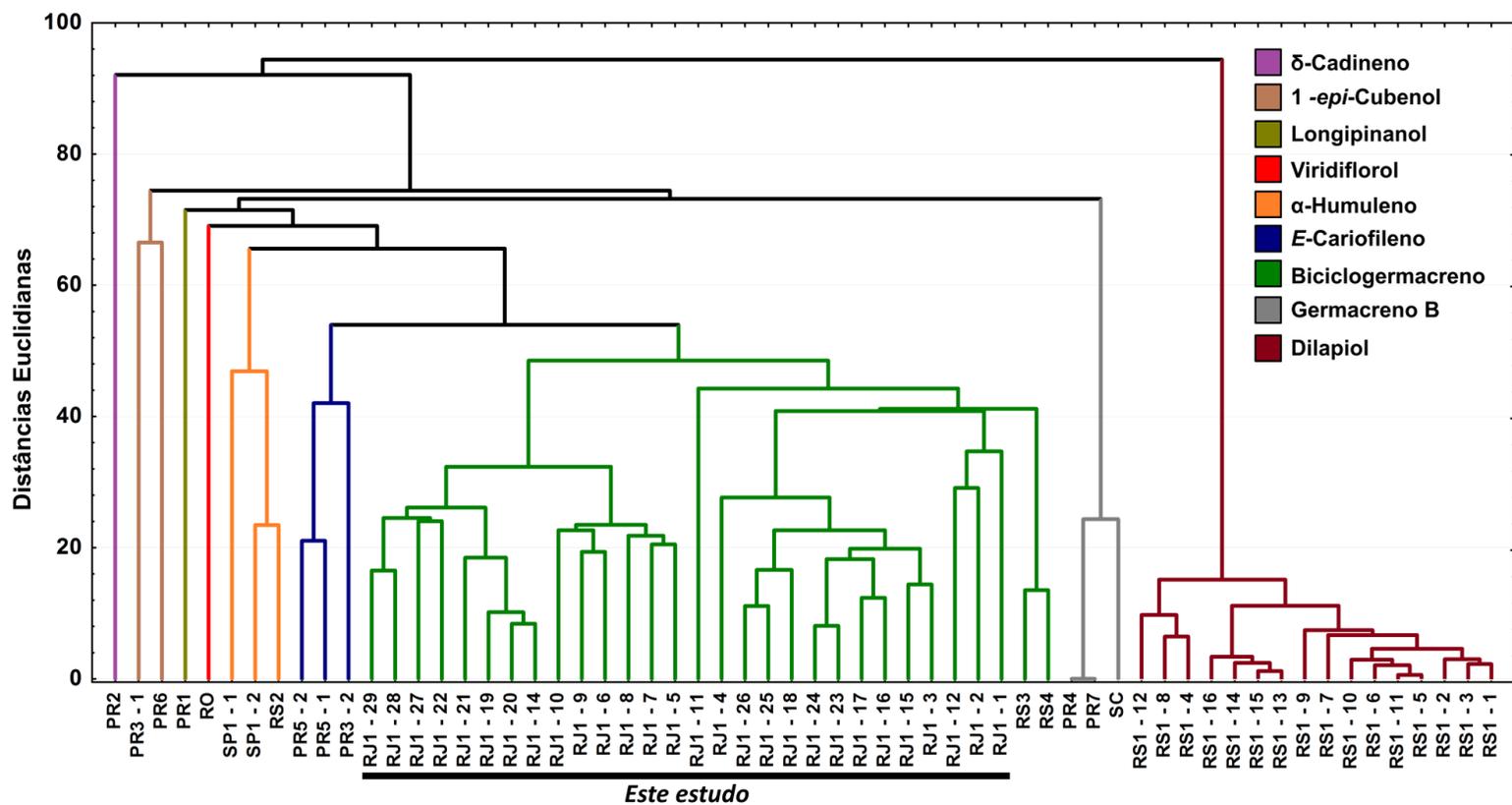
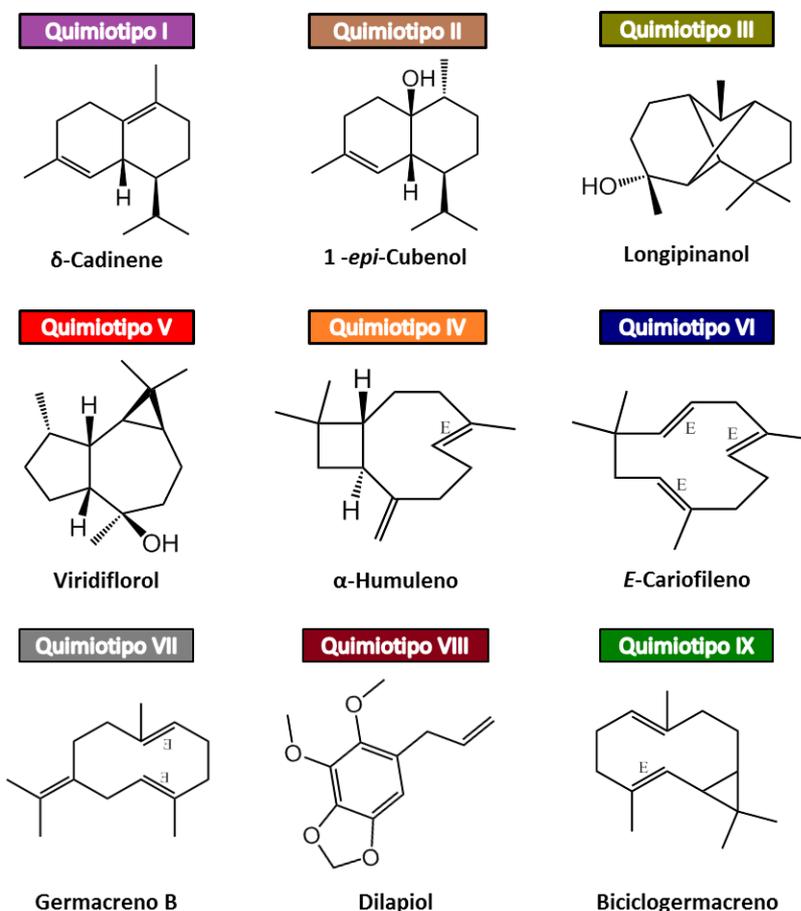


Figura 47 - Dendrograma representando a relação de similaridade da composição de 60 óleos essenciais de folhas de *Piper gaudichaudianum* obtidos neste estudo e da literatura.



Legenda: Este estudo (estudo sazonal - RJ1-12; estudo circadiano - RJ13-29) e no banco de dados da literatura (RO (MORAIS *et al.*, 2007); RS 1 - 1 a 16 (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017); RS2 (VON POSER *et al.*, 1994); RS3 (PÉRES *et al.*, 2009); RS4 (SPEROTTO *et al.*, 2013); SC (CHAABAN *et al.*, 2018); SP1- 1 a 2 (ANDRADE *et al.*, 1998); PR1 (KRINSKI *et al.*, 2016); PR2 (BERNUCI *et al.*, 2016); PR3 -1 a 2 (KRINSKI *et al.*, 2018); PR4 (SILVA *et al.*, 2019); PR5 - 1 a 2 (QUIQUI *et al.*, 2019); PR6 (SOUZA *et al.*, 2020) e; PR7 (SOUZA *et al.*, 2020).

Figura 48 – Estruturas químicas das substâncias que definem os quimiotipos de óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre.



Realizando uma abordagem Quimiogeográfica os quimiotipos foram distribuídos no mapa do Brasil (Figura 49). Hachurado de verde são as áreas de ocorrência das espécies segundo o Guimarães e colaboradores (2021b). Foi observado que as amostras encontradas e analisadas se concentraram mais ao Sul do Brasil (Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul), exceto uma amostra de Rondônia (Norte), que teve ocorrência em área não hachurada. Consta-se que a maioria das amostras apresentaram elevados teores de sesquiterpenos não oxigenados (8,3 – 81,5%) em relação aos outros tipos de terpenos e classes de metabólitos. Opostamente, destacamos que as produções dos monoterpenos não são preferenciais na biossíntese a partir do pirofosfato de geranila, e sim, como precursor para formação do pirofosfato de farnesila. Detectam-se apenas amostras no Estado do Paraná com teores significativas de monoterpenos (7,1-22,8%). As amostras mais ao Sul do Brasil apresentaram teores elevados de substâncias derivadas da via do chiquimato, dilapiol (70,5-

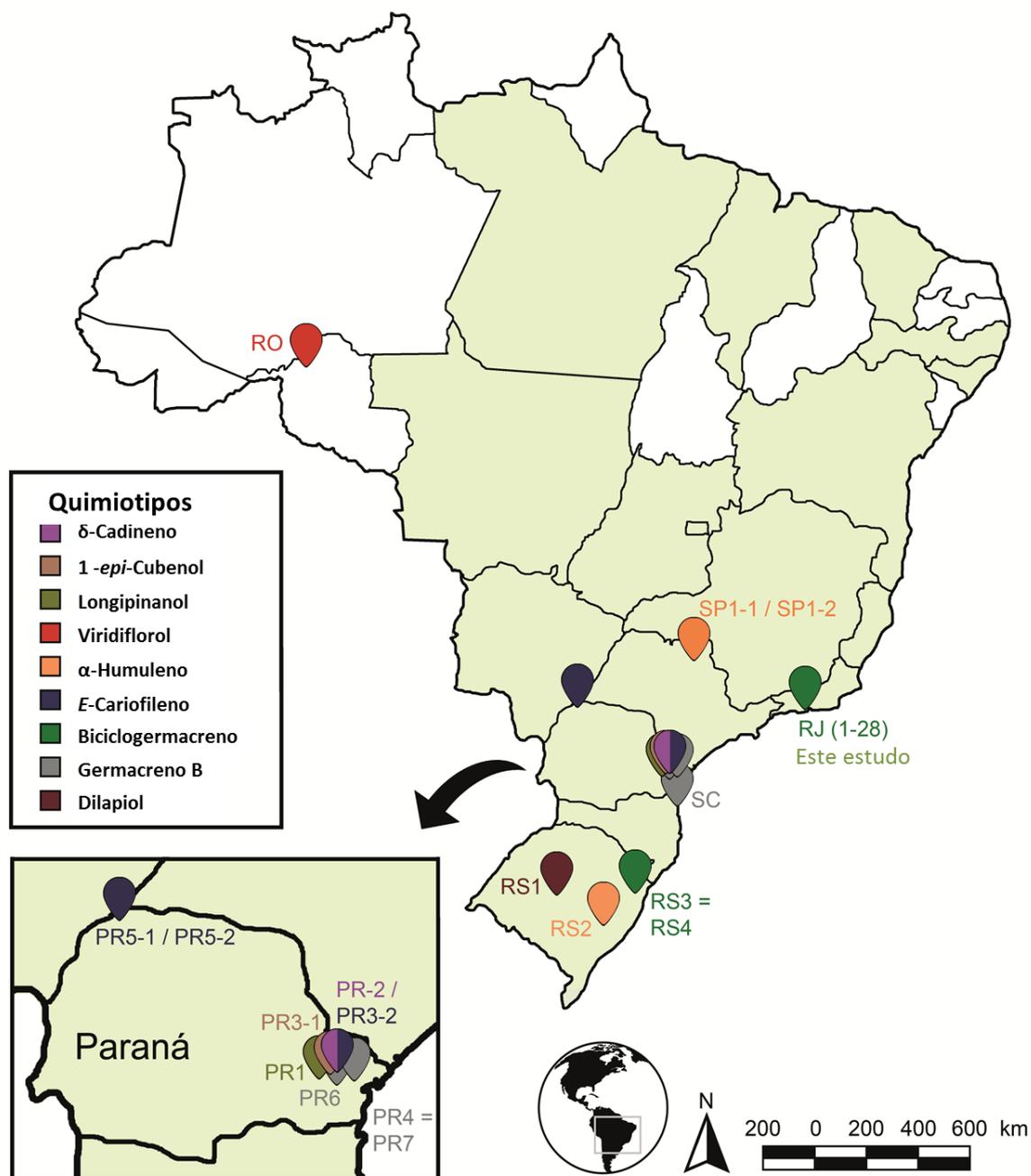
57,8% - RS1-1 - 16) e miristicina (15,2% - PR6). Descrevemos aqui a necessidade de avaliações mais profundas em diferentes escalas temporais para todas as amostras do Estado do Paraná, pois esse estudo lança luz sobre a enorme plasticidade química apresentada por *P. gaudichaudianum*, indicando que essas venham a apresentar não uma variação quimiotípica, e sim, variação plástica do fenótipo.

Nos OEs obtidos de hidrodestilação foliar de *P. gaudichaudianum* da literatura e deste estudo foram observados trinta e um (n=31) tipos de esqueletos de carbono, sendo um (n=1) derivado C₆.C₃ (miristicina, eugenol e dilapiol) (alquilbenzeno); um (n=1) derivado de ácido benzoico C₆-C₆ (benzoato de benzila); um (n=1) cromeno (eupatoriocromeno), além de vinte e oitos (n=21) derivados das vias MEP e MEV, principalmente, precursores de pirofosfato de farnesila. Para os derivados terpênicos foi realizada uma proposta de mapa biossintético, que está apresentado na Figura 50.

Os esqueletos de carbonos (via MEP e MEV) com maiores ocorrências qualitativas (presença e ausência) foram cariofilano (n= 58), aromadendrano (n=56), humulano (n=56) e germacrano (n=55). A maior tendência biossintética para as rotas na produção de esqueletos de carbonos humulano e cariofilano é constatada qualitativa e quantitativamente nas amostras (n=59). Exceto a amostra PR1 que foi favorecida na produção de esqueleto de carbono longipinano (tricíclico), estruturalmente mais complexo que humulano, que é o esqueleto precursor.

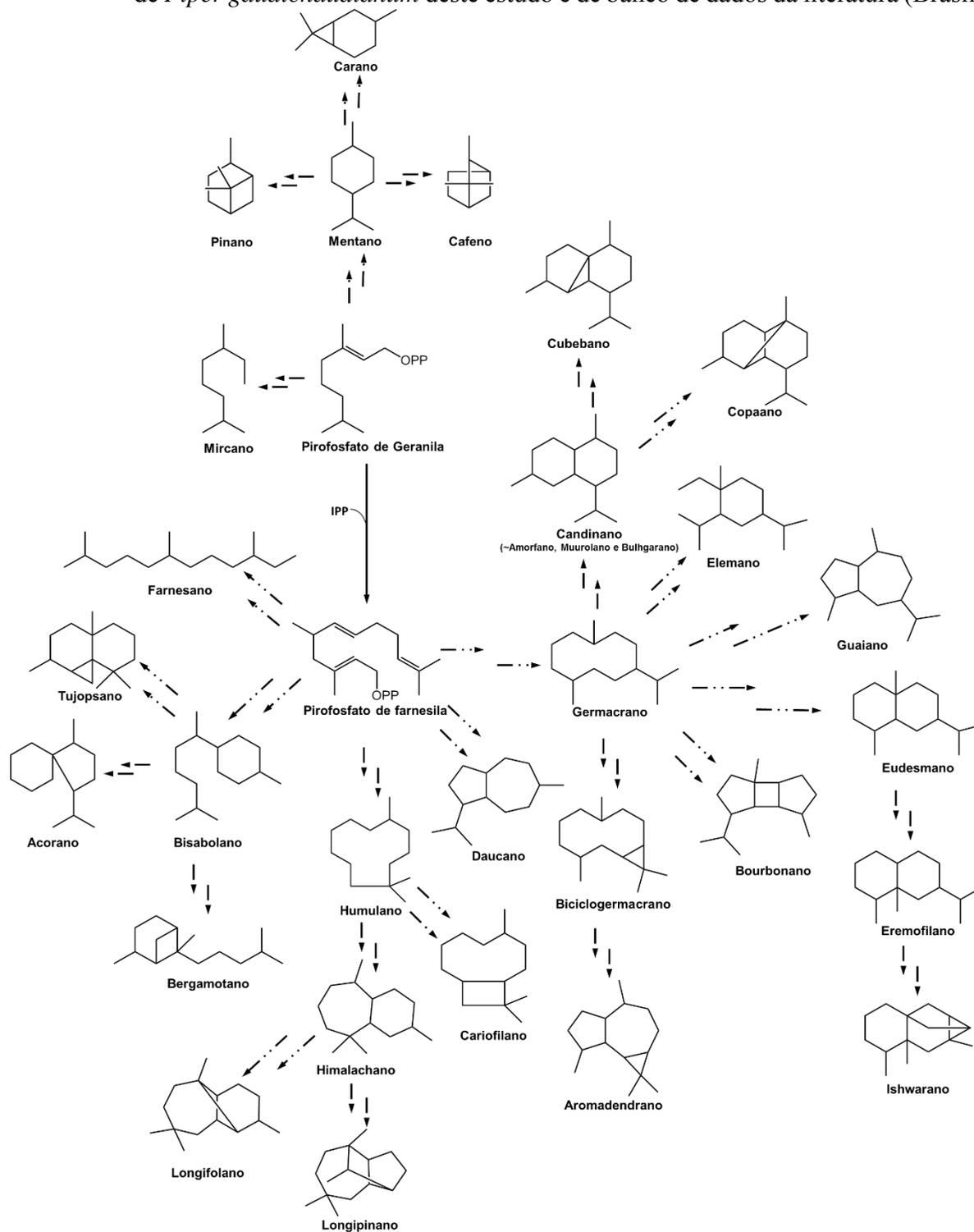
Foi realizada correlação de Pearson entre os teores das substâncias por esqueleto de carbonos, a latitude (Lt) e longitude (Lg), obtidas dos dados da literatura e deste estudo. Foi observado que houve aumentos significativos ($p < 0,05$) e diretamente proporcionais desses parâmetros com os valores quantitativos das substâncias com esqueleto de carbono germacrano (Lt: $r^2= 0,563$; Lg: $r^2= 0,578$), bicilogermacrano (Lt: $r^2= 0,572$; Lg: $r^2= 0,793$) e aromadendrano (Lt: $r^2= 0,532$; Lg: $r^2= 0,508$). Registra-se que a formação dos possíveis quimiotipos apresentaram uma maior diversificação estrutural, sem homogeneidade especial nos fenótipos químicos em relação à latitude e longitude. A maioria dos quimiotipos teve sua diversificação em esqueletos centrada nos derivados biogenéticos ou substâncias com esqueleto de germacrano ou humulano. Essa diversificação seguiu o sentido germacrano (PR4; PR7 e SC), cadinano (PR2) e cubebano (PR6 e PR3-1) ou germacrano, bicilogermacrano (RJ, RS 3 e 4) e aromadendrano (RO). Quando essa diversificação seguiu o esqueleto do tipo humulano (RS2, SP), há formação de cariofilano (PR3-1) ou longipinano (PR1).

Figura 49 - Distribuição espacial dos quimiotipos de *Piper gaudichaudianum* no Brasil.



Legenda: Este estudo (estudo sazonal - RJ1-12; estudo circadiano - RJ13-29) e no banco de dados da literatura (RO (MORAIS *et al.*, 2007); RS 1 - 1 a 16 (SCHINDLER *et al.*, 2017); RS2 (VON POSER *et al.*, 1994); RS3 (PÉRES *et al.*, 2009); RS4 (SPEROTTO *et al.*, 2013); SC (CHAABAN *et al.*, 2018); SP1- 1 a 2 (ANDRADE *et al.*, 1998); PR1 (KRINSKI *et al.*, 2016); PR2 (BERNUCI *et al.*, 2016); PR3 -1 a 2 (KRINSKI *et al.*, 2018); PR4 (SILVA *et al.*, 2019); PR5 - 1 a 2 (QUIQUI *et al.*, 2019); PR6 (SOUZA *et al.*, 2020) e; PR7 (SOUZA *et al.*, 2020).

Figura 50 - Mapa biossintético dos tipos de esqueleto terpênico com base nos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* deste estudo e de banco de dados da literatura (Brasil).



4.3 Composição química dos óleos essenciais de *Piper gaudichaudianum* silvestre e cultivada

A elevada amplitude de fenoplasticidade química apresentada nos fez questionar: *As variações quimiofenéticas em espécies selvagens são conservadas quando o espécime é colocado em condição de cultivo controlado?* Para responder a essa questão foram obtidos o rendimento e a composição química do OE das folhas de *P. gaudichaudianum* cultivada em primeira e segunda geração, propagadas e silvestre coletadas na região do Parque Nacional da Tijuca no mês janeiro de 2018 e analisadas por CG-EM e CG-DIC (Tabela 20).

Os OEs obtidos eram de cor ligeiramente amarelada e demonstraram 41 substâncias, que correspondem a 97,97% da quantificação. A diversidade química qualitativa dos exemplares silvestres (n=41) e cultivadas aumentaram em primeira geração (n=48) e diminuíram na segunda geração (n=28). Comportamento inverso foi encontrado para os maiores rendimentos, obtidos dos espécimes silvestre (0,17%) e segunda geração (0,18%) e menor na primeira (0,13%) geração.

Os OEs obtidos dos espécimes de *P. gaudichaudianum* foram caracterizados por teores percentuais elevados de sesquiterpenos (97,51 - 91,27%). Os resultados das análises dos OE mostraram uma composição formada majoritariamente por sesquiterpenos não oxigenados (acima de 90%), e teores percentuais de monoterpenos muito reduzidos (1%). Os principais constituintes de *P. gaudichaudianum* foram: biciclogermacreno (14,23% - 28,16%), *cis*-eudesma-6,11-dieno (2,31% - 4,32%), *E*-cariofileno (2,34% - 8,43%) e os sesquiterpenos oxigenados *E*-nerolidol (6,32% - 12,11%), viridiflorol (5,2% - 7,89%) e α -cadinol (3,21% - 9,32%). As variações nas composições químicas entre silvestre e gerações cultivadas não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). Os sesquiterpenos *E*-cariofileno ($r^2 = 0,999$) e biciclogermacreno ($r^2 = 0,922$) aumentaram proporcionalmente o teor no OE da planta silvestre em direção à segunda geração propagada. Comportamento inversamente proporcional foi observado para *E*-nerolidol ($r^2 = -0,686$).

Análise qualitativa obtida por diagrama de *Venn* está apresentada na figura 51. Esse diagrama permite demonstrar e exportar qualquer subconjunto individual ou múltiplo como listas de entidades separadas. A análise do diagrama de *Venn* com dados de *P. gaudichaudianum* mostrou que existem 18 substâncias comuns a todos os espécimes de *P. gaudichaudianum* neste estudo (32,10%), que representam 67,36%, 67,86% e 81,33% do teor

total de substâncias do OE. Seis substâncias foram encontradas apenas na primeira geração cultivada, sendo elas: α -pineno, α -ilangeno, amorfa-4,7(11)-dieno, β -calacoreno, 5-*epi*-7-*epi*- α -eudesmol, 7-*epi*- α -eudesmol, porém nenhuma dessas substâncias registraram uma porcentagem relativa valiosa (<1%). Para a segunda geração de cultivo, apenas uma substância foi identificada como exclusiva, o *E*- β -farneseno (1,73%). Há o compartilhamento de 30 substâncias e que juntas representam mais de 80% do conteúdo total do OE entre o espécime silvestre de *P. gaudichaudianum* e o espécime cultivado de primeira geração, e o compartilhamento de 8 (oito) substâncias entre os espécimes cultivados.

Figura 51 - Diagrama de Venn feito a partir dos constituintes do óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* selvagem e cultivada.

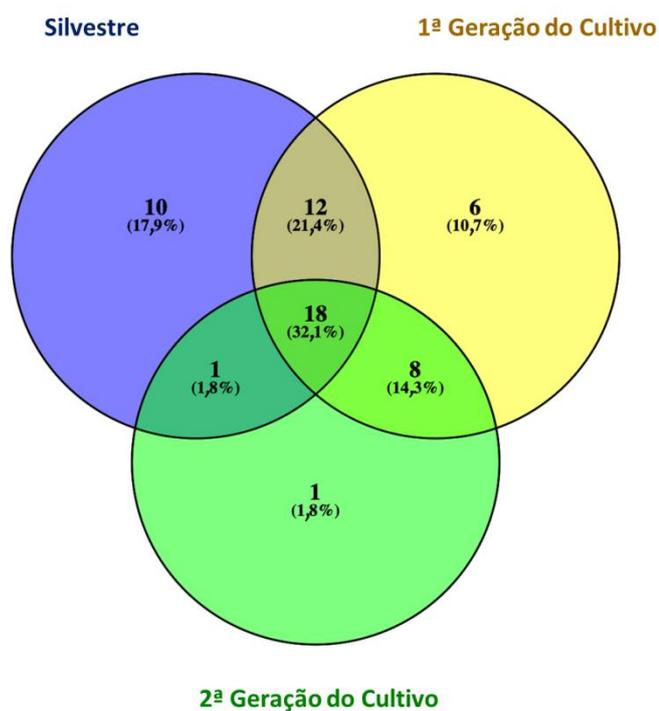


Tabela 20 - Constituição química e rendimentos (%) dos óleos essenciais das folhas de *Piper gaudichaudianum* silvestre e em cultivo de primeira e segunda gerações.

Substâncias ^a	IR _{lit}	IR _{calc}	Área Percentual Relativa (%) ± DP		
			Silvestre	Cultivada	
				1º Geração	2º Geração
3E-hexanol	844	844	0,03±0,01	-	-
α-pineno	932	928	0,02±0,02	-	-
canfeno	946	954	0,04±0,00	-	-
β-pineno	974	979	-	0,31±0,02	-
limoneno	1024	1026	-	0,12±0,03	0,03±0,02
linalol	1095	1094	0,02±0,01	-	-
cânfora	1141	1143	-	1,23±0,02	0,31±0,03
borneol	1168	1170	0,12±0,03	-	-
α-terpineol	1186	1190	0,23±0,02	4,87±0,02	5,62±0,02
δ-elemeno	1335	1337	2,31±0,03	1,34±0,04	1,87±0,33
α-cubebeno	1345	1352	0,32±0,02	0,98±0,06	1,89±0,02
α-ilangeno	1373	1374	-	0,78±0,05	-
α-copaeno	1374	1376	1,23±0,05	1,45±0,03	1,67±0,07
β-bourboneno	1384	1383	-	0,32±0,02	0,89±0,08
β-elemeno	1389	1388	1,23±0,04	1,37±0,03	1,67±0,04
α-gurjuneno	1409	1409	1,45±0,06	0,32±0,07	-
E-cariofileno	1417	1418	2,34±0,04	5,43±0,06	8,43±0,07
β-gurjuneno	1431	1435	0,45±0,02	0,23±0,02	0,21±0,03
γ-elemeno	1434	1438	0,78±0,06	0,03±0,01	-
Z-β-farneseno	1440	1440	-	0,57±0,02	3,43±0,06
aromadendreno	1441	1441	1,23±0,07	1,04±0,03	1,65±0,76
α-humuleno	1452	1456	1,21±0,06	0,32±0,02	-
E-β-farneseno	1454	1454	-	-	1,73±0,08
allo-aromadendreno	1458	1461	2,34±0,04	-	-
9-epi-E-cariofilene	1464	1468	-	1,23±0,03	0,43±0,02

γ -Muuroleno	1478	1497	0,23 \pm 0,00	-	1,21 \pm 0,00
amorfa-4,7(11)-diene	1479	1478	-	0,23 \pm 0,02	-
<i>ar</i> -Curcumeno	1480	1480	0,08 \pm 0,02	-	-
germacreno D	1483	1483	0,05 \pm 0,01	0,32 \pm 0,03	-
α -amorfenno	1484	1484	5,21 \pm 0,04	1,43 \pm 0,34	0,76 \pm 0,04
Z-eudesma-6,11-diene (eudesmadieno)	1489	1489	4,32 \pm 0,35	2,31 \pm 0,12	3,34 \pm 0,31
β -selineno	1490	1490	3,45 \pm 0,06	1,23 \pm 0,03	1,87 \pm 0,02
γ -amorfenno	1495	1496	4,21 \pm 0,00	-	-
α -selineno	1497	1997	4,87 \pm 0,00	3,25 \pm 0,00	1,01 \pm 0,00
biciclogermacreno	1498	1496	14,23\pm0,00	16,12\pm0,00	28,16\pm0,00
α -muuroleno	1500	1500	0,76 \pm 0,00	1,23 \pm 0,00	-
γ -cadineno	1513	1516	1,23 \pm 0,11	2,32 \pm 0,27	-
7- <i>epi</i> - α -selineno	1520	1521	1,23 \pm 0,05	1,23 \pm 0,04	-
δ -cadineno	1522	1522	5,67 \pm 0,08	3,56 \pm 0,05	-
<i>E</i> -cadin-1,4-dieno	1533	1534	1,87 \pm 0,08	0,67 \pm 0,02	0,31 \pm 0,04
α -cadineno	1537	1537	1,98 \pm 0,06	0,89 \pm 0,04	-
selina-3,7(11)-dieno	1545	1546	1,45 \pm 0,08	1,94 \pm 0,09	2,31 \pm 0,06
germacreno B	1559	1558	-	1,23 \pm 0,04	2,23 \pm 0,05
<i>E</i> -nerolidol	1561	1563	12,11\pm1,04	6,32\pm0,21	8,03\pm0,09
β -calacoreno	1565	1566	-	0,09 \pm 0,02	-
palustol	1567	1568	0,09 \pm 0,02		
espatulenol	1577	1573		5,32 \pm 0,02	3,32 \pm 0,02
óxido de cariofileno	1582	1581	1,23 \pm 0,02	-	-
viridiflorol	1592	1594	5,43 \pm 0,05	7,89 \pm 0,56	5,21 \pm 0,40
ledol	1602	1604	5,08 \pm 0,02	5,54 \pm 0,07	-
5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1607	1607	-	0,32 \pm 0,01	-
α -muurolol	1644	1645	3,42 \pm 0,04	0,98 \pm 0,00	-
α -eudesmol	1652	1652	1,21 \pm 0,05	0,56 \pm 0,04	-
α -candinol	1653	1653	3,21\pm0,12	9,32\pm1,12	7,32\pm0,68
7- <i>epi</i> - α -eudesmol	1662	1663	-	0,32 \pm 0,02	-

intermedeol	1665	1667	-	1,34±0,01	2,32±0,03
Monoterpenos não oxigenados			0,09	0,43	0,03
Monoterpenos oxigenados			0,37	6,10	5,93
Sesquiterpenos não oxigenados			65,73	53,46	65,07
Sesquiterpenos oxigenados			31,78	37,91	26,20
Número de Substâncias Identificadas			41	44	28
Total de Substância Quantificada (%)			97,97	97,90	97,23
Rendimento do OE (%)			0,17±0.03	0,13±0.02	0,18±0,02

Legenda: IRcalc = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IRLit = índice de retenção de literatura (Adams, 2007; 2017); DP= desvio padrão. a) Todas as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. OE – Óleo essencial; Principais constituintes em negrito.

4.4 Composição química e rendimentos dos óleos essenciais e voláteis de *Piper multinodum* C.DC. silvestre

4.4.1 Composição química dos diferentes órgãos de *Piper multinodum*

A composição química e rendimento dos OEs de *P. multinodum* nos meses de dezembro de 2018 para raízes, caules, galhos, folhas e inflorescências, e janeiro de 2019 para infrutescências está apresentada na tabela 21 (6 amostras). As estruturas químicas dos constituintes majoritários estão apresentadas figura 52. A hidrodestilação dos diferentes órgãos de *P. multinodum* produziu OEs com rendimento que variaram entre 0,19 a 1,32%, calculado com base na massa do material vegetal fresco. As partes reprodutivas inflorescências e infrutescências apresentaram os maiores rendimentos, com 1,32% e 0,93%, respectivamente.

Nos OEs foi possível identificar 33 substâncias, com constituintes que divergiam entre as partes vegetativas e reprodutivas, entre 8 e 16, nas amostras analisadas. O total de substâncias identificadas ficou entre 80,70% e 99,44%.

Nas infrutescências e inflorescências esse espécime apresentou uma composição rica em monoterpenos não oxigenados α -pineno (67,23 e 40,23%, respectivamente), β -pineno (8,67% e 6,57%, respectivamente) e mirceno (9,92% e 13,23%). Entre os sesquiterpenos não oxigenados destacou-se o *E*-cariofileno (7,67%). A classe arilpropanoide apresentou um teor percentual relevante nas infrutescências, com um percentual de 27,25%, sendo esses identificados como asaricina (5,23%), miristicina (6,23%), dilapiol (5,78%) e apiol (7,67%). A composição química do OE das folhas mostrou-se rica nos monoterpenos não oxigenados α -pineno (32,49%) e mirceno (14,50%), com maior número de substâncias identificadas em comparação as demais partes da planta. O galho (caule secundário) apresentou uma composição mais rica em sesquiterpenos não oxigenados (47,36%), com α -copaeno (13,24%) e *E*-cariofileno (12,32%). No entanto, os componentes majoritários foram identificados como sendo o α -pineno (20,34%) e mirceno (11,23%). Diferentemente, o caule e a raiz demonstraram baixo teor percentual de monoterpenos e sesquiterpenos, com composição rica em arilpropanoides, sendo os majoritários *E*-metil-isoeugenol (77,58%) no caule e eusarona (81,34%) na raiz. A substância *E*-metil-isoeugenol foi registrada em teores baixos (< 2%) na raiz. Nas Figuras 53 e 54 os espectros de massas são apresentados com proposta de fragmentação para eusarona e *E*-metil-isoeugenol, respectivamente. É perceptível que o íon molecular e o pico base destoam

entres as estruturas identificadas e convergem nas substâncias propostas. Na *E*-metil-isoeugenol tem-se m/z 178 (Figura 53) e para eusarona tem-se o m/z 208 (Figura 54).

Figura 52 - Substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais de *Piper multinodum*: α - pineno (1), mirceno (2), terpinen-4-ol (3), *E*-cariofileno (4), α -copaeno (5), germacreno D (6), *E*-metil-isoeugenol (7), eusarona (8), asaricina (9), miristicina (10), dilapiol (11) e apiol (12).

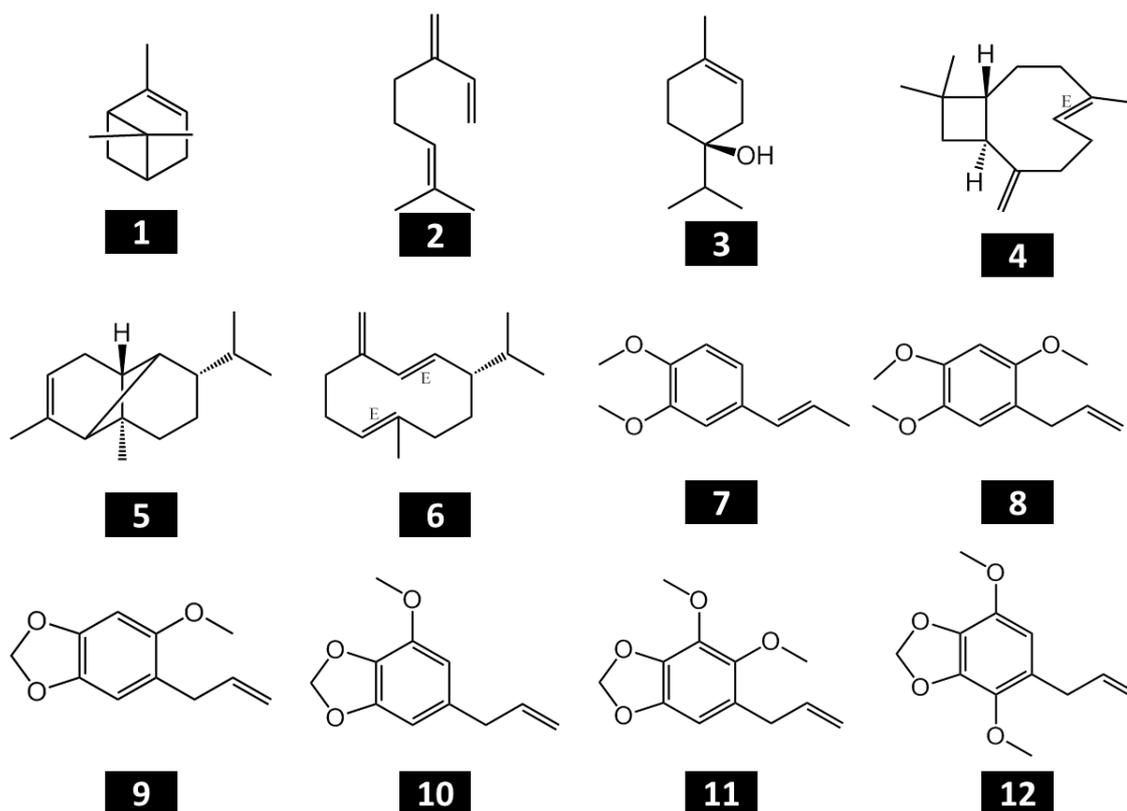


Figura 53 - Espectro de massas obtido por CG-EM (A) e proposta de fragmentação para *E*-metil-isoeugenol (B).

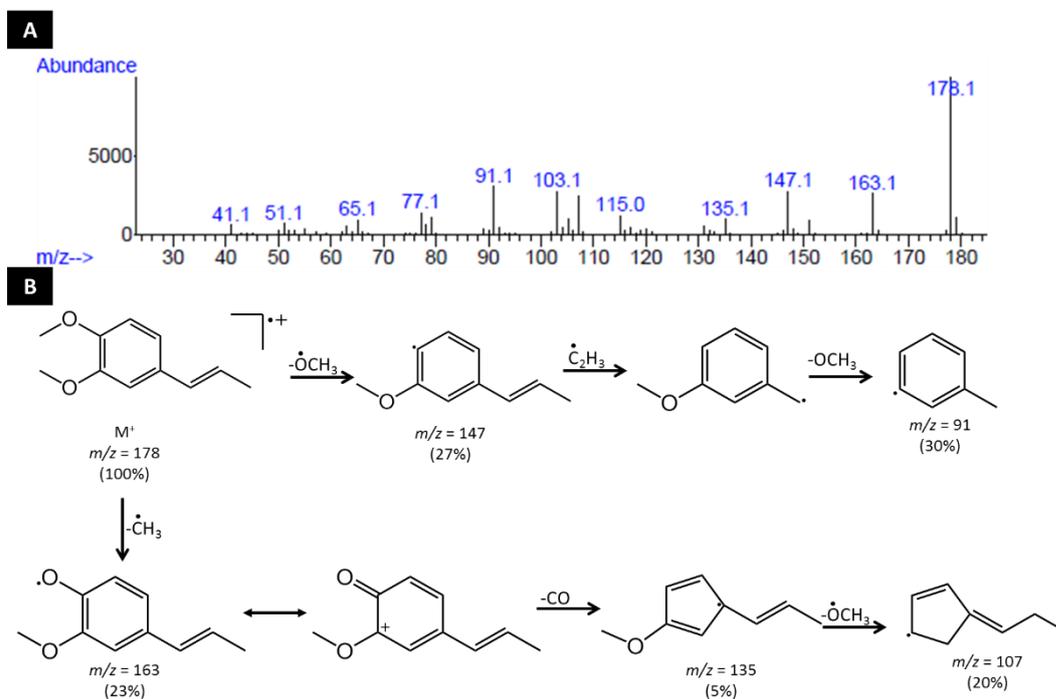


Figura 54 - Espectro de massas obtido por CG-EM (A) e proposta de fragmentação da eusarona (B)

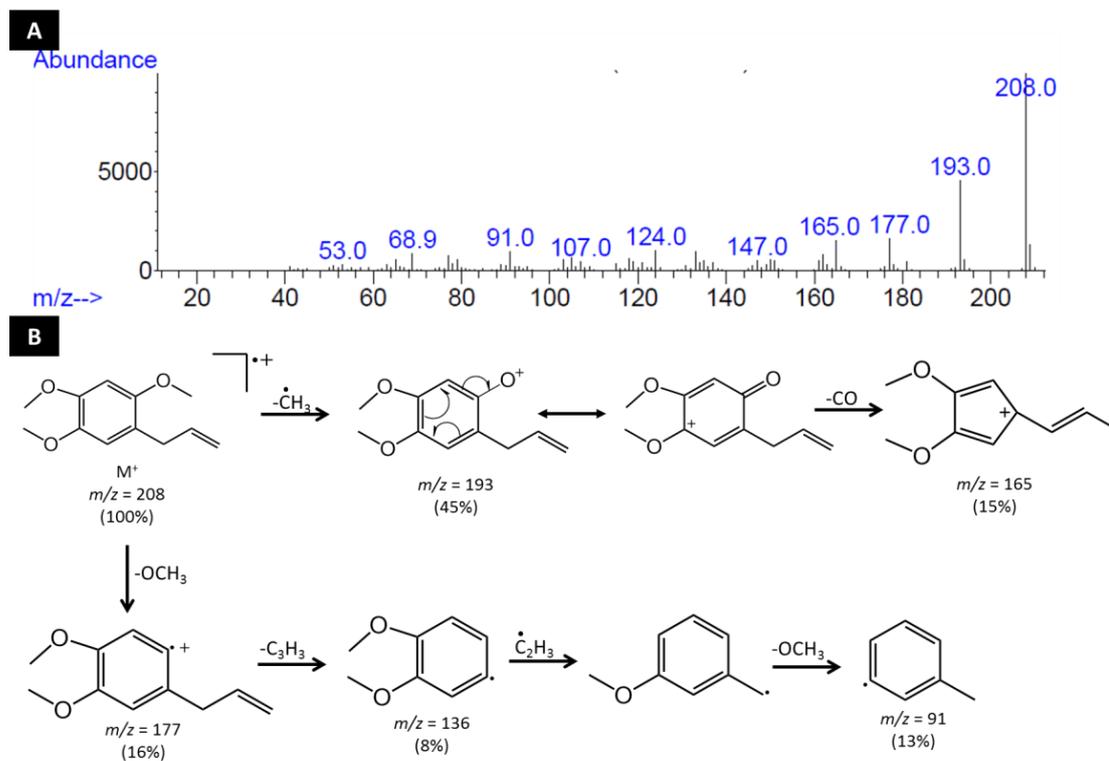


Tabela 21 - Constituição química, esqueleto de carbono, rendimentos e índice ecológico de oxi-redução dos óleos essenciais de diferentes órgãos de *Piper multinodum* C.DC.

Esqueleto -C	Substâncias	IRcalc	IRlit	Área percentual relativa (%) ± DP					
				Raiz	Caule	Galho	Folha	Inflorescência	Infrutescência
Pinano	α -pineno	929	932	0,16±0,02		20,34±1,05	32,49±2,32	67,23±3,87	40,23±1,33
Canfano	canfeno	936	946				0,51±0,03	0,20±0,03	
Sabinano	sabineno	966	969		1,31±0,12	2,31±0,06	2,44±0,06	1,23±0,08	0,35±0,00
Pinano	β -pineno	977	974			3,45±0,09	3,49±0,03	8,67±0,29	6,57±0,72
Mircano	mirceno	987	988			11,23±0,45	14,5±0,02	9,92±0,56	13,23±1,32
Mentano	α -felandreno	1000	1002				1,73±0,02		
Carano	δ -3-careno	1005	1008				4,78±0,05		
Mircano	Z- β -ocimeno	1030	1032			7,67±0,08	2,40±0,23		
	NI (<i>m/z</i> 204)						1,15±0,06		
Canfano	hidrato de canfeno	1140	1145		0,70±0,02				
Mentano	terpinen-4-ol	1176	1174	1,34±0,07	11,70±0,23	1,34±0,02			
Mentano	α -terpineol	1189	1186		2,57±0,12				
Canfano	acetato de isobornila	1283	1283	0,60±0,03					
Ciclosativano	ciclosativeno	1366	1369	0,43±0,01					
Copaano	α -copaeno	1372	1374				1,98±0,24		
Bourbonano	β -bourboneno	1379	1384			6,72±0,03	0,53±0,02	0,56±0,07	
Elemano	β -elemeno	1387	1389	0,61±0,02					
Cariofilano	<i>E</i> -cariofileno	1416	1417	5,42±0,02	0,60±0,03	12,32±0,21	4,11±0,04	1,30±0,03	7,67±0,05
Copaano	β -copaeno	1415	1430	0,23±0,32		13,24±0,03		1,23±0,05	1,32±0,06
Aromadendrano	aromadendreno	1440	1439			4,32±0,23			
Humulano	α -humuleno	1449	1452			1,23±0,00	4,60±0,05		

Aromadendrano	<i>allo</i> -aromadendreno	1425	1458			0,32±0,00	0,35±0,09		
Cadinano	<i>E</i> -muurolo-4,14,5-dieno	1470	1465				1,52±0,15		
Germacrano	germacreno D	1480	1480	2,43±0,03		9,21±1,20			1,87±0,08
Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	<i>E</i> -metil-isoeugenol	1493	1491	1,25±0,00	77,58±2,21	5,23±0,43			
Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	asaricina	1498	1495					1,21±0,02	5,23±0,21
BicycloGermacrano	biciclogermacreno	1487	1500				2,41±0,03		
Cadinano	α -muurolo	1501	1500		1,03±0,09				
Bisabolano	<i>Z</i> - α -Bisaboleno	1505	1506	0,17±0,00					
Cadinano	δ -amorfenol	1510	1511				1,69±0,04		
Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	miristicina	1514	1518	5,48±0,00				0,78±0,01	6,23±0,34
Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	euasarona	1573	1572	81,32±1,43	1,15±0,03				2,34±0,12
Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	dilapiol	1622	1620					0,32±0,03	5,78±0,08
Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	apiol	1675	1678					0,23±0,04	7,67±0,05
Monoterpenos não oxigenados				0,16	1,31	45,00	62,36	87,25	60,38
Monoterpenos oxigenados				1,94	14,97	1,34	0,00	0,00	0,00
Sesquiterpenos não oxigenados				9,29	1,63	47,36	17,19	3,09	10,86
Arilpropanoides				88,05	78,73	5,23	0,00	2,54	27,25
Número de substâncias identificadas				12	8	14	17	12	12
Total de substâncias quantificadas (%)				99,44	96,64	98,93	80,70	92,88	98,49
Rendimentos dos EOs (%)				0,21	0,11	0,19	0,63	1,32	0,93
IE_{OR}^b				-13,26	-12,52	-11,05	-7,59	-12,16	-10,74

Legenda: IR_{calc} = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IR_{lit} = índice de retenção de literatura (Adams, 2007; 2017); Principais constituintes em negrito. DP = desvio-padrão. ^aTodas as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. ^bÍndice ecológico de oxi-redução. tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%).

4.4.1.1 Variação Quimiofenética espacial em *Piper multinodum*

Os resultados dos cálculos dos Índices Ecológicos de Oxi-redução variaram de **-13,26** a **-7,59**, com diferenças significativas entre si ($p < 0,01$) (Tabela 21). As substâncias químicas do OEs das folhas apresentam-se mais oxidadas (-7,59%) e das raízes mais reduzidas (-13,26). Os órgãos reprodutivos apresentaram valores altos de IE_{OR}. Portanto, é possível constatar que existe um gradiente químico oxi-redutivo da raiz para as folhas, que passa de mais reduzido para mais oxidado, sendo os órgãos reprodutivos são mais oxidados do que as folhas e comparáveis em oxidação com caules e galhos.

A análise de componente principal (ACP) e análise de agrupamento hierárquico (AAH) para as diferentes partes de *P. multinodum* são mostradas nas figuras 57 e 58, respectivamente.

A ACP apresentou uma variância total de 76,82% (Figura 55). O primeiro componente (58,46%) foi responsável pela separação da composição química de caule e da raiz das demais partes vegetativas com cargas positivas. O segundo componente (18,36%) foi responsável pela separação do galho e caule das demais partes também com cargas positivas. O monoterpeno não oxigenado α -pineno (-6,26) foi responsável pela separação no PC1 pelos levados teores encontrados nas inflorescências, infrutescências, folhas e galhos. No PC2 a carga positiva de *E*-metil-isoeugenol (+2,69) levaram a separação do galho e caule. Apesar das variações nos teores de *E*-metil-isoeugenol, análise de AAH (Figura 58) demonstrou claramente a separação de três grupos, de cima para baixo: **Grupo I** – Rico em eusarona; **Grupo II** – Rico em α -pineno e; **Grupo III** – Rico em *E*-metil-isoeugenol. A separação em maior distância euclidiana do caule é devida, principalmente, aos teores percentuais elevados do monoterpeno oxigenando terpinen-4-ol.

Figura 55 – Gráfico *Biplot* (ACP) resultante da análise da composição dos óleos essenciais de diferentes partes vegetativas de *Piper multinodum*.

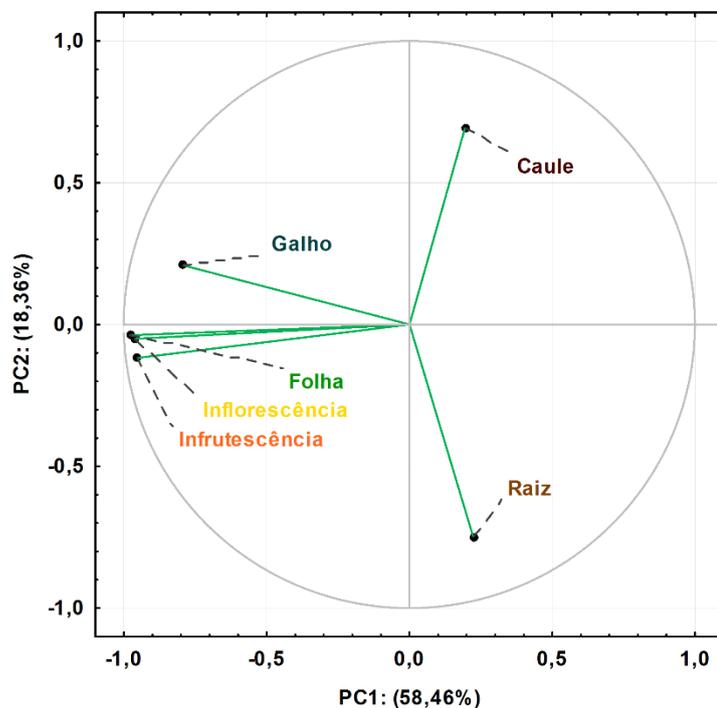
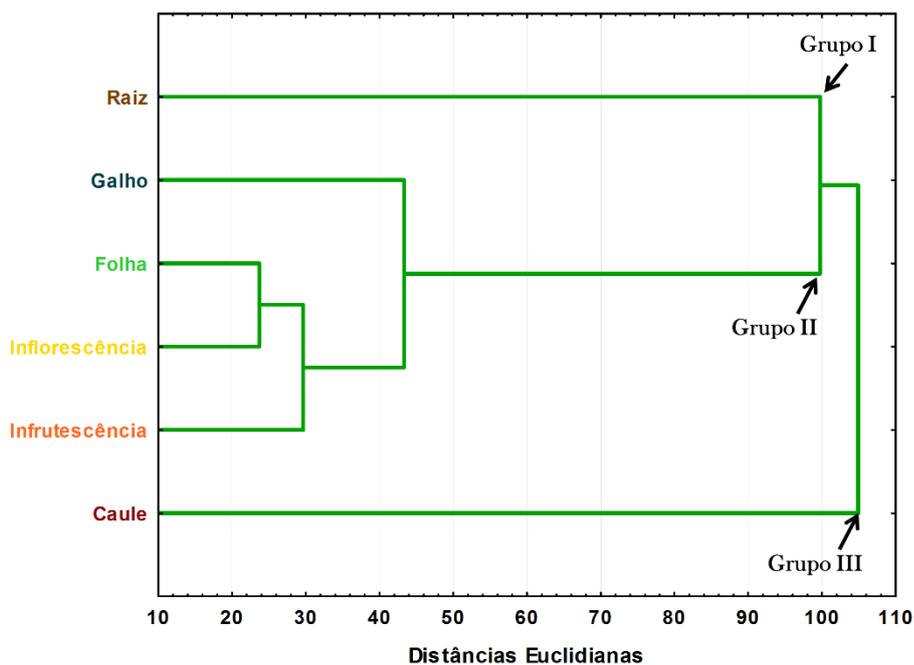


Figura 56 - Dendrograma representando a relação de similaridade da composição dos óleos essenciais de diferentes órgãos de *Piper multinodum*.



As análises dos esqueletos carbônicos nos OEs das diferentes partes da planta possibilitaram o registro de 18 esqueletos. Com maior número de substâncias tem-se o esqueleto

Alquilbenzeno (C₃-C₆) (n=6), seguido dos esqueletos de monoterpene Mentano (n=3) e Canfano (n=3) e sesquiterpene Cadinano (n=3). No entanto, com base no teor média dos esqueletos de carbono tem-se Pinano e Alquilbenzeno (Tabela 22).

Tabela 22 - Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbono dos componentes do óleo essencial dos diferentes órgãos de *Piper multinodum*

Esqueleto - C	Porcentagem de Ocorrência (%)					
	Raiz	Caule	Galho	Folha	Inflorescência	Infrutescência
Alquilbenzeno (C ₆ -C ₃)	88,05	78,73	5,23	0,00	2,54	27,25
Aromadendrano	0,00	0,00	4,64	0,35	0,00	0,00
Biciclogermacrano	0,00	0,00	0,00	2,41	0,00	0,00
Bisabolano	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bourbonano	0,00	0,00	6,72	0,53	0,56	0,00
Cadinano	0,00	1,03	0,00	3,20	0,00	0,00
Canfano	0,60	0,70	0,00	0,51	0,20	0,00
Carano	0,00	0,00	0,00	4,78	0,00	0,00
Cariofilano	5,42	0,60	12,32	4,11	1,30	7,67
Copaano	0,23	0,00	13,24	1,98	1,23	1,32
Ciclosativano	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Elemmano	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Germacrano	2,43	0,00	9,21	0,00	0,00	1,87
Humulano	0,00	0,00	1,23	4,60	0,00	0,00
Mentano	1,34	14,27	1,34	1,73	0,00	0,00
Mircano	0,00	0,00	18,90	16,90	9,92	13,23
Pinano	0,16	0,00	23,79	35,99	75,90	46,80
Sabinano	0,00	1,31	2,31	2,44	1,23	0,35

Os percentuais de ocorrência de esqueletos de carbono foram submetidos às análises ACP e AAH e os resultados estão apresentados nas figuras 57 e 58. Na ACP, com variância total de 93,77%, foi possível registrar no PC1 (57,07%) a separação das amostras de caule e raiz com cargas positivas em relação a demais amostras. Essa separação foi devido à carga negativa dos derivados de Pinano (-4,53). O PC2 (36,70%) foi responsável pela separação dos caules, raízes e infrutescências, e com menor carga a inflorescência e infrutescência derivada da influência da carga positiva do alquilbenzeno (+3,867).

Análise por AAH levou à separação clara de dois grupos: **Grupo I** – Com predominância das substâncias com esqueleto produzidos pela via do chiquimato; e **Grupo II** - Com predominância das substâncias com esqueleto produzidos pela via do mevalato e/ou

metileritrose-4-fosfato. No **grupo II**, em distâncias euclidianas menores, é possível observar uma separação pelo elevado teor percentual de alquilbenzenos.

Figura 57 - Gráfico *Biplot* (ACP) resultante da análise dos esqueletos de carbono obtidos a partir dos constituintes dos óleos essenciais de diferentes partes de *Piper multinodum*

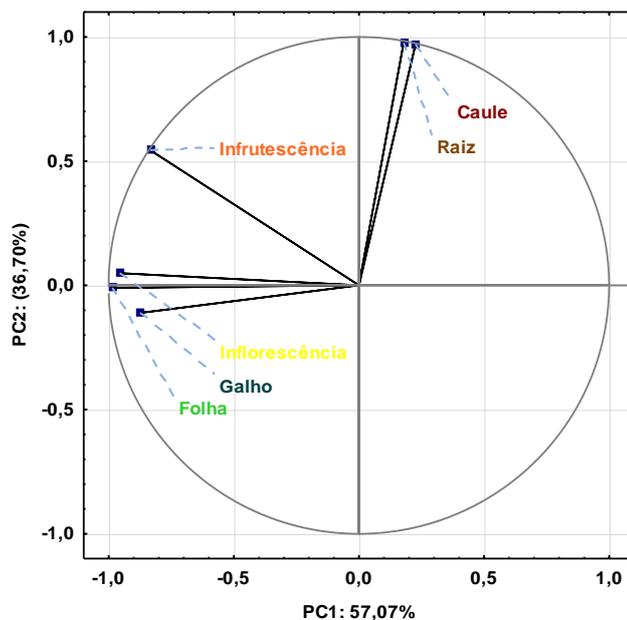
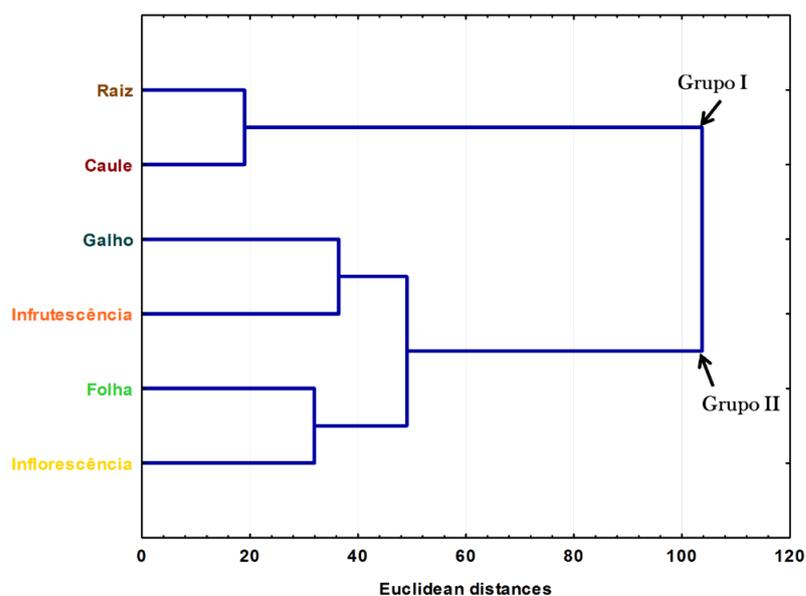


Figura 58 - Dendrograma representando a relação de similaridade dos esqueletos de carbono obtidos a partir dos constituintes dos óleos essenciais de diferentes partes de *Piper multinodum*



4.4.2 Composição química dos óleos essenciais do estudo sazonal de *Piper multinodum* silvestre

Na avaliação do efeito da variação sazonal na composição química dos OEs de *P. multinodum* foram analisadas um total de 12 amostras. As composições químicas e rendimentos são descritas na tabela 23. Foi possível identificar um total de 62 substâncias, variando entre 14 e 39 no período de estudo. O total percentual de substâncias identificadas variou entre 70,34 a 99,53%. Os rendimentos variaram entre 0,09 e 0,68%. Os OEs apresentaram coloração amarela durante todos os meses do ano. O espécime apresentou fase reprodutiva no período de janeiro, junho a agosto, novembro e dezembro de 2019.

Esses OEs são ricos em monoterpenos (46,58 a 72,07%). As substâncias majoritárias são os monoterpenos não oxigenado α -pineno (22,17 a 40,44%), mirceno (0,31 a 18,23%) e β -pineno (0,00 a 12,25%) (Tabela 23). Das 62 substâncias identificadas apenas 19 apresentaram variações acima de 5% ao longo do ano em algum momento amostrado.

Na figura 59 são apresentadas as médias mensais e diagramas ombrotérmicos referentes à normal climatológica dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade de Teresópolis/ RJ, no período de janeiro a dezembro de 2019, em que foram realizadas as coletas. O clima do local de coleta apresentou um período completamente seco nos meses de junho e julho, o que pode ser observado no diagrama ombrotérmico (Figura 59B). Os meses de janeiro a março apresentaram os maiores índices pluviométricos (364 - 569 mm) definindo uma estação mais chuvosa. Ao longo do ano foi possível observar que os meses de julho e junho apresentaram uma estação seca.

Tabela 23 - Constituição química, rendimentos (%), esqueleto de carbonos (esqueleto-C) e Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais de folhas de *Piper multinodum* C.DC. silvestre nos meses de janeiro a dezembro de 2019.

Esqueleto-C	Substâncias	IRcal c	IRli t	Área Percentual Relativa (%) ± Desvio Padrão (DP)												
				Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
Canfeno	triciclono	922	921	0,28±0,01		0,14±0,03		5,00±0,69		0,13±0,01						
Tujano	α-tujeno	924	924		0,19±0,03	0,35±0,04	0,44±0,04	7,56±0,78	0,45±0,00	0,38±0,09	0,38±0,03				0,35±0,04	0,24±0,03
Pinano	α-pineno	931	932	28,31±1,03	25,21±1,08	22,17±1,23	30,21±1,06	32,80±2,16	36,19±1,03	38,37±1,11	40,44±1,23	33,58±2,34	30,47±1,23	23,61±1,43	23,74±0,78	
Canfeno	canfeno	944	946	0,56±0,06	0,43±0,08	0,77±0,04	0,87±0,05		1,17±0,00	1,01±0,03	0,56±0,08	0,15±0,01			0,73±0,05	0,72±0,01
Tujano	sabineno	970	969	2,84±0,08	4,32±0,73	2,89±0,05	3,47±0,04		5,95±0,00	5,53±0,04	2,55±0,08	1,09±0,02	3,97±0,06			2,82±0,03
Pinano	β-pineno	975	974	3,42±0,04	3,60±0,08	3,64±0,07	6,56±0,53	5,52±0,05	12,25±0,00	4,46±0,06	3,67±0,32	1,50±0,02	3,56±0,08			4,47±0,08
Mircano	mirceno	989	988	15,09±0,21	11,26±0,90	10,87±1,23	6,23±0,71	0,31±0,13	0,34±0,07	6,67±0,02	13,59±0,94	2,84±0,35	8,47±0,32	9,21±1,21	18,23±1,23	
Mentano	α-felandreno	1003	1002	0,87±0,02	0,56±0,02	0,92±0,02	0,96±0,03			0,87±0,04	0,81±0,02			0,71±0,07	9,65±0,06	2,46±0,06
Carano	δ-3-careno	1008	1008		3,87±0,05	0,03±0,00	0,04±0,00	3,19±0,08	7,61±0,00			0,23±0,02			8,56±0,08	2,33±0,04
Mentano	α-terpineno	1015	1014			0,05±0,00	0,07±0,01			0,20±0,00						
Mentano	ρ-cimeno	1021	1020			0,20±0,12	0,23±0,00					0,09±0,01				
Mentano	o-cimeno	1022	1022	0,14±0,03						0,31±0,00				0,23±0,03		
Mentano	limoneno	1023	1024	0,86±0,08						1,24±0,04	1,22±0,02	0,48±0,03	1,19±0,02			
Mentano	β-felandreno	1026	1025	2,03±0,15		2,51±0,03	2,95±0,67	0,18±0,02	0,12±0,00	1,33±0,06	1,80±0,02	0,55±0,03	1,48±0,02	0,17±0,02		
Mircano	Z-β-ocimeno	1032	1032	4,96±0,82		4,34±0,07	4,52±0,07			5,37±0,09	4,37±0,32	1,86±0,03	4,32±0,45			
Mircano	E-β-ocimeno	1044	1044	1,89±0,02		2,22±0,09	2,46±0,04			2,81±0,20	2,21±0,23	1,10±0,43	2,39±0,21			

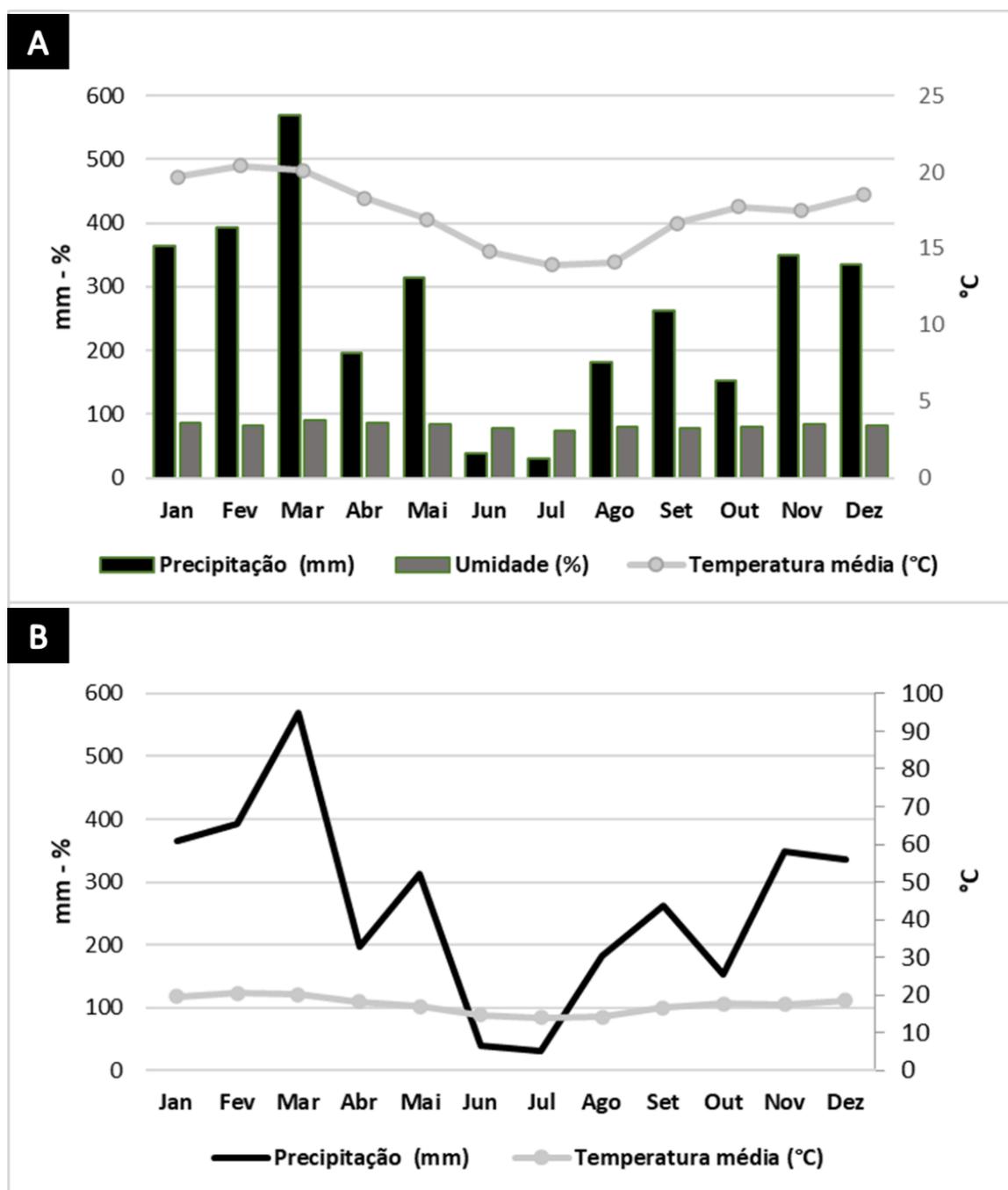
Mentano	γ -terpineno	1055	105 4		0,08±0,08	0,12±0,02		0,32±0,01	0,11±0,01				
Mentano	terpinoleno	1087	108 6		0,05±0,05	0,08±0,00		0,13±0,02					
Mentano	perileno	1098	110 2		3,52±0,02				0,60±0,01				
Pinano	crisantenona	1120	112 4						2,21±0,04				
Mircano	<i>allo</i> -ocimeno	1129	112 8		0,45±0,10	0,82±0,02		1,00±0,03	0,47±0,03	0,19±0,01	0,61±0,04		
Mentano	terpinen-4-ol	1175	117 4					0,20±0,02					
Tujano	<i>neoiso</i> -3-acetato de tujanol	1282	128 1		0,86±0,09								
Canfeno	acetato de isobornila	1284	128 3					0,16±0,03					
Elemeno	δ -elemeno	1335	133 5	0,43±0,06				0,32±0,01	0,83±0,04				
Cubebano	α -cubebeno	1348	134 8	1,04±0,08	0,17±0,03	0,28±0,03			0,20±0,02	5,03±0,02	7,27±0,34		
Copaano	α -copaeno	1375	137 4		2,80±0,05				0,52±0,04	4,67±0,04	3,50±0,01		
Cubebano	β -cubebeno	1385	138 7	0,37±0,06	0,25±0,03	0,18±0,01	0,16±0,00				0,49±0,04	0,50±0,04	
Bourbonano	β -bourboneno	1387	138 7	2,40±0,02	2,97±0,14			2,21±0,02	2,23±0,05	4,09±0,03	2,33±0,12		
Elemeno	β -elemeno	1388	138 9	0,54±0,02	0,74±0,08			1,14±0,01	0,60±0,02	0,97±0,03	0,66±0,05		
Longipinano	β -longipineno	1398	140 0	3,65±0,43	7,60±0,09		1,94±0,05	1,49±0,00			8,65±0,09	12,39±1,5 6	
Longifolano	longifoleno	1405	140 7	0,36±0,02		8,54±0,04							
Aromadendrano	α -gurjuneno	1410	140 9		0,18±0,02	0,05±0,00			0,22±0,02				
Cariofilano	<i>e</i> -cariofileno	1418	141 7		4,30±0,67			3,03±0,04	3,12±0,03	7,28±0,03	4,17±0,07		
Copaano	β -copaeno	1430	143 0	8,17±0,09	0,74±0,04	7,01±0,19	3,58±0,00	0,61±0,05	1,04±0,02	0,43±0,08	0,31±0,05	0,25±0,03	

Aromadendrano	β -gurjuneno	1432	143 1	5,87±0,21			0,45±0,02	0,28±0,02	0,61±0,03	0,25±0,04	0,32±0,03	0,36±0,03
Elemeno	γ -elemeno	1433	143 4		3,39±0,08		3,20±0,03	0,68±0,00			7,01±0,54	3,18±0,10
Aromadendrano	aromadendreno	1436	143 9	0,27±0,40		0,05±0,01	0,07±0,05					
Guaiano	6,9-guaiadieno	1447	144 2	5,15±0,06		0,44±0,02	0,14±0,04	1,39±0,06			0,22±0,03	0,30±0,02
Humulano	α -humuleno	1453	145 2			2,94±0,07		1,84±0,12	2,95±0,03	3,99±0,02	2,26±0,00	
Aromadendrano	<i>allo</i> -aromadendreno	1459	145 8	0,27±0,08		4,07±0,05		2,24±0,08	5,76±0,02	6,04±0,02	4,81±0,00	
Cadinano	<i>E</i> -cadinina-1(6),4-dieno	1462	146 1			0,43±0,00	0,35±0,03	0,28±0,00	0,33±0,03	0,56±0,03		0,13±0,02
Cadinano	<i>Z</i> -cadinina-1(6),4-dieno	1465	147 5	1,28±0,02								0,18±0,01
Cadinano	γ -muuroleno	1479	147 8			8,82±0,02		0,31±0,03	5,11±0,03	0,71±0,03	0,38±0,03	
Germacrano	germacreno D	1480	148 0			0,61±0,09		5,52±0,02	9,28±0,02	5,91±0,02		
Eudesmano	β -selineno	1488	148 9			0,07±0,02		0,32±0,03	0,85±0,04			
Cadinano	γ -amorfenno	1491	149 5						0,37±0,02			
Biciclogermacrano	biciclogermacreno	1497	150 0			0,23±0,02		1,57±0,06	2,49±0,04	4,20±0,02	2,18±0,02	
Cadinano	α -muuroleno	1498	150 0			0,29±0,07		0,21±0,03	0,42±0,03			
Farnesano	<i>E,E</i> - α -farneseno	1503	150 5				0,56±0,04					
Bisabolano	β -bisaboleno	1506	150 5		0,53±0,03	0,58±0,07	1,50±0,09	0,44±0,00		0,14±0,01		1,07±0,03
Cadinano	γ -cadineno	1512	151 3		0,26±0,02	2,38±0,09	0,46±0,04	0,35±0,04	0,15±0,04	0,22±0,02	0,23±0,02	
Cadinano	δ -cadineno	1520	152 2			0,11±0,02		1,91±0,03	3,85±0,04	2,45±0,04		
Cadinano	<i>Z</i> -cadinina-1,4-dieno	1531	153 3			0,05±0,00			0,12±0,03			

Eudesmano	selina-3,7(11)-dieno	1534	154 5										0,24±0,03		
Farnesano	<i>E</i> -nerolidol	1559	156 1										1,28±0,02		
Cariofilano	óxido de cariofileno	1581	158 2	0,33±0,02						0,35±0,06			0,21±0,03		
Copaano	β-copaen-4-α-ol	1590	159 0		0,40±0,06	0,18±0,02									
Cadinano	murolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1628	163 0										0,30±0,02		
Cadinano	<i>epi</i> -α-muurolol	1639	164 0							1,86±0,05			2,04±0,03		
Cadinano	α-muurolol	1650	164 4										0,63±0,02		
Fitano	Z,Z-linalool de geranila	1965	196 0										1,66±0,04		
Monoterpenos não oxigenados				61,25	49,89	51,23	60,03	54,56	64,08	70,13	72,07	43,77	57,4	52,28	55,01
Monoterpenos oxigenados				0	0,86	3,52	0	0	0	0,36	0	2,81	0	0	0
Sesquiterpenos não oxigenados				21,26	20,32	32,97	11,36	15,6	6,63	21,99	22,78	50,66	29,56	22,03	25,63
Sesquiterpenos oxigenados				0	0	0,33	0,4	0,18	0	2,21	0	2,29	3,83	0	0
Diterpenos oxigenados				0	0	0	0	0	0	0	0	1,66	0	0	0
Número de substâncias identificadas				23	16	39	25	18	14	37	20	39	28	14	18
Total de substâncias quantificadas no óleo essencial (%)				82,51	71,07	88,05	71,79	70,34	70,71	94,69	94,85	99,53	90,79	74,31	80,64
Rendimento de OE (%)				0,15	0,13	0,09	0,16	0,16	0,56	0,68	0,32	0,18	0,17	0,21	0,19
IEOR^a				-5,74	-7,10	-3,61	-4,59	-6,25	-8,08	-4,09	-7,58	-4,082	-5,19	-8,49	-7,17

Legenda: IRcalc = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IRLit = índice de retenção de literatura (Adams, 2007; 2017); Principais constituintes em negrito. DP = desvio-padrão. ^aTodas as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. ^bÍndice Ecológico de Oxirredução. OE – Óleo Essencial; tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%). Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Ago- agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro.

Figura 59 - Médias mensais e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade do Teresópolis/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2019.



Legenda: Médias mensais (A) e diagrama ombrotérmico (B). Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Ago- agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; Jan-janeiro de 2019 .

Fonte: INMET, 2019.

Tabela 24 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de *Piper multidonum*

Variáveis analisadas	Correlação de Pearson (r^2)									
	Umidade relativa (%)	Precipitação (mm)	Temperatura (°C)	Radiação solar (Kj/m ²)	pH em água	Acidez Total	Al	Ca	Mg	Na
triciclono	0,165	0,114	-0,051	-0,277	-0,140	-0,076	0,180	-0,009	-0,205	-0,320
α -tujeno	0,143	0,079	-0,098	-0,329	-0,174	-0,100	0,159	0,033	-0,221	-0,312
α -pineno	-0,740**	-0,807**	-0,880**	-0,026	-0,707*	-0,282	-0,763*	0,479	-0,352	0,082
sabineno	-0,393	-0,508	-0,182	0,352	-0,530	0,034	-0,400	0,560	0,409	0,701*
β -pineno	-0,156	-0,493	-0,302	-0,192	-0,710*	-0,117	-0,227	0,519	0,319	0,531
mirceno	0,271	0,427	0,420	0,087	0,501	0,257	0,489	-0,652*	0,115	0,013
α -felandreno	0,182	0,221	0,083	-0,372	0,586*	-0,164	0,268	-0,251	-0,190	-0,164
α -cubebeno	0,149	0,269	0,194	-0,629*	0,495	-0,142	0,454	-0,625*	-0,210	0,197
β -longipineno	0,198	0,369	0,401	-0,339	0,636*	-0,105	0,506	-0,565	-0,072	0,182
γ -elemeno	0,196	0,322	0,205	-0,417	0,631*	-0,191	0,356	-0,267	-0,220	-0,181
γ -muuroleno	0,358	0,451	0,085	0,095	0,062	0,814**	0,208	0,119	0,508	-0,307
germacreno D	-0,568	-0,331	-0,282	0,225	-0,157	-0,148	-0,631*	0,175	-0,348	0,051
Monoterpenos não oxigenados	-0,423	-0,637*	-0,636*	-0,060	-0,602*	-0,295	-0,346	0,331	-0,037	0,290
Monoterpenos oxigenados	0,284	0,521	0,297	0,313	0,185	0,743**	0,137	0,105	0,448	-0,140
Sesquiterpenos não oxigenados	-0,067	0,324	0,145	0,166	0,376	0,300	-0,093	-0,290	-0,144	-0,264
Sesquiterpenos oxigenados	-0,532	-0,405	-0,218	0,224	-0,222	-0,157	-0,653*	0,226	-0,347	0,020
Diterpenos oxigenados	-0,240	-0,008	-0,104	0,095	0,080	-0,093	-0,298	-0,110	-0,283	-0,134
Rendimentos dos óleos (%)	-0,744**	-0,793**	-0,813**	-0,133	-0,634*	-0,353	-0,627*	0,681*	-0,004	0,643*

Legenda - *Significativo a $p < 0,05$ ** Significativo a $p < 0,01$; +OE – Óleo Essencial

Tabela 24 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de *P. multidonum* (Continuação)

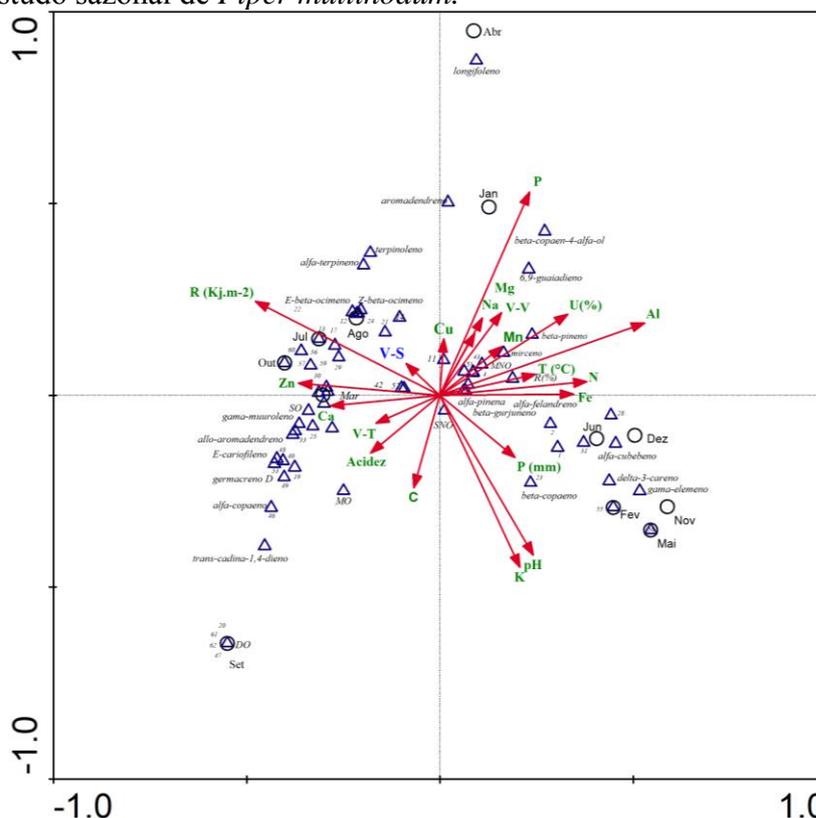
Variáveis analisadas	Correlação de Pearson (r^2)											
	K	P	Cu	Fe	Mn	Zn	C	N	Valor S	Valor T	Valor V	
Substâncias > 5% no OE	triciclono	0,204	-0,280	0,248	0,058	-0,093	-0,188	0,748**	0,470	-0,127	-0,093	-0,018
	α -tujeno	0,213	-0,279	0,289	0,086	-0,079	-0,177	0,766**	0,502	-0,113	-0,109	0,036
	α -pineno	-0,746**	-0,372	0,797*	0,305	0,000	0,330	0,457	0,457	-0,028	-0,408	0,469
	sabineno	-0,604*	0,207	0,424	0,578*	0,279	0,114	-0,421	0,289	0,544	0,159	0,228
	β -pineno	-0,464	-0,017	0,635*	0,631*	0,584*	0,283	-0,094	0,719*	0,471	0,016	0,392
	mirceno	0,104	0,592*	-0,431	-0,316	-0,401	-0,455	-0,594	-0,421	-0,284	0,143	-0,559
	α -felandreno	0,544	0,055	-0,331	-0,177	0,132	-0,248	0,006	-0,323	-0,218	-0,190	0,198
	α -cubebeno	0,434	0,374	-0,382	0,049	-0,046	-0,312	-0,275	-0,249	-0,442	-0,230	-0,129
	β -longipineno	0,370	0,220	-0,412	0,085	-0,109	-0,492	-0,302	-0,152	-0,326	-0,170	-0,205
	γ -elemeno	0,600*	-0,135	-0,272	-0,027	-0,001	-0,427	0,215	-0,041	-0,241	-0,218	0,074
	γ -muuroleno	0,366	0,490	0,011	-0,401	-0,068	-0,172	-0,217	0,009	0,423	0,785**	-0,573
Classes químicas	germacreno D	-0,183	-0,292	-0,079	-0,006	-0,212	0,457	0,185	-0,363	-0,143	-0,159	0,058
	Monoterpenos não oxigenados	-0,661*	0,163	0,747*	0,362	0,117	-0,043	0,076	0,453	0,108	-0,221	0,399
	Monoterpenos oxigenados	0,431	0,251	-0,322	-0,270	-0,063	-0,018	-0,242	-0,235	0,387	0,716**	-0,547
	Sesquiterpenos não oxigenados	0,291	0,018	-0,499	-0,452	-0,411	0,137	-0,095	-0,590*	-0,238	0,193	-0,532
	Sesquiterpenos oxigenados	-0,183	-0,291	-0,067	-0,044	-0,189	0,529	0,222	-0,375	-0,114	-0,159	0,116
Diterpenos oxigenados	-0,030	-0,335	-0,256	-0,188	-0,168	0,405	0,052	-0,341	-0,253	-0,139	-0,092	
Rendimentos dos óleos (%)	-0,564	0,023	0,836**	0,791**	0,361	0,001	0,139	0,577*	0,346	-0,212	0,587*	

Legenda - *Significativo a $p < 0,05$ ** Significativo a $p < 0,01$; +OE – Óleo Essencial

Nas tabelas 23 e figura 60 estão dispostos os resultados referentes às análises de Pearson e a Análise de Correspondência Canônica (ACC), respectivamente, que correlacionam as classes químicas, rendimentos e as substâncias majoritárias presentes nos OE com os fatores ambientais (constituente de solo, precipitação, umidade e temperatura média) no estudo sazonal. ACC apresentou uma variância total de 80,8 (eixo 1 = 33,5; eixo 2 = 47,3).

As figuras 60 mostram nos três eixos de ordenação, as relações entre as variáveis ambientais representadas na forma de vetores, a variação anual das substâncias químicas individualmente por pontos triangulares e as variações no mês representados por pontos circulares.

Figura 60 - Diagrama de ordenação produzido pela análise de correspondência canônica relacionando a composição dos óleos essenciais e as variáveis ambientais do estudo sazonal de *Piper multinodum*.



Legenda: Da esquerda para direita = Jan– janeiro; Fev –fevereiro; Mar–março; Abr – abril; Mai –maio; Jun – junho; Jul – julho; Ago- agosto; Set – setembro; Out – outubro; Nov–novembro; Dez– dezembro; T(°C) – Temperatura, R (Kj.m⁻²) – Radiação, P (mm) – Precipitação, Al – alumínio, Ca – Cálcio, Mg – Manganésio, Na – Sódio, K – Potássio, P – Fósforo, Cu – Cobre, Fe – Ferro, Mn – Manganês, Zn – Zinco, C – Carbono, N – Nitrogênio, V-S - Valor S, V-T - Valor T, V-V - Valor V, MNO – Monoterpeno Não Oxigenado, MO – Monoterpeno Oxigenado, SNO – Sesquiterpenos Não Oxigenado, DNO – Diterpenos Não oxigenado, DO – Diterpenos Oxigenados.

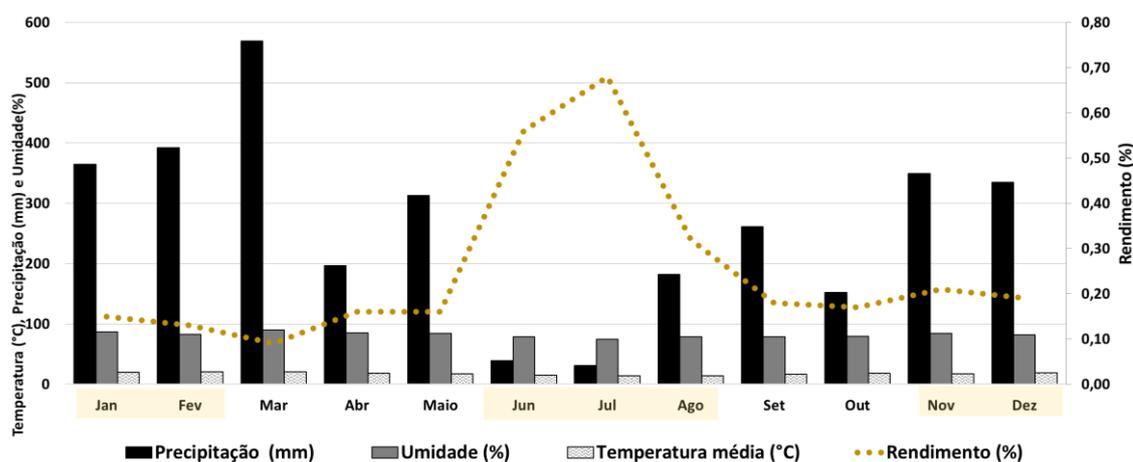
As variações dos rendimentos e as correlações com os fatores ambientais (precipitação, umidade e temperatura média) podem ser observados na figura 61.

Os rendimentos dos OEs das folhas de *P. multinodum* ao longo do ano apresentaram médias com diferenças significativas ($p=0,0006$) (Figura 61). Os maiores rendimentos (0,56, 0,68 e 0,32) foram nos meses mais secos (junho, julho e agosto). Pode-se observar que existe um incremento nos valores de rendimentos com surgimento do estado reprodutivo (Figura 61).

Os valores de rendimento apresentaram fortes correlações inversamente proporcionais significativos com umidade ($r^2=-0,744$; $p=0,006$), precipitação ($r^2=-0,793$; $p=0,002$) e temperatura ($r^2=-0,813$; $p=0,001$). Esses dados ainda tiveram correlações diretamente proporcional com os níveis no solo de cobre ($r^2=0,836$; $p=0,001$) e ferro ($r^2=0,791$; $p=0,002$).

Na ACC os dados de temperatura média e ferro melhor correlacionaram-se com os rendimentos. O sentido e direção para os autovetores precipitação (45°) e cobre (90°) no primeiro eixo de ordenação evidencia sua menor correlação (Figura 60).

Figura 61 – Comparações das variações dos rendimentos (%) de óleos essenciais de *Piper multinodum* silvestre e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média ($^\circ\text{C}$), no período de janeiro a dezembro de 2019.



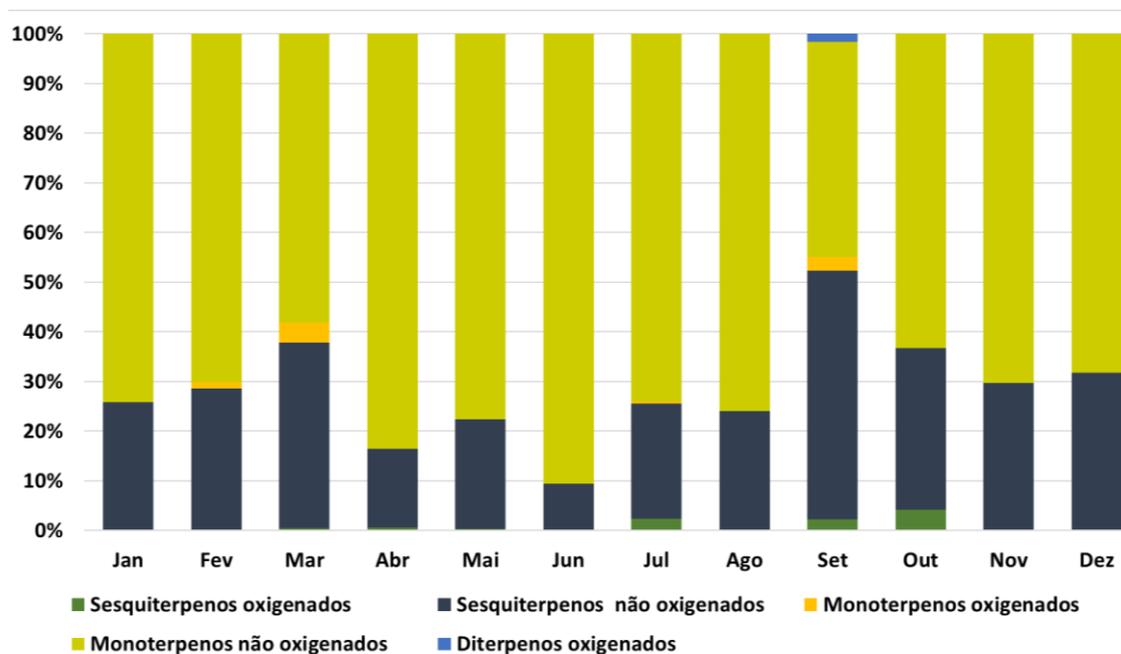
Legenda: Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul – julho; Ago-agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; #Área hachurada em amarelo representa os meses de ocorrência das fases reprodutivas.

Na figura 62 são apresentados os gráficos de variações em porcentagem das classes químicas identificadas nos óleos essenciais de *P. multinodum*. É demonstrado a existência de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (Tabela 23; Figura 63).

A porcentagem das classes químicas nos OEs do estudo sazonal de *P. multinodum* demonstrou uma composição rica em monoterpenos. Os monoterpenos não oxigenados ($p=0,00001$) e sesquiterpenos não oxigenados ($p=0,00002$) apresentaram médias com variação significativa ao longo do ano. No mês de setembro é possível encontrar maior teor percentual de sesquiterpenos (52,95%) e diterpenos (1,66%).

A figura 62 demonstrou que no período mais chuvosos os monoterpenos tendem a diminuir e os sesquiterpenos tendem a aumentar. No período mais seco foi possível encontrar os maiores teores percentuais de monoterpenos não oxigenados (64,08-72,07%). Foi registrado correlações inversamente proporcionais positivas e moderadas para precipitação ($r^2=-0,637$; $p=0,026$) e temperatura ($r^2=-0,636$; $p=0,027$) com os monoterpenos não oxigenados. Apesar de não apresentar correlação de Pearson com sesquiterpenos não oxigenados, no eixo 1 da ACC foi possível observar tendência de correlação com precipitação.

Figura 62 – Variações das classes químicas de óleos essenciais de *Piper multidonum* silvestre no período de janeiro a dezembro de 2019.



Legenda: Da esquerda para direita = Jan– janeiro; Fev –fevereiro; Mar–março; Abr – abril; Mai –maio; Jun – junho; Jul – julho; Ago- agosto; Set – setembro; Out – outubro; Nov–novembro; Dez– dezembro;

As figuras 63 apresentam as comparações das variações dos componentes majoritários dos OE de *P. multinodum* com à normal climatológica dos fatores ambientais.

No período de 12 meses foi possível observar a presença majoritariamente do α -pineno, no entanto, as médias apresentaram variação significativa ($p=0,0001$). Os maiores teores percentuais de α -pineno (32,80-40,44%) nas amostras foram observados nos meses com menor índice pluviométrico. Nos meses de abril a junho, após período mais chuvoso, foi possível observar o incremento de β -pineno (5,52-12,25%), no entanto, nesse mesmo período existe a diminuição dos teores percentuais de mirceno. Ressalta-se que os maiores teores de mirceno foram observados no período de maiores índices pluviométricos.

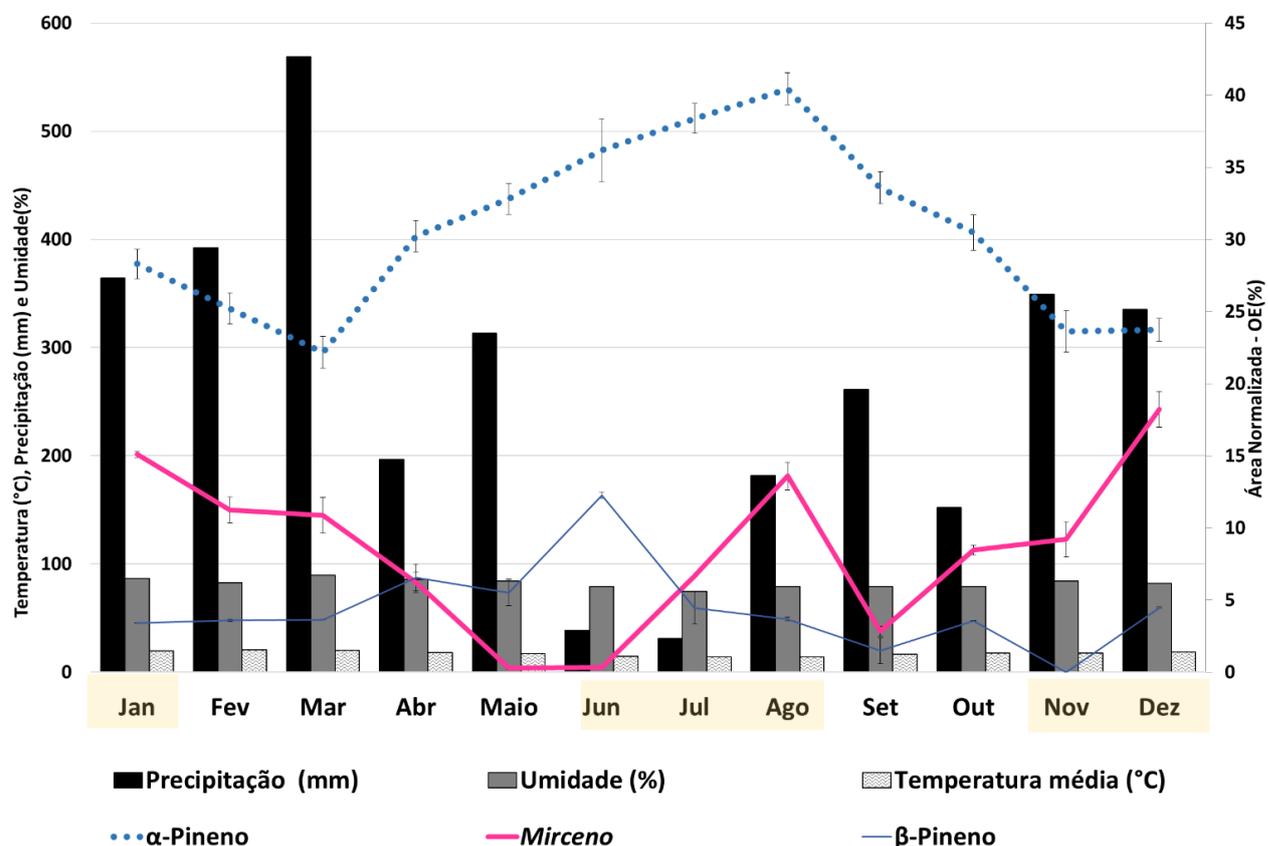
Foi demonstrado, através da análise de Pearson (Tabelas 24) e a ACC (Figura 60), correlações significativas, fortes e inversamente proporcionais com α -pineno e os fatores abióticos umidade ($r^2= -0,740$; $p=0,006$), precipitação ($r^2= -0,807$; $p=0,002$) e temperatura ($r^2= -0,880$; $p=0,001$).

Os aspectos do solo apresentaram correlações significativas com os constituintes majoritários. O pH apresentou correlação inversamente proporcionais com o α -pineno ($r= -0,807$; $p=0,002$) e β -pineno ($r= -0,807$; $p=0,002$). Os teores de Al ($r= -0,7628$; $p= 0,004$), K ($r=-0,746$; $p=0,005$) e Cu ($r= -0,796$; $p=0,002$) apresentaram correlação negativas significativas com o α -pineno. No entanto, essa substância na ACC (Figura 60) apresentou correlações com Al, Mn e outras variáveis ambientais (temperatura e umidade).

O monoterpene bicíclico não oxigenado β -pineno apresentou correlações diretamente proporcionais com os teores de Cu ($r^2= 0,635$; $p=0,026$), Fe ($r^2= 0,631$; $p=0,028$), Mn ($r^2= 0,584$; $p=0,04$) e N ($r^2= 0,719$; $p=0,008$). O monoterpene acíclico, mirceno apresentou correlação diretamente proporcional com os teores de P ($r^2= 0,592$; $p=0,043$) e inversamente com os de Ca ($r^2= -0,652$; $p=0,021$).

As figuras 64 A e B apresentam as análises de agrupamento hierárquico (dendrograma em A e gráfico de *two-way joining* em B) para as 12 amostras dos OEs de *P. multinodum*. No dendrograma (Figura 64A) as maiores distâncias Euclidianas foram definidas pelo gradiente de concentração de α -pineno em uma relação inversamente proporcional.

Figura 63 – Comparação das variações dos componentes majoritários nos óleos essenciais de *Piper multinodum* silvestre com à normal climatológica dos fatores ambientais precipitação (mm) e umidade (%), no período de janeiro a dezembro de 2019.



Legenda: #Áreas hachuradas em amarelo evidência o estado de fase reprodutiva. *Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Ago - agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro.

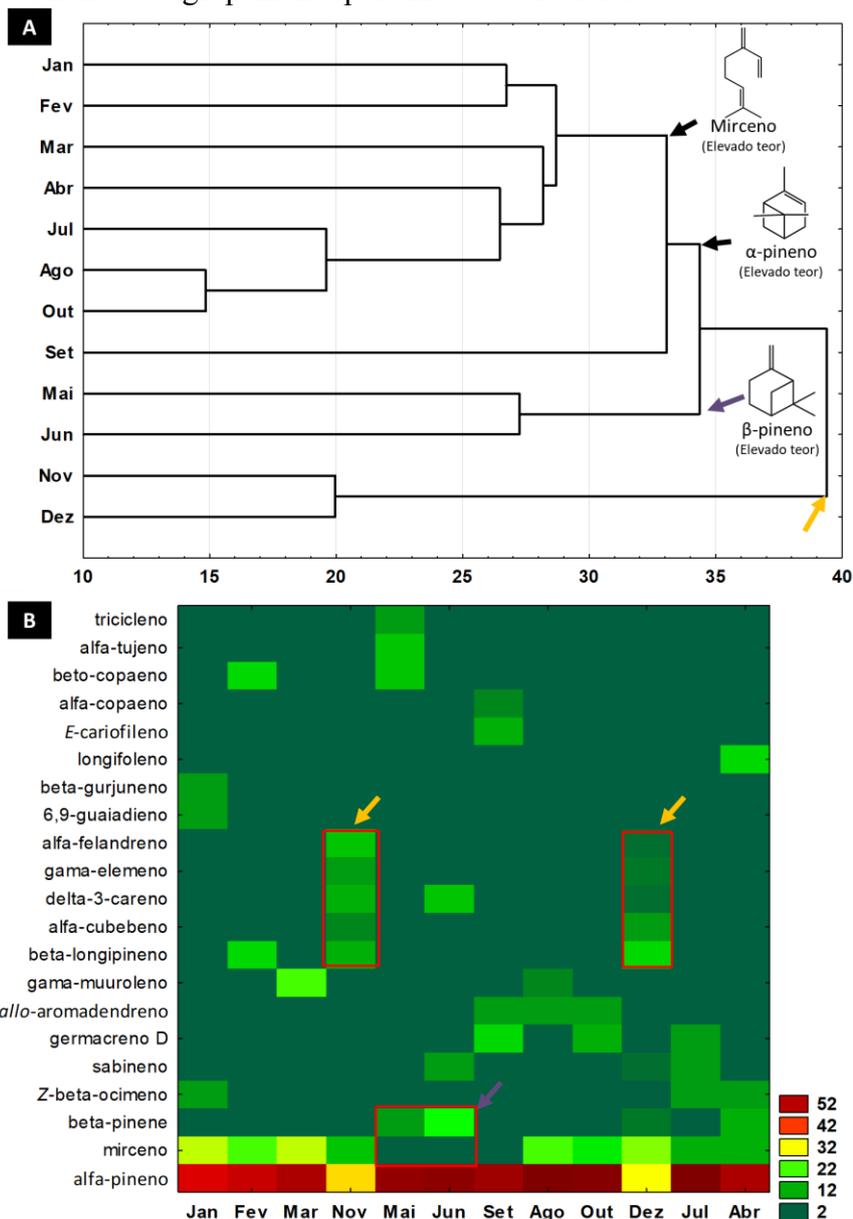
Para as amostras temos os grupos de UTO discriminados por meses de baixo para cima: **Grupo I** – Baixo teor em α -pineno: novembro e dezembro; **Grupo II**- Elevado teor β -pineno e α -pineno: maio e junho; **Grupo III** – Elevado teor de α -pineno: setembro; **Grupo IV** – Elevado teor de mirceno e α -pineno: janeiro, fevereiro, março, abril, julho, agosto e outubro.

No gráfico de *two-way joining* (Figura 64B) as amostras sinalizadas com setas amarelas correspondem ao grupo I (novembro e dezembro), sendo essas caracterizadas pelos altos teores de sesquiterpenos.

Na figura 65 são apresentadas as ACP para as amostras de OEs do estudo sazonal. A análise apresentou a variância total de 89,92% tendo no primeiro componente de 83,67% e o

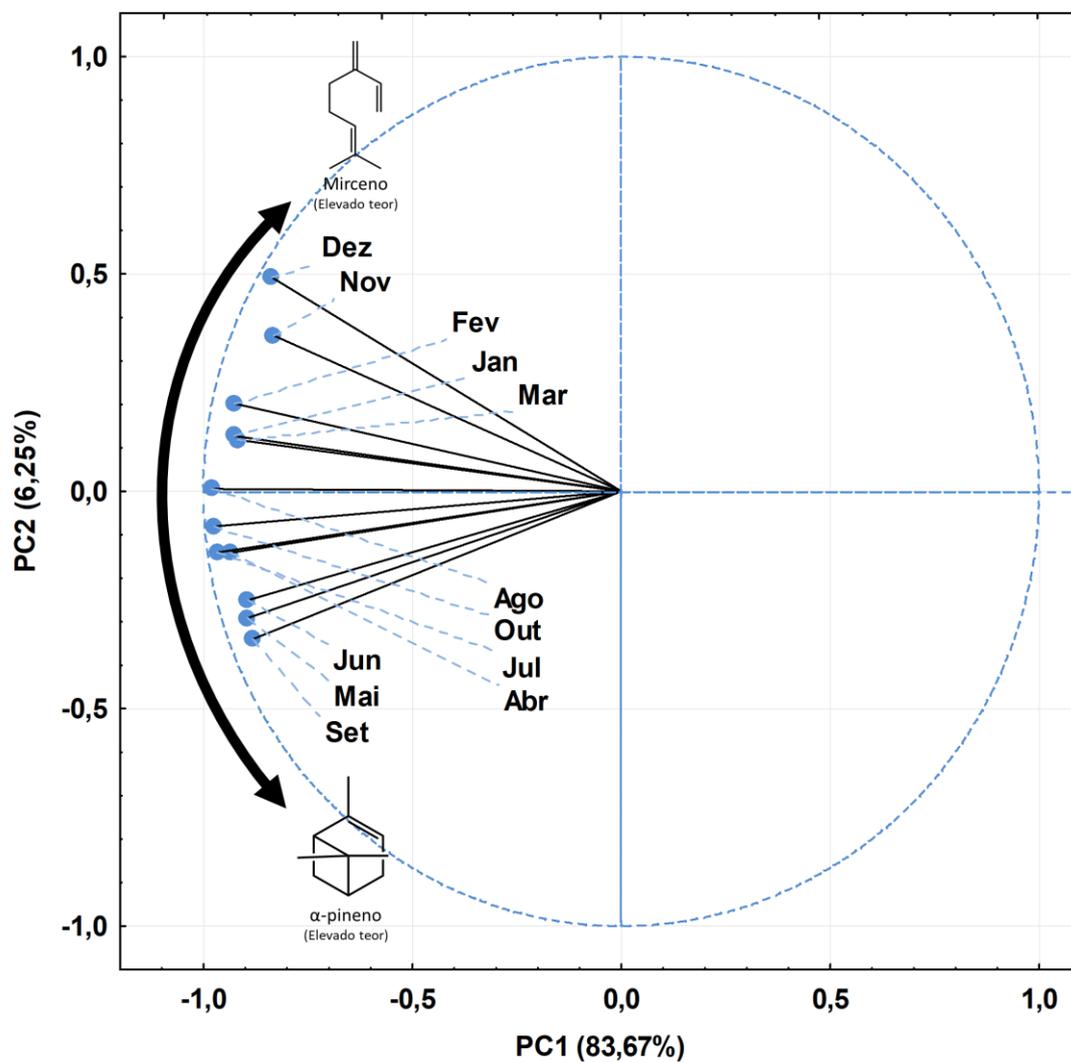
segundo componente de 6,25% da variação das amostras. Pela alta variância do primeiro componente é insuficiente para justificar a separação das amostras entre os meses. No entanto, essa variação poderá ser obtida pelas cargas positiva de mirceno (+2,62) e negativa de α -pineno (-0,77) no PC2.

Figura 64 – Dendrograma e gráfico de *two-way joining* de 12 amostras de óleos essenciais de *Piper multinodum* silvestre, de janeiro de 2019 a dezembro 2019, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.



Legenda: *O programa não suporta o uso de símbolos. Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Agos- agosto; Set-setembro; Out-outubro; Dez-dezembro; Dendrograma (A) e gráfico de *two-way joining* (B); #As setas demonstram semelhanças entre as amostras.

Figura 65 - Gráfico *Biplot* (ACP) resultante da análise da composição dos óleos essenciais de *Piper multinodum* silvestre, coletadas de janeiro a dezembro de 2019.



4.4.3 Composição química dos óleos essenciais do estudo circadiano de *P. multidonum* silvestre

A avaliação das alterações químicas na composição química do óleo essencial de *P. multinodum* ao longo de 24 h foi realizada nos meses de fevereiro de 2020 (chuvoso) e de julho de 2021 (seco). Os óleos essenciais obtidos apresentaram coloração levemente amarelada para todas as 16 coletas realizadas. As composições químicas, esqueletos, índices de retenção calculados e da literatura e suas porcentagens estão apresentados na tabela 25 para o mês de fevereiro de 2020 e tabela 26 para o mês julho de 2021.

O estudo circadiano foi possível identificar 109 substâncias diferentes, variando entre 12 a 72 nos OE analisados. No mês de fevereiro de 2020 foi possível 80 substâncias, variando entre 12 a 72. O total de substâncias identificadas ficou acima de 92% (92,34 a 99,56%). Os rendimentos variaram entre 0,08 a 0,36%. Nesse mês, o espécime apresentava-se na fase vegetativa, com composição rica em monoterpenos não oxigenados: α -pineno (12,82 a 64,46%), mirceno (6,63% a 13,08%) e o sesquiterpeno não oxigenado germacreno D (4,84 a 11,10%) (Tabela 25).

No mês de julho de 2021, a espécie apresentava-se na fase reprodutiva, neste foi possível identificar uma variação na quantidade de substância (63-47), nos OE analisados. O total de substâncias identificadas ficou acima de 90 % (90,63 - 97,17%). Os rendimentos variaram entre 0,95 a 3,25 %. O espécime apresentou-se em fase reprodutiva durante o estudo, com composição rica em monoterpenos não oxigenados: α -pineno (20,81 a 42,41%) e β -pineno (5,30 a 11,78%) (Tabela 26).

Tabela 25 - Constituição química, Rendimento (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas de *Piper multidonum* no ciclo circadiano (fevereiro de 2020).

C-Esqueleto	Substâncias ^a	IR calc	IRlit	Área relativa (%) ± DP							
				Estação Chuvosa (fevereiro de 2020)							
				00:00h	03:00h	06:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h
Canfeno	triciclano	922	921	0,29±0,01	0,27±0,03	0,11±0,01	0,13±0,02	0,20±0,02	0,15±0,04		0,24±0,05
Tujano	α-tujeno	923	924	0,62±0,05	0,53±0,03	0,24±0,04	0,19±0,03	0,36±0,04	0,23±0,08	1,03±0,02	0,41±0,03
Pinano	α-pineno	930	932	12,82±1,2	16,87±0,89	31,46±3,21	29,49±0,12	33,53±3,09	41,97±3,09	64,46±4,31	25,46±1,45
Canfeno	canfeno	943	946	0,68±0,02	0,82±0,08	0,70±0,02	0,83±0,03	0,70±0,04	0,78±0,03		0,53±0,09
Tujano	sabineno	968	969	3,48±0,09	2,74±0,10	5,86±0,19	3,69±0,05	3,05±0,02	4,05±0,08	3,06±0,12	2,68±0,07
Pinano	β-pineno	975	974	3,59±0,20	4,24±0,08	4,9±0,32	5,38±0,08	4,28±0,03	4,97±0,39		3,47±0,43
Mircano	mirceno	989	988	9,13±0,89	9,88±0,74	7,91±0,13	6,65±0,54	12,54±0,32	8,83±0,56	5,55±0,11	13,08±0,12
Mentano	α-felandreno	1005	1002	1,07±0,23	1,04±0,09	0,62±0,03	0,59±0,02	0,80±0,04	0,59±0,02		0,72±0,04
Mentano	α-terpineno	1020	1014	0,05±0,01	0,05±0,02	0,05±0,01		0,03±0,02			0,21±0,07
Mentano	o-cimeno	1022	1022	0,27±0,04	0,30±0,02	0,15±0,03	0,19±0,02	0,19±0,03	0,18±0,06		
Mentano	limoneno	1027	1024		1,46±0,04	0,87±0,43	0,98±0,92	1,08±0,07	0,93±0,05		1,04±0,03
Mentano	β-felandreno	1029	1025	3,77±0,76	2,19±0,04	1,18±0,04	1,15±0,05	1,82±0,02	1,27±0,08		1,84±0,03
Mircano	Z-β-ocimeno	1032	1032	4,81±0,32	5,56±0,89	5,21±0,04	4,67±0,32	4,34±0,76	4,16±0,09		4,04±0,89
Mircano	E-β-ocimeno	1044	1044	2,44±0,07	2,77±0,13	2,31±0,54	2,19±0,03	2,04±0,04	2,02±0,03		1,79±0,22
Mentano	γ-terpineno	1055	1054	0,10±0,00	0,09±0,04	0,10±0,03		0,06±0,01	0,09±0,01		0,94±0,05
Mentano	terpinoleno	1085	1086	0,08±0,00	0,08±0,01	0,30±0,04	0,07±0,03	0,04±0,00			
Mircano	dehidro-linalool	1087	1088	1,28±0,21	0,64±0,04		0,56±0,02	0,73±0,03	0,59±0,05		
Mentano	perileno	1090	1102	5,33±0,85	3,27±0,32	1,64±0,07	2,25±0,56	3,20±0,03	2,47±0,03		4,42±0,06
Mircano	linalool	1094	1095	0,11±0,00	0,22±0,03	0,16±0,02	0,17±0,03	0,17±0,00			
Mircano	allo-ocimeno	1129	1128	0,67±0,01	0,74±0,05	0,46±0,03	0,44±0,00	0,36±0,00	0,30±0,01	0,29±0,01	0,34±0,03

Mentano	<i>p</i> -Z-menta-2,8-dien-1-ol	1133	1133	0,06±0,03								
Mentano	<i>E</i> -dihidro-β-terpineol	1134	1134		0,04±0,01	0,30±0,02	0,08±0,00					
Mircano	<i>neo-allo</i> -ocimeno	1140	1140		0,05±0,03							
Canfeno	formato de isobornila	1235	1235	0,15±0,03	0,19±0,04			0,12±0,03	0,08±0,01			0,10±0,03
Tujano	acetato de <i>neois</i> -3-tujanol	1280	1281		0,06±0,01			0,02±0,00	0,27±0,03			
Elemo	bicicloelemeno	1330	1335	0,10±0,01	0,44±0,04	0,33±0,03	0,44±0,04	0,31±0,00	0,09±0,00			0,46±0,03
Elemo	δ-elemeno	1337	1335					0,19±0,01				
Cubebano	α-cubebeno	1348	1348	0,10±0,02	0,04±0,03	0,06±0,00	0,22±0,00	0,04±0,00				
Copaano	α-copaeno	1375	1374	2,11±0,05	0,38±0,02	2,25±0,03	2,44±0,00	1,63±0,09	1,61±0,08	4,17±0,05		1,58±0,04
Bourbonano	β-bourboneno	1387	1387	3,27±0,64	4,44±0,05	2,17±0,00	3,26±0,00	1,83±0,08	1,95±0,07	3,15±0,07		2,95±0,43
Elemo	β-elemeno	1388	1389	0,55±0,00	0,55±0,07	0,37±0,00	0,48±0,00	0,4±0,00	0,37±0,00			0,35±0,00
Alkylbenzene (C3-C6)	metil eugenol	1402	1403	0,13±0,00								
Aromadendrano	α-gurjuneno	1410	1409	0,18±0,01	0,11±0,02	0,09±0,00	0,10±0,01	0,06±0,04	0,07±0,00			0,17±0,00
Cariofilano	<i>E</i> -cariofileno	1420	1417	4,36±0,12	5,82±0,98	2,80±0,56	3,57±0,09	2,39±0,09	2,27±0,54	2,98±0,07		3,64±0,43
Copaano	β-copaeno	1430	1430	0,65±0,02	0,89±0,07	0,43±0,07	0,52±0,04	0,35±0,02	0,31±0,00			0,54±0,03
Aromadendrano	β-gurjuneno	1432	1431	0,37±0,02	0,52±0,04	0,22±0,00	0,52±0,03	0,20±0,02	0,19±0,00			0,32±0,00
Elemo	γ-elemeno	1433	1434	0,13±0,01	0,80±0,07	0,99±0,05	1,07±0,02	1,25±0,04	1,21±0,43	2,87±0,05		1,32±0,07
Aromadendrano	aromadendreno	1438	1439	5,14±0,98	4,46±0,76	3,65±0,78	4,72±0,07	3,44±0,32	3,50±0,32	4,31±0,19		5,48±0,21
Guaiano	6,9-guaiadieno	1447	1442		0,41±0,00	0,21±0,00	0,27±0,00	0,18±0,00	0,19±0,00			0,30±0,06
Cadinano	<i>E</i> -cadina-1(6),4-dieno	1465	1475	0,34±0,05								
Cadinano	γ-muurolo	1479	1478	0,27±0,04								
Germacrano	germacreno D	1480	1480	8,95±1,23	11,10±0,32	6,87±0,76	7,10±0,19	5,49±0,32	4,84±0,13	5,38±0,43		8,56±0,78
Eudesmano	β-selineno	1488	1489	0,09±0,03	0,17±0,05	0,16±0,02	0,21±0,00	0,22±0,00	0,22±0,00			0,21±0,00

Eudesmano	α -selineno	1496	1498		0,09±0,04	0,08±0,04	0,11±0,00	0,07±0,00			
Biciclogermacrano	biciclogermacreno	1498	1500	2,81±0,04	1,98±0,34	1,79±0,08	2,08±0,05	1,84±0,02	1,63±0,02		2,70±0,53
Cadinano	α -muuroleno	1500	1500	0,22±0,04	0,25±0,07	0,14±0,00	0,19±0,00	0,14±0,00	0,13±0,00		0,20±0,00
Farnesano	<i>E,E</i> - α -farneseno	1504	1505	0,12±0,02	0,12±0,00	0,06±0,00	0,08±0,00	0,50±0,00	0,07±0,00		0,14±0,00
Bisabolano	β -bisaboleno	1506	1505	0,19±0,02	0,15±0,00		0,07±0,00	0,06±0,00			
Cadinano	δ -amorfenol	1511	1511		0,15±0,00	0,15±0,00	0,10±0,00	0,15±0,00	0,05±0,00		0,11±0,00
Cadinano	γ -cadineno	1512	1513	0,13±0,03	0,16±0,00	0,16±0,00	0,22±0,00	0,16±0,00	0,13±0,00		0,19±0,00
Cadinano	cubebol	1514	1514	0,25±0,03							
Cadinano	δ -cadineno	1520	1522	2,16±0,08	0,72±0,43	2,06±0,09	2,26±0,04	1,74±0,07	1,55±0,04	2,04±0,08	1,78±0,00
Cadinano	<i>E</i> -cadinina-1,4-dieno	1531	1533		0,10±0,03			0,06±0,00			
Cadinano	α -cadineno	1538	1537		0,02±0,01						
Cadinano	α -calacoreno	1543	1544		0,11±0,00		0,07±0,00				
Eudesmano	selina-3,7(11)-dieno	1544	1545	0,09±0,03	0,04±0,01						
Elemo	elemol	1546	1548	0,16±0,01	0,20±0,04		0,11±0,00	0,09±0,00			
Germacrano	germacreno B	1558	1559	0,15±0,03	0,19±0,03		0,04±0,00	0,06±0,00			
Farnesano	<i>E</i> -nerolidol	1559	1561	3,38±0,43	2,25±0,43	5,33±0,29	1,52±0,09	0,89±0,09	0,64±0,00		1,61±0,11
Farnesano	butanoato de geranila	1560	1562		0,08±0,01						
Aromadendrano	palustrol	1565	1567	0,12±0,02	0,08±0,00	0,10±0,00	0,07±0,00	0,09±0,00	0,09±0,00		
Aromadendrano	espatulenol	1576	1577	1,46±0,04	1,29±0,32	0,87±0,00	1,17±0,06	1,10±0,08	0,93±0,01		1,18±0,00
Cariofilano	óxido de cariofileno	1581	1582	0,35±0,02	0,69±0,09	0,23±0,00	0,39±0,00	0,25±0,00	0,31±0,02		0,31±0,00
Copaano	β -copaen-4- α -ol	1589	1590	0,14±0,04	0,23±0,04	0,09±0,00	0,15±0,00	0,16±0,00	0,13±0,00		0,15±0,00
Aromadendrano	viridiflorol	1592	1592	0,62±0,02	0,56±0,00	0,40±0,03	0,49±0,02	0,43±0,03	0,37±0,02		0,54±0,00
Guaiano	guaiol	1600	1600		0,11±0,00	0,09±0,00	0,14±0,00	0,13±0,00	0,11±0,00		0,13±0,00
Elemo	<i>E</i> - β -elemenona	1601	1601		0,22±0,06	0,13±0,00	0,12±0,00	0,09±0,00	0,06±0,00		
Aromadendrano	ledol	1602	1602				0,13±0,00		0,15±0,02		
Bisabolano	β -atlantol	1606	1608		0,18±0,02	0,11±0,00	0,13±0,00	0,16±0,00	0,09±0,03		

Cadinano	muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1623	1630		0,11±0,00			0,12±0,00				
Cadinano	<i>epi</i> -α-muurolol	1643	1640		0,34±0,02	1,32±0,04	1,92±0,05	1,43±0,02	1,27±0,04	1,52±0,21		
Cadinano	α-muurolol	1645	1644		0,17±0,01	0,09±0,00	0,15±0,00	0,12±0,00	0,21±0,00	0,13±0,00		
Cadinano	α-cadinol	1653	1652	0,58±0,02	0,61±0,09	0,61±0,00	0,35±0,00	0,29±0,00		0,35±0,00		
Aromadendrano	valerianol	1661	1659		0,28±0,06	0,11±0,00	0,19±0,00	0,15±0,00	0,12±0,00	0,37±0,00		
Eudesmano	eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	1685	1687		1,07±0,02	0,30±0,00	0,50±0,07	0,03±0,00	0,24±0,00			
Cadinano	14-hidroxi-α-muuroleno	1778	1779				0,15±0,02	0,10±0,02				
Eudesmano	eudesm-11-en-4-α,6-α-diol	1807	1808				0,09±0,00	0,10±0,01				
Farnesano	<i>2E,6E</i> -ácido de farnesóico	1815	1816		0,23±0,02		0,07±0,01	0,07±0,00		0,17±0,00		
Farnesano	<i>2E,6E</i> -acetato de farnesila	1820	1821	0,96±0,09	0,72±0,04	0,30±0,00	0,51±0,02	0,42±0,04	0,21±0,00	0,39±0,00		
Fitano	fitol	1945	1942	0,91±0,01	0,50±0,03	0,09±0,00	0,30±0,03		0,16±0,01	0,26±0,00		
Monoterpenos não oxigenados					49,20	52,95	64,07	58,89	68,62	72,99	75,10	61,21
Monoterpenos oxigenados					1,60	1,15	0,46	0,81	1,04	0,94	0,00	0,10
Sesquiterpenos não oxigenados					32,48	34,52	25,27	30,41	22,94	20,54	24,90	31,25
Sesquiterpenos oxigenados					8,02	9,42	10,08	8,35	6,22	4,93	0,00	6,85
Diterpenos oxigenados					0,91	0,50	0,09	0,30	0,00	0,16	0,00	0,26
Arilpropanoides					0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Número de substâncias identificadas					56	72	58	65	68	55	12	50
Total de substâncias quantificadas no óleo essencial (%)					92,34	98,54	99,97	98,76	98,82	99,56	99,00	99,67
Rendimento de OE (%)					0,18	0,22	0,25	0,23	0,36	0,13	0,08	0,09
IE_{OR}^a					-2,64	-2,19	-2,76	-2,43	-2,32	-2,90	-5,28	-3,19

Legenda: IR_{cal} = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IR_{lit} = índice de retenção da literatura (Adams, 2007; 2017); Principais constituintes em negrito. DP = desvio-padrão. ^aTodas as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. ^bÍndice Ecológico de Oxi-redução. OE – Óleo essencial; tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%).

Tabela 26 - Constituição química, Rendimento (%), Esqueleto de Carbonos (Esqueleto – C), Índice Ecológico de Oxi-redução dos óleos essenciais das folhas de *Piper multidonum* no ciclo circadiano (julho de 2021).

C-Esqueleto	Substâncias	IR calc	IRlit	Área relativa (%) ± DP							
				Estação Seca (Julho de 2021)							
				00:00h	03:00h	06:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h
Tujano	α -tujeno	923	924	1,25±0,02	0,22±0,03	0,20±0,03	0,23±0,04	0,21±0,05	0,21±0,06		0,19±0,02
Pinano	α-pineno	930	932	27,24±2,32	35,82±1,27	35,23±1,03	27,99±2,54	20,81±0,09	37,72±0,23	21,48±0,43	42,41±1,09
Tujano	sabineno	968	969	2,80±0,07	3,13±0,04	2,70±0,09	3,04±0,05	3,15±0,08	2,94±0,09	2,82±0,08	3,36±0,09
Pinano	β-pineno	976	974	9,23±0,32	11,78±1,21	10,59±1,02	10,97±1,13	5,53±0,98	11,08±0,16	5,30±0,47	8,92±0,05
Mentano	α -felandreno	1005	1002	3,91±0,05	3,44±0,54	3,45±0,00	3,71±0,09	3,10±0,05	3,39±0,07	2,90±0,31	3,25±0,32
Carano	δ -3-careno	1008	1008				0,23±0,01				
Mircano	Z- β -ocimeno	1032	1032	1,75±0,08	1,45±0,32	1,81±0,04	2,50±0,08	1,46±0,56	1,89±0,07	1,69±0,04	1,79±0,01
Mentano	terpinoleno	1085	1086					0,10±0,01			
Mircano	dehidro-linalool	1087	1088	1,67±0,05	1,01±0,03	0,96±0,03	0,50±0,00	1,04±0,04	1,02±0,05	1,06±0,02	0,40±0,02
Mircano	linalool	1094	1095			0,43±0,07	0,23±0,00				0,26±0,02
Mentano	perileno	1099	1102	4,26±0,65	3,72±0,17	2,95±0,12	2,37±0,04	3,03±0,01	3,14±0,04	2,74±0,05	2,03±0,09
Mircano	<i>allo</i> -ocimeno	1129	1128	4,17±0,89	2,72±0,00	3,30±0,00	4,75±0,32	3,69±0,09	3,56±0,74	3,11±0,06	4,39±0,21
Mentano	<i>p-Z</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1133	1133					0,02±0,00		0,26±0,02	0,10±0,00
Mircano	<i>neo-allo</i> -ocimeno	1140	1140				0,21±0,02	0,09±0,01	0,12±0,00	0,09±0,00	0,15±0,02
Mentano	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8ol	1166	1166	0,11±0,00		0,11±0,02	0,05±0,01	0,04±0,00			
Mentano	terpinen-4-ol	1174	1174	0,08±0,00				0,03±0,00			
Mentano	<i>p-E</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	1189	1189					0,08±0,02			
Mircano	linalool formate	1214	1214					0,05±0,00			

Mentano	<i>Z-p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	1227	1227									0,02±0,00
Canfeno	formoato de isobornila	1235	1235									0,12±0,02
Tujano	acetato de <i>iso</i> -3-tujanol	1267	1267									0,02±0,00
Tujano	acetato de <i>neoiso</i> -3-tujanol	1278	1281	0,06±0,03	0,14±0,04	0,16±0,02	0,07±0,03					
Pinano	<i>Z</i> -acetato de verbenila	1280	1280	0,08±0,02								0,04±0,04
Canfeno	acetato de isobornila	1287	1283	0,07±0,02								
Elemeno	bicicloelemeno	1318	1335	1,66±0,02	1,15±0,03	1,30±0,03	1,16±0,03	1,51±0,06	0,94±0,00	1,25±0,05	1,20±0,02	
Elemeno	δ -elemeno	1335	1335					0,58±0,04	0,20±0,05	0,15±0,00		
Cubebano	α -cubebeno	1348	1348				0,23±0,02	0,23±0,03	0,10±0,02			0,15±0,02
Copaano	ylangene	1372	1373				0,07±0,00	0,06±0,01				
Copaano	α -copaeno	1375	1374	0,49±0,08	0,37±0,02	0,20±0,01						
Cubebano	β -cubebeno	1384	1387	2,01±0,21	2,60±0,23	2,66±0,09	2,99±0,02	1,11±0,02	1,04±0,06	1,96±0,05	1,48±0,09	
Bourbonano	β -bourboneno	1387	1387	1,96±0,45			1,87±0,00	2,76±0,54	1,50±0,45	2,33±0,09	1,56±0,06	
Elemeno	β -elemeno	1388	1389	1,35±0,32	1,02±0,08	0,94±0,05	1,24±0,07	1,58±0,04	1,32±0,09	2,03±0,05	1,02±0,02	
Himalachane	β -longipineno	1398	1400				0,13±0,02		0,06±0,00			0,10±0,00
Alkylbenzene (C3-C6)	metil eugenol	1402	1403	0,06±0,00	0,10±0,00		0,03±0,00	0,13±0,01	0,05±0,03	0,10±0,02	0,06±0,01	
Aromadendrano	α -gurjuneno	1410	1409		0,10±0,00	0,15±0,00		0,19±0,02	0,08±0,04	0,12±0,02		
Cariofilano	<i>e</i> -cariofileno	1420	1417					5,78±0,45	3,86±0,45	4,57±0,67	4,38±0,56	
Copaano	β -copaeno	1430	1430	0,18±0,00								
Aromadendrano	β -gurjuneno	1432	1431	4,36±1,21	4,66±0,23	4,85±0,03	4,52±0,04	2,22±0,06	0,92±0,05	1,48±0,04	1,29±0,03	
Elemeno	γ -elemeno	1433	1434					0,14±0,00				
Guaiano	α -guaieno	1436	1437					1,07±0,02				

Aromadendrano	aromadendreno	1438	1439	1,33±0,02	1,55±0,01	1,46±0,04	1,42±0,05	2,05±0,07	0,41±0,04		
Guaiano	6,9-guaiadieno	1442	1442	0,05±0,00			0,09±0,00		0,08±0,00		0,59±0,04
Cadinano	Z-muurola-3,5-dieno	1448	1448	0,68±0,00	0,77±0,07	0,81±0,07	0,74±0,04		0,70±0,03	0,09±0,01	0,08±0,01
Cadinano	E-muurola-3,5-dieno	1451	1451		1,50±0,56	0,91±0,32	0,97±0,12			0,71±0,04	0,61±0,04
Humulano	α-humuleno	1453	1452	2,40±0,21	1,44±0,09	1,32±0,06	1,87±0,02	1,95±0,05	1,19±0,03	1,78±0,09	1,32±0,06
Aromadendrano	allo-aromadendreno	1459	1458	3,63±0,42	4,64±0,13	5,77±0,43	4,01±0,98	2,89±0,21	3,54±0,45	3,66±0,08	3,90±0,08
Cadinano	E-cadina-1(6),4-dieno	1465	1475	0,34±0,04	0,30±0,02	0,27±0,00	0,25±0,00	0,43±0,04	0,18±0,02	0,37±0,05	0,22±0,03
Cadinano	γ-muuroloeno	1479	1478	0,49±0,02	0,52±0,05	0,74±0,00	0,79±0,00	0,74±0,07	0,72±0,08	0,90±0,06	0,49±0,02
Germacrano	germacreno D	1480	1480	1,23±0,08	1,43±0,03	1,22±0,04	1,43±0,05	2,34±0,04	0,83±0,07	2,08±0,08	1,24±0,04
Eudesmano	β-selineno	1488	1489	0,60±0,03	0,35±0,01	0,33±0,04	0,53±0,04	1,12±0,09	0,69±0,07	1,01±0,02	0,27±0,06
Cadinano	γ-amorfeno	1491	1495	0,20±0,03	0,23±0,02	0,40±0,06			1,12±0,34	1,33±0,03	
Bisabolano	zingibereno	1493	1493				0,98±0,04	3,34±0,09	2,18±0,07	4,63±0,45	
Eudesmano	α-selineno	1496	1498	1,82±0,32							0,22±0,02
Biciclogermacrano	biciclogermacreno	1498	1500	0,59±0,04	1,15±0,05	1,01±0,07	1,24±0,09			2,62±0,23	1,05±0,04
Cadinano	α-muuroloeno	1500	1500		0,58±0,04	0,75±0,04	0,74±0,05		0,29±0,02		0,53±0,03
Farnesano	E,E-α-farneseno	1504	1505		0,26±0,04	0,23±0,01	0,29±0,06				0,28±0,02
Bisabolano	β-bisaboleno	1506	1505		0,16±0,02		0,29±0,03	0,45±0,01	0,34±0,06		0,08±0,01
Cadinano	δ-amorfeno	1511	1511								0,19±0,02
Cadinano	γ-cadineno	1512	1513	0,15±0,04	0,19±0,03		0,11±0,03	0,49±0,04	0,21±0,03		0,12±0,01
Cadinano	cubebol	1514	1514	0,18±0,02	0,13±0,03				0,12±0,02	1,37±0,04	
Cadinano	δ-cadineno	1520	1522	1,87±0,43	0,70±0,08	2,87±0,03	3,04±0,18	1,33±0,22	1,37±0,12	2,15±0,13	1,74±0,08
-	não identificado (m/z 204)	1528	-	0,12±0,03			0,14±0,01		0,64±0,04		0,13±0,09
Cadinano	E-cadina-1,4-dieno	1531	1533	0,10±0,04			0,12±0,02	0,49±0,02	0,08±0,02	0,14±0,04	0,08±0,03

-	não identificado (<i>m/z</i> 204)	1535	-							1,05±0,04	
Cadinano	α -cadineno	1538	1537	0,06±0,01		0,10±0,03	0,23±0,03	0,13±0,01	0,09±0,01	0,26±0,02	0,06±0,03
Cadinano	α -calacoreno	1543	1544	0,08±0,02	0,07±0,00	0,18±0,04					0,09±0,00
Eudesmano	selina-3,7(11)- dieno	1544	1545	0,18±0,03	0,41±0,01			0,20±0,02	0,16±0,02	1,94±0,09	0,31±0,04
Farnesano	<i>E</i> -nerolidol	1559	1561	3,66±0,07	3,28±0,09	1,18±0,09	1,03±0,07	4,86±0,43	2,03±0,32	1,48±0,09	0,91±0,05
Farnesano	butanoato de geranila	1560	1562	0,18±0,01	0,26±0,04	0,22±0,06	0,78±0,06		0,18±0,00	0,12±0,00	0,21±0,00
-	não identificado (<i>m/z</i> 222)	1569	-	0,11±0,06			0,26±0,00	0,26±0,00			
Aromadendrano	espatulenol	1576	1577	1,38±0,04	0,84±0,02	0,80±0,03		1,44±0,27	0,68±0,09	1,26±0,03	0,77±0,43
Cariofilano	óxido de cariofileno	1581	1582		0,18±0,03		0,22±0,02	0,35±0,03	0,24±0,00	0,46±0,02	0,16±0,00
Copaano	β -copaen-4- α -ol	1589	1590	0,24±0,03	0,25±0,00	0,13±0,01			0,23±0,02	0,35±0,00	0,15±0,02
Aromadendrano	viridiflorol	1592	1592					0,23±0,07		0,29±0,09	0,11±0,04
Guaiano	guaiol	1600	1600		0,33±0,03						
Elemeno	<i>E</i> - β -elemenona	1601	1601	0,10±0,01			0,21±0,06	0,23±0,03	0,44±0,03		
Aromadendrano	ledol	1602	1602	0,07±0,00	0,46±0,00	0,19±0,02		0,56±0,08		0,61±0,43	0,44±0,04
Bisabolano	β -atlantol	1606	1608		0,26±0,03			0,36±0,05	0,07±0,03	0,11±0,07	
Cadinano	muurolo-4,10(14)- dien-1- β -ol	1623	1630	0,33±0,03	0,12±0,43	0,21±0,06					
Eudesmano	γ -Eudesmol	1628	1630					0,54±0,08		2,58±0,02	
Cadinano	<i>Z</i> -cadin-4-em-7-ol	1634	1635	0,23±0,06	0,17±0,03		0,08±0,05			0,23±0,04	
Cariofilano	cariofila- 4(12),8(13)-dien- 5 β -ol	1637	1639	0,08±0,00			2,33±0,06	0,17±0,03		0,23±0,04	
Acorane	α -acorenol	1638	1632		0,26±0,04	0,10±0,04		0,26±0,03		0,34±0,01	
Cadinano	<i>epi</i> - α -murolol	1643	1640	1,93±0,07	0,36±0,04	1,98±0,09			0,96±0,04	2,68±0,08	1,59±0,01
Cadinano	α -murolol	1646	1644	0,06±0,00	0,17±0,00		0,46±0,00	0,30±0,00	0,22±0,03	1,34±0,09	

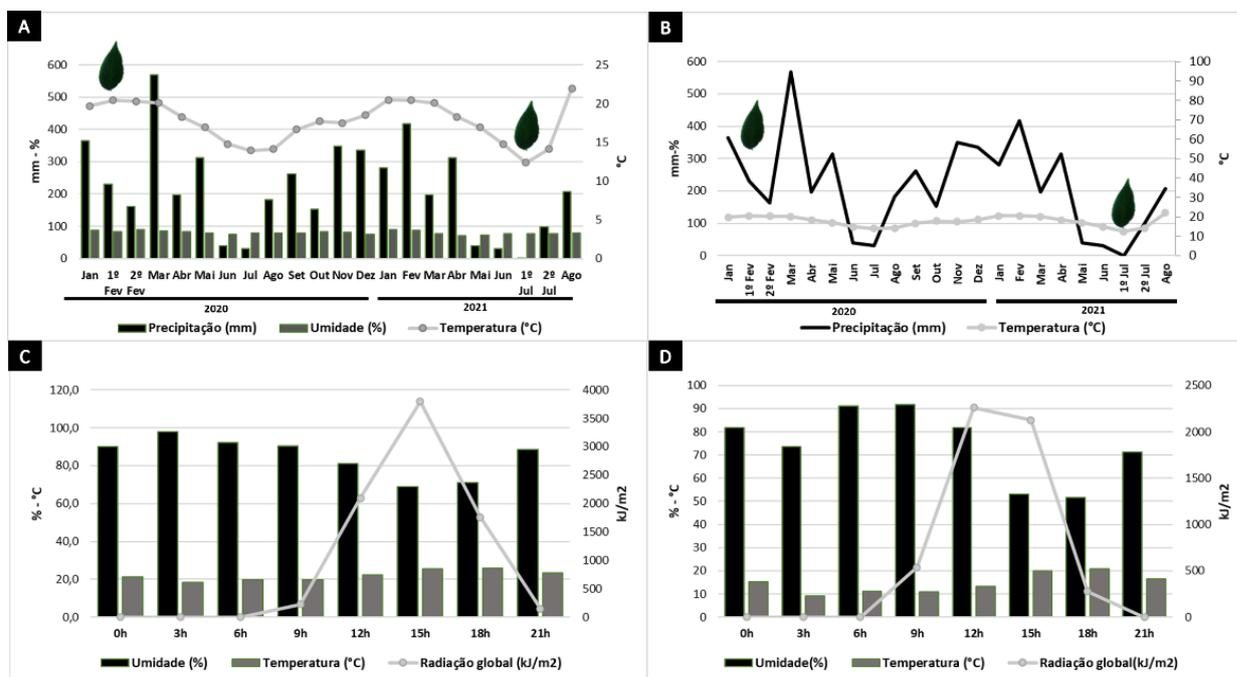
Cadinano	α -cadinol	1655	1652	0,55±0,04	0,43±0,02	0,36±0,06		1,31±0,05	0,40±0,05	0,69±0,06	
Aromadendrano	valerianol	1661	1659					0,11±0,00			
-	não identificado (<i>m/z</i> 222)	1740	-					0,08±0,00			
Cadinano	14-hidroxi- α - muroleno	1778	1779	0,27±0,04	0,18±0,04	0,10±0,02	0,07±0,00				
Eudesmano	eudesm-11-en-4- α , 6- α -diol	1807	1808	0,56±0,03		0,18±0,03					
Farnesano	2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -ácido farnesóico	1815	1816	0,13±0,00			0,11±0,02				
Farnesano	2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> -acetato de farnesila	1820	1821	0,12±0,04		0,17±0,03	0,03±0,00				
Farnesano	<i>Z,Z</i> -acetato de farnesila	1861	1860	0,06±0,00					0,54±0,03		
Fitano	fitol	1945	1942						0,15±0,00		
Fitano	<i>Z,Z</i> -linalool de geranila	1959	1960	0,04±0,01	0,72±0,03		0,06±0,01	1,63±0,02	0,41±0,00	0,69±0,00	0,58±0,32
Cembrano	3 <i>Z</i> -cembreno A	1964	1965				0,98±0,02				
Fitano	<i>E,Z</i> -linalool de geranila	1986	1987	0,94±0,03	0,61±0,02	0,32±0,01	0,33±0,03				
Eicosane	eicosano	2000	2000	0,04±0,01	0,16±0,03		0,02±0,01		0,29±0,00	0,02±0,00	0,16±0,01
Tricoisane	tricosano	2300	2300					0,04			
Monoterpenos não oxigenados				54,61	62,28	60,23	56,00	41,17	64,05	40,13	66,49
Monoterpenos oxigenados				2,07	1,15	1,66	0,89	1,42	1,02	1,32	0,76
Sesquiterpenos não oxigenados				27,93	26,15	28,47	31,49	35,18	24,84	38,61	24,78
Sesquiterpenos oxigenados				10,24	7,68	5,62	5,58	11,60	6,11	16,72	4,34
Diterpenos não oxigenados				0,00	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00	0,00	0,00
Diterpenos oxigenados				0,98	1,33	0,32	0,39	1,63	0,56	0,69	0,58
Arilpropanoides				0,06	0,10	0,00	0,03	0,13	0,05	0,10	0,06
Número de substâncias identificadas				63,00	54,00	47,00	59,00	63,00	55,00	53,00	53,00

Total de substâncias quantificadas no óleo essencial (%)	95,88	98,85	96,30	95,38	90,63	96,92	95,01	97,17
Rendimentos dos EO (%)	0,19	0,20	0,28	0,13	0,09	0,10	0,10	0,13
IE_{OR}^a	-2,44	-2,93	-3,28	-2,59	-2,30	-2,82	-2,87	-2,93

Legenda: IRcal = Índice de retenção calculado (coluna HP-5MS); IRLit = índice de retenção da literatura (Adams, 2007; 2017); Principais constituintes em negrito. DP = desvio-padrão. ^aTodas as substâncias foram identificadas por EM e IR de acordo com experimental. ^bÍndice Ecológico de Oxi-redução. OE – Óleo essencial; tr - Traço (valor percentual menor que 0,05%).

As médias mensais, diagrama ombrotérmico e médias durante janeiro a dezembro de 2020, janeiro a agosto de 2021 e das 24 horas de coletas (representadas por intervalos de três em três horas) do dia 13 ao 14 dos meses de fevereiro de 2020 e julho de 2021, correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais para o acesso do Teresópolis/ RJ estão evidenciadas na figura 66. Esses dados apresentam que o espécime de *P. multinodum* estava em um período chuvoso e seco no período selecionado para o estudo do ciclo circadiano, nos meses de fevereiro de 2020 e julho de 2021, respectivamente.

Figura 66 - Médias mensais e diagrama ombrotérmico correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais, precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) da cidade do Teresópolis/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2020 e janeiro a agosto 2021.



Legenda: Médias mensais (A) e diagrama ombrotérmico (B). Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Ago- agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro;

Fonte: INMET, 2021.

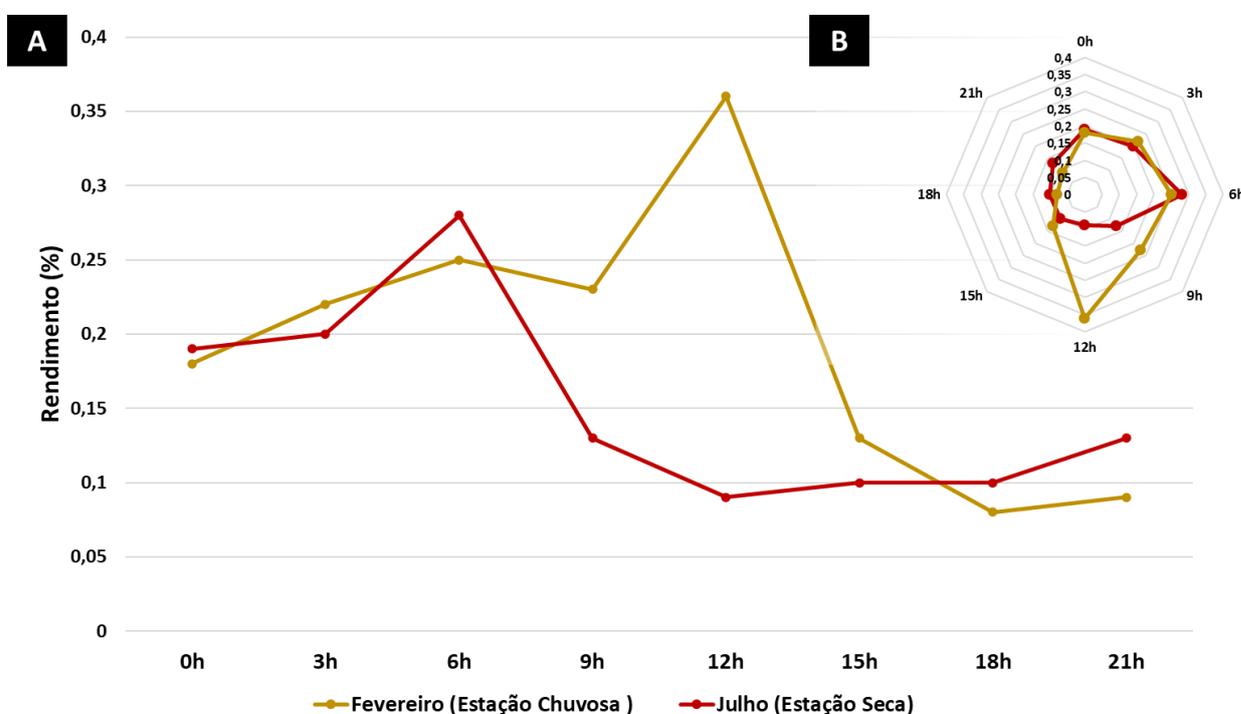
A figura 67 apresenta as variações nos rendimentos dos OE das folhas dos períodos chuvosos (C) e secos (S) durante as 24 horas de coletas nos meses de fevereiro de 2021 e julho de 2021 em Teresópolis/RJ, respectivamente. A tabela 27 são resultados referentes às análises de Pearson. Essas tabelas demonstram as correlações entre as classes químicas, rendimentos e

as substâncias majoritárias presentes nos OE com os fatores ambientais (radiação, umidade e temperatura) no período e local anteriormente mencionado.

Nos dois períodos analisado, a maior média de rendimento foi observado no mês de fevereiro na estação chuvosa (~0,19%) em relação a estação seca (~0,15%). Apesar disso, as médias entre os dois períodos deste estudo não apresentou diferença significativa ($p=0,3087$). No gráfico radar (Figura 67A), que descreve a homogeneidade da distribuição dos rendimentos durante as 24 horas. Foi possível constatar que o período seco apresenta maior homogeneidade em comparação ao chuvoso. No entanto, o maior rendimento entre os dois foi constatado no período chuvosos no horário de 12:00h (0,36%).

Na análise, no período seco os maiores rendimentos foram observados entre 00:00 às 06:00h e as menores entre 12:00 às 21:00h. Foi possível apurar que os horários de 06:00h, 18:00h e 21:00h os rendimentos forma maiores no seco que no chuvosos (Figura 67A). Em relação às correlações com fatores abióticos, foi demonstrado que existiu forte correlação inversamente proporcional no mês de julho com a radiação ($r^2=-0,833$, $p=0,04$) (Tabelas 27).

Figura 67 – Rendimentos dos óleos essenciais (%) obtidos das coletas de três em três horas, comparando suas variações e distribuição diária no ciclo circadiano de *Piper multinodum* nos meses de fevereiro e outubro de 2017.



Legenda: (A) Comparando suas variações durante 24h; (B) Distribuição do rendimento durante às 24h

Tabela 27 - Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais, rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais do ciclo circadiano de *Piper multinodum* do acesso de Rio de Janeiro/RJ (PMR), no mês de fevereiro de 2020 e julho de 2021.

Variáveis analisadas	r^2					
	Umidade (%)		Temperatura (°C)		Radiação (KJm ⁻²)	
	Fevereiro	Julho	Fevereiro	Julho	Fevereiro	Julho
Rendimento (%)	0,362	0,446	-0,582	-0,481	-0,100	-0,833*
α -pineno	-0,815**	-0,483	0,735*	0,127	0,604	-0,266
sabineno	0,052	-0,186	-0,234	-0,235	-0,031	0,437
β -pineno	0,427	-0,198	-0,576	-0,116	-0,081	-0,535
mirceno	0,224		-0,028		-0,032	
Z- α -ocimeno	0,704	0,272	-0,760*	0,036	-0,371	-0,121
perileno	0,469	-0,261	-0,290	0,161	-0,333	-0,331
E-cariofileno	0,725*	-0,452	-0,607	0,511	-0,665	0,962**
aromadendreno	0,437	0,717	-0,136	-0,726	-0,643	-0,163
allo-aromadendreno		0,362		-0,513		-0,709
germacreno d	0,847**	0,415	-0,674	-0,408	-0,770**	0,317
E-nerolidol	0,673	-0,155	-0,675	0,070	-0,639	0,329
Monoterpenos não oxigenados	-0,859**	-0,396	0,761**	0,103	0,781**	-0,409
Monoterpenos oxigenados	0,298	0,306	-0,450	0,063	-0,032	-0,367
Sesquiterpenos não oxigenados	0,810**	0,601	-0,622	-0,314	-0,839**	0,314
Sesquiterpenos oxigenados	0,858**	0,038	-0,885**	0,075	-0,614	0,272
Diterpenos não oxigenados		0,441		-0,302		-0,128
Diterpenos oxigenados	0,526	-0,124	-0,434	-0,146	-0,502	0,280
Arilpropanoides	0,195	-0,257	-0,131	-0,046	-0,287	0,442
Outras substâncias		-0,673		0,593		0,437

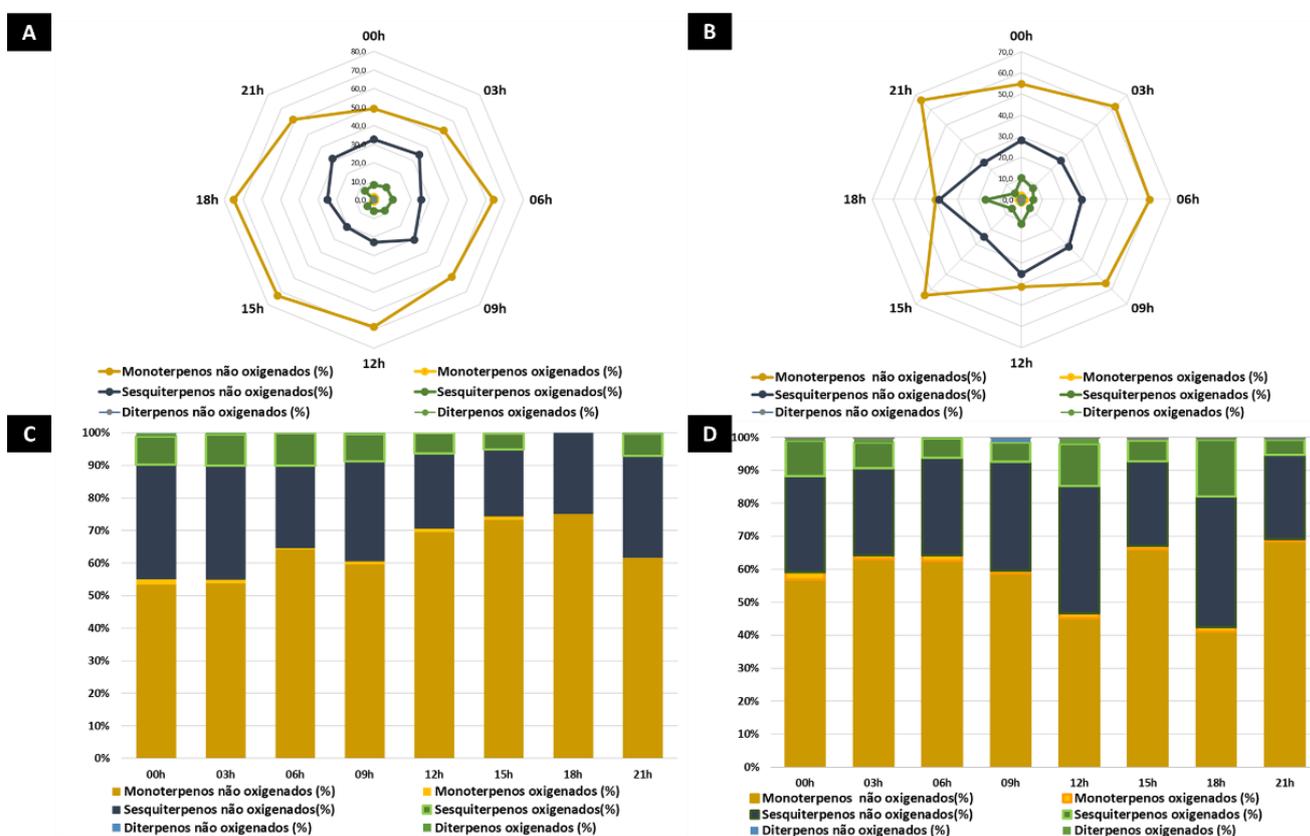
Legenda - *Significativo a $p < 0,05$; **Significativo a $p < 0,01$; OE – Óleo Essencial.

Os gráficos com as porcentagens ao longo de 24 horas das classes químicas presentes nos OE de *P. multinodum* estão apresentadas na figura 68. Na figura 68 A-B encontra-se as porcentagens com áreas normalizadas e figura Y11 B- D as distribuições, para os meses de fevereiro (Figura 68 A e C) e julho (Figura 68 B e D).

Os OE apresentaram-se com uma composição composta de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Curiosamente, os teores de diterpenos no período mais seco apresentaram maiores teores do que no período chuvoso com diferença significativa entre si ($p=0,002$).

Os teores de monoterpenos não oxigenados são predominantes nas duas estações, no entanto as médias não apresentaram diferença significativas entre si ($p=0,242$). Foi constatado maiores teores dessa classe química nos períodos de 06:00 às 18:00h para estação chuvosa e, opostamente, na estação seca foi encontrado nos horários entre 21:00 às 03:00h. Os sesquiterpenos não oxigenados apresentaram incrementos nos teores nos horários de 06:00 às 18:00 na estação seca (julho de 2021) e na chuvosa esse aumento foi observado nos horários de 21:00 às 03:00h (Figura 68).

Figura 68 – Distribuições das variações das classes químicas de óleos essenciais de folhas de *Piper multinodum* silvestre coletadas em fevereiro de 2020 e junho de 2021, durante 24 h, em intervalos de 3 em 3 h.



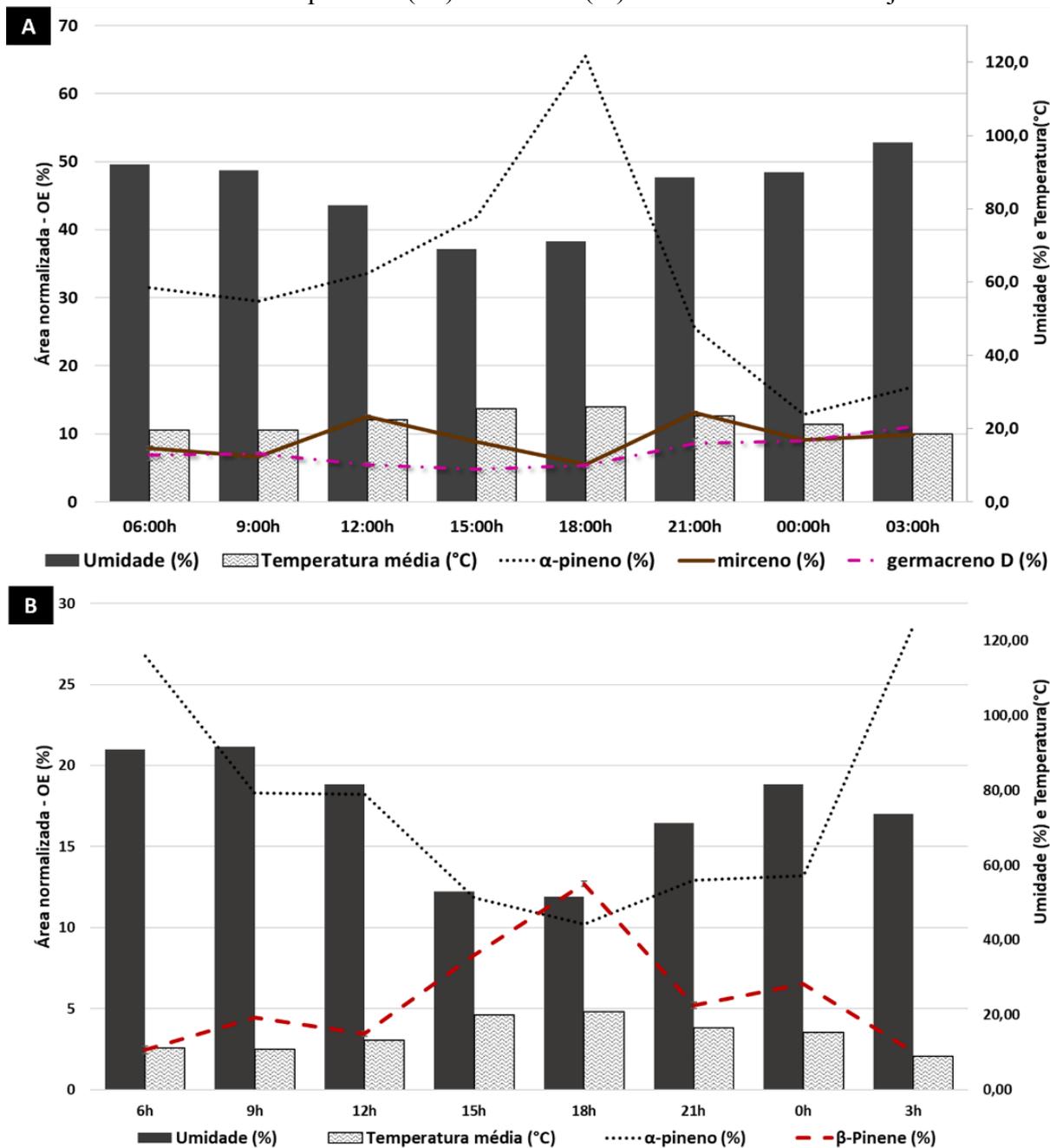
Legenda: Variações das classes químicas de óleos essenciais em (A e B) área normalizada e (C e D) porcentagem. Coletas realizadas em fevereiro de 2020 (A e C) e julho de 2021 (B e D).

A análise de correlação de Pearson (Tabela 27) demonstrou que apenas as variações com fatores abióticos no período chuvoso poderiam ser explicadas com correlações com valores significativos ($p>0,05$). Foi possível observar no mês de fevereiro, fortes correlações significativas com monoterpenos não oxigenados inversamente com umidade ($r^2=-0,859$, $p=0,006$) e diretamente proporcionais com temperatura ($r^2=0,761$, $p=0,028$) e radiação

($r^2=0,781$, $p=0,022$). Os sesquiterpenos não oxigenados e os oxigenados apresentaram correlação fortes diretamente proporcionais com umidade ($r^2=0,810$, $p=0,015$; $r^2=0,858$; $p=0,006$), respectivamente. Os sesquiterpenos não oxigenados apresentaram correlação inversamente proporcionais fortes com radiação ($r^2=-0,839$; $p=0,009$) e sesquiterpenos oxigenados com temperatura ($r^2=-0,885$; $p=0,003$).

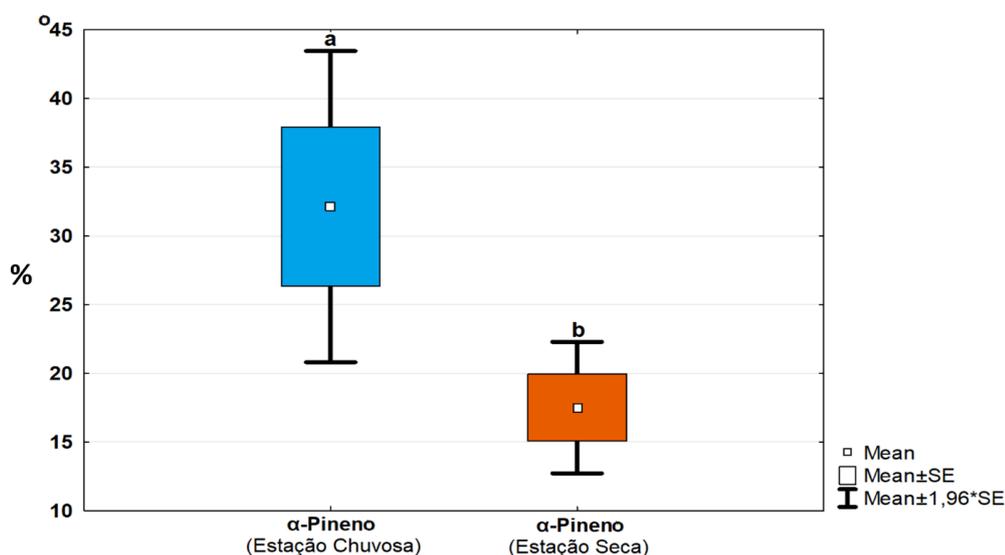
As comparações das variações dos componentes majoritários dos OE de *P. multinodum* no ciclo circadiano em comparação com à normal climatológica, nas 24 horas das quinzenas dos meses de fevereiro de 2020 e julho de 2021 estão apresentados nas figuras 69A e B, respectivamente. A figura 70 apresenta o *Box plot* comparativo entre os teores de α -pineno nas estações chuvosa e seca.

Figura 69 - Comparação das variações dos componentes majoritários de óleos essenciais do ciclo circadiano de *Piper multinodum* com a normal climatológica dos fatores ambientais temperatura (°C) e umidade (%) de fevereiro de 2020 e julho de 2021.



Legenda: Coletas realizadas em fevereiro de 2020 (A) e julho de 2021 (B).

Figura 70 - Análises de *box plot* de α -pineno presente no óleo essencial das folhas de *Piper multinodum* silvestre no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações chuvosa (março) e seca (outubro).



Legenda - Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes usando o teste de Tukey ($p < 0,05$)

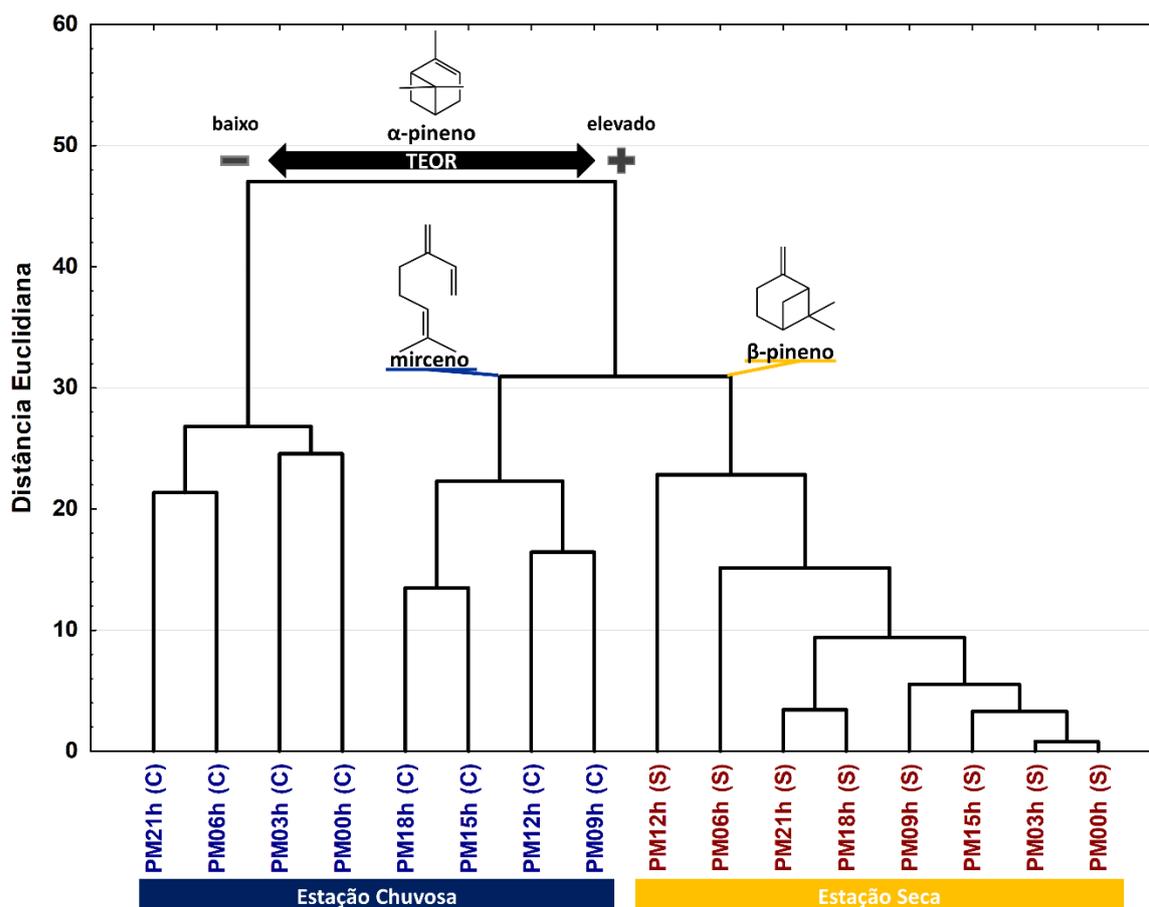
Nas estações seca e chuvosa as médias dos teores do α -pineno são majoritários entre todas as substâncias (Figura 69 e 70), no entanto essas apresentam diferenças significativas entre as estações ($p=0,035$) sendo a estação seca com menores teores (Figura 70).

Para a estação chuvosa (fase vegetativa), os teores de α -pineno aumentam com a diminuição da umidade ($r^2=-0,815$; $p=0,014$) e aumento da temperatura ($r^2=-0,735$; $p=0,038$). O pico do teor dessa substância é atingido às 18:00h (64,46%). Opostamente, na estação seca (fase reprodutivas) é observado que esses incrementos na umidade e temperatura é acompanhado pela diminuição nos teores de α -pineno, diretamente proporcional a isso existe, o aumento do isômero β -pineno. No entanto, não apresentaram correlações significativas. Curiosamente, os horários de 18:00h foi o possível encontrar o maior e menor teores nas estações chuvosa e seca, respectivamente.

Outras substâncias tiveram incrementos significativos com as variações dos fatores abióticos, destaca-se o *E*-cariofileno que apresentou correlações diretamente proporcionais na estação chuvosa com umidade ($r^2=-0,815$; $p=0,014$) e na seca com radiação ($r^2=-0,815$; $p=0,014$). O germacreno D também apresentou na estação chuvosa correlação forte diretamente com umidade ($r^2=-0,815$; $p=0,014$) e inversamente proporcional com radiação ($r^2=-0,815$; $p=0,014$).

Na figura 71 é apresentada as análises de agrupamento hierárquico. Nesse é demonstrado a discriminação na distância euclidiana de 47,03 de dois grupos formados a partir da variação quantitativa química relativo ao teor de α -pineno, no qual um (1) grupo com baixo teor (PM21h (C), PM06h (C), PM03h (C), PM00h (C)) e o segundo (2) grupo com alto teor (PM18h (C), PM15h (C), PM12h (C), PM09h (C), PM12h (S), PM06h (S), PM21h (S), PM18h (S), PM09h (S), PM15h (S), PM03h (S), PM00h (S)). É possível em uma distância euclidiana menor (30,94) distinguir a partir dos elevados teores de mirceno e β -pineno nas estações chuvosa e seca, respectivamente.

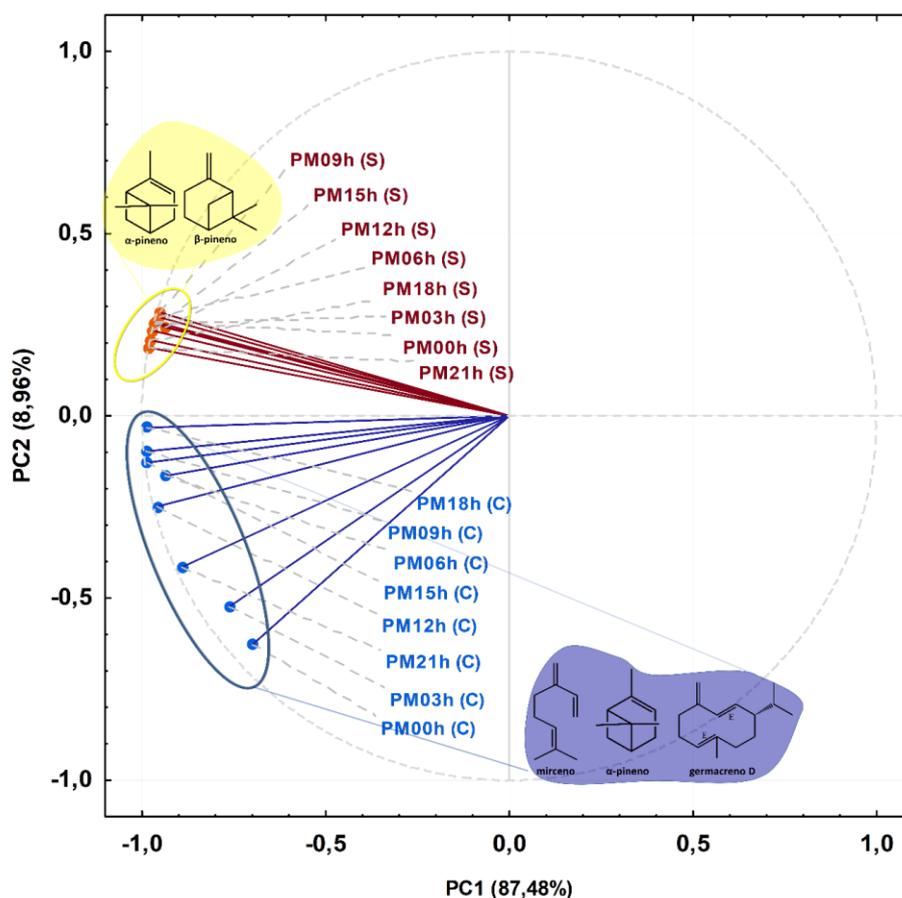
Figura 71 – Dendrograma das 16 amostras de óleos essenciais do ciclo circadiano de *Piper multinodum* (PM) nos meses de fevereiro na estação chuvosa (C) e julho de 2021 na estação seca (S), de três em três horas de um dia, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.



A ACP está apresentada na figura 72. Nesta a maioria dos dados são representados em dois eixos principais que contém 96,44% de variância total (PC1 = 87,48% e PC2 = 8,96%, Figura 72). No gráfico score (Figura 72) é possível observar as projeções das amostras na direção dos componentes principais (PC), discriminando em dois grupos distintos: 1 – Rico em α -pineno e β -pineno (estação seca) e 2 – Rico em α -pineno, mirceno e germacreno D (estação chuvosa). Apesar das influências dos outros componentes na separação, o primeiro componente (α -pineno) sozinho já justificaria a variância entre as amostras.

No período seco (fase reprodutiva) ter teores maiores de isômeros pinenos e na chuvosa (fase vegetativa) o seu precursor biossintético mirceno não é deslocado completamente para produção dos dois produtos indicam correlações biossintéticas importantes que será discutida na seção de Discussão.

Figura 72 – Gráfico *score* de 16 amostras de óleos essenciais do ciclo circadiano de *Piper multinodum* (PM) nos meses de fevereiro na estação chuvosa (C) e julho de 2021 na estação seca (S), de três em três horas de um dia, baseado em análise de componente principal.



4.4.4 Tendências Quimiofenéticas e de quimiodiversidade temporais dos óleos essenciais de *Piper multinodum*.

4.4.4.1 Aspectos Quimiofenéticos a partir dos esqueletos de carbono nos estudos sazonal e circadiano de *Piper multinodum*

Os esqueletos de carbono foram deslindados a partir do agrupamento das substâncias identificados e seus teores percentuais nos estudos sazonal (Sz) e circadiano (Cc), nas estações seca (S) e chuvosa (C), e estão apresentados nas tabelas 23, 25 e 26, respectivamente. Na figura 73 é apresenta um mapa com a proposta biossintética com os 27 esqueletos de carbono (Sz: 22; Cc: 27) dos OEs encontrado no estudo de ritmo circadiano e sazonal. Foi possível identificar 21 e 28 esqueletos na estação chuvosa e seca, respectivamente.

Nos estudos descritos observou-se que os principais esqueletos de carbonos a partir das porcentagens médias foram pinano (Sz: 23,61 - 48,44%; Cc: 16,41 - 71,01%), mircano (Sz: 0,31 - 21,94%; Cc: 5,55 - 20,18%), tujano (Sz: 0,24 - 11,03%; Cc: 2,81 - 6,10%), himalachano (Sz: 0,00 - 12,39%; Cc: 0,00 - 0,12%), mentano (Sz: 0,12 - 9,82%; Cc: 0,00 - 10,78%), aromadetrano (Sz: 0,00 - 6,87%; Cc: 4,31 - 13,22%), e germacrano (Sz: 0,00- 9,28; Cc: 0,83 - 11,29%). Os esqueletos com maior número de substâncias em termos de diversificação foram cadinano (Sz: 11; Cc: 19), mentano (Sz: 10; Cc: 14), aromadendrano (Sz: 4; Cc: 9), e mircano (Sz: 4; Cc: 8).

Foi possível identificar esqueleto participantes de diferentes rotas biossintéticas, predominando a do metileritose fosfato e/ou mevalonato. Derivados da via do chiquimato (alquilbenzeno (C₃-C₆)) foram encontrados no estudo circadiano. Foi observado nos dois estudos para as vias biossintéticas predominantes derivados de esqueletos precursores pirofosfato de geranila (monoterpenos), pirofosfato de farnesila (sesquiterpenos) e o pirofosfato de geranilgeranila (diterpenos). Ressaltamos que o fitano, derivado desse último precursor, pode ser um artefato da clorofila, gerado no processo de obtenção do OE.

No estudo sazonal foram avaliadas as dinâmicas biossintéticas na formação dos esqueletos de carbono (Tabela 28 e Figura 73). Os esqueletos precursores de pirofosfato de geranila permanece em elevados teores ao longo do ano, exceto no mês de setembro, pós-frutificação, em que a biossíntese favoreceu a produção dos esqueletos de pirofosfato de farnesila. Ressalta-se que o aumento dos esqueletos de pirofosfato de farnesila é diretamente proporcional ao aumento de esqueleto de pirofosfato de geralgeranila ($r^2=0,743$; $p=0,006$), mesmo esse segundo apresentando teores muito inferiores nas amostras analisadas.

Pela elevada porcentagem é possível observar que a produção de substâncias com esqueletos de pinano é favorecida por pirofosfato de geranila, passando por mentano, ao longo de todo ano. Essa afirmação baseia-se no fato que os teores de mentano são inversamente proporcionais aos de pinano ($r^2=-0,531$, $p=0,045$). Nos meses de janeiro, julho, agosto, novembro e dezembro foi possível constatar que a via biossintética de maior ocorrência foi a que gerou esqueletos de mircano. Ressaltamos que esse esqueleto possui a forma mais simples para o precursor comum dos monoterpenos (pirofosfato de geranila).

Os meses de junho e julho foram os mais secos e o período reprodutivo da planta. Após esses meses, como mencionado anteriormente, foi observado uma tendência gradativa para produção de esqueletos derivado de pirofosfato de farnesila (sesquiterpenos), principalmente, cadinano, germacrano e aromadendrano. O aumento dos teores percentuais dessas substâncias se deu no mês de setembro com o aumento dos índices pluviométricos e temperatura média. Após esse período ocorreu desvio biossintético do esqueleto central germacrano para formação do longipinano.

No estudo circadiano, nas estações chuvosa e seca, foi observado a manutenção do favorecimento dos esqueletos derivados de pirofosfato de geranila durante todo o dia. No entanto, essa produção foi estimulada de maneira opostas entre as estações. A estação chuvosa (fevereiro) possui maior produção de substâncias com esqueletos produzidos desse precursor nos horários entre 12:00 e 18:00h e na estação seca entre o período de 21:00 às 06:00h. No horário entre 12:00h e 18:00h foi possível constatar um favorecimento para produção de derivados de pirofosfato de farnesila na estação seca. Esse fato não foi observado na estação chuvosa, que demonstrou teores menores de produtos formados desse precursor (sesquiterpenos) no período do dia. Na estação chuvosa foi possível observar, também, um favorecimento gradativo para produção de esqueletos de pineno, atingido o pico às 18:00h. Esse aumento é acompanhado com o desfavorecimento da via biossintética para produção de substâncias com esqueleto mircano. A partir das 21:00h é favorecida a produção de esqueletos mentano e mircano. No horário de 00:00h os teores das substâncias com esqueleto mircano ultrapassam os teores do tipo pinano que são majoritários no OE de *P. multinodum*. Os derivados de pirofosfato de farnesila são evidenciados a partir das 21:00, sendo registrados a produção dos esqueletos germacrano em direção para aromadendrano.

Na estação seca foi possível observar valores dos teores flutuantes para os tipos pinano. Essa flutuação está relacionada ao favorecimento das vias do pirofosfato de farnesila na produção de germacrano, aromadendrano, cariofilano e cadinano.

Figura 73 - Mapa biossintético de tipos de esqueleto de carbonos terpênicos presentes em óleos essenciais dos estudos sazonal e circadiano de *Piper multinodum*.

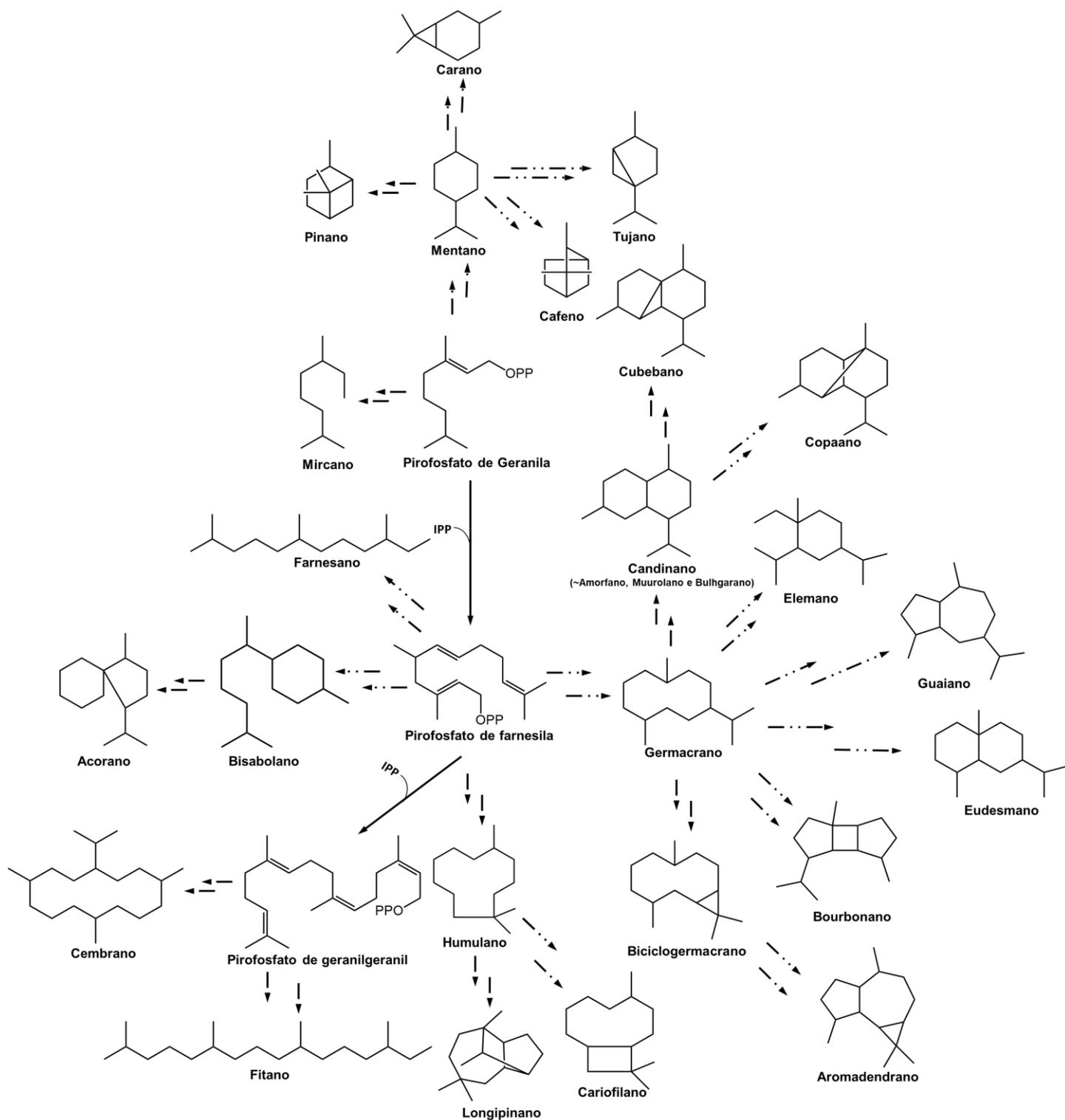


Tabela 28 - Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbonos dos componentes do óleo essencial de *Piper multinodum* silvestre no estudo sazonal durante 12 meses (janeiro a dezembro de 2019).

Esqueleto - C	Porcentagem de Ocorrência (%)											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Aromadendrano	6,41	0,00	4,30	0,12	0,45	0,00	2,52	5,76	6,87	5,06	0,32	0,36
Biciclogermacrano	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00	1,57	2,49	4,20	2,18	0,00	0,00
Bisabolano	0,00	0,53	0,58	1,50	0,00	0,44	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	1,07
Bourbonano	2,40	0,00	2,97	0,00	0,00	0,00	2,21	2,23	4,09	2,33	0,00	0,00
Cadinano	1,28	0,26	12,08	0,81	0,35	0,28	4,77	5,11	6,88	5,40	0,00	0,31
Canfeno	0,84	0,43	0,91	0,87	5,00	1,17	1,30	0,56	0,15	0,00	0,73	0,72
Carano	0,00	3,87	0,03	0,04	3,19	7,61	0,00	0,00	0,23	0,00	8,56	2,33
Cariofilano	0,00	0,00	4,63	0,00	0,00	0,00	3,38	3,12	7,28	4,38	0,00	0,00
Copaano	0,00	8,17	3,54	0,40	7,19	3,58	0,61	0,52	5,71	3,93	0,31	0,25
Cubebano	1,04	0,37	0,17	0,25	0,46	0,16	0,00	0,00	0,20	0,00	5,52	7,77
Elemano	0,97	3,39	0,74	0,00	3,20	0,68	1,46	0,60	1,80	0,66	7,01	3,18
Eudesmano	0,00	0,00	0,07	0,00	0,24	0,00	0,32	0,00	0,85	0,00	0,00	0,00
Farnesano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,56	0,00	0,00	0,00	0,00	1,28	0,00	0,00
Germacrano	0,00	0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	5,52	0,00	9,28	5,91	0,00	0,00
Guaiano	5,15	0,00	0,44	0,14	1,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,30
Humulano	0,00	0,00	2,94	0,00	0,00	0,00	1,84	2,95	3,99	2,26	0,00	0,00
Longipinano	4,01	7,60	0,00	8,54	1,94	1,49	0,00	0,00	0,00	0,00	8,65	12,39
Mentano	3,90	0,56	7,33	4,41	0,18	0,12	4,60	3,83	1,83	3,61	9,82	2,46
Mircano	21,94	11,71	17,43	14,03	0,31	0,34	15,85	20,64	5,99	15,79	9,21	18,23
Fitano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,66	0,00	0,00	0,00
Pinano	31,73	28,81	25,81	36,77	38,32	48,44	42,83	44,11	37,29	34,03	23,61	28,21
Tujano	3,89	4,67	3,33	11,03	0,45	6,33	5,91	2,55	1,09	4,32	0,24	2,82

Tabela 29 - Porcentagens de ocorrência dos esqueletos de carbono dos componentes do óleo essencial das folhas de *Piper multinodum* silvestre no estudo circadiano, durante as estações chuvosa (C, março) e seca (S, outubro), das 12h às 00h.

Esqueleto - C	Porcentagem de Ocorrência (%)															
	Estação Seca (Julho de 2021)								Estação Chuvosa (Fevereiro de 2020)							
	00:00h	03:00h	06:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h	00:00h	03:00h	06:00h	9:00h	12:00h	15:00h	18:00h	21:00h
Acorane	0,00	0,26	0,10	0,00	0,26	0,00	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	0,06	0,10		0,03	0,13	0,05	0,10	0,06	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Aromadendrano	10,77	12,25	13,22	9,95	9,69	5,63	7,42	6,51	7,89	7,30	5,44	7,39	5,47	5,42	4,31	8,06
Biciclogermacrano	0,59	1,15	1,01	1,24	0,00	0,00	2,62	1,05	2,81	1,98	1,79	2,08	1,84	1,63	0,00	2,70
Bisabolano	0,00	0,42	0,00	1,27	4,15	2,59	4,74	0,08	0,19	0,33	0,11	0,20	0,22	0,09	0,00	0,00
Bourbonano	1,96	0,00	0,00	1,87	2,76	1,50	2,33	1,56	3,27	4,44	2,17	3,26	1,83	1,95	3,15	2,95
Cadinano	7,52	6,42	9,68	7,60	5,22	6,46	12,26	5,80	3,95	3,05	4,76	5,68	4,49	3,50	2,04	4,53
Canfeno	0,07	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	1,12	1,28	0,81	0,96	1,02	1,01	0,00	0,87
Carano	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Cariofilano	0,08	0,18	0,00	2,55	6,30	4,10	5,26	4,54	4,71	6,51	3,03	3,96	2,64	2,58	2,98	3,95
Cembrane	0,00	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Copaano	0,91	0,62	0,33	0,07	0,06	0,23	0,35	0,15	2,90	1,50	2,77	3,11	2,14	2,05	4,17	2,27
Cubebano	2,01	2,60	2,66	3,22	1,34	1,14	1,96	1,63	0,10	0,04	0,06	0,22	0,04	0,00	0,00	0,00
Eicosane	0,04	0,16	0,00	0,02	0,00	0,29	0,02	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Elemano	3,11	2,17	2,24	2,61	4,04	2,90	3,43	2,22	0,94	2,21	1,82	2,22	2,33	1,73	2,87	2,13
Eudesmano	3,16	0,76	0,51	0,53	1,86	0,85	5,53	0,80	0,18	1,37	0,54	0,91	0,42	0,46	0,00	0,21
Farnesano	4,15	3,80	1,80	2,24	4,86	2,75	1,60	1,40	4,46	3,40	5,69	2,18	1,88	0,92	0,00	2,31
Germacrano	1,23	1,43	1,22	1,43	2,34	0,83	2,08	1,24	9,10	11,29	6,87	7,14	5,55	4,84	5,38	8,56
Guaiano	0,05	0,33	0,00	0,09	1,07	0,08	0,00	0,59	0,00	0,52	0,30	0,41	0,31	0,30	0,00	0,43
Humulano	2,40	1,44	1,32	1,87	1,95	1,19	1,78	1,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Longipinano	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,06	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mentano	8,36	7,16	6,51	6,13	6,42	6,53	5,90	5,38	10,73	8,52	5,21	5,31	7,22	5,53	0,00	9,17
Mircano	7,59	5,18	6,50	8,19	6,33	6,59	5,95	6,99	18,44	19,86	16,05	14,68	20,18	15,90	0,00	19,25
Fitano	0,98	1,33	0,32	0,39	1,63	0,56	0,69	0,58	0,91	0,50	0,09	0,30	0,00	0,16	0,00	0,26
Pinano	36,55	47,60	45,82	39,00	26,34	48,80	26,78	51,33	16,41	21,11	36,36	34,87	37,81	46,94	71,01	28,93
Tujano	4,11	3,49	3,06	3,34	3,38	3,15	2,82	3,55	4,10	3,33	6,10	3,88	3,43	4,55	4,09	3,09
Tricoisano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

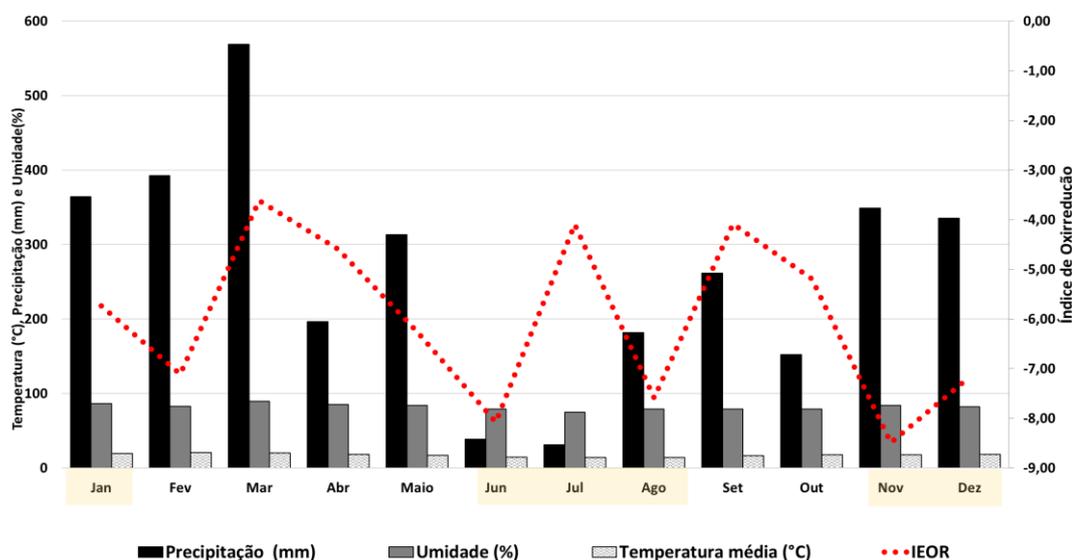
4.4.4.2 Impacto oxi-redutor em diferentes escalas temporais nos óleos essenciais de *Piper multinodum*

Os resultados dos cálculos de Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR}) dos estudos sazonal e circadiano a partir dos OEs de *P. multinodum* estão apresentados nas Tabelas 23, 25 e 26. Na tabela 30 estão apresentadas as correlações de Pearson entre os fatores ambientais e os valores do IE_{OR} obtidos das misturas dos OEs dos estudos sazonal e circadiano. A variação dos fatores abióticos (precipitação, umidade e temperatura média) e os valores obtidos do IE_{OR} estão apresentados na figura 74.

Nos estudos foram encontradas variações entre **-8,49** a **-2,19** (SZ: -8,49 a -3,61; Cc: -5,3 a -2,19). Ao longo do ano, a variação de IE_{OR} apresentou diferença significativa ($p < 0,001$). Na figura 74 é possível observar que maior oxidação do OE foi no mês de março, caracterizado como o mais chuvoso do ano. Os menores IE_{OR} (mais reduzidos) foram registrados no início e no final de cada fase reprodutiva. Foi possível identificar que no período reprodutivo, no auge da floração, a mistura de voláteis apresentou-se mais oxidada. Após o período de seca e término da floração, no mês de setembro, a mistura apresentou-se mais oxidada. Apesar dos resultados apresentarem tendências com os fatores abióticos, esses não apresentaram valores significativos de correlação de Pearson para a variação anual, igualmente como *P. gaudichaudianum*.

No estudo circadiano, a variação dos valores do IE_{OR} obtidos apresentaram variação significativa durante os dias (em fevereiro e julho) e entre os períodos (estação seca e chuvosa). Essas variações estão apresentadas na Figura 75. Os valores de IE_{OR} para o período seco (-3,28 a -2,30) foram maiores do que no período chuvoso (-5,28 a -2,19). Esse achado direciona entendimento que as misturas de substâncias dos OEs estão mais oxidadas no período mais seco e no chuvoso mais reduzidas. As variações de IE_{OR} entre o dia e a noite para a estação seca não apresentaram diferenças significativas. No entanto, no período chuvoso, as variações foram significativas, sendo que no período da noite a mistura apresentou-se mais oxidada e mais reduzida durante o dia. Esses valores de IE_{OR} apresentaram correlações significativas e inversa com temperatura e direta com umidade e radiação (Tabela 30).

Figura 74 - Comparações das variações do Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira obtido a partir da composição de óleos essenciais de *Piper multinodum* e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) no período de janeiro a dezembro de 2019.



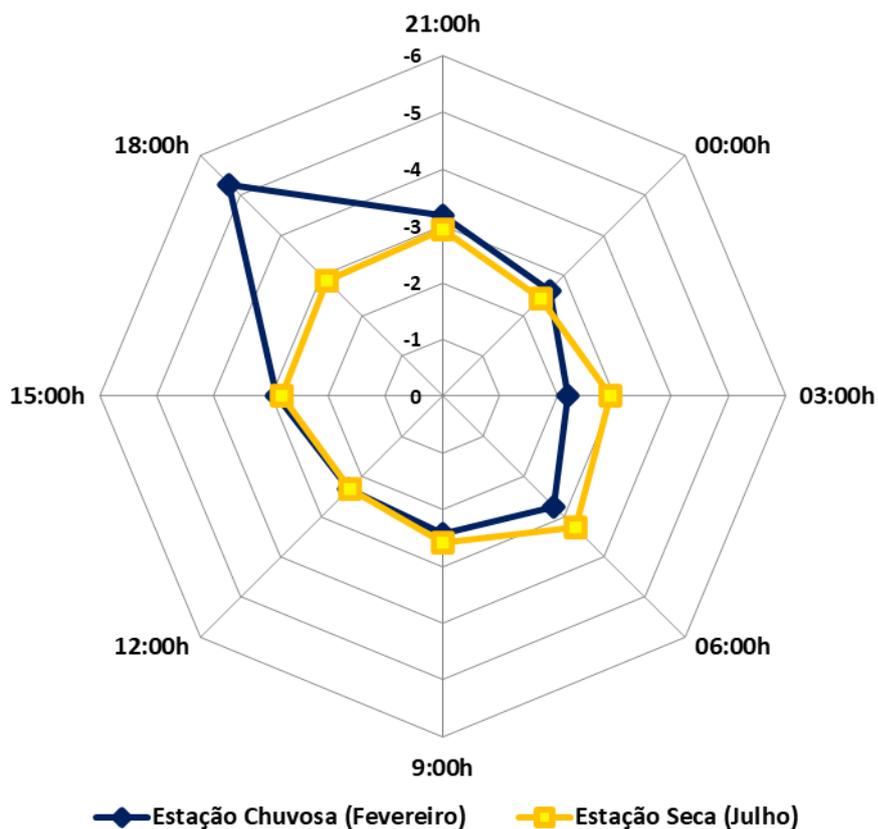
Legenda: Da esquerda para direita = Jan-janeiro; Fev-fevereiro; Mar-março; Abr-abril; Mai-maio; Jun-junho; Jul-julho; Agos-agosto; Set-setembro; Out-outubro; Nov-novembro; Dez-dezembro; #Área hachurada em amarelo representa os meses de ocorrência da fase reprodutivas.

Tabela 30 – Análise da correlação de Pearson entre variáveis ambientais e os valores obtidos dos Índice Ecológicos de Oxi-redução (IE_{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira do estudo sazonal (anual) e estudo circadiano (fevereiro de 2020 e julho de 2021) de *Piper multinodum*.

Variável	Período	Índice Ecológico de Oxi-redução
Umidade (%)	Anual	0,087
	Fevereiro	0,613*
	Julho	0,021
Temperatura (°C)	Anual	0,155
	Fevereiro	-0,711**
	Julho	0,227
Radiação (KJm ⁻²)	Fevereiro	-0,245
	Julho	0,530*
Precipitação (mm)	Anual	0,094

Legenda - *Significativo a $p < 0,05$; **Significativo a $p < 0,01$.

Figura 75 - Representação do gráfico de radar do Índice Ecológico de Oxi-redução (IE_{OR}) ou Índice de Ramos & Moreira obtido do óleo essencial das folhas de *Piper multinodum* no estudo do ritmo circadiano das 12h às 00h, durante as estações de chuvosa (fevereiro) e seca (julho).



4.5 Atividades biológicas dos óleos essenciais

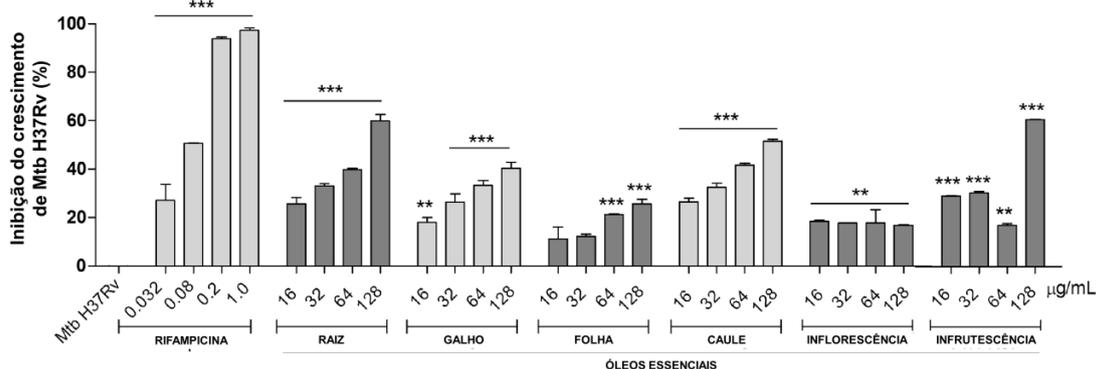
4.5.1 Atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* dos óleos essenciais de diferentes partes vegetativas

Avaliação da atividade contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv dos OEs das diferentes partes da planta (inflorescências, infrutescências, caules, raízes, folhas e galhos) registrou valores de concentração inibitória mínima (CIM) apresentados na tabela 31 e figura 76. As maiores atividades foram registradas para os OEs das raízes (78,51 µg/mL) e das infrutescências (85,91 µg/mL).

Tabela 31 - Atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv de óleos essenciais de diferentes partes vegetativas de *Piper multinodum*.

Óleos Essenciais	CIM (µg/mL)
Raízes	78,51 ± 1,15
Caules	115,00 ± 1,07
Galhos	>128
Folhas	>128
Inflorescências	>128
Infrutescências	85,91 ± 1,01
Rifampicina	0,06 ± 1,01

Figura 76 - Inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv após tratamento com os óleos essenciais de diferentes órgãos de *Piper multinodum*.



Legenda - Ensaio com MTT após 5 dias de incubação na presença das amostras nas concentrações de 16, 32, 64 e 128 µg/mL. Controle positivo, *M. tuberculosis* H₃₇Rv tratados com rifampicina (fármaco de tratamento) e controle negativo, *M. tuberculosis* H₃₇Rv sem tratamento. Análise estatística: *Oneway* ANOVA seguido do teste de Tukey *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ comparado com o controle negativo (Mtb H₃₇Rv 1×10^6 CFU/mL). Resultados em triplicata representados em média ± erro padrão.

Os teores das substâncias majoritárias, classes químicas e os esqueletos de carbono foram correlacionados com as CIM. Os resultados das correlações de Pearson estão apresentados na Tabela 32. Foi possível averiguar que a eusarona ($r^2=-0,713$), classe química de arilpropanoides ($r^2=-0,667$) e o esqueleto de alquilbenzenos ($r^2=-0,667$) apresentaram correlações inversamente proporcional e significativa.

Tabela 32 - Análise de correlação de Pearson entre as substâncias majoritárias, classes químicas e esqueleto de carbono dos óleos essenciais de *Piper multinodum* com inibição do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv

	Variáveis analisadas	r ² CIM
Constituintes majoritários	eusarona	-0,713*
	<i>E</i> -metil-isoeugenol	0,112
	α -pineno	0,375
	mirreno	0,4004
	terpinen-4-ol	0,062
Classe química	Monoterpenos não oxigenados	0,477
	Monoterpenos oxigenados	0,0411
	Sesquiterpenos não oxigenados	0,325
	Arilpropanoides	-0,667*
Esqueleto de carbono	Alquilbenzeno (C ₃ -C ₆)	-0,667*
	Mentano	0,118
	Mircano	0,506
	Pinano	0,369
	Mentano	0,118

Legenda: * $p < 0,05$

4.5.2 Atividades antifúngicas dos óleos essenciais do estudo sazonal

A atividade antifúngica avaliada em *Candida glabrata* resistente ao fluconazol (ATCC 2001D-5) dos OEs referentes as quatro estações do ano estão apresentadas na tabela 33. De acordo com os valores de IC₅₀ observou-se que o OE do mês de novembro, referente a primavera, foi o mais eficaz na inibição do crescimento de *C. glabrata* (IC₅₀ = 139 μ g/mL).

Tabela 33 – Atividade dos óleos essenciais de *Piper multinodum* do estudo sazonal contra isolado *Candida glabrata* resistente (ATCC 2001D-5).

Óleos Essenciais (Estação)	IC ₅₀ (µg/mL)
Janeiro (Verão)	617,9
Maio (Outono)	368,2
Agosto (Inverno)	698,8
Novembro (Primavera)	139,0

As percentagens maiores que 5% nos meses de janeiro, maio, agosto e novembro das substâncias majoritárias, classes químicas e os esqueletos de carbono foram correlacionados com as IC₅₀. Os resultados das correlações de Pearson estão apresentados na Tabela 34. São apresentadas que a atividade contra *Candida glabrata* resistente são melhoradas com o aumento dos teores de δ -3-careno ($r^2=-0,973$), β -longipineno ($r^2=-0,822$), γ -elemeno ($r^2=-0,986$) e seus respectivos esqueletos em correlações inversamente proporcionais e significativas.

Tabela 34 - Análise de correlação de Pearson entre as substâncias majoritárias, classes químicas e esqueleto de carbono dos óleos essenciais de *Piper multinodum* contra isolado *Candida glabrata* resistente (ATCC 2001D-5).

	Variáveis analisadas	IC ₅₀
Constituintes majoritários	α -pineno	0,741*
	mirceno	0,553
	δ -3-careno	-0,973**
	β -longipineno	-0,822*
	γ -elemeno	-0,986**
Classe química	Monoterpenos não oxigenados	0,896*
	Sesquiterpenos não oxigenados	0,250
	Sesquiterpenos oxigenados	-0,230
Esqueleto de carbono	Aromadendrano	0,913*
	Elemeno	-0,981**
	Longipinano	-0,800*
	Mircano	0,721
	Pinano	0,745*
	Carano	-0,973**

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

A família Piperaceae é reconhecida por possuir espécies com elevados rendimentos de OEs (SANTOS *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2013; FILLY *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2020; KEMPRAI *et al.*, 2020). Os teores encontrados nos diferentes órgãos de *P. multinodum* e *P. gaudichaudianum* são valores considerados adequados, quando comparados, segundo a Farmacopeia Brasileira, com espécies produtoras de OEs comerciais, como por exemplo, inflorescências de *Matricaria chamomilla* L. (camomila, mínimo de 0,4%), frutos de *Coriandrum sativum* L. (coentro, mínimo de 0,3%), folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (capim limão, mínimo de 0,5%) e partes áreas de *Mentha arvensis* L. (hortelã, mínimo de 0,8%) (BRASIL, 2019b).

Os rendimentos dos OEs foliares de *P. gaudichaudianum* apresentaram variações significativas ($p < 0,05$) durante os estudos sazonais e circadianos, sendo maiores na fase reprodutiva. Na literatura é possível encontrar teores inferiores em comparação a alguns dos resultados registrados nessa Tese, os quais mencionam rendimentos inferiores a 0,01% (MORAIS *et al.*, 2007; RODIG; POSER, 1990). Valores com maiores rendimentos foram publicados para amostras de Santa Maria (Rio Grande do Sul) que variaram entre 1,32 a 1,61% (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017). Valores intermediários foram registrados para amostras coletadas em Atalanta (Santa Catarina) (0,24 a 0,46%) (SANTOS, 2009). Na literatura é descrito que as espécies tendem a apresentar rendimentos dependentes do estágio no ciclo vegetativo, mais do que em relação aos fatores climáticas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Esse fato pode explicar a tendência encontrada em *P. gaudichaudianum* do Rio de Janeiro de produzir maiores teores de OE durante a fase reprodutiva. Esses resultados corroboram com os dados encontrados para as amostras em Santa Maria (RS), que apresentaram maiores rendimentos durante a fase reprodutiva (SCHINDLER; HEINZMANN, 2018).

Os rendimentos dos OEs em *P. gaudichaudianum* no estudo circadiano apresentaram forte correlação com a radiação. As espécies tendem a apresentar diferentes padrões de respostas plásticas qualitativas nos OEs em variações de níveis de sombreamento (intensidade da luz), aumento da temperatura e umidade relativa. Por exemplo, *Piper umbellatum* L. exibiu maiores rendimentos dos OEs quando cultivado à sombra, enquanto *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) teve esse aumento sob condições de intensa luminosidade (SALEH, 1973; MATTANA *et al.*, 2010). Um estudo correlacionando rendimentos de OEs de *P. umbellatum* e

atividades fotossintéticas descreveu que, quando plantas esciófitas, como *P. gaudichaudianum*, são submetidas à alta irradiação, geralmente, ocorre clorose e necrose com a fotodegradação dos cromopigmentos, levando à redução da fotossíntese e do rendimento de biomassa (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005; MERCHESE *et al.*, 2008). Além desse mecanismo, existe diminuição no acúmulo de OE a partir de evaporação proporcionado pelos aumentos da temperatura, condutância estomática e na taxa de assimilação de CO₂ (SANGWAN *et al.*, 2001; MATTANA *et al.*, 2006; MATTANA *et al.*, 2008; REHMAN *et al.*, 2016; FAN *et al.*, 2018; THAKUR; KUMAR, 2020).

A espécie *P. multinodum* apresentou maior rendimento de OE nas inflorescências. Como mencionado anteriormente, os estágios de desenvolvimento do órgão e as diferentes partes vegetais podem ser um determinante para alteração dos rendimentos dos OEs (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Os maiores teores de OEs nos órgãos reprodutivos podem estar ligados as suas funções ecológicas, principalmente, na atração de polinizadores que conferem fragrância às flores, ou repelem insetos por ação inseticida e dissuasora, reduzindo a herbivoria (BASÍLIO *et al.*, 2015). Estudo publicado pelo grupo constatou que *Piper mollicomum* Kunth registrou maiores rendimentos de OE nas inflorescências (1,80%) do que nas diferentes partes vegetativas (RAMOS *et al.*, 2020). No entanto, *Piper betleoides* C.DC. apresentou maiores rendimentos de OE foliares (0,35%) que nas inflorescências estaminadas (0,26%) e pistiladas (0,31%) (KEMPRAI *et al.*, 2020).

Os rendimentos dos OE de *P. multinodum* nos estudos sazonal e circadiano apresentaram variações significativas ($p < 0,05$) e suas respectivas porcentagens responderam inversamente proporcional com umidade, temperatura e precipitação. Ainda, os maiores rendimentos de OEs foram registrados nos períodos mais secos do ano e do dia. Como mencionado anteriormente para *P. gaudichaudianum*, períodos secos/ chuvosos e/ou dia/ noite apresentam um conjunto diferente de níveis de influência de fatores abióticos eliciadores que provocam alteração no acúmulo de metabólitos presentes em OEs, conseqüentemente, alteram os rendimentos (GLYNN *et al.*, 2007; TATAGIBA *et al.*, 2007; THAKUR *et al.*, 2019).

As variações de temperatura, precipitação e umidade podem alterar a disponibilidade hídrica no ambiente, conseqüentemente, influenciando no movimento estomático que é considerado o mecanismo de controle de trocas gasosas e nas taxas de fotossínteses nas plantas superiores. Essas variações podem apresentar tendências diferentes a depender das escalas temporais e espaciais em uma floresta tropical úmida (TATAGIBA *et al.*, 2007; GLYNN *et al.*, 2007; MARČETIĆ *et al.*, 2017)

No período mais seco, o maior rendimento de *P. multinodum* foi às 06:00h e no chuvoso às 12:00h. Alguns estudos apontam a mudança no conteúdo em massa de terpenoides ao estresse hídrico. Na literatura é descrito que a fotossíntese das espécies vegetais é limitada pelo estresse hídrico, sendo que esse fator altera: as taxas de absorção e circulação de nutrientes e; alocação de carbono entre as raízes e as áreas meristemáticas.

Existe uma hipótese denominada *equilíbrio de crescimento–diferenciação*, na qual é postulado que há um *trade-off* fisiológico entre o crescimento e o metabolismo especializado (GLYNN *et al.*, 2007; MARČETIĆ *et al.*, 2017). Nesta hipótese é estabelecido que conforme uma planta se aclimata às limitações de nutrientes e/ou água, o estado de alocação de equilíbrio é previsto e as restrições iniciais na fotossíntese são diminuídas, levando a um aumento excessivo de fotoassimilados produzidos e, possivelmente, a um direcionamento para o metabolismo especializado e para seu acúmulo (GLYNN *et al.*, 2007). Marčetić e colaboradores (2017) descreveram que essas tendências no acúmulo de metabolismo especializados podem responder de maneira diferentes a depender da escala espacial (espécie, órgão ou região).

Estudos com espécies aclimatadas ao ambiente úmido revelaram diferentes respostas a indução ao estresse hídrico, por exemplo, algumas espécies aumentaram os rendimentos nesta condição, como *Anethum graveolens* L. (Apiaceae), *Artemisia dracuncululus* L. (Asteraceae), *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae), *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae), *Picea abies* (L.) H. Karst. (Pinaceae), *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) e *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae). No entanto, outras espécies tendem a não ser afetados pela seca, como o *Artemisia annua* L. (Asteraceae), *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) e *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), mas aumentou em condições de maior abastecimento de água (TURTOLA *et al.*, 2003; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; ORMENO *et al.*, 2007; SANZ *et al.*, 2014; MARČETIĆ *et al.*, 2017). Cabe lembrar que *P. multinodum* é uma espécie altamente adaptada ao ambiente úmido.

Espécies como *Piper aduncum* L. e *P. hispidinervum* C.DC. com características satélites como *P. gaudichaudianum*, em situação de estresse hídrico, tendem a diminuir os rendimentos dos OEs (SILVA, 2009; JACINTO *et al.*, 2018). Essa constatação deve ser mais bem explorada em novas investigações para compreender os mecanismos que levam a esse processo, já que as duas espécies dessa Tese possuem comportamentos ecológicos distintos (satélite e nucleares) e, ainda assim, acumulam mais OEs em períodos secos.

O perfil químico dos OEs de *P. gaudichaudianum* variou nos estudos sazonais e circadianos. O primeiro estudo de caracterização química do OE dessa espécie foi realizado

com amostra obtida no município de Sapiranga, Rio Grande do Sul (Brasil) e descreve uma composição química rica no sesquiterpeno não oxigenado α -humuleno (37,5%) (VON-POSER *et al.*, 1994). Para esse mesmo Estado brasileiro foram descritos no município de Riozinho os sesquiterpenos *E*-nerolidol (22,1-22,4%) e α -humuleno (16,5-37,5%) como majoritários (PÉRES *et al.*, 2009; SPEROTTO *et al.*, 2013). No município de Santa Maria a predominância foi do arilpropanoide dilapiol (57.8-70.5%) (SCHINDLER; HEINZMANN, 2017).

No Estado do Paraná (Brasil), em diferentes localidades do município de Curitiba, foram identificados como majoritários as substâncias longipinanol (19,1%) e 5-*epi*-7-*epi*- α -eudesmol (13,3%) (KRINSKI *et al.*, 2016); 1-*epi*-cubenol (24,2%) e cadaleno (33,7%) (KRINSKI *et al.*, 2018); e *E*-cariofileno (17,8%) e β -pineno (13,2%) (KRINSKI *et al.*, 2018). No mesmo Estado, no município de Antonina foram encontrados δ -cadineno (45,3%) (BERNUCI *et al.*, 2016); germacreno B (21,5%) e δ -cadineno (9,4%) como os majoritários (SILVA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020). Em Diamante do Norte (PR), os majoritários foram identificados como *E*-cariofileno (7,3 – 7,4%), β -pineno (3,8 -6,6%) e δ -cadineno (5,6-7,1%) (QUIQUI *et al.*, 2019). No município de Piraquara (PR), 1-*epi*-cubenol (25,1%) e eudesm-7(11)-*en*-4-ol (28,4%) foram os majoritários das amostras. Amostra rica em viridiflorol (27,5%) e aromadendreno (15,6%) foi encontrada para o município de Porto Velho, no Estado de Rondônia (MORAIS *et al.*, 2007); germacreno B (21,5%) e δ -cadineno (9,3%) no município de Araquari, no Estado de Santa Catarina (CHAABAN *et al.*, 2018). Além desses estudos, foram encontrados nas amostras como componentes majoritários α -selineno (16,6%) e α -humuleno (13,3%) para o município de São Paulo, no Estado de São Paulo (ANDRADE *et al.*, 1998);

Nos OEs foliares de *P. gaudichaudianum* desta Tese o biciclogermacreno foi identificado como majoritário. Esse sesquiterpeno não oxigenado foi encontrado também majoritariamente nos OEs de algumas espécies do gênero *Piper*, como por exemplo, *P. aduncum* L. (20,9%) (BERNUCI *et al.*, 2016); *P. amalago* L. (27,9%) (MORANDIM-GIANNETTI *et al.*, 2010); *P. arboreum* Aubl. (49,5%) (NIVICKIENE *et al.*, 2006); *P. cernuum* Vell. (25,1%) (MORANDIM *et al.*, 2010); e *P. manausense* Yunck. (41,0%) (ANDRADE *et al.*, 2005a). O *E*-nerolidol apresentou elevados teores nos OEs de *P. gaudichaudianum* no período da fase reprodutiva. Variações químicas nos OEs das folhas por possível influência fenológica já foram descritas para várias espécies (FARHAT *et al.*, 2016; DAGHBOUCHE *et al.*, 2020; HAZRATI *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2020). Sabe-se que sazonalmente são estabelecidos padrões de alocação de recursos para responder as diferentes demandas fisiológicas associadas ao crescimento, defesa e reprodução (GOMES *et al.*, 2019;

RAMOS *et al.*, 2020). *Piper mollicomum* Kunth, por exemplo, no período vegetativo apresentou-se com teores elevados do monoterpene oxigenado linalol. Quando se estabeleceu o período reprodutivo, a biossíntese foi direcionada para a produção do monoterpene oxigenado 1,8-cineol (RAMOS *et al.*, 2020).

O *E*-nerolidol é um dos principais componentes dos buquês florais noturnos denominados de "imagens olfativas brancas", além de exercer papel importante na proteção contra herbívoros. No último caso, essa substância sob catálise de terpeno-sintases, e subsequente degradação oxidativa do álcool por uma monooxigenase do citocromo P-450, via intermediário, forma o 4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno (DMNT), principal homoterpene responsável pela atração de parasitoides e predadores de herbívoros (BALAO *et al.*, 2011). Além disso, existe na literatura a premissa que a emissão de voláteis induzida por herbívoros seria facilitada pela capacidade de manipular de forma precisa a quantidade e a composição dos voláteis por meio da expressão alterada de genes que codificam etapas em sua biossíntese (PICHESKY; GERSHENZON, 2002). Estudo com *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) demonstrou que os ataques constitutivos de herbívoro levam à ativação de genes para a decodificação da *E*-nerolidol sintase para a produção de DMNT (BOUWMEESTER *et al.*, 1999).

Outro ponto a ser ressaltado refere-se a um estudo que avaliou as variações na herbivoria de *Piper* por espécies do gênero *Eois* (Hübner, 1818) (herbívoros especializados) em diferentes padrões de floresta (secas e úmidas) e variações de fatores abióticos. Destacou-se que a incidência de parasitismo de *Eois* aumentou significativamente com o aumento da precipitação, principalmente em floresta úmida (CONNAHS *et al.*, 2009). Isso direciona para a hipótese de que *P. gaudichaudianum* durante sua história evolutiva, adaptou-se para adquirir essa plasticidade fenotípica química (aumento de *E*-nerolidol) como mecanismo para responder às questões ambientais, que são fruto da pressão ecológica exercida pela herbivoria, como a causada por *Eois*.

Em contraponto, tem-se também descrito na literatura que o reconhecimento da emissão de homoterpene leva à redução da preferência do polinizador ou na eficiência da transferência de pólen (CHAUTA *et al.*, 2017). Outra questão que fortalece a argumentação proposta para *P. gaudichaudianum* é que os voláteis de folhas e flores podem diferir, mas agem sinergisticamente para atrair visitantes. As diferenças na química de folhas e flores não são inesperadas, já que as plantas estão sob seleção para atrair polinizadores para as flores e, contudo, dissuadir os herbívoros das folhas (PARACHNOWITSCH; MANSON, 2015). Em

estudo com *Nicotiana attenuata* Torr. ex S.Watson e *Datura wrightii* Regel (Solanaceae) foi demonstrado que a presença do odor da folha aumenta ainda mais a atração pela mistura de flores polinizadas por mariposa. Essa interação das misturas de flores e folhas pode, portanto, ser vista como uma estratégia para otimizar a mensagem olfativa, e assim, melhorar a orientação da fonte alimentar com base em odores de maneira mais segura e sem risco de atração equivocada (KARPATI *et al.*, 2013).

Durante o dia, outras substâncias do OE de *P. gaudichaudianum* apresentaram alterações nos teores percentuais ao ponto de passar o teor da substância majoritária principal, o biciclogermacreno. Na literatura é descrito que a maioria das plantas emite sinais de voláteis terpenoides ao meio-dia ou no início da tarde, regulados pela luz ou pelo relógio circadiano interno (DUDAREVA *et al.*, 2003). O aumento da radiação proporciona o aumento dos teores e de emissão a partir de estímulo por eliciação nos genes relacionado à biossíntese de sesquiterpenos. Por exemplo, os teores do sesquiterpeno *E*-nerolidol foram aumentados de acordo com a taxa de fluência de radiação UV-B em folhas jovens e maduras de *Vitis vinifera* L. Vitaceae (GIL *et al.*, 2012). Esse fato fortalece a hipótese da função do *E*-nerolidol no processo de proteção de *P. gaudichaudianum*. Além disso, terpenoides foram reconhecidos por seu papel protetor em condições de alta temperatura e outros estresses ambientais (BEHNKE *et al.*, 2010; LORETO *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2020).

No estudo circadiano foi observado que as dinâmicas relacionadas à produção das substâncias foram marcadas pelo mesmo padrão entre o dia e a noite nas duas estações (seca e chuvosa). Observou-se que em alguns momentos do ciclo circadiano existiu o aumento do teor percentual relacionado ao aumento de fatores abióticos, como mencionado anteriormente, o que indica que o relógio circadiano interno também regula a produção e o processamento dos componentes dos OEs. Notório é que as eliciações por fatores abióticos e bióticos podem maximizar ou bloquear a produção dos componentes como respostas fisiológicas ou moleculares, principalmente, aos fatores temperatura, umidade, intensidade e qualidade da luz (ZENG *et al.*, 2017; LIEBELT *et al.*, 2019).

As alterações químicas rítmicas entre os componentes químicos do dia e da noite nos levou a descrever, pela primeira vez, evidências substanciais da formação de um possível **cronotipo** a partir do OE de *P. gaudichaudianum*. O cronotipo está associado à preferência obtida ou observada a partir de determinados comportamentos fisiológicos sincrônicos, principalmente, diferenciados pelos períodos dos dias e das noites. O cronotipo também está

associado a diferenças no tempo entre os vários eventos fisiológicos nas diferentes escalas espaço-temporais (APOSTOL, 2011; SHAWA *et al.*, 2018; HOTTA, 2021).

No estudo circadiano foi observado que as dinâmicas relacionadas à produção das substâncias voláteis a partir dos esqueletos de carbono foram marcadas pelo mesmo padrão entre o dia e a noite nas duas estações. Observou-se que em alguns momentos existiu o aumento da porcentagem relacionada aos fatores abióticos, como mencionado anteriormente, o que indica que o relógio circadiano interno também regula a produção dos precursores e a configuração dos esqueletos de carbono dos componentes dos OEs. Estudos sobre a expressão de genes associados às vias metileritritol-fosfato (MEP) e mevalonato (MEV) demonstraram desempenhar papéis cruciais na modulação do ritmo circadiano (DUDAVERA *et al.*, 2003; 2013; ZHENG *et al.*, 2017).

Portanto, nossos achados despertam para as *possibilidades de alterações nas atividades biológicas e para as indicações no uso popular e ritualístico de P. gaudichaudianum relacionadas a época e hora de coleta.*

Do ponto de vista ecológico, a alteração da composição química em função da hora/mês lança luz para a preocupação na coleta de amostra para obtenção de OEs utilizados na construção de modelos de isca experimental para morcegos (MIKICH *et al.*, 2003; BIANCONI *et al.*, 2007; BIANCONI *et al.*, 2012; LEISER-MILLER *et al.*, 2020). Até o presente momento, sabe-se que a emissão de substâncias voláteis é importante para essas espécies (BIANCONI *et al.*, 2012). Os esqueletos de carbonos dessas substâncias na planta inteira agem como aleloquímicos (cairomonas, alomonas ou sinomonas) que garantem a efetividade das interações interespecíficas nas interações com os receptores celulares. Essa compreensão com *P. gaudichaudianum* nos leva ao questionamento: *a complexidade e rigidez estruturais das substâncias voláteis alteram a sensação olfativa no processo de atração ou repulsão para os mamíferos (principalmente em morcego)?* Existem poucas evidências sobre esse questionamento. Até o presente momento, sabe-se que as características estruturais (padrão de ramificação das cadeias carbônicas, cargas, ligações de carbono não saturadas, entre outras) e os grupos funcionais (ácidos carboxílicos, álcool e aldeídos, por exemplo) presentes alteram significativamente a qualidade do odor perceptível (UCHIDA, 2000; GADZIOLA *et al.*, 2020; MURATA, 2020). Por exemplo, os alongamentos das cadeias carbônicas levam ao surgimento de odores pungentes (MURATA, 2020). Além disso, sabe-se que pequenas alterações enantioméricas e estruturais podem levar ao isolamento sexual e contribuir para o processo de especiação de espécies (WICKER-THOMAS *et al.*, 2011; HEMBRY; WEBER, 2020).

Adicionalmente, foi descrito que duas populações de traças (*Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796)) que vivem em uma mesma região estão sendo isoladas sexualmente por uma modificação em uma dessaturase envolvida na biossíntese de feromônios (WICKER-THOMAS *et al.*, 2011). Portanto, como base em outros estudos, pode-se sugerir que as diferenças dos constituintes químicos voláteis diurnos e noturnos do OE de *P. gaudichaudianum* exerçam alguma influência na interação dessa planta com insetos, mamíferos e pássaros, campo fértil para estudo.

Análises com base no N_{ox} e PO para os dois estudos (sazonal e circadiano), quando comparados os valores com o precursor da respectiva classe química ou tipo de terpeno, registrou-se que as substâncias produzidas mantiveram os números de PO. Apesar de ser amplamente descrita a falta de seletividade das enzimas terpenos sintases (VATTEKKATTE; BOLAND, 2020) e a grande diversificação em esqueletos terpênicos (SAYURI *et al.*, 2010), não houve um aumento no grau de oxidação dos constituintes químicos produzidos. Esse achado foi descrito em um estudo de quimiotaxonomia a partir de terpenoides em Asteraceae (EMERENCIANO *et al.*, 2006) e na análise dos padrões temporais de produção de esqueletos em óleos essenciais de *Baccharis microdonta* Steud. ex Baker e *Baccharis elaeagnoides* DC. (SAYURI *et al.*, 2010). Os estudos descritos anteriormente sobre esse tipo de análise quimiosistemática com base em correlação evolutiva, postulam que a produção e diversidade de metabólitos especializados atingem o máximo em táxons mais evoluídos. No entanto, em grupos que apresentam essas diversificações em metabólitos, a evolução tende a encontrar o equilíbrio oxidativo, mantendo sempre uma ou duas classes não oxidadas. Por exemplo, têm-se os flavonoides/ terpenoides (EMERENCIANO *et al.*, 2006), iridoides (DAS *et al.*, 1987) e limonoides (KAPLAN; GOTTLIEB, 1982). Em outros grupos taxonômicos, as variações podem ser na diversidade de esqueletos produzidos. Em abordagem geral, mesmo em nível hierárquico mais baixo que as Asteraceae, esse fato pode ter ocorrido com *P. gaudichaudianum*. Porém, análise quimiosistemática mais aprofundada merece ser realizada. No entanto, cabe ressaltar, que essa análise quimiosistemática é uma abordagem estática e que se baseia apenas na ausência e na presença de substâncias na mistura. A Teoria Redox desenvolvida por Gottlieb (1989) tem sido amplamente estudada durante décadas, e demonstrou que a evolução de micromoléculas procede por oxidação de substâncias altamente oxidadas. Foi postulado que as vias oxidativas em plantas ocorrem paralelamente a um mecanismo de proteção contra degradação oxidativa, refletido diretamente sobre o papel do oxigênio atmosférico (GOTTLIEB; KAPLAN, 1993). Esses achados levaram ao desenvolvimento e aplicação de metodologias quantitativas estáticas para avaliação dos avanços evolutivos das espécies, a partir

dos padrões de micromoléculas (GOTTLIEB, 1982a; GOTTLIEB; BORIN, 2012; FEITOZA; LIMA, 2020), como discutido na Introdução desta Tese. Notório que as reações redox (Redução-Oxidação) fazem parte do ciclo metabólico das plantas, principalmente, nos processos fisiológicos de respostas plásticas às variações sazonais e sob comando do relógio circadiano (DIETZ; PFAMMSCHMIDT, 2011). Normalmente, esse processo envolve mecanismos químicos complexos. Portanto, avaliar esses padrões de oxidação molecular a partir de uma mistura faz-se necessário para de fato compreender o mecanismo Redox em escala temporal fluida e com base em modelo não-estático. Lançar luz sobre a quantificação do metabólito em uma mistura é o primeiro passo para ponderar esse grau de oxidação desenvolvido nesta Tese pelos cálculos dos índices NO_R e IE_{OR} .

Nestes índices deve-se atentar para a necessidade de padronização da técnica de quantificação aplicada (por exemplo, CG-EM, CG-DIC, CLAE-EM e CLUE-EM) para permitir a comparação dos dados e garantir a melhor quantificação para reduzir os resultados interferentes. O cálculo falha se a comparação do IE_{OR} é feita entre amostras que foram quantificadas usando diferentes metodologias. Esse índice é explicado por quanto maior o valor obtido (mais próximo de zero), maior a oxidação das substâncias da mistura e vice-versa; quanto mais distante um valor está do zero, maior é a redução.

O IE_{OR} , conceitualmente, podem ser aplicados amplamente em ecologia, química pura e desenvolvimento de produtos (autenticação). Por exemplo, em ecologia química em nível da α -quimiodiversidade, pode prever e explicar um padrão sobre mudanças no metabolismo induzidas por fatores abióticos e ontogênicos, bem como interações em nichos ecológicos. No nível da β -quimiodiversidade, o IE_{OR} permite correlacionar e explicar fenômenos relacionados às flutuações adaptativas do metabolismo especial dos espécimes em diferentes locais. Finalmente, em nível da quimiodiversidade γ , este índice ajuda a compreender as mudanças ao nível interespecies que ocorrem pela sucessão ecológica.

O estudo circadiano e sazonal do OE de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* demonstrou valores de IE_{OR} que descrevem o movimento natural metabólico e que se direciona para um possível equilíbrio redox ao longo do dia. Além disso, esses valores de IE_{OR} fortalecem a hipótese de proteção que os metabólitos especializados exercem em condições de estresse para minimização das formações de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Todas essas variações têm como intuito garantir o pleno funcionamento e manutenção da fisiologia vegetal (DIETZ; PFANNCHMIDT, 2011; JIMÉNEZ *et al.*, 2021).

Estudo comparando os efeitos de adaptação e danos causados em folhas de uvas demonstrou que o metabolismo dos isoprenoides foi modulado seguindo taxas de UV-B. Além disso, esse estudo associou os danos causados à geração de ROS pelo aumento de energia de excitação (GIL *et al.*, 2012). Na literatura é descrito que os terpenoides voláteis (monoterpenos e sesquiterpenos) são rapidamente combinados com ROS e que essas reações são estimuladas por mudanças nas condições de luz e temperatura (GIL *et al.*, 2012; JAISWAL; AGRAWAL, 2021). Portanto, nossos achados são compatíveis com esses dados.

Igualmente, os dados obtidos com os valores de IE_{OR} em um nível macro metabólico corroboram com a Teoria Redox, que postula que em nível de oxidação no metabolismo especializado requer a existência de sistemas antioxidantes binários. Ou seja, existirá uma balança para garantir uma proporção de classes de substâncias no sistema que podem variar em quantidade (abundância) ou em poder redutor (alto potencial), no intuito de atingir o “poder redutivo geral”, considerada como uma homeostase metabólica (GOTTLIEB; KAPLAN, 1993).

Assim, conseguimos provar o conceito de que um novo índice (IE_{OR}) é extremamente útil para avaliar misturas complexas em escalas de tempo-espço e que este é totalmente compatível com a Teoria Redox. Seu uso trará enormes benefícios às discussões acerca de, por exemplo, por que uma determinada espécie vegetal tem enormes gastos energéticos para modificar sua composição química volátil ao longo de 24h, de meses, de anos?

Os quimiotipos em *P. gaudichaudianum* são derivados das diversas interações ecológicas dessa espécie. *Thymus vulgaris* L. (tomilho), espécie pioneira e invasora em muitos países, apresentou modulações fenotípicas químicas nos terpenos presentes nos OEs em diferentes posições geográficas e em avaliação sobre o efeito de borda de mata. Foi descrito que a resposta plástica química estava relacionada, principalmente, aos fatores ambientais e que o mecanismo mais importante para sucesso da invasão na borda de mata está associado à presença do quimiotipo de carvacrol (NIELSEN *et al.*, 2014), favorecendo argumento para diversificação espacial dos quimiotipos presentes em *P. gaudichaudianum*, que também tem características pioneiras. A existência de quimiotipos em Piperaceae vem sendo descrita nos últimos dez anos (TESCHKE *et al.*, 2011; MONZOTE *et al.*, 2017; SALEHI *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2020).

As composições químicas dos OEs das espécies cultivadas em *P. gaudichaudianum* em ambiente controlado foram obtidos pela primeira vez. Esse resultado contribui principalmente para o uso medicinal e ritualístico de comunidades religiosas Afro-brasileiras, que cultivam

espécies silvestres em torno de seus espaços sagrados. Além disso, esses espécimes de matriz servem como o principal meio de replicação nas hortas caseiras dos profissionais e podem, teoricamente, alterar o efeito terapêutico esperado das espécies selvagens (FATUMBI, 1995; GUEDES *et al.*, 1985). Ressaltamos que existem vários fatores que alteram a composição química dos OEs, por exemplo abióticos e bióticos (SANGWAN *et al.*, 2001). A diferença de idade entre as três espécies cultivadas e silvestres estudadas é um fator limitante e deve ser explorado em maior escala de tempo. No entanto, as diferentes respostas plásticas obtidas pelas espécies estudadas refletem a complexidade do mecanismo envolvido. *Satureja hortensis* L., popularmente conhecida no mediterrâneo como *garden savory*, apresentou nas espécies cultivadas uma composição rica em monoterpeno carvacrol e na silvestre o timol (BASER *et al.*, 2004). Além disso, sabe-se que a seleção leva a mudanças microevolutivas na composição e na diversidade de metabólitos especializados, que podem ocorrer em apenas algumas gerações em escalas de tempo relevantes para interações ecológicas e formas de cultivo. O fornecimento de safras em gerações é uma ferramenta importante para a determinação de características fenotípicas permanentes em espécies, principalmente, no processo de determinação e diferenciação de quimiotipos e geotipos, respectivamente (KESSLER; KALSKE, 2018; GERVASI; SCHIESTL, 2017; AGRAWAL *et al.*, 2012).

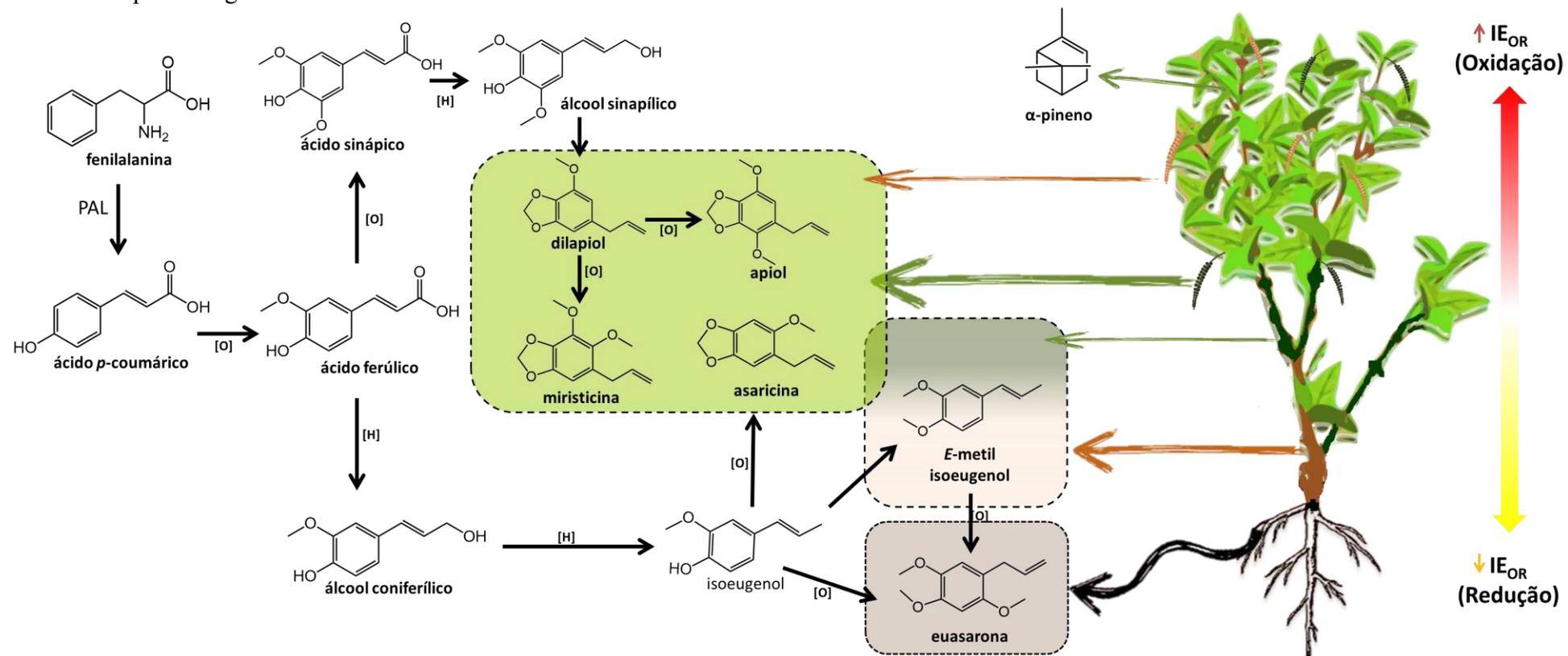
Os OEs dos diferentes órgãos de *P. multinodum* apresentaram diferentes composições químicas qualitativa e quantitativa. Os diferentes perfis de expressão gênica em diferentes órgãos são esperados, conseqüentemente, a produção de enzimas pode ser favorecida de uma forma mais expressiva em alguns tecidos em relação a outros (HAJDARI *et al.*, 2016), bem como cada estrutura vegetal possui diferentes características de lignificação (morfológicas) e funções ecológicas (atração de polinizadores, defesa contra patógenos e herbivoria) (ABBAS *et al.*, 2017). Os perfis que levam a distinção de vias biossintéticas nos órgãos foram observados para *Piper mollicomum* (RAMOS *et al.*, 2020), no entanto, é a primeira vez que é descrito para *P. multinodum*. Esses achados são importantes para compreensão dos conhecimentos quimiofenéticos, como também, para abordagens clássicas em quimiotaxonomia no gênero *Piper*.

Nos órgãos aéreos (galhos, folhas, inflo- e infrutescências) de *P. multinodum* a substância majoritária foi identificada como α -pineno. No gênero *Piper*, OEs foliares têm sido obtidos com teores percentuais elevados dessa substância, por exemplo, *Piper aequale* Vahl (39,3%) (SETZER *et al.*, 2008); *P. amalago* L. (30,5%) (POTZERNHEIM *et al.*, 2006); *P. anonifolium* Kunth (53,1%) (ANDRADE *et al.*, 2005b); *P. lucaeanum* var. *grandifolium*

Yunck. (30,0%) (MARQUES *et al.*, 2015); e *P. rivinoides* Kunth (73,2%) (PERIGO *et al.*, 2016). O arilpropanoide *E*-metil isoeugenol foi identificado nos caules principais e em teores mais baixos nos galhos (caules secundários) de *P. multinodum*. Esta substância também foi encontrada no OE de folhas de *Piper marginatum* Jacq. (27,1%) (SANTANA *et al.*, 2015). O isômero configuracional do *E*-metil isoeugenol foi identificado em altos teores no OE de *Piper divaricatum* G. Mey. (63,8 - 93,3%) (SILVA *et al.*, 2010; 2012; 2014). Estudos ecológicos mostram sistematicamente o papel do *E*-metil isoeugenol na atração de moscas-das-frutas, principalmente, *Bactrocera* (Macquart, 1835) e na defesa contra herbívoros (TAN; NISHIDA, 2012; ROYER *et al.*, 2018). Ressaltamos que os principais polinizadores em Piperaceae são as espécies da ordem Diptera (FIGUEIREDO; SAZIMA, 2000).

Outro arilpropanoide identificado no OE das raízes foi a eusarona (γ -asarona/isoasarona). No gênero *Piper* são descritos baixos teores dessa substância, por exemplo, na espécie de *Piper sarmentosum* Roxb., amplamente utilizada na Ásia para tratamento de tosse, resfriado, febre, reumatismo, artralgia, diarreia, disenteria, inchaço pós-parto nos pés, dor de estômago, dor de dente, diabetes e lesões traumáticas (QUI *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2020). Adicionalmente, essa substância é abundante em raízes de espécies medicinais de angiospermas basais, como a asiática *Acorus calamus* L. (25,4%) (VETELÄINEN, 2021) e nos troncos de *Aniba hostmanniana* (Nees) Mez (98,6%) (Lauraceae) da América tropical (GOTTLIEB; ROCHA, 1972). Além disso, seus isômeros α e β -asarona são amplamente estudados, devido efeitos sedativos, hipolipidêmicos, imunossupressores, antiinflamatórios, antioxidantes, diuréticos, inseticidas, antifúngicos, anticâncer, antiespasmódicos e anticonvulsivantes (BELOVA *et al.*, 1985; CHELLIAN *et al.*, 2017; BAI *et al.*, 2020). Estudos comparativos entre os isômeros realizados por Berg e colaboradores (2016) demonstraram, pela primeira vez, que a γ -asarona não é mutagênica, em contraste com uma ampla variedade de congêneres estruturalmente semelhantes, que também ocorrem em alimentos e medicamentos fitoterápicos. Em contraponto, os isômeros propenílicos α - e β -asarona foram mutagênicos na presença de um homogenato de fígado metabolicamente ativo.

Figura 77- Relação biossintética entre arilpropanoídeos em *Piper multinodum* do metabolismo especializados e sua diferenciação nas diferentes partes vegetativas analisadas.



As análises dos OEs das diferentes partes vegetais de *P. multinodum* nos permitiu observar a existência de correlações biossintéticas, levando-nos a propor o esquema da figura 77. Gottlieb e colaboradores (1996) descreveram a existência de uma relação antagônica entre as vias do mevalonato e do chiquimato, em uma relação inversamente proporcional. Esse fato explica a predominância de monoterpenos (vias do MEP e MVA) nas partes aéreas e sua redução significativa ao longo do tempo, bem como a predominância de arilpropanoides (via do chiquimato). Notoriamente, espera-se que a rota biossintética seja cancelada, e os produtos gerados pelo chiquimato sejam totalmente consumidos no processo de dimerização, por meio de acoplamento oxidativo radicalar para a formação de lignanas e/ou neolignananas (KATO; FURLAN, 2007; DEWICK, 2002).

A formação após a conversão da fenilalanina em ácido *p*-cumárico e posterior oxidação leva ao ácido ferúlico. Esse último poderá ser oxidado ou reduzido, podendo formar dois diferentes produtos, álcool sinapílico ou álcool coníferílico, respectivamente. Na proposta para as partes mais aéreas (folha, inflorescência e infrutescência), o ácido sinápico tem possível preferência de formação. Esse é convertido em álcool sinapílico por meio de oxidação (O_2), seguido de metilação por ativação do cofator enzimático S-adenosilmetionina (SAM). Em seguida, os produtos sofrem reduções pela ação enzimática do cinamiol-CoA (CCR) e álcool cinamílico desidrogenase (CAD). Nas partes inferiores (caule e raízes) o ácido ferulílico passa por redução a um aldeído (coniferaldeído) pela enzima CCR e seguida por CAD, formando o álcool coníferílico; seguido pela formação por redução em isoeugenol. Esse último é metilado para formar *E*-metil-isoeugenol nos galhos. Por meio da oxidação no carbono 4, seguido de metilação é formado a eusarona. A formação do grupo metilenodioxílico nos arilpropanoides é predominante na inflorescência. Muitas vezes esses anéis são formados por enzimas da superfamília do citocromo P450 (KATO; FURLAN, 2007; DEWICK, 2002).

Os dados do IE_{OR} de diferentes órgãos demonstram um gradiente redox das folhas (misturas mais oxidadas) em direção às raízes (misturas mais reduzidas) (Figura 77). As diferentes funções desempenhadas pelos órgãos levam a diferentes expressões enzimáticas e, conseqüentemente, refletem-se nos valores de IE_{OR} das misturas. Alguns pontos para *P. multinodum* devem ser destacados: 1) As folhas são o principal órgão de respiração e fotossíntese, portanto, produzem mais espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio; 2) As raízes são o principal órgão de fixação (função estrutural) da espécie ao solo para a absorção de substâncias essenciais (água e micronutrientes), como também se encontram em maior contato

com a microbiota do solo; 3) Sabe-se que nos OEs as vias do isopreno (acetato-mevalonato e metilertrose fosfato) geram produtos mais oxidados em relação à via do chiquimato, que produzem substâncias mais reduzidas (DEWICK, 2002); (4) O OE de raízes de *P. multinodum* é rico em substâncias da classe dos arilpropanoides que são “blocos de construção” e facilmente convertidos em outras substâncias, como lignanas e ligninas. Essas substâncias são essenciais para a vascularização (xilema), rigidez, defesa contra o ataque microbiano (fitoalexinas) e na interação planta-micróbio (EMILIANI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2020; VRIES *et al.*, 2021). *Face a essas considerações, por que existem diferenças redox entre os diferentes órgãos de P. multinodum?* **Primeiramente**, em discussões anteriores com *P. gaudichaudianum* foi destacado o papel de metabólitos especiais contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (JIMÉNEZ *et al.*, 2021). Para entender a discussão central no que tange as diferenças oxidativas apresentadas, é possível elencar dois ambientes para *P. multinodum*, um (1) com maior tensão de oxigênio (hiperóxia) no qual as partes aéreas (folhas) se encontram, e outra, (2) com menor tensão de oxigênio (hipóxica) caracterizada por partes subterrâneas (raízes). Ao longo da evolução, essa tendência à hiperóxia levou a uma diversificação na direção de gerar metabólitos mais oxidáveis, criando um equilíbrio entre produção e acúmulo com função de proteção em diferentes compartimentos do vegetal. Nesse sentido, há de se considerar compartimentos na mesma planta com alta produção para acúmulo de metabólitos e outro com produção sustentada para consumo imediato (GOTTLIEB, KAPLAN, 1993; MAEDA; FERNIE, 2021). **Como segunda** consideração para responder ao questionamento, podemos lançar mão do estudo realizado por Rogge e colaboradores (1998). Os autores descreveram características do metabolismo respiratório de raízes em florestas tropicais. Em um ambiente com hipóxica há uma mudança da rota metabólica aeróbia para a rota anaeróbia, na qual, CO₂ e uma baixa quantidade de ATP são produzidos e como recurso de compensação há uma aceleração da glicólise e acúmulo de fitotóxicos (etanol, lactato e acetaldeído). Essa aceleração da glicólise desencadeia uma diversificação de substância, resultando no aumento dos precursores de vias presentes nos plastídios, como o ácido chiquímico e o fosfato de metilertrose, substratos iniciais da via de produção de arilpropanoides e monoterpenos. Sabe-se que o metabolismo evoluiu em certos ambientes (antigos), inicialmente mediado por reações não enzimáticas que auxiliavam na proteção contra xenobióticos (MAEDA; FERNIE, 2021). No entanto, com a especialização do metabolismo e seleção natural, nesse ambiente que são geradas grandes quantidades de substâncias fitotóxicas, a biossíntese provavelmente favorecerá a produção de substâncias com

maior potencial oxidável (substância reduzida) e / ou com capacidade de capturar / quelar outras substâncias com potencial fitotóxico (de maneira não enzimática). **Portanto**, a produção de misturas mais reduzidas pelas raízes sugere a possibilidade dessa diferença ser resultado da história evolutiva de *P. multinodum*, **derivada da hipóxia, proteção contra patógenos e agentes estimuladores**. Essa argumentação permite a construção de uma hipótese de proteção múltipla que *estende a relação causa-efeito para o acúmulo, consumo e produção de blocos de construção na biossíntese*. Esse argumento para *P. multinodum* poderia explicar a mesma ocorrência para algumas espécies do gênero *Piper* que apresentam composições de OE diferentes entre as raízes e folhas, como *Piper aduncum* L. (PACHECO *et al.*, 2016), *P. mollicomum* Kunth (RAMOS *et al.*, 2020), *P. sarmentosum* Roxb (HEMATPOOR *et al.*, 2017) e *P. marginatum* Jacq. (BAY-HURTADO *et al.*, 2016).

No período do estudo sazonal os teores de monoterpenos foliares foram maiores nos meses relacionados a reprodução, no entanto, no período mais seco e com a espécie em estado reprodutivo com inflorescência, apresentaram os maiores teores no período da noite. Para *P. gaudichaudianum* foi descrito, extensivamente, a função exercida dos terpenoides na comunicação planta-animal, planta-planta, planta-microorganismo e planta-inseto. Para Piperaceae há importância ecológica para morcegos, mariposas e lepidópteros. Na literatura é sugerido que os monoterpenos nas gimnospermas e angiospermas evoluíram, principalmente, para dissuasão de herbívoros e a atração de polinizadores. No entendimento de alguns autores essa seria uma função secundária. Como demonstrado na introdução desta Tese, esta hipótese é apoiada pela presença, sugerida, de muitos monoterpenos no ancestral de todas as plantas com sementes, muito antes da radiação das plantas com flores. É importante ressaltar que os monoterpenos não foram uma novidade evolutiva associada à origem e evolução das flores. Algumas substâncias de perfume floral não são produzidas exclusivamente por flores, mas também são encontrados em outras partes vegetais (SCHIESTL, 2010; PARACHNOWITSCH; MANSON, 2015). Nota-se também que essas substâncias podem exercer funções duplas: dissuasão e atração (HEIL, 2008; SCHIESTL, 2010). Isso poderia explicar porque muitas vezes são encontrados os mesmos monoterpenos em folhas e flores. Porém, a emissão floral poderia apresentar padrões com modificações significativas, e a presença de derivados de C₆-C₃ nas inflorescências de *P. multinodum* poderá ser um indicativo da participação do boque floral na atração de polinizadores e facilitar o direcionamento para esse órgão reprodutivo. No entanto, precisa ser melhor investigado.

O α -pineno e o esqueleto carbono pinano apresentaram teores elevados (15%- 64%) ao longo dos dois estudos com *P. multinodum*. Esse é um monoterpeneo bicíclico com diversas aplicações industriais em alimentos, medicamentos e cosméticos. Muitas atividades farmacológicas para esta substância já foram descritas, tais como antibacteriana, antifúngica, antileishmania, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, antiapoptótica, apoptótica, antitumoral, antimetastática, gastroprotetora, inseticida, nematocida e neuroprotetora. Este hidrocarboneto cíclico é usado na indústria de química fina como uma unidade na síntese de α -terpineol, limoneno, borneol e, finalmente, a terebintina que é usada na produção de aziridinas, aminas secundárias aplicadas e ésteres de oxima, funcionais como herbicidas e inseticidas (WEI et al., 2020; ALLENSPACH; STEUER, 2021). *P. multinodum* é uma fonte promissora de pineno, que pode garantir esses potenciais industriais.

Variações nos fatores abióticos (precipitação, umidade, temperatura e micronutrientes do solo) se correlacionaram com os teores de α -pineno e seu isômero β . Foi mencionado anteriormente que o estresse ambiental leva à depressão fotossintética e mudanças consecutivas nos precursores terpenoídicos (MARČETIĆ et al., 2017, RAMOS et al., 2020). As variações maiores nos teores de α -pineno na estação chuvosa e seca ocorreu onde existe maior amplitude térmica, o que pode ser explicado pelas alterações médias da temperatura, provando a influência do estresse por calor, no qual, em valores moderados, fornecem inibição reversível da atividade fotossintética; enquanto o estresse severo leva a uma redução sustentada na fotossíntese, conseqüentemente, alteram a disponibilidade de precursores para produção de isoprenoides (DEWICK, 2002, ORMENO et al., 2007; MARČETIĆ et al., 2017, RAMOS et al., 2020). É amplamente conhecido que a temperatura regula a atividade enzimática das sintases de isopreno e terpeno-sintases. Esse estresse proveniente da temperatura a longo prazo, alteram os padrões de expressão gênica, resultando na produção quantitativa de enzimas. Por meio do movimento dos estômatos, a temperatura e a umidade afetam a respiração e podem regular indiretamente a quantidade de piruvato disponível. A qualidade da luz (disponibilidade de luz) também determina a quantidade de gliceraldeído-3-fosfato produzida pela fotossíntese e também controla a disponibilidade de energia (ATP e NADPH). Ressaltamos que, além de tudo isso, há compartimentação biossintética na produção de terpenoides: monoterpeneos produzidos em plastídios e sesquiterpenos produzidos no citosol. Essa compartimentalização por si só regula a disponibilidade do substrato, causando proporções quantitativas diferenciadas em função dos fatores abióticos e bióticos (DEWICK, 2002, ORMENO et al., 2007; MARČETIĆ et al., 2017,

RAMOS *et al.*, 2020). Os teores de α -pineno apresentaram tendências diferentes entre as duas estações. Na estação chuvosa registrou-se os menores teores percentuais nas noites e os maiores durante o dia. Na estação seca registrou-se o oposto. *Por que a produção de α -pineno entre os dias e as noites nas estações seca e chuvosas foram antagônicas em *P. multinodum*? Algumas considerações devem ser feitas para responder a essa pergunta: 1) A alocação de recursos para o metabolismo (efeito de dreno) em decorrência dessa espécie estar na fase reprodutiva (floração) na estação seca; 2) A combinação entre as diferentes amplitudes térmicas com outros fatores abióticos (radiação, umidade e temperatura) nas estações diferentes.*

A relação α -pineno *vs.* fatores climáticos não é novidade na literatura científica: *Juniperus excelsa* M.Bieb. (Cupressaceae), que compõe OE de zimbro (junípero) comercial, utilizado principalmente nas regiões montanhosas do Irã, possui em sua composição o α -pineno (14- 50%) como majoritário (SHANJANI *et al.*, 2010). Estudo realizado por Shanjani e colaboradores (2010) demonstram que no período mais seco a composição deste majoritário caiu cerca de 70% do total do período em relação ao mais chuvoso. Na espécie *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) estudos demonstraram que a quantidade de α -pineno aumenta à tarde e diminui à noite em uma proporção de 30 a 50%. No Sul da Finlândia, no mês de setembro, os maiores teores de α -pineno foram registrados por volta de 12h e o teor mínimo foi notado no início da manhã (BECK *et al.*, 2004). KOPACZYK e colaboradores (2020) em uma revisão sobre variações química em coníferas descreveram que vários estudos sobre os efeitos da luz, da umidade e da temperatura na biossíntese e emissão de terpenos, também deram resultados ambíguos. Em algumas espécies de *Pinus pinaster* Aiton e *Picea abies* (L.) H. Karst. a síntese de α - e β -pinenos é ativada com a maior incidência de luz e temperatura (KOPACZYK *et al.*, 2020). Esse fator justificaria os altos teores desses isômeros na estação seca. Por outro lado, um estudo sobre *Pinus elliottii* Engelm. não mostrou diferenças significativas nas taxas de emissão de monoterpenos sob vários tratamentos, de temperatura, luz ou no escuro (KOPACZYK *et al.*, 2020).

Os micronutrientes dos solos apresentaram correlações ao longo do ano com os componentes principais. Foi possível correlacionar os teores de α - e β -pinenos negativamente com o teor de potássio e positivamente com o teor de alumínio, cobre, ferro, manganês e nitrogênio. Para compreensão dos dados é importante estabelecer a primeira premissa: os níveis dos componentes do solo podem diferir dos níveis de nutrição tecidual das plantas, pois envolvem dinâmica de fixação/absorção e distribuição fisiológicas. No entanto, esses dois

podem correlacionar-se de maneira discreta (FERNANDES *et al.*, 2017). Por exemplo, a melhora nos níveis de nitrogênio, potássio e fósforo no solo leva a um acúmulo de carboidrato e a um aumento das taxas fotossintéticas que podem proporcionar a diminuição de terpenos (KHALID, 2015). Alumínio, boro, cobre e zinco, denominados oligoelementos, são considerados componentes-chaves em muitos processos biológicos e desempenham papel significativo para o aumento da fotossíntese, absorção da radiação fotossintética ativa e consequentemente na produção de terpenoides (VUWANI *et al.*, 2017). Dias e colaboradores (2021) descrevem que cátions, como manganês, estão relacionados a cofatores de enzimas sintases. No entanto, a sesquiterpeno sintase usa preferencialmente magnésio e as enzima monoterpene sintase são menos seletivas para cátions divalentes. Ainda, é descrito que os cátions podem competir uns com outros, quando existe a diminuição de zinco e ferro e o aumento de manganês (LEFÈVRE *et al.*, 2014). Porém, alguns estudos indicam que nem sempre as alterações nas características do solo podem levar a alterações químicas nas plantas, por exemplo, para *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) e *Rosmarinum officinalis* L. (Lamiaceae) de habitats naturais com diferenças significativas nas concentrações de nutrientes do solo, mostraram que não houve dependência na quantidade de α -pineno (LOŽIENĚ; LABOKAS, 2012; HENDAWY *et al.*, 2017). No entanto, em *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) os teores de α -pineno e limoneno foram elevados no OE de folhas e frutos em solos calcários; e em solos siliciosos houve aumento de linalol, acetato de linalila e acetato de Z-mirtanol (FLAMINI *et al.*, 2004).

Em estudo realizado pelo nosso grupo em dois diferentes acessos no Cerrado Brasileiro com a espécie *Piper aduncum* L. (Piperaceae), foi demonstrado que a composição química do OE da planta pode apresentar alterações químicas, em relação aos constituintes majoritários 1,8-cineol ou Z-ocimeno *vs.* solo das localidades. Quando *P. aduncum* dos dois acessos diferentes foi submetida ao mesmo sistema de cultivo, o OE apresentou como componente majoritário apenas 1,8-cineol. Foi sugerido que as alterações nesta composição química são provenientes das alterações nos valores de pH e do nível de potássio do solo. Dessa forma, é precipitado considerar que a composição do solo *per se* altera a composição da mistura volátil. No entanto, considerando os exemplos anteriores, é certo que as características do solo podem alterar a composição química. Análises mais sofisticadas que combinem a composição de microelementos do solo com os microelementos encontrados no órgão vegetal de análise podem

permitir correlações mais robustas. Para tanto, equipamentos como difratômetro de raio-X (DRX) são fundamentais.

O uso de medicamentos para o tratamento da tuberculose é o mesmo há décadas. O número de resistência tende a aumentar levando a um aumento na busca por novos protótipos, sendo de interesse os provenientes de produtos naturais. Os resultados encontrados para *P. multinodum* são extremamente relevantes, sendo registrados valores de CIM abaixo de 100 µg/mL. É descrito que CIM < 100 µg/mL tornam o extrato, fração ou substância isolada candidatos ideais contra *M. tuberculosis*, enquanto valores entre 100 a 200 µg/ mL são considerados candidatos moderados (BERNUCI *et al.*, 2016).

Nos dados apresentados para *P. multinodum*, a presença de arilpropanoídes e eusarona foi significativa para o aumento da atividade antimicobacteriana. Um estudo contra a cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv demonstrou que uma mistura de arilpropanoídes (taiwaneses A e B) isoladas de *Piper taiwanese* Lin & Lu, apresentou CIM de 30,0 µg/ mL (CHEN *et al.*, 2014). Amostras ricas em sesquiterpenos não oxigenados de *Piper cernuum* Vell., *P. diospyrifolium* Kunth, *P. mosenii* C. DC. e *P. rivinoides* Kunth, com teores relevantes de *E*-cariofileno (9 - 10%) demonstraram valores de CIM entre 125 e 250 µg/ mL (BERNUCI *et al.*, 2016). Esta atividade biológica é descrita para a eusarona (> 80% no OE), pela primeira vez. Observando-se os conjuntos de dados, é possível criar algumas hipóteses para explicar os resultados:

- a) Metoxilações em anéis aromáticos são importantes e diminuem a atividade. Essa hipótese é resultado da atividade obtida da mistura com *E*-metil-isoeugenol, onde esse é majoritário. A CIM diminui com a diminuição dessa substância, como nas amostras dos OEs obtidas das raízes e inflorescências;
- b) A presença de grupos metilenodioxílicos na substância é importante para melhoria da atividade antimicobacteriana. Os teores (~24%) de arilpropanoídes com anel metilenodioxílico no OE demonstrou atividade em 85,9 µg/mL. Isso indica que maiores teores de substâncias com padrão de substituição de grupos metilenodioxílicos poderão melhorar significativamente a CIM.

Andrade-Ochoa e colaboradores (2015) estudaram a relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR) com vinte e cinco substâncias puras de OEs comerciais. Esse estudo concluiu que a razão de partição octanol-água (LogP_{o/w}) e o grupo fenólico (nArOH) como as principais propriedades e elementos estruturais que contribuem para a atividade antimicobacteriana. O cinamaldeído e o ácido cinâmico foram os arilpropanos mais ativos com valores de MIC de

3,12 e 8,16 $\mu\text{g/mL}$, nesse estudo. Como mencionado anteriormente, esses são precursores para formação da eusarona e *E*-metil-iso Eugenol. Investigações futuras poderão testar padrões de análogos $\text{C}_6\text{-C}_3$, isolados ou em mistura, e os resultados obtidos poderão ser comparados com os dos OEs.

Existe um aumento de esforços em bioprospecção para identificar novos agentes antifúngicos, principalmente, com a necessidade de combater a resistência microbiana (SILVA *et al.*, 2017). Sobretudo, quando essa busca está associada a necessidade de diminuição da toxicidade nos tecidos saudáveis e aumento da ação terapêutica (ALMEIDA *et al.*, 2017). *C. glabrata* é considerado fungo não patogênico em pessoas normais, sem relação com infecções graves em humanos. O uso abusivo e difundido de agentes imunossupressores e antibióticos de amplo espectro estão aumentando drasticamente o número de infecções sistêmicas e micóticas causada por esse agente (MACÊDO-ANDRADE *et al.*, 2018, ALDEJOHANN *et al.*, 2021). Nesta Tese demonstramos que a atividade contra *C. glabrata* resistente a fluconazol apresentou variações que se correlacionaram com variações químicas decorrentes dos fatores sazonais. As atividades do α -pineno e monoterpênos não oxigenados apresentaram uma relação inversa (diretamente proporcional ao aumento do IC_{50}) com a melhora da atividade biológica. No entanto, o monoterpêno não oxigenado δ -3-careno e os sesquiterpênos não oxigenados β -longipineno e γ -elemeno tiveram correlações significativas e teores muito baixos no OE (5 a 10%).

Estudo do grupo com OE de *Casearia sylvestris* Sw. (Silicaceae) rico nos sesquiterpênos α -humuleno e hidróxi-9-*epi*- β -cariofileno, apresentou boa ação contra *C. glabrata* (PEREIRA *et al.*, 2017). Os OEs da espécie *Hornstedtia havilandii* (K.Schum.) K.Schum (Zingiberaceae) com composição rica em β -pineno, (19,5%), β -elemeno, (10,0%), β -cubebeno, (6,2%) e α -pineno, (5,6%) apresentaram atividade muito fraca contra *C. albicans* e *C. glabrata*, com valores de MIC de 900–1800 $\mu\text{g/mL}$ (HASHIM *et al.*, 2014). Macêdo-Andrade e colaboradores (2018) analisaram os enantiômeros (R) e (S) β -pineno contra *Candida* spp. Os resultados demonstraram que os valores de CIM variaram de $< 56,25$ a 1800 $\mu\text{mol/L}$. No entanto, no mês de novembro (período de maior atividade) não possuía teores de β -pineno com valores detectáveis. Estudo comparando os OEs de três espécies do gênero *Juniperus* ricos em α -pineno contra cepas de dermatófitos (*Aspergillus* e *Candida*) descreveu que o OE das folhas de *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* foi o mais ativo (α -pineno (65,5%), δ -3-careno (5,5%)). Das amostras testadas, apenas esse OE ativo possuía na composição o monoterpêno bicíclico δ -3-

careno. Os autores descrevem esse componente como fundamental para atividade. Esse trabalho descreve ainda, as atividades das substâncias isoladas contra *C. glabrata* D10R, demonstrado que o δ -3-careno possui atividade sete vezes maior que α -pineno (CAVALEIRO *et al.*, 2006). Esses dados podem respaldar os resultados encontrados para *P. multinodum* já que a atividade biológica é aumentada de acordo com o aumento do teor desse constituinte.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pela análise de óleos essenciais foram descritas pela primeira vez uma alta plasticidade fenotípica química em diferentes escalas de tempo e de espaço para *Piper gaudichaudianum* e *Piper multinodum*.

No caso de *P. gaudichaudianum*, o ritmo sazonal influenciou o rendimento e a composição dos óleos essenciais foliares, sendo possível correlacionar alterações na composição química em diferentes estágios fenológicos e sob diferentes fatores abióticos e bióticos. As variações significativas nos óleos essenciais na comparação entre dia e noite evidenciou a ocorrência de um possível padrão de **cronotipo**, descrito pela primeira vez no gênero *Piper*. Com base na análise dos esqueletos de carbono dos nove possíveis quimiotipos evidenciados para *P. gaudichaudianum*, foi demonstrado que a maioria das diversificações é centrada nos derivados biogénéticos ou substâncias com esqueleto do tipo germacrano ou humulano. Embora tenha sido identificado um gradiente biossintético longitudinal e latitudinal quantitativo de substâncias com esqueletos de carbono germacrano em direção ao aromadrendrano, os dados não evidenciam a ocorrência homogênea espacial nos fenótipos químicos nestes gradientes.

Considerando *P. multinodum*, a composição química dos óleos essenciais de diferentes órgãos e suas variações circadianas e sazonais, caracterizadas pela primeira vez para a espécie, demonstram distinção das vias biossintéticas envolvidas, o que constitui dado significativo para a compreensão do conhecimento quimiotaxonômico no gênero *Piper*. Essa variação química nos diferentes órgãos também foi refletida em variações de atividade contra micobactéria e contra *Candida glabrata* resistente ao fluconazol.

As distintas características ecológicas e químicas de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum*, evidenciadas pelas análises dos óleos essenciais, refletem diretamente a diversidade química em Piperaceae e a necessidade de compreensão do mecanismo que leva a essa diversidade. Os novos índices para análise de misturas com base na quantificação dos componentes do óleo essencial foliar de *P. gaudichaudianum* e *P. multinodum* permitiu inferir sobre equilíbrio redox em diferentes escalas temporais.

Dessa forma, o viés metodológico desenvolvido neste estudo levou a resultados inéditos, inovadores e bastante expressivos, podendo servir de estímulo para estudos futuros com outras

espécies da família Piperaceae. Os dados proporcionam ainda evidências com significância ecológica, quimiosistemática e quimiofenética para o manejo e conservação dessas espécies medicinais e ritualísticas utilizadas pela população brasileira. Fica evidente que os estudos químico e biológico de espécies vegetais com potencial medicinal ou uso ritualístico devem ser contextualizados em uma visão mais ampla, no tempo e no espaço, e não em escala estática, a partir de coleta única, pois o ser vivo é vida, e vida É QUÍMICA!

REFERÊNCIAS

- ABBAS, F.; KE, Y.; YU, R.; YUE, Y.; AMANULLAH, S.; JAAHNGIR, M. M.; FAN, Y. 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 spectroscopy**. Ed. IV Allured Bus. Mul, Carol Stream, Illinois, USA, 2009.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 5 online ed, 2017.
- AGRAWAL, A. A.; HASTINGS, A. P.; JOHNSON, M. T.; MARON, J. L.; SALMINEN, J. P. Insect herbivores drive real-time ecological and evolutionary change in plant populations. **Science**, v. 338, n. 6103, p. 113-116, 2012.
- AHMAD, N.; FAZAL, H.; ABBASI, BH.; FAROOQ, S.; ALI, M; KHAN, MA. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1945-S1953, 2012.
- ALBIERO, A. L. M.; SOUZA, L. A.; MOURAO, KSM; de ALMEIDA, O. J. G.; LOPES, W. A. L. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 4, p. 550, 2005.
- ALDEJOHANN, A. M.; HERZ, M.; MARTIN, R.; WALTHER, G.; KURZAI, O. Emergence of resistant *Candida glabrata* in Germany. **JAC - Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 3, p. dlab122, 2021.
- ALLENSPACH, M.; STEUER, C. α -Pinene: A never-ending story. **Phytochemistry**, v. 190, p. 112857, 2021.
- ALMEIDA, C. G.; MORO, R. S.; ZANON, C. M. V. Feeding habits of two species of frugivorous bats (*Chiroptera, Phyllostomidae*) from urban disturbed forest patches in Ponta Grossa, PR, southern Brazil. Publ. UEPG **Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 11, n. 3/4, p. 15-21, 2005.
- ALMEIDA, L. D. F. D. D.; PAULA, J. F. D.; ALMEIDA-MARQUES, R. V. D. D.; CAVALCANTI, Y. W.; HEBLING, J. Atividade Inibitória de Óleos Essenciais Vegetais Frente à *Candida glabrata*, Resistente a Fluconazol. **Revista Brasileira de Ciência da Saúde**, p. 133-138, 2017.
- ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. D. G. B.; SANTOS, A. S.; MAIA, J. G. S. Essential oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C. DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 4, p. 465-467, 1998.

- ANDRADE, E. H. A.; RIBEIRO A. F.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA J. G. S. Essential oil composition of *Piper manausense* Yuncker. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 8, p. 295–299, 2005a.
- ANDRADE, E. H. A.; RIBEIRO, A. F.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Essential oil composition of *Piper anonofolium* (Kunth) C. DC. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 8, n. 3, p. 289-294, 2005b.
- ANDRADE-OCHOA, S.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V.; SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; VILLANUEVA-GARCÍA, M.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B. E.; RODRÍGUEZ-VALDEZ, L. M.; RIVERA-CHAVIRA, B. E. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.
- APOSTOL, S. Plant Chronophysiology. **Analele Științ. Univ. “Al. I. Cuza” Iași, s. II, a Biol. veget**, v. 57, n. 1, p. 23-30, 2011.
- ARRUDA, M. R.; MOREIRA, A.; PEREIRA, J. C. R. Amostragem e cuidados na coleta de solo para fins de fertilidade. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos (INFOTECA-E)**, v. 115, n. 8, 2014
- BAI, Y.; SUN, Y.; XIE, J.; LI, B.; BAI, Y.; ZHANG, D.; ZHENG, X. The asarone-derived phenylpropanoids from the rhizome of *Acorus calamus* var. *angustatus* Besser. **Phytochemistry**, v. 170, p. 112212, 2020.
- BALAO, F.; HERRERA, J.; TALAVERA, S.; DÖTTERL, S. Spatial and temporal patterns of floral scent emission in *Dianthus inoxianus* and electroantennographic responses of its hawkmoth pollinator. **Phytochemistry**, v. 72, n. 7, p. 601-609, 2011.
- BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 553-561, 2008.
- BARROS, J. F. P. **A floresta sagrada de Ossaim: o segredo das folhas**. Pallas Editora, 2015.
- BARROS, M. A.; RUI, A. M.; FABIAN, M. E. Seasonal variation in the diet of the bat *Anoura caudifer* (Phyllostomidae: Glossophaginae) at the southern limit of its geographic range. **Acta Chiropterologica**, v. 15, n. 1, p. 77-84, 2013.
- BASER K. H. C.; ÖZEK, T.; KIRIMER, N.; TÜMEN G. A Comparative Study of the Essential Oils of Wild and Cultivated *Satureja hortensis* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 422-424, 2004.
- BASÍLIO, I. J. L. D.; ARAUJO, N. D.; SILVA, R. C. **Pharmacobotanical Aspects of Aromatic Plants**. In: Sousa D. (eds) *Bioactive Essential Oils and Cancer* pp. 63-79. Springer, Cham., 2015.

BASSANI, V. L.; GONZÁLES, O. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 01, p. 14-17, 2013.

BATISTA J. R.; JOÃO M.; LOPES, A. A, AMBROSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; da SILVA, BOLZANI, V.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 538-540, 2008.

BATISTA, J. R.; JOAO M.; BATISTA, A. N.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; AMBRÓSIO, DL.; CICARELLI, RM.; FURLAN, M. Absolute configuration and selective trypanocidal activity of gaudichaudianic acid enantiomers. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 1154-1160, 2011.

BAY-HURTADO, F.; LIMA, R. A.; TEIXEIRA, L. F.; SILVA, I. D. C. F.; BAY, M.; AZEVEDO, M. S.; FACUNDO, V. A. Antioxidant activity and characterization of the essential oil from the roots of *Piper marginatum* Jacq. **Ciência e Natura**, v. 38, n. 3, p. 1504-1511, 2016.

BECK, E. H.; HEIM, R.; HANSEN, J. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. **Journal of Biosciences**, v. 29, n. 4, p. 449-459, 2004.

BEHNKE, K.; KAISER, A.; ZIMMER, I.; BRÜGGEMANN, N.; JANZ, D.; POLLE, A.; EHLTING, B. RNAi-mediated suppression of isoprene emission in poplar transiently impacts phenolic metabolism under high temperature and high light intensities: a transcriptomic and metabolomic analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 74, n. 1-2, p. 61-75, 2010.

BELOVA, L. F.; ALIBEKOV, S. D.; BAGINSKAIA, A. I.; SIA, S.; POKROVSKAIA, G. V. Asarone and its biological properties. **Farmakologija i Toksikologija**, v. 48, n. 6, p. 17-20, 1985.

BERG, K.; BISCHOFF, R.; STEGMÜLLER, S.; CARTUS, A.; SCHRENK, D. Comparative investigation of the mutagenicity of propenyl and allylic asarone isomers in the Ames fluctuation assay. **Mutagenesis**, v. 31, n. 4, p. 443-451. 2016.

BERGMAN, M. E.; DAVIS, B.; PHILLIPS, M. A. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3961, 2019.

BERNUCI K. Z.; IWANAGA C. C.; FERNANDEZ-ANDRADE C. M. M.; LORENZETTI F. B.; TORRES-SANTOS E. C.; FAIÕES V. D. S.; CORTEZ D. A. G. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper* species. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1698, 2016.

BIANCONI, G. V.; MIKICH, SB.; TEIXEIRA, S. D.; MAIA, B. H. L. Attraction of fruit-eating bats with essential oils of fruits: a potential tool for forest restoration. **Biotropica**, v. 39, n. 1, p. 136-140, 2007.

- BIANCONI, G. V.; SUCKOW, U. M.; CRUZ-NETO, A. P.; MIKICH, S. B. Use of fruit essential oils to assist forest regeneration by bats. **Restoration Ecology**, v. 20, n. 2, p. 211-217, 2012.
- BIEBER, A. G.; TOLEDO, C. C, DE MOURA, C. A, LEITÃO, R. P.; DA SILVA, W. R.; SASAL, Y. **Dispersão de sementes de *Piper* sp. (Piperaceae) por morcegos e aves em floresta de terra firme, Amazônia Central**. 2004. Disponível em<<https://www.inpa.gov.br/pdbff/cursos/efa/livro/2004/efa2004.htm>>. Acesso em 06 de outubro de 2021.
- BOLSON, M.; HEFLER, S. R, DALL, EI.; CHAVES, O.; JUNIOR, AG.; JUNIOR, ELC. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 1-10, 2015.
- BOREN, K.; CROWN, A. A.; CARLSON, R. Multidrug and Pan-Antibiotic Resistance—The Role of Antimicrobial and Synergistic Essential Oils: A Review. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 10, p. 1934578X20962595, 2020.
- BORGES, K. N.; BAUTISTA, H. Etnobotânica de plantas medicinais na comunidade de Cordoaria, litoral norte do estado da Bahia, Brasil. **Plurais Revista Multidisciplinar**, v. 1, n. 2, 2010.
- BORGES, M. S. **Plantas medicinais utilizadas para o tratamento de doenças respiratórias: estudo de caso e etnobotânica**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, 2016.
- BOUWMEESTER, H. J.; VERSTAPPEN, F. W.; POSTHUMUS, M. A.; DICKE, M. Spider mite-induced (3S)-(E)-nerolidol synthase activity in *cucumber* and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 121, n. 1, p. 173-180, 1999.
- BRAGA, S; MARIA P. A. S.; MARTINS. M.; PENTEADO-DIAS, A. M. Aspectos bionômicos de *Eois tegularia* (Guenée) e *Eois glauculata* (Walker) (Lepidoptera, Geometridae, Larentiinae) e seus parasitóides. **Revista Brasileiro de Zoologia**, v. 18, n. 3, p. 837-840, Sept. 2001.
- BRANDÃO, M. D. G. L.; COSENZA, G. P.; PEREIRA, F. L.; VASCONCELOS, A. S.; FAGG, C. W. Changes in the trade in native medicinal plants in Brazilian public markets. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 8, p. 7013-7023, 2013.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 6ªed. Vol. Plantas medicinais, 2019.
- BRASIL. **Constituição Federal do Brasil**. Presidência da República, v. 1, 1988.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC nº 298, de 12 de agosto de 2019**. Aprova a Farmacopeia Brasileira, 6ª edição e dá outras providências, 2019.

- BRITO M. R.; SENNA-VALE L. 2011. Plantas medicinais utilizadas na comunidade Caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 25, n. 2, p. 363-372, 2011.
- BRÜCKNER, A.; HEETHOFF, M. A chemo-ecologists' practical guide to compositional data analysis. **Chemoecology**, v. 27, n. 1, p. 33-46, 2017.
- CÁCERES, A.; KATO, M. J. Importance of a multidisciplinary evaluation of *Piper* genus for development of new natural products in Latin America. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 1, n. 1, p. 4-4, 2014.
- CAHLÍKOVÁ, L.; ŠAFRATOVÁ, M.; HOŠŤÁLKOVÁ, A.; CHLEBEK, J.; HULCOVÁ, D.; BREITEROVÁ, K.; OPLETAL, L. Pharmacognosy and Its Role in the System of Profile Disciplines in Pharmacy. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 9, p. 1934578X20945450, 2020.
- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e aplicações**. São Paulo: Editora Artmed S.A, 2003.
- CAMPELO, Y.; OMBREDANE, A.; VASCONCELOS, A. G.; ALBUQUERQUE, L.; MOREIRA, D. C.; PLÁCIDO, A.; ROCHA, J.; FOKOUE, H. H.; YAMAGUCHI, L.; MAFUD A.; MASCARENHAS Y. P.; DELERUE-MATOS, C.; BORGES T.; JOANITTI G. A.; ARCANJO, D. D. R.; KATO M. J.; KUCKELHAUS S. A. S.; SILVA M. P. N.; MORAES J. Structure – Activity relationship of pipartine and synthetic analogues against *Schistosoma mansoni* and cytotoxicity to mammalian cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1802, 2018.
- CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. D.; CRUZ, P. L.; SOUZA, A. R. L. D.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; TAVARES, M. F. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, p. 75-91, 2018.
- CARMO, A. P. B.; BORBOREMA, M.; RIBEIRO, S.; DE-OLIVEIRA, A.C.X.; PAUMGARTEN, F.J.R.; MOREIRA, D.L. A new validated HPLC-DAD-UV method for analysis of the antimalarial drug primaquine in the blood plasma. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 499-505, 2017.
- CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1333-1338, 2006.
- CHAABAN, A.; SANTOS, V. M. C. S.; GOMES, E. M.; MARTINS, C. E. N.; AMARAL, W. D.; DESCHAMPS, C.; MOLENTO, M. B. Chemical composition of *Piper gaudichaudianum* essential oil and its bioactivity against *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 3, p. 159-166, 2018.
- CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; BYNG, J. W.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D. E.; STEVENS, P. F. 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.

CHAUTA, A.; WHITEHEAD, S.; AMAYA-MARQUEZ, M.; POVEDA, K. Leaf herbivory imposes fitness costs mediated by hummingbird and insect pollinators. **PloS one**, v. 12, n. 12, p. e0188408, 2017.

CHELLIAN, R.; PANDY, V.; MOHAMED, Z. Pharmacology and toxicology of α - and β -Asarone: A review of preclinical evidence. **Phytomedicine**, v. 32, p. 41-58, 2017.

CHEN, S.; CHENG, M. J.; WU, C. C.; PENG, C. F.; HUANG, H. Y.; CHANG, H. S.; WANG, C.-J.; CHEN, I. S. Three new phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their inhibitory activities on platelet aggregation and *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry & Biodiversity**, 11, n. 5, p. 792-799, 2014.

CHEN, R.; Huangfu, L.; Lu, Y.; Fang, H.; Xu, Y.; Li, P.; Zhou Y.; Xu, C.; Huang, J.; Yang, Z. Adaptive innovation of green plants by horizontal gene transfer. **Biotechnology Advances**, v. 46, p. 107671, 2020.

CHENG, A. X.; LOU, Y. G.; MAO, Y. B.; LU, S.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 179-186, 2007.

CNCFlora - **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/listavermelha/PIPERACEAE>> Acesso em: 10/10/2021.

CODY, M. L.; DIAMOND, J. M. Towards a theory of continental species diversities (Eds.), Ecology and Evolution of Communities, **Harvard University Press, Harvard**, pp. 214-257, 1975.

CONNAHS, H.; RODRÍGUEZ-CASTAÑEDA, G.; WALTERS, T.; WALLA, T.; DYER, L.; MILLER, J. Geographic variation in host-specificity and parasitoid pressure of an herbivore (Geometridae) associated with the tropical genus *Piper* (Piperaceae). **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 1, 2009.

CRAGG, D. J.; NEWMAN, K. M. S. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

DAGHBOUCHE, S.; AMMAR, I.; REKIK, DM.; DJAZOULI, ZE.; ZEBIB, B.; MERAH, O. Effect of phenological stages on essential oil composition of *Cytisus triflorus* L'Her. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 4, p. 2383-2387, 2020.

DAVIES, K. M., JIBRAN, R., ZHOU, Y., ALBERT, N. W., BRUMMELL, D. A., JORDAN, B. R.; SCHWINN, K. E. The evolution of flavonoid biosynthesis: A bryophyte perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. 7, 2020.

DELGODA, R.; MURRAY, J. E. Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. **Pharmacognosy**, 93-100, 2017.

DE-VRIES, J.; ARCHIBALD, J. M. Plant evolution: landmarks on the path to terrestrial life. **New Phytologist**, v. 217, n. 4, p. 1428-1434, 2018.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. Editora Unesp. 2002a.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002b.

DIAS, E. B. D. S.; CAMILO, Y. M. V.; SOUZA, E. R. B. D.; FERRI, P. H. Essential oil variability in *Eugenia dysenterica* fruits. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2021.

DIETZ, K. J.; PFANNSCHMIDT, T. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. **Plant Physiology**, v. 155, n. 4, p. 1477-1485, 2011.

DOLL, H. V. D.; KRATZ P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, 11, 463-471, 1963.

DONAGEMA, G. K.; CAMPOS, D. V.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. H. M. **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v.198, p.16-32, 2013.

DUDAREVA, N.; MARTIN, D.; KISH, C. M.; KOLOSOVA, N.; GORENSTEIN, N.; FALDT, J. (*E*)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new TPS-subfamily. **Plant Cell**, v. 15, p. 1227-1241, 2003.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1893-902, 2004.

DUPLAIS, C.; PAPON, N.; COURDAVAULT, V. Tracking the Origin and Evolution of Plant Metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 12, p. 1182-1184, 2020.

DYER, L. A.; PALMER, A. D. N. (Ed.). **Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution**. New York: Kluwer academic/Plenum publishers, 2004.

EMERENCIANO, V. P.; RODRIGUES, G. V.; ALVARENGA, S. A. V.; MACARI, P. A. T.; KAPLAN, M. A. C. Um novo método para agrupar parâmetros quimiotaxonômicos. **Química nova**, v. 21, n. 2, p. 125-129, 1998.

- EMERENCIANO, V. P.; CABROL-BASS, D.; FERREIRA, M. J. P.; ALVARENGA, S. A. V.; BRANT, A. J. C.; SCOTTI, MT.KO. Chemical evolution in the Asteraceae. The oxidation–reduction mechanism and production of secondary metabolites. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 6, p. 1934578X0600100612, 2006.
- EMILIANI, G.; FONDI, M.; FANI, R.; GRIBALDO, S. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. **Biology Direct**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2009.
- EVERGETIS, E.; HAROUTOUNIAN, S A. Volatile systematics: A novel biochemical interpretation of essential oil compounds enhances their chemophenetic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 92, p. 104087, 2020.
- FACUNDO, V. A.; BÁLICO, L. J.; LIMA, D. K.; SANTOS, A. R.; MORAIS, S. M.; SILVA, G. V. J.; MILITÃO, J. S. Non-substituted B-ring flavonoids and an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 206-208, 2012.
- FAN, F.; LI, C.; LUO, Z.; TANG, G. UV-B Radiation-Induced Changes in Tea Metabolites and Related Gene Expression. **Stress Physiology of Tea in the Face of Climate Change**, p. 111–133, 2018.
- FARHAT, M. B.; JORDÁN, M. J.; CHAOUCH-HAMADA, R.; LANDOULSI, A.; SOTOMAYOR, JA. Phenophase effects on sage (*Salvia officinalis* L.) yield and composition of essential oil. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 3, p. 87-93, 2016.
- FATUMBI, P. V. **Ewé: uso das plantas na sociedade Iorubá**. São Paulo: Cia das Letras, 1995.
- FEITOZA, R. B.; LIMA, H. R. P. Chemosystematic and evolutionary trends of the genistoid clade *sensu stricto* (*Papilionoideae*, Fabaceae). **Phytochemistry**, v. 183, p. 112616, 2020.
- FELIPE, F. C. B.; SOUSA-FILHO J. T.; SOUZA, L. E. O.; SILVEIRA, J.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; VIANA, G. S. B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine** v. 14, p. 605-612, 2007.
- FENG, X.; ZHANG, W.; WU, W.; BAI, R.; KUANG, S.; SHI, B.; LI, D. Chemical composition and diversity of the essential oils of *Juniperus rigida* along the elevations in Helan and Changbai Mountains and correlation with the soil characteristics. **Industrial Crops and Products**, v. 159, p. 113032, 2021.
- FERNANDES, S. R., FERREIRA, H. D., SÁ, S. D., BORGES, L. L., TRESVENZOL, L. M., FERRI, P. H., FIUZA, T. S. Chemical composition and seasonal variation of the volatile oils from *Trembleya phlogiformis* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 419-425, 2017.
- FERNANDEZ, C. M.; BALDIN, VP.; IEQUE, AL.; BERNUCI, KZ.; ALMEIDA, R. T.; VALONE, L. M.; DIAS FILHO, B. P. Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of

dichloromethane extract of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. roots and isolated compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 131, p. 341-347, 2019.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHEFFER, J. J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FIGUEIREDO, R. A.; SAZIMA, M. Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. **Annals of Botany**, v. 85, n. 4, p. 455-460, 2000.

FILLY A.; FERNANDEZ X.; MINUTI M.; VISINONI F.; CRAVOTTO G.; CHEMAT F. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: from laboratory to pilot and industrial scale. **Food chemistry**, v. 150, p. 193-198, 2014.

FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F.; PRATI, AUC.; DE SOUZA JÚNIOR, AA.; MAZZEU, BF.; FELIPPE, LG.; VENTURINI, J. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PloS one**, v. 13, n. 6, 2018.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; MACCIONI, S.; BALDINI, R. Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). **Food chemistry**, v. 85, n. 4, p. 599-604, 2004.

FORDYCE, J. A. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2377–2383, 2006.

FUNARI, C. S., CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. D. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, p. 1605-1609, 2013.

GADZIOLA, M. A.; STETZIK, L. A.; WRIGHT, K. N.; MILTON, A. J.; ARAKAWA, K.; DEL MAR CORTIJO, M. A neural system that represents the association of odors with rewarded outcomes and promotes behavioral engagement. **Cell reports**, v. 32, n. 3, p. 107919, 2020.

GERVASI, D. D. L.; SCHIESTL, F. P. Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2017.

GIL, M.; PONTIN, M.; BERLI, F.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. **Phytochemistry**, v. 77, p. 89-98, 2012.

GLYNN, C.; HERMS, D. A.; ORIAN, C. M.; HANSEN, R. C.; LARSSON, S. Testing the growth–differentiation balance hypothesis: dynamic responses of willows to nutrient availability. **New Phytologist**, v. 176, n. 3, p. 623-634, 2007.

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.

- GOMES, A. F.; ALMEIDA, M. P.; LEITE, M. F.; SCHWAIGER, S.; STUPPNER, H.; HALABALAKI, M.; DAVID, J. M. Seasonal variation in the chemical composition of two chemotypes of *Lippia alba*. **Food chemistry**, v. 273, p. 186-193, 2019.
- GOMEZ-FLORES, R.; GUPTA, S.; TAMEZ-GUERRA, R.; MEHTA, R. T. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1842-1846, 1995.
- GOTTLIEB, O. R.; ROCHA, A. I. Constituents of *Aniba hostmanniana*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 5, p. 1861 - 1863, 1972.
- GOTTLIEB, O. R. **Evolução Micromolecular, Sistemática e Ecologia**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 20-34, 1982a.
- GOTTLIEB, O. R. Ethnopharmacology versus chemosystematics in the search for biologically active principles in plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 227-238, 1982b.
- GOTTLIEB, O. R. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2545-2558, 1989.
- GOTTLIEB, O. R. Phytochemicals: differentiation and function. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1715-1724, 1990.
- GOTTLIEB, O. Biodiversidade: uma teoria molecular. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 167-171, 1992.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Phytochemical evolution: The redox theory. **Natural Products Letters**, v. 2, n.3, p. 171-176, 1993.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico**. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, 267 pp. 1996.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Review Article Number 132 Evolution of Angiosperms via Modulation of Antagonisms. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 1-15, 1998.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. Medicinal products: regulation of biosynthesis in space and time. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 115-120, 2000.
- GOTTLIEB, O. R. **Micromolecular evolution, systematics and ecology: an essay into a novel botanical discipline**. Springer Science & Business Media, 2012.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105-2114, 2012.
- GOUYON, P. H.; VERNET, P. H.; GUILLERM, J. L.; VALDEYRON, G. Polymorphisms and environment: the adaptive value of the oil polymorphisms in *Thymus vulgaris* L. **Heredity**, v. 57, n. 1, p. 59-66, 1986.

GUEDES, R. R.; PROFICE, S. R.; COSTA, E. D. L.; BAUMGRATZ, J. F. A.; LIMA, H. C. D. Plantas utilizadas em rituais afro-brasileiros no Estado do Rio de Janeiro—um ensaio Etnobotânico. **Rodriguésia** v. 37, n. 63, p. 3-9, 1985.

GUENTHER, E. **The essential oils-Vol 1: History-origin in plants-production-analysis**. Read Books Ltd, 2014.

GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M.; MEDEIROS, E. V. S. S.; MONTEIRO, D.; QUEIROZ, G. A. Piperaceae in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB190>. Acesso em: 13 fev. 2021a.

GUIMARÃES, E. F.; MEDEIROS, E. V. S. S.; QUEIROZ, G. A. *Piper* in Flora do Brasil 2020. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12735>. Acesso em: 13 fev. 2021b.

GUIMARÃES, E. F.; MAUTONE, L.; MAGALHÃES, H. G.; GUIMARÃES, L. G. Piperaceae *Organensis*. **Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 32, 50-106, 1994.

GUO, X. W.; FERNANDO, W. G.; SEOW-BROCK, H. Y. Population structure, chemotype diversity, and potential chemotype shifting of *Fusarium graminearum* in wheat fields of Manitoba. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 756-762, 2008.

GUTIERREZ, M. P. R.; GONZALEZ, M. N. A.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from Piper: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 163-193, 2013.

HAJDARI, A., MUSTAFA, B., NEBIJA, D., SELIMI, H., VESELAJ, Z., BREZNICA, P., NOVAK, J. Essential oil composition of *Pinus peuce* Griseb. needles and twigs from two national parks of Kosovo. **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 5393079, 2016.

HANSKI, I. Dynamics of regional distribution: the core and satellite species hypothesis. **Oikos**, p. 210-221, 1982.

HASHIM, S. E.; SIRAT, H. M.; YEN, K. H. Chemical compositions and antimicrobial activity of the essential oils of *Hornstedtia havilandii* (Zingiberaceae). **Natural product communications**, v. 9, n. 1, p. 1934578X1400900133, 2014.

HAZRATI, S.; MOLLAEI, S.; RABBI ANGOURANI, H.; HOSSEINI, S. J.; SEDAGHAT, M.; NICOLA, S. How do essential oil composition and phenolic acid profile of *Heracleum persicum* fluctuate at different phenological stages? **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 11, p. 6192-6206, 2020.

HEIL, M. Indirect defence—recent developments and open questions. In: **Progress in botany**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 359-396, 2008.

HEMATPOOR, A.; LIEW, S. Y.; AZIRUN, M. S.; AWANG, K. Insecticidal activity and the mechanism of action of three phenylpropanoids isolated from the roots of *Piper sarmentosum* Roxb. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

HEMBRY, DAVID H.; WEBER, MARJORIE G. Ecological interactions and macroevolution.: a new field with old roots. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 215-243, 2020.

HENDAWY, S. F., HUSSEIN, M. S.; AMER, H. M.; EL-GOHARY, A. E.; SOLIMAN, W. S. Effect of soil type on growth, productivity, and essential oil constituents of rosemary, *Rosmarinus officinalis*. **Asian Journal of Agriculture and Biology**, v. 5, n. 4, p. 303-311, 2017.

HENDRICKSON, J. B.; CRAM, D. J.; HAMMOND, G. S.; **Organic Chemistry**. 3a ed. McGraw-Hill, New York, 1970.

HENRIQUES, M.; WILLIAMS, D. Pathogenesis and Virulence of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 752, 2020.

HILAN, C. H.; RABIHA, S.; AITOUR, S. Chemotype common planets in Lebanon gender and gender *Micromeria origanum* (Lamiaceae). **Lebanese Science Journal**, p. 79-91, 2011.

HOTTA, C. T. From crops to shops: how agriculture can use circadian clocks. **Journal of Experimental Botany**, v. 1, n. 8, p. 1-12, 2021.

IASON, G. R.; LENNON, J. J.; PAKEMAN, R. J.; THOSS, V.; BEATON, J. K.; SIM, D. A.; ELSTON, D. A. Does chemical composition of individual Scots pine trees determine the biodiversity of their associated ground vegetation? **Ecology Letters**, v. 8, n. 4, p. 364-369, 2005.

INMT - **Instituto Nacional de Metereologia**, MA. Disponível em: <<https://portal.inmet.gov.br/>> Acesso em: 12 de dezembro de 2017 e 12 de dezembro de 2020.

JACCARD, P. Distribution de la flore alpine dans le Bassin des Drouces et dans quelques regions voisines. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, v. 37, n. 140, p. 241– 272, 1901.

JACINTO, A. C. P.; SOUZA, L. P.; NAKAMURA, A. T.; CARVALHO, F. J.; SIMÃO, E.; ZOCOLER, J. L.; BERGO, C. L. Formação de idioblastos e produção de óleo essencial em cultivo irrigado de *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, p. 447-452, 2018.

JAISWAL, D.; AGRAWAL, S. B. Ultraviolet-B induced changes in physiology, phenylpropanoid pathway, and essential oil composition in two *Curcuma* species (*C. caesia* Roxb. and *C. longa* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111739, 2021.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. Avaliação agronômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

JARAMILLO, MA.; MANOS, PS. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

JIMÉNEZ, A.; SEVILLA, F.; MARTÍ, M. C. Reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythms in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 16, p. 5825-5840, 2021.

JONES, W. P.; CHIN, Y. W.; KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. **Current drug targets**, v. 7, n. 3, p. 247-264, 2006.

KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O. R. Iridoids as systematic markers in dicotyledon. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 10, n. 4, p. 329-347, 1982.

KARPATI, Z.; KNADEN, M.; REINECKE, A.; HANSSON, B. S. Intraspecific combinations of flower and leaf volatiles act together in attracting hawkmoth pollinators. **PloS one**, v. 8, n.9), p. e72805, 2013.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, p. 529-538, 2007.

KAUFFMAN, S. Respondendo a “What Is Life?” De Schrödinger. **Entropia** , v. 22, n. 8, p. 815, 2020.

KEMPRAI, P.; BORA, PK; MAHANTA, BP.; SUT, D, SAIKIA, SP, BANIK, D, HALDAR , S. *Piper betleoides* C. DC.: Edible source of betel-scented sesquiterpene-rich essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 35 n. 1, p. 70-78, 2020.

KESSLER A.; KALSKE A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 49, p. 115-138, 2018.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 299-328, 2002.

KESSLER, A.; HALITSCHKE, R. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 409-414, 2007.

KESSLER, A.; HALITSCHKE, R. Testing the potential for conflicting selection on floral chemical traits by pollinators and herbivores: predictions and case study. **Functional Ecology**, v. 23, n. 5, p. 901-912, 2009.

KFOURY, N., SCOTT, E. R., ORIAN, C. M., AHMED, S., CASH, S. B., GRIFFIN, T., ROBBAT JR, A. Plant-climate interaction effects: Changes in the relative distribution and concentration of the volatile tea leaf metabolome in 2014–2016. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1518, 2019.

KFOURY, N. S. E. R.; ORIAN, C. M.; AHMED, S.; CASH, S.; GRIFFIN, T.; LONG, C. Plant-Climatic Interaction Effects: Changes in the Relative Distribution and Concentration of

- the Volatile Tea Leaf Metabolome in 2014-2016. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1518, 2019.
- KHALID, A. K. Quality and quantity of *Pimpinella anisum* L. essential oil treated with macro and micronutrients under desert conditions. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 6, p. 2396, 2015.
- KIM, J. A.; KIM, H. S.; CHOI, S. H.; JANG, J. Y.; JEONG, M. J.; LEE, S. I. The importance of the circadian clock in regulating plant metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2680, 2017.
- KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 2, p. 135-148, 2001.
- KIRSCHNING, A. Coenzymes and their role in the evolution of Life. **Angewandte Chemie International Edition**, 2020.
- KÖLLNER, T. G.; SCHNEE, C.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes. **Plant Cell**, v. 16, n. 5, p. 1115–31, 2004.
- KOPACZYK, J. M.; WARGUŁA, J.; JELONEK, T. The variability of terpenes in conifers under developmental and environmental stimuli. **Environmental and Experimental Botany**, p. 104197, 2020.
- KRINSKI D.; FOERSTER L. A. Toxicity of essential oils from leaves of Piperaceae species in rice stalk stink bug eggs, *Tibraca limbativentris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Ciência. Agrotecnologia**, v.40, n. 6, p. 676-687, 2016.
- KRINSKI D.; FOERSTER, L. A.; DESCHAMPS, C. Ovicidal effect of the essential oils from 18 Brazilian *Piper* species: controlling *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Erebidae) at the initial stage of development. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, 2018.
- KUBITZKI, K.; GOTTLIEB, O. R. Phytochemical aspect of angiosperm origin and evolution. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 33, n. 4, p. 457-468, 1984.
- KUMAR, DARSHA.; AYESHA, MJ.; GAUTAM, P.; JOSHI, H.; KUMAR, N. A Recent Report on 'Plants with Anti-*Candida* Properties'. **International Journal of Current Research and Review**,| v. 12, n. 18, p. 25, 2020.
- KURLOVICH, B.S. Species and intraspecific diversity of white, blue and yellow lupin. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n. 115, p.23-32, 1998.
- LAGO, J. H. G.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C. C.; MORANDIM, A. D. A.; BERGAMO, D. C. B.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J. Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium ladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal Natural Product**, v. 67, n. 11, p. 1783-1788, 2004.

LAROCA, S.; LAUER, S. Adaptação comportamental de *Scaura latitarsis* para coleta de pólen. **Acta Biológica Paranaense**, v. 2, 1973.

LARSSON, S. The “new” chemosystematics: Phylogeny and phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2904-2908, 2007.

LAWSON, P. A.; PATEL, N. B. The Strength of Chemotaxonomy. **Trends in the Systematics of Bacteria and Fungi**, p. 141, 2020.

LEAL, J. B.; SILVA, M. M.; COSTA, J. M.; ALBUQUERQUE, L. C. D. S.; SILVA-PEREIRA, M. D. G.; SOUSA, R. L. Etnobotânica de plantas medicinais com potencial anti-inflamatório utilizadas pelos moradores de duas comunidades no município de Abaetetuba, Pará. **Biodiversidade**, v. 18, n. 3, 2019.

LEFÈVRE, I.; VOGEL-MIKUŠ, K. A. T. A. R. I. N. A.; JEROMEL, L.; VAVPETIČ, P.; PLANCHON, S.; ARČON, I.; LUTTS, S. Differential cadmium and zinc distribution in relation to their physiological impact in the leaves of the accumulating *Zygophyllum fabago* L. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 6, p. 1299-1320, 2014.

LEINER, N. O.; SILVA, W. R. Seasonal variation in the diet of the Brazilian slender opossum (*Marmosops paulensis*) in a montane Atlantic Forest area, southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 1, p. 158-164, 2007.

LEISER-MILLER, L. B.; KALISZEWSKA, Z. A.; LAUTERBUR, M. E.; MANN, B.; RIFFELL, J. A.; SANTANA, S. E. A fruitful endeavor: scent cues and echolocation behavior used by *Carollia castanea* to find fruit. **Integrative Organismal Biology**, v. 2, n. 1, p. obaa007, 2020.

LI, K.; GUSTAFSON, K. R. Sesterterpenoids: chemistry, biology, and biosynthesis. **Natural Product Reports**, 2021.

LIEBELT, DJ.; JORDAN, J. T.; DOHERTY, C. J. Only a matter of time: the impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 6, p. 1409-1433, 2019.

LIMA, I. P. D.; REIS, N. R. D. The availability of Piperaceae and the search for this resource by *Carollia perspicillata* (Linnaeus) (Chiroptera, Phyllostomidae, Carollinae) in Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 2, p. 371-377, 2004.

LOPES, A. A.; BALDOQUI, D. C.; LÓPEZ, S. N.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of gaudichaudianic acid in *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 68, n. 15, p. 2053-2058, 2007.

LORETO, F.; DICKE, M.; SCHNITZLER, J. P.; TURLINGS, T. C. Plant volatiles and the environment. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 8, p. 1905-1908, 2004.

- LOŽIENĖ, K.; LABOKAS, J. Effects of abiotic environmental conditions on amount and enantiomeric composition of α -pinene in *Juniperus communis* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 36-43, 2012.
- MACEDO, A. L.; SANTOS, T. C. C.; LEDA-VALVERDE, A.; MOREIRA, D. L.; VASCONCELOS, T. R. A. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. Uma visão geral dos neolignanos do gênero *Piper* L.: métodos de isolamento e atividades biológicas. **Mini-reviews em Medicinal Chemistry**. v.17, p.693-720, 2017.
- MACEDO, A. L.; SILVA, D. P.; MOREIRA, D. L.; DE QUEIROZ, L. N.; VASCONCELOS, T. R.; ARAUJO, G. F.; ROBBS B. K. Cytotoxicity and selectiveness of Brazilian *Piper* species towards oral carcinoma cells. **Biomed Pharmacother** v. 110, p. 342-352, 2019.
- MACÊDO-ANDRADE, A. C.; ROSALEN, P. L.; FREIRES, I. A.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; AQUINO, S. G.; CASTRO, R. D. Antifungal activity, mode of action, docking prediction and anti-biofilm effects of (+)- β -pinene enantiomers against *Candida* spp. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, 18(29), 2481-2490.
- MAEDA, H. A. Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution to plant chemical diversity. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 881, 2019.
- MAEDA, H. A.; FERNIE, A. R. Evolutionary history of plant metabolism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 72, p. 185-216, 2021.
- MARČETIĆ, M.; KOVAČEVIĆ, N.; LAKUŠIĆ, D.; LAKUŠIĆ, B. Habitat-related variation in composition of the essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae). **Phytochemistry**, v. 135, p. 80-92, 2017.
- MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. Use of technologies before and after harvest and good agricultural practices in the production of medicinal and aromatic plants. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p.86-96, 2005.
- MARCHESE, J. Á.; MATTANA, R. S.; MING, L. C.; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P. F.; MORAES, R. M. Light stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miquel.] plants. **Photosynthetica** v. 46, p. 501-505, 2008.
- MARGONARI, N. **Florais de Saint Germain: os doze raios divinos**. São Paulo. Edições Florais de São Germain, 1999.
- MARINHO-FILHO, J. S. The coexistence of two frugivorous bat species and the phenology of their food plants in Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, p. 59-67, 1991.
- MARQUES, A. M.; PAIVA, R. A.; MOREIRA, D. L.; TINOCO, L.W.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C.; ZAPATA-SUDO, G. Hypoglycemic Effect of the Methanol flower Extract of *Piper Claussenianum* and the Major Constituent 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone in Streptozotocin Diabetic Rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 237-243, 2015.

- MÁRTONFI, P.; GREJTOVSKÝ, A.; REPČÁK, M. Chemotype pattern differentiation of *Thymus pulegioides* on different substrates. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 8, p. 819–825, 1994.
- MASSA, N.; CANTAMESSA, S.; NOVELLO, G.; RANZATO, E.; MARTINOTTI, S.; PAVAN, M.; BONA, E. Antifungal activity of essential oils against azole-resistant and azole-susceptible vaginal *Candida glabrata* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, p. 1–17, 2018.
- MATA, R.; MORALES, I.; PÉREZ, O.; RIVERO-CRUZ, I.; ACEVEDO, L.; ENRIQUEZ-MENDOZA, I.; TIMMERMANN, B. Antimycobacterial Compounds from *Piper sanctum*. **Journal of Natural Products**, v. 6, n. 12, p. 1961–1968., 2004.
- MATTANA, R. S.; MING, L. C.; MARCHESE, J. Á.; MARQUES, M. O. M. Biomass production in plants of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. submitted to different shade levels. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 8, p. 83-85, 2006.
- MATTANA, RS.; VIEIRA, MAR.; MARCHESE, JÁ.; MING, LC.; MARQUES, MOM. Shade level effects on yield and chemical composition of the leaf essential oil of *Pothomorphe umbellata* (L.) **Miquel. Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 414-418, 2010.
- MEDEIROS, E. V. S. S.; GUIMARÃES, E. F. Piperaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim Botânico da Universidade de São Paulo** v. 25, p. 227-252, 2007.
- MEHRANVAR, L.; JACKSON, D. A. History and taxonomy: their roles in the core-satellite hypothesis. **Oecologia**, v. 127, n. 1, p. 131-142, 2001.
- MELLO, M. A.; KALKO, E. K.; SILVA, W. R. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian montane Atlantic Forest. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n.2, p. 485-492, 2008.
- MICHAEL, A. J. Evolution of biosynthetic diversity. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 14, p. 2277-2299, 2017.
- MIKICH, S. B. A dieta dos morcegos frugívoros (*Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae*) de um pequeno remanescente de Floresta Estacionai Semidecidual do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, p. 239-249, 2002.
- MIKICH, S. B.; BIANCONI, G. V.; MAIA, L. N. S.; TEIXEIRA, S. D. Attraction of the fruit-eating bat *Carollia perspicillata* to *Piper gaudichaudianum* essential oil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 10, p. 2379-2383, 2003.
- MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 168-173, 2010.

- MONZOTE, L.; SCULL, R.; COS, P., SETZER, W. Essential oil from *Piper aduncum*: Chemical analysis, antimicrobial assessment, and literature review. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 49, 2017
- MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; ANJOS-JÚNIOR J. F.; FERREIRA S. A.; SOUZA-NETO, M. A. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 10, p. 670-675, 2007.
- MORANDIM, A. D.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A.; ALECIO A. C.; KATO, M. J.; YOUNG C. M.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of *Piper* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 37, p. 6135-6139, 2010.
- MORANDIM-GIANNETTI, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A.; ALECIO A. C.; KATO, M. J.; YOUNG C. M.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. **Journal of Medicinal Plant Research**, p. 1810-1814, 2010.
- MOREIRA, D. L.; CARDOSO, G. L.; SOUZA, P. O.; GUIMARÃES, E. F.; PEREIRA, N. A.; KAPLAN, M. A. C. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C. DC. in mice behaviour. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 1, p. 33-57, 2001
- MOREIRA, D. L.; PAIVA, R. A.; MARQUES, A. M.; BORGES, R. M.; BARRETO, A. L. S.; CURVELO, J. A. R.; CAVALCANTI, J. F.; ROMANOS, M. T. V.; SOARES, R. M. A.; KAPLAN, M. A. C. Bioactive Neolignans from the Leaves of *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae). **Records of Natural Products**, v. 10, p. 472-484, 2016.
- MURATA, K. Hypothetical Roles of the Olfactory Tubercle in Odor-Guided Eating Behavior. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 14, 2020.
- NAGEGOWDA, D. A.; GUPTA, P. Advances in biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids. **Plant Science**, v. 294, p. 110457, 2020.
- NAYYAR, A.; JAIN, R. Recent advances in new structural classes of anti-tuberculosis agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 16, p. 1873-1886, 2005.
- NEGRE, F.; KISH, C. M.; BOATRIGHT, J.; UNDERWOOD, B.; SHIBUYA, K.; WAGNER, C.; DUDAREVA, N. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. **The Plant Cell**, v. 15, n. 12, p. 2992-3006, 2003.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NIELSEN, J. A.; WHIGHAM, P. A.; FREW, R. D.; CALLAWAY, R. M.; DICKINSON, K. J. M. Invasion essentials: does secondary chemistry plasticity contribute to the invasiveness of *Thymus vulgaris* L.? **Chemoecology**, v. 24, n. 1, p. 15-27, 2014.

NODA-GARCIA, L.; LIEBERMEISTER, W.; TAWFIK, DS. Metabolite–enzyme coevolution: from single enzymes to metabolic pathways and networks. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, p. 187-216, 2018.

NYGB: Bats as Dispersers of Plants in the Lowland Forests of Central French Guiana.

Disponível em:

<https://www.nybg.org/botany/tlobova/mori/batsplants/batdispersal/bat_disp_app1.htm>

Acesso de 14/02/2021

OLIVEIRA, F. A. Z.; PASSARINI, G. M., MEDEIROS, D. S. S.; SANTOS, A. P. A.; FIALHO, S. N.; GOUVEIA, A. J.; LATORRE, M.; FREITAG, E. M.; MEDEIROS, P. S. M.; TELES, C. B. G.; FACUNDO, V. A. Antiplasmodial and antileishmanial activities of compounds from *Piper tuberculatum* Jacq fruits. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 382-386, 2018.

OLIVEIRA, G. L.; MOREIRA, D. D. L.; MENDES, A. D. R.; GUIMARÃES, E. F., FIGUEIREDO, L. S., KAPLAN, M. A. C., MARTINS, E. R. 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.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia identificação de drogas vegetais.** 2014.

OLIVEIRA, G. L.; CARDOSO, S. K.; LARA-JUNIOR, C. R.; VIEIRA, T. M.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; GUIMARÃES, E. F.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C. Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1227-1234, 2013.

OLIVEIRA, G. L.; VIEIRA, T. M.; NUNES, V. F.; RUAS, M. O.; DUARTE, E. R.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MARTINS, E. R. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 288-292, 2014.

OLIVEROS, J. C. (2007–2015) **Venn’s. An Interactive Tool for Comparing Lists with Venn’s Diagrams.** Disponível em: <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/Venn’sy/index.html>> Acesso em: 13 de outubro de 2020.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Miltefosine - 1200 patients in Phase IV trial in India.** TDR News, v. 69, p. 12., 2002.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development:** fourth WHO report on neglected tropical diseases, Geneva. World Health Organization. 2017.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Global tuberculosis reports 1997-2020.** Genebre. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/> Acesso em 13 de dezembro de 2020.

- PACHECO, F. V.; PAULA -AVELAR, R.; ALVARENGA, I. C. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ALVARENGA, A. A.; PINTO, J. E. B. P. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251-257, 2016.
- PARACHNOWITSCH, A. L.; MANSON, J. S. The chemical ecology of plant-pollinator interactions: recent advances and future directions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 8, p. 41-46, 2015.
- PARMAR, V. S.; AIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PARRA, J. E.; PATIÑO, O. J.; PRIETO, J. Á.; DELGADO, W. A.; CUCA, L. E. New benzoic acid derivative isolated from *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 590-592, 2013.
- PARRINI, R.; PARDO, C. S.; PACHECO, J. F. Conhecendo as plantas cujos frutos e recursos florais são consumidos pelas aves na Mata Atlântica do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. **Atualidades Ornitológicas**, v. 199, p. 38-136, 2017.
- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633-1644, 2007.
- PENZ, C. M.; ARAÚJO, A. M. Interaction between *Papilio hectorides* (Papilionidae) and four host plants (Piperaceae, Rutaceae) in a southern Brazilian population. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 29, n. 1-2, p. 161-171, 1990.
- PEREIRA, A. D.; REIS, N. R.; ORSI, M. L.; MAGNONI, A. P. V. Dieta de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) em um fragmento florestal urbano da cidade de Londrina, Paraná, Brasil. **Biotemas**, v. 32, n. 2, p. 79-86, 2019.
- PEREIRA, F. G.; MARQUETE, R.; DOMINGOS, L. T.; ROCHA, M. E.; FERREIRA-PEREIRA, A.; MANSUR, E.; MOREIRA, D. L. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2817-2824, 2017.
- PÉRES, V. F.; SAFFI, J.; MELECCHI, M. I. S.; ABAD, F. C.; ABAD, F. C.; ASSIS JACQUES, R.; MARTINEZ, M. M.; CARAMÃO, E. B. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1-2, p. 115-118, 2006a.
- PÉRES, V. F.; SAFFI, J.; MELECCHI, M. I. S.; ABAD, F. C.; ABAD, F. C.; ASSIS JACQUES, R.; MARTINEZ, M. M.; CARAMÃO, E. B. Optimization of pressurized liquid extraction of *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 1105, n. 1-2, p. 148-153, 2006b.

PÉRES, V. F.; MOURA, D. J.; SPEROTTO, A. R. M.; DAMASCENO, F. C.; CARAMÃO, E.B.; ZINI, C. A.; SAFFI, J. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food Chem Toxicol**, v. 47, p. 2389–2395, 2009.

PERIGO, C.V.; TORRES, R.B.; BERNACCI, L.C.; GUIMARÃES, E.F.; HABER, L.L.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; QUECINI, V.; MARQUES, M.O.M. The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 528-539, 2016.

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

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PIELOU, E. C. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession. **Journal of theoretical biology**, v. 10, n. 2, p. 370-383, 1966.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C.; PINHO, D. R., CARNEVALE NETO, F.; LOPES, N. P. Metabolômica de plantas: Métodos e desafios. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329-354, 2020.

PIMPINELLI, S.; PIACENTINI, L. Environmental change and the evolution of genomes: Transposable elements as translators of phenotypic plasticity into genotypic variability. **Functional Ecology**, v. 34, n. 2, p. 428-441, 2020.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. D. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POLATOGLU, K. “Chemotypes”–A Fact that should not be Ignored in Natural Product Studies. **The Natural Products Journal**, v. 3, n. 1, p. 10-14, 2013.

POTZERNHEIM, M.; BIZZO, H. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F.; CARVALHO-CILVA, M.; GRACINDO, L. A. M. B. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 10-12, 2006.

PROSS, A. **What is life?: How chemistry becomes biology**. Oxford University Press, 2016.

QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 39-53, 2006.

QUEIROZ, G. A.; GUIMARÃES, E. F. *Piper* L.(Piperaceae) do Leste Metropolitano, RJ, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 93597-93634, 2020.

- QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D. R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 7, p. 1266-1278, 2006.
- QUIQUI, E. M. D.; DESCHAMPS, C.; AMARAL, W.; SIPRIANO, R. R.; MACHADO, M. P. Yield and Chemical Composition of Essential oil of Piperaceae in one Segment of the Semideciduous Forest of Paraná State, Brazil, in Seasonal Samplings. **International Journal of Advanced**, v. 6, n. 5, 2019.
- RAJA-MAZLAN, R. N. A.; RUKAYADI, Y.; MAULIDIANI, M.; ISMAIL, I. S. Solvent extraction and identification of active anticariogenic metabolites in *Piper cubeba* L. through ¹H-NMR-based metabolomics approach. **Molecules**, v. 2, p. 1730, 2018.
- RAMOS, C. S. **Ecologia química de insetos e espécies de Piperaceae**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.
- RAMOS, C. S.; VANIN, A. S.; KATO, M. J. Sequestration of prenylated benzoic acid and chromenes by *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae) feeding on *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae). **Chemoecology**, v. 19, n. 2, p. 73, 2009.
- RAMOS, Y. J.; MOREIRA, D. L. Seasonal Study of Essential Oil from Aerial Parts of *Peperomia galioides* Kunth (Piperaceae). **Revista Virtual Química**, v. 11, n. 5, 2019.
- RAMOS, Y. J.; BRITO-MACHADO, D.; QUEIROZ, G. A.; GUIMARÃES, E. F.; DEFAVERI, A. C. A.; MOREIRA, D. 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, p. 104116, 2020.
- RAMOS, Y. J.; FELISBERTO, J. R. S.; OLIVEIRA, C. C.; PONTES, E. D.; MACHADO, D. B.; FONSECA, I. C.; MOREIRA, D. L. Produção e Variações Químicas de Óleos Essenciais: uma breve revisão sobre os fatores que afetam a qualidade e a quantidade. **Avanços Científicos, Tecnológicos e de Inovação na Botânica**. 1ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020.
- REHMAN, R.; HANIF, M. A.; MUSHTAQ, Z.; AL-SADI, A. M. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. **Food Reviews International**, v. 32, n. 2, p. 117-160, 2016.
- RIBEIRO, T. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; DE LIMA, M. E. F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 13, p. 3555-3558, 2004.
- RICHARDS, L. A.; GLASSMIRE, A. E.; OCHSENIDER, K. M.; SMILANICH, A. M.; DODSON, C. D.; JEFFREY, C. S.; DYER, L. A. Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 6, p. 1153-1166, 2016.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, p. 92-121, 1997.

RODIG, L.; POSER, G. Constituintes químicos de espécies da família Piperaceae. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 1, 57-64. (1990).

RODRIGUES-SILVA, D.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO B. P.; TÂNIA, U. M.; CORTEZ D. A. G. *In vitro* Antileishmanial Activity of Hydroalcoholic Extract, Fractions, and Compounds Isolated from Leaves of *Piper ovatum* Vahl against *Leishmania amazonensis*. **Acta Protozoologica**, v. 48, n. 1, 2009.

ROGGE, G. D.; PIMENTA, J. A.; BIANCHINI, E.; MEDRI, M. E.; COLLI, S.; ALVES, L. M. T. Metabolismo respiratório de raízes de espécies arbóreas tropicais submetidas à inundação. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, p. 153-158, 1998.

RORIG, L. R.; VON POSER, G. L. Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 72, n. 1, p. 15-17, 1991.

ROYER, J. E.; KHAN, M.; MAYER, D. G. Methyl-isoeugenol, a highly attractive male lure for the cucurbit flower pest *Zeugodacus diversus* (Coquillett) (syn. *Bactrocera diversus*) (Diptera: Tephritidae: Dacinae). **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 3, p. 1197-1201, 2018.

RUANDA, A. D. **Banhos, Defumações, e Amacis da Umbanda**. 5ª edição. Rio de Janeiro: editora espiritualista, 1954.

RUKACHAISIRIKUL, T.; PRABPAI, S.; CHAMPUNG, P.; SUKSAMRARN, A. Chabamide, a novel piperine dimer from stems of *Piper chaba*. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 853 – 855, 2002.

RUKACHAISIRIKUL, T.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; SUKSAMRARN, A. (+)-Bornyl piperate, a new monoterpene ester from *Piper pedicellatum* Aff. roots. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 6, p. 760-761, 2004a.

RUKACHAISIRIKUL, T.; SIRIWATTANAKIT, P.; SUKCHAROENPHOL, K.; WONGVEIN, C.; RUTTANAWEANG, P.; WONGWATTANAVUCH, P.; SUKSAMRARN, A. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2–3, p. 173- 176. 2004b,

SÁ, S. D.; FIUZA, T. S.; BORGES, L. L.; FERREIRA, H. D.; TRESVENZOL, L. M.; FERRI, P. H.; REZENDE, M.H.; PAULA, J. R. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p.688–693, 2016.

SADGROVE, N. J.; JONES, G. L. Cytogeography of essential oil chemotypes of *Eremophila longifolia* F. Muell (Scrophulariaceae). **Phytochemistry**, v. 105, p. 43-51, 2014.

SADGROVE, N. J.; PADILLA-GONZÁLEZ, G. F.; TELFORD, I. R.; GREATREX, B. W.; JONES, G. L.; ANDREW, R.; FERNANDEZ-CUSIMAMANI, E. *Prostanthera* (Lamiaceae) as a ‘Cradle of Incense’: Chemophenetics of Rare Essential Oils from Both New and Forgotten Australian ‘Mint Bush’ Species. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1570, 2020a.

- SADGROVE, N. J., TELFORD, I. R.; PADILLA-GONZÁLEZ, G. F.; GREATREX, B. W.; BRUHL, J. J. GC-MS 'chemophenetics' on Australian pink-flowered *Phebalium* (Rutaceae) using herbarium leaf material demonstrates phenetic agreement with putative new species. **Phytochemistry Letters**, v. 38, p. 112-120, 2020b.
- SALAZAR, D.; JARAMILLO, A.; MARQUIS, R.J. The impact of plant chemical diversity on plant-herbivore interactions at the community level. **Oecologia**, v. 181, n. 4, p. 1199-1208, 2016a.
- SALAZAR, D.; JARAMILLO, M. A.; MARQUIS, R. J. Chemical similarity and local community assembly in the species rich tropical genus *Piper*. **Ecology**, v. 97, n. 11, p. 3176-3183, 2016b.
- SALEH, M. Efeitos da luz sobre a quantidade e a qualidade do óleo de *Matricaria chamomila*. **Planta Medica**, v. 24, p. 337-340, 1973.
- SALEHI, B., ZAKARIA, Z. A.; GYAWALI, R.; IBRAHIM, A. S.; RAJKOVIC, J.; SHINWARI, Z. K.; VALUSSI, M. *Piper* species: A comprehensive review on their phytochemistry, biological activities and applications. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1364, 2019.
- SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant growth regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.
- SANTANA, H. T., TRINDADE, F. T. T., RG, S., SILVA, A. A. E., MILITÃO, J. S. T. L., & FACUNDO, V. A. Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 105-111, 2015.
- SANTOS, P. R. D., MOREIRA, D. L., GUIMARÃES, E. F., KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 547-551, 2001.
- SANTOS, M. I. S.; LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C. **Metodologia em quimiosistemática. Abordagem quimiosistemática e evolução química de fanerógamas**. Rio de Janeiro: Edur UFRRJ, Rio de Janeiro, Brasil, p. 39-50, 2010.
- SANTOS, T. G. **Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de três espécies do gênero Piper e de Baccharis semiserrata DC**. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2009.
- SAYURI, V. A.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; FERREIRA, M. J.; LAGO, J. H.; BUTURI, F. O. Chemical composition, seasonal variation, and biosynthetic considerations of essential oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 11, p. 2771-2782, 2010.
- SCHIESTL, F. P. The evolution of floral scent and insect chemical communication. **Ecology letters**, v. 13, n. 5, p. 643-656, 2010.

- SCHINDLER B, HEINZMANN, B. M. *Piper gaudichaudianum* Kunth: Seasonal characterization of the essential oil chemical composition of leaves and reproductive organs. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017.
- SCHLICHTING, C. D.; SMITH, H. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. **Evolutionary Ecology**, v. 16, n. 3, p. 189-211, 2002.
- SCODRO, R. B. L.; PIRES, C. T. A.; CARRARA, V. S.; LEMOS, C. O. T., CARDOZO-FILHO, L.; SOUZA, V. A.; CORTEZ, D. A. G. Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 600-604, 2013.
- SCOTT, I. M.; JENSEN, H. R.; PHILOGÈNE, B. J.; ARNASON, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 65, 2008.
- SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: A review. **Fitoterapia**, v. 58, p. 147-166, 1987.
- SETZER, W. N.; PARK, G.; AGIUS, B. R.; STOKES, S. L.; WALKER, T. M.; HABER, W. A. Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of twelve species of *Piper* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 8, p. 1934578X0800300823, 2008.
- SHANJANI, P. S.; MIRZA, M.; CALAGARI, M.; ADAMS, R. P. Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 2, p. 83-87, 2010.
- SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**. v. 27, p. 379-423 - 623-656, 1948.
- SHAWA, N.; RAE, D. E.; RODEN, L. C. Impact of seasons on an individual's chronotype: current perspectives. **Nature and Science of Sleep**, v. 10, p. 345, 2018.
- SILVA, A. C.; DIODATO, J. S.; CASTRO, J. W.; MATIAS, E. F.; SILVA, L. E.; AMARAL, W.; COUTINHO, H. D. Effect of the essential oils from *Piper* sp. and blue led lights in the enhancement of the antibiotic activity of drugs against mdr bacterial strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, n. 199, p. 111604, 2019.
- SILVA, A. C. A.; MATIAS, E. F.; ROCHA, J. E.; ARAÚJO, A. C. J.; FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; COUTINHO, H. D. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) characterization and evaluation of antibacterial bioactivities of the essential oils from *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 76, n. 1-2, p. 35-42, 2021.
- SILVA, J.; TRINDADE, R.; ALVES, N.; FIGUEIREDO, P.; MAIA, J.; SETZER, W. Essential oils from neotropical *Piper* species and their biological activities. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2571, 2017.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., DE MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2017.

SIMPSON, E. H., Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688-688, 1949.

SOMAVILLA, N.; CANTO-DOROW, T. S. Levantamento das plantas medicinais utilizadas em bairros de Santa Maria-RS. **Ciência e Natura**, v. 18, n. 18, p. 131-148, 1996.

SORENSEN, T. A. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. **Biol. Skar.**, v. 5, p. 1-34, 1948.

SOUZA, M. T.; SOUZA, M. T.; BERNARDI, D.; KRINSKI, D.; MELO, D. J.; COSTA OLIVEIRA, D.; ZAWADNEAK, M. A. C. Chemical composition of essential oils of selected species of *Piper* and their insecticidal activity against *Drosophila suzukii* and *Trichopria anastrephae*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2020.

SOUZA-OLIVEIRA, F. A.; PASSARINI, G. M.; MEDEIROS, D. S. S.; AZEVEDO, A. P.; FIALHO, S. N.; JESUS, A.; LATORRE, M.; FREITAG, E. M.; MEDEIROS, O. S.; TELES C. B. G.; FACUNDO, V. A. Antiplasmodial and antileishmanial activities of compounds from *Piper tuberculatum* Jacq fruits. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 382-386, 2018.

SPEROTTO, A. R. M.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; DAMASCENO, F. C.; CARAMÃO, E. B.; HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 57-68, 2013.

SRIVASTAVA, A. K.; MISHRA, P.; MISHRA, A. K. Effect of climate change on plant secondary metabolism: An ecological perspective. In: **Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules**. Academic Press, p. 47-76, 2021.

STEHMANN, J. R. **Plantas da floresta atlântica**. Fundação Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro. p. 5-12. 2009.

SZWEDA, P.; GUCWA, K.; KURZYK, E.; ROMANOWSKA, E.; DZIERŻANOWSKA-FANGRAT, K.; JUREK, A. Z.; MILEWSKI, S. Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 175-183, 2015.

TATAGIBA, S. D.; PEZZOPANE, J. E. M.; REIS, E. F.; DARDENGO, M. C. J. D.; EFFGEN, T. A. M. Comportamento fisiológico de dois clones de Eucalyptus na época seca e chuvosa. **Cerne**, v. 13, n. 2, p. 149-159, 2007.

TESCHKE, R.; STOUGH, C. K. K.; SCHOLEY, A. Re-introduction of kava (*Piper methysticum*) to the EU: is there a way forward? **Planta Medica**, v. 77, n. 02, p. 107-110, 2011.

THAKUR, M.; KUMAR, R. Microclimatic buffering on medicinal and aromatic plants: A review. **Industrial Crops and Products**, p. 113144, 2020.

THAKUR, M.; BHATTACHARYA, S.; KHOSLA, P. K.; PURI, S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 1-12, 2019.

THEIS, N.; LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. S3, p. S93-S102, 2003.

TRINDADE, H., PEDRO, L. G., FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. G. Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of the art. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 530-547, 2018.

TRIPATHI, R. P., TEWARI, N., DWIVEDI, N., TIWARI, V. K. Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 1, p. 93-131, 2005.

UCHIDA, N.; TAKAHASHI, Y. K.; TANIFUJI, M.; MORI, K. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 10, p. 1035-1043, 2000.

UESUGI, A.; KESSLER, A. Herbivore exclusion drives the evolution of plant competitiveness via increased allelopathy. **New Phytologist**, v. 198, n. 3, p. 916-924, 2013.

VARJABEDIAN, R. Lei da Mata Atlântica: retrocesso ambiental. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 147-160, 2010.

VATTEKKATTE, A.; BOLAND, W. Biosynthetic Origin of Complex Terpenoid Mixtures by Multiproduct Enzymes, Metal Cofactors, and Substrate Isomers. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 8, p. 372, 2020.

VETELÄINEN, M. **The Finnish National Program Supporting Conservation and Use of Plant Genetic Resources on 2003–2008**. Disponível em : <
<https://jukuri.luke.fi/bitstream/handle/10024/474759/mtts165.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>
Acesso em 12 de outubro de 2021.

VON MARTIUS, C. F. Tropeiros e barçaças. O sertão, o boi e a seca: Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. Seleção, introdução e notas Ernani Silva Bruno. **Coleção Histórias e Paisagens do Brasil**, v. 2, 1959.

VON POSER, G. L., RÖRIG, L. R.; HENRIQUES, A. T.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. 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, n. 4, p. 337-340, 1994.

VRIES, S.; FUERST-JANSEN, J. M.; IRISARRI, I.; ASHOK, A. D.; ISCHEBECK, T.; FEUSSNER, K.; VRIES, J. The evolution of the phenylpropanoid pathway entailed pronounced radiations and divergences of enzyme families. **bioRxiv**, v. 5, n. 27, 2021.

VUWANI, M. K.; NKOMO, M.; NGEZIMANA, W.; MAKUNGA, N. P.; MUDAU, F. N. Response of phytochemicals in bush tea (*Athrixia phylicoides* DC.) as influenced by selected micronutrients. **HortScience**, v. 52, n. 7, p. 965-971, 2017.

WASICKY R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista Faculdade de Farmácia e Bioquímica** v. 1, n. 1, p. 77-81, 1963.

WEI, L. J.; ZHONG, Y. T.; NIE, M. Y.; LIU, S. C.; HUA, Q. Biosynthesis of α -Pinene by Genetically Engineered *Yarrowia lipolytica* from Low-Cost Renewable Feedstocks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 1, p. 275-285, 2020.

WENG, J. K.; YE, M.; LI, B.; NOEL, J. P. Co-evolution of hormone metabolism and signaling networks expands plant adaptive plasticity. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 881-893, 2016.

WICKER-THOMAS, C. **Evolution of insect pheromones and their role in reproductive isolation and speciation**. In: Annales de la Société entomologique de France. Taylor & Francis Group, p. 55-62. 2011.

WOEHL-JUNIOR, G. **Fêmea do TIÊ-PRETO comendo frutos de pariparoba** - Piper aduncum <https://www.youtube.com/watch?v=S8QuJc-SCFs> Acesso de 14/02/2021

YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; HIGASHI, Y.; NAKABAYASHI, R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 943, 2019.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil – I Piper – Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, n. 2, v. 167, pag. 19-366, 1972.

ZENG, L.; WANG, X.; KANG, M.; DONG, F.; YANG, Z. Regulation of the rhythmic emission of plant volatiles by the circadian clock. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2408, 2017.

ZHENG, R.; LIU, C.; WANG, Y.; LUO, J.; ZENG, X.; DING, H.; WANG, C. Expression of MEP pathway genes and non-volatile sequestration are associated with circadian rhythm of dominant terpenoids emission in *Osmanthus fragrans* Lour. flowers. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1869, 2017b.

ZIDORN, C. Plant chemophenetics– A new term for plant chemosystematics/plant chemotaxonomy in the macro-molecular era. **Phytochemistry**, v. 163, p. 147-148, 2019.

ZUCHIWSCHI, E. F.; FANTINI, A. C.; ALVES, AC.; PERONI, N. Limitations of native forest species use may contribute to erosion of traditional and local ecological knowledge among family farmers. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 270-282, 2010.

APÊNDICE A – Dados da literatura da composição química dos óleos essenciais e seus respectivos esqueletos de carbono de *Piper gaudichaudianum* usados para determinar as variações quimiofenética no Brasil. (Continua)

Esqueleto -C	Substâncias	RO	RS1 - 1	RS1 - 2	RS1 - 3	RS1 - 4	RS1 - 5	RS1 - 6	RS1 - 7	RS1 - 8	RS1 - 9	RS1 - 10	RS1 - 11	RS1 - 12	RS1 - 13	RS1 - 14	RS1 - 15
Alquilbenzeno (C ₃ C ₆)	dilapiol		63,6	63,4	66,7	57,8	68,4	62,7	70,5	60,5	66,6	61,6	65,2	59,2	69,2	68,8	68,1
Aromadendrano	aromadendreno	15,6	0,4	2,5	2,4	3,5	2,6		2,4	1,6		2,0	1,5		0,2	1,7	2
Aromadendrano	espatulenol		0,2	0,2		0,2	0,9	2,1	0,2	1,8	2,1	1,2	1,9		1,6		0,2
Aromadendrano	viridiflorol	27,5															
Bourbonano	β-bourboneno		0,5	0,4		0,5			0,5						0,3	0,4	0,3
Cadinano	γ-muuroleno	4,35															
Cadinano	δ-cadinol														0,8	0,5	0,4
Cadinano	γ-cadinol					0,2									0,3	0,6	0,2
Cadinano	ι-muurolol									0,8							
Cariofilano	E-cariofileno		3,7	4,2	4,0	5,0	3,5	3,8	3,8	4,6	3,9	4,2	3,8	4,9	4	3,1	3,7
Cariofilano	óxido de cariofileno					0,3									0,6	0,7	0,5
Chromane	eupatoriocromeno	3,6															
Copaano	α-copaeno		0,4	0,4		0,5									0,3	0,3	0,3
Copaano	β-copaeno		0,6												0,4	0,4	0,4
Cubebano	δ-cadineno		0,5	1,3	1,6	3,7		2,7		2,3		2,8		1,9	1,7	1,3	4,0
Eremofilano	aristoleno	3,9															
Eudesmano	α-selineno	3,9										1,3		1,5			
Eudesmano	β-selineno	10,5															
Eudesmano	selin-11-en-4-α-ol	8,5															
Farnesano	E-nerolidol		0,9	0,9		1,1		3,0					3,0	2,9			
Germacrano	germacreno D		2,1														

Germacrano	germacreno B	6,9	4,7	5,8	5,9	6,1	6,9	5,0	7,4	5,1	6,1	5,9	5,4	4,4	4,4	1,2		
Guiano	α -bulneseno				1,6									1,9	1,1	1,6		
Humulano	α -humuleno	11,8	13,3	12	14,3	10,2	8,2	7,9	10,1	9,7	9,3	9,3	11,2	9,6	8,4	10,2		
Humulano	epóxido de humuleno II	0,6	0,4															
Humulano	óxido de humuleno	4,1																
Ishwarano	ishwareno	10,0	3,9	4,3	3,3	1,4	2,5	4,1	2,8	3,7	5,0	4,2	3,8	6,4	1,3	3,7	1,9	
Classes química	Monoterpenos não oxigenados	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Monoterpenos oxigenados	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Sesquiterpenos não oxigenados	48,2	30,8	31,1	29,1	36,4	24,9	25,7	22,4	29,7	23,7	29,9	24,3	31,3	24,1	24,8	25,6	
	Sesquiterpenos oxigenados	40,1	1,7	1,5	0,0	1,8	0,9	5,1	0,2	2,6	2,1	1,2	4,9	2,9	3,3	1,8	1,3	
	Arilpropanoídes (C₆C₃)	0,0	63,6	63,4	66,7	57,8	68,4	62,7	70,5	60,5	66,6	61,6	65,2	59,2	69,2	68,8	68,1	
	Benzoato de benzila(C₆C₆)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Eupatoriocromeno	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Outras substâncias	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Esqueleto - C	Acorano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Alquilbenzeno (C₃C₆)		0,0	63,6	63,4	66,7	57,8	68,4	62,7	70,5	60,5	66,6	61,6	65,2	59,2	69,2	68,8	68,1	
Aromadendrano		43,1	0,6	2,7	2,4	3,7	3,5	2,1	2,6	3,4	2,1	3,2	3,4	0,0	1,8	1,7	2,2	
Bergamotano		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Biciclogermacreno		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Bisabolano		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Bourbonano		0,0	0,5	0,4	0,0	0,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,4	0,3	
Benzoato de benzila(C₆C₆)		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Cadinano	4,3	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,1	0,6
Carano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cariofilano	0,0	3,7	4,2	4,0	5,3	3,5	3,8	3,8	4,6	3,9	4,2	3,8	4,9	4,6	3,8	4,2
Chromane	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Copaano	0,0	1	0,4	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,7	0,7
Cubebano	0	0,5	1,3	1,6	3,7	0,0	2,7	0,0	2,3	0,0	2,8	0,0	1,9	1,7	1,3	4,0
Daucane	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Elemo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Eremofilano	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Eudesmano	22,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0
Farnesano	0,0	0,9	0,9	0,0	1,1	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	2,9	0,0	0,0	0,0
Germacrano	0,0	9,0	4,7	5,8	5,9	6,1	6,9	5,0	7,4	5,1	6,1	5,9	5,4	4,4	4,4	1,2
Guiano	0,0	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	1,1	1,6
Hidrocarboneto	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Himalachano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Humulano	4,1	12,4	13,7	12	14,3	10,2	8,2	7,9	10,1	9,7	9,3	9,3	11,2	9,6	8,4	10,2
Ishwarano	10,0	3,9	4,3	3,3	1,4	2,5	4,1	2,8	3,7	5,0	4,2	3,8	6,4	1,3	3,7	1,9
Longifolane	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Longipinano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mentano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mircano	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pinano	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tujopsano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Legenda: tr = traço (substâncias <0,05).

APENDICE A - *Continuação*

Esqueleto de C	Substâncias	RS1 - 16	RS2	RS3	RS4	SC	SP1 - 1	SP1 - 2	PR1	PR 2	PR3 - 1	PR3 - 2	PR4	PR5 - 1	PR5 - 2	PR6	PR7
Acorane	α -acorenol							0,6									
Alquilbenzeno (C ₃ C ₆)	dilapiol	64,7															
Alquilbenzeno (C ₃ C ₆)	eugenol			0,1													
Alquilbenzeno (C ₃ C ₆)	miristicina															15,2	
Aromadendrano	aromadendreno	2,1	2,2	2,7	2,9		2,3							1,4	0,4		
Aromadendrano	α -gurjuneno		tr	0,2	0,1									0,5	0,4		
Aromadendrano	<i>allo</i> aromadendreno		7,7	3,1	3,3		0,6	4,3		2,3							
Aromadendrano	γ -gurjuneno			4,3	0,23					2,9							
Aromadendrano	β -gurjuneno			0,4										4,9	5,1		
Aromadendrano	espatulenol	1,4	0,7	1,8	2,0		4,5	3,8		1,4				3,2	0,8		
Aromadendrano	óxido de <i>allo</i> -aromadendreno				tr	1,1							2,5				2,5
Aromadendrano	ledol				tr												
Aromadendrano	globulol		0,5		0,2		2,9	3,1	10,3					0,1			
Aromadendrano	viridiflorol			0,6	0,2									0,21	0,2		
Bergamotano	<i>E</i> - α -bergamoteno				0,2												
Biciclogermacrano	biciclogermacreno		1,2	7,4	13,2					4,4	5,1	6,4	2,6	4,2	4,8	4,6	2,6
Bisabolano	α -zingiberene					2,5											
Bisabolano	α -santalene				0,3												
Bisabolano	β -santalene				1,1												
Bisabolano	γ -curcumeno				0,1												

Bisabolano	β -curcumeno			0,5							
Bisabolano	γ - <i>E</i> -bisaboleno			0,2							
Bisabolano	α - <i>Z</i> -bisaboleno										
Bisabolano	<i>Z</i> -calamenen-10-ol					1,5					
Bisabolano	<i>E</i> -calamenen-10-ol					3,1					
Bisabolano	α -bisabolol			tr							
Bisabolano	<i>Z</i> - α - <i>e</i> -bergamotol			0,1							
Bisabolano	<i>epi</i> - α -bisabolol									1,9	1,4
Bourbonano (C ₆ C ₆)	β -bourboneno	0,4	0,2								
	benzoato de benzila					0,2	2,5				
Cadinano	α -amorfeno					1,2					
Cadinano	α -calacoreno		0,1	0,2	3,5			3,5	0,2	0,6	3,5
Cadinano	β -calacoreno				1,9			2,0			2,0
Cadinano	<i>E</i> -muurolo-3.5-dieno			0,1							
Cadinano	γ -muurolo			0,9		2,3			0,6	0,6	
Cadinano	α -muurolo		0,3	0,7					4,0	5,0	
Cadinano	δ -amorfeno			0,2							
Cadinano	γ -cadineno	0,4	0,8	1,3	1,1	1,6			3,8	4,1	
Cadinano	zonareno			tr							
Cadinano	α -cadineno			0,2					0,3	0,4	
Cadinano	cadaleno						33,7				
Cadinano	<i>Z</i> -cadinina-1(6),4-dieno								0,3	0,3	
Cadinano	<i>E</i> -cadinina-1,4-dieno								0,6	0,8	
Cadinano	1.10-di- <i>epi</i> -cubenol			0,1		0,3			0,7	0,8	
Cadinano	α -muurolol		0,3	tr					1,9	2,2	
Cadinano	α -cadinol	0,2		0,3	4,3	1,2	3,3		1,3	1,3	

Cadinano	1- <i>epi</i> -cubenol						0,7			24,2			1,2	1,6	25,0		
Cadinano	<i>epi</i> - α -cadinol							1,1		1,6							
Cadinano	<i>epi</i> - α -muurolol						1,2						1,9	2,2			
Cadinano	cubebol									1,5							
Carano	δ -2-careno			0,1													
Carano	<i>p</i> -cimeno			0,1						1,2							
Carano	δ -3-careno			0,1						5,9							
Cariofilano	<i>E</i> -cariofileno	4,3	17,4	8,9	7,51	3,7	12,1	19,3		1,7	4,3	17,8	3,8	7,4	7,2	3,7	3,8
Cariofilano	<i>Z</i> -cariofileno						5,2										
Cariofilano	óxido de cariofileno		0,7	1,6	tr								2,0	3,1	3,7		2,0
Cariofilano	cariofila-4(14),8(15)-dien-5- α -ol					0,1											
Cariofilano	cariofile-4(12),8(13)-dien-5 β -ol													0,2	1,2		
Copaano	α -copaeno	0,4	0,5	0,5	tr	4,3		0,5					4,4	3,2			4,4
Copaano	β -copaeno				0,2												
Copaano	α -ylangeno			tr													
Copaano	β -capaen-4- α -ol					2											
Copaano	β -copaen-4- α -ol									2,1			2,1				2,1
Copaano	α -copaen-11-ol													0,2	0,1		
Cubebano	δ -cadineno	1,5	0,8	1,2	1,5	9,3	2,4	3,5		45, 3	6,9		9,4	5,6	7,1		9,4
Cubebano	amorfa-4,7(11)-diene					2,8							2,9				2,9
Cubebano	α -cubebeno			0,2				0,2						0,6			
Daucane	dauca-5,8-dieno					2,4								5,2	6,3		
Elemeno	γ -elemeno				tr	6,1				5,4			5,2				5,2

Elemmano	β -elemeno	tr	1,7	0,7	2,1	0,5	3,5	6,1	6,1
Elemmano	δ -elemeno		0,2						
Elemmano	elemol		0,1	0,3					
Elemmano	shiobunol						1,2		
Eremofilano	4,5-di- <i>epi</i> -aristolocheno				1,2			1,3	1,3
Eremofilano	aristoleno			tr					
Eremofilano	4- <i>epi</i> -Z-dihidro-agarofurano							3,0	3,0
Eudesmano	α -selineno	2,1		2,7	2,9	16,6	8,9		
Eudesmano	δ -selineno		0,6		1,6			1,7	0,3
Eudesmano	drima-7,9(11)-dieno			0,3					0,4
Eudesmano	β -selineno	2	4,8	3,4		15,7	3,7		0,1
Eudesmano	7- <i>epi</i> - α -selineno			0,2		0,4			0,4
Eudesmano	selina-3,7(11)-dieno					0,5			
Eudesmano	intermedeol			0,5					
Eudesmano	selin-11-en-4- α -ol							1,2	
Eudesmano	5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol						13,3		
Eudesmano	β -eudesmol		0,2						0,7
Eudesmano	eudesm-7(11)-en-4-ol								0,8
Eudesmano	rosifoliol								28,4
Eudesmano	γ -eudesmol							0,5	0,5
Eudesmano	γ -eudesmol							0,6	0,6
Farnesano	<i>E,E</i> - α -farneseno		tr	1,31	1,9			1,92	0,3
Farnesano	<i>E</i> -nerolidol	4,1	22,4	22,0	3,2	2,7	2,8	4,0	5,0
Farnesano	<i>Z,E</i> -farnesol			0,1				3,3	6,1
Farnesano	2-sesquilavandulol					0,4	1,6		7,1
Farnesano	2-Z-6-E-farnesol								5,3
									3,3

Germacrano	germacreno D		1,3	2,2	tr		4,7		1,7		1,2	1,4	1,7	1,2
Germacrano	germacreno B	4,2			0,4	21,5	1,1				21,5	0,4	0,2	21,5
Germacrano	hedicariol					1,1								
Germacrano	germacreno A			1,5	0,12			0,9	2,6					
Guiano	α -bulneseno													
Guiano	α -guaieno			0,3					8,3					
Guiano	6.9-guaiadieno											0,2	0,2	
Hidrocarbonetos	3Z-hexenol											0,3		
Hidrocarbonetos	6-methyl-5-hepten-2-ono											0,8		
Himalachano	α -hirschachaleno								3,2					
Humulano	α -humuleno	10,9	37,5	16,5	21,3	3,6	13,3	29,2	2,2		3,7	2,3	1,4	3,67
Humulano	epóxido dehumuleno II			2,5	2,3			2,8				0,9	0,5	
Humulano	óxido de humuleno		1,1											
Ishwarane	ishwareno	1,9												
Longifolane	longifolol									1,2				
LongiPinano	longipinanol									19,1				
Mentano	limoneno		0,5	0,3	0,1		0,5	0,5					0,7	
Mentano	α -felandreno			0,1										
Mentano	α -terpineno			0,1										
Mentano	γ -terpineno			0,1										
Mentano	terpinoleno			0,1										
Mentano	α -terpineol			0,1	0,01									
Mircano	mirceno		0,3	0,2									0,3	
Mircano	Z- β -ocimeno		0,4										0,2	
Mircano	E- β -ocimeno		0,6	0,2										
Mircano	linalol		4,8	0,3	0,04									

Mircano	acetato de geranyl													5,3	5,7		
Pinano	α -pineno	2,0	1,9		2,1						9,7	2,2	5,1				2,2
Pinano	β -pineno	5,6	1,2								13,2		6,6				
Tujopsano	Z-dihydro-mayurono					1,9											

Classes químicas	Monoterpenos não oxigenados	0,0	9,4	4,5	0,1	2,1	0,5	0,5	0,0	7,1	0,0	22,8	2,2	12,9	0,0	0,0	2,2	
	Monoterpenos oxigenados	0,0	4,8	0,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3	5,7	0,0	0,0
	Sesquiterpenos não oxigenados	25,7	73,1	58,1	65,4	76,7	72,9	78,1	8,3	72,0	50,0	24,2	69,7	47,9	47,7	8,3	69,7	
	Sesquiterpenos oxigenados	1,4	7,3	29,5	28,2	12,8	16,7	17,3	42,7	11,4	30,3	5,0	12,7	24,6	25,0	58,8	12,7	
	Arilpropanoides (C₆C₃)	64,7	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,2	0,0
	Benzoato de benzila(C₆C₆)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Cromeno (Eupatoriocromeno)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Outras substâncias																	
			0,0	5,1	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0
		Acorano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Esqueleto - C	Alquilbenzeno (C₃-C₆)	64,7	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,2	0,0	
	Aromadendrano	3,5	11,1	13,1	8,9	1,1	10,3	11,2	10,3	6,6	0,0	0,0	2,5	10,4	7,0	0,0	2,5	
	Bergamotano	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Biciclogermacrano	0,0	1,2	7,4	13,2	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	5,1	6,4	2,6	4,2	4,8	4,6	2,6	
	Bisabolano	0,0	0,0	0,0	2,4	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	1,4	0,0	0,0	
	Bourbonano	0,4	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Benzoato de benzila (C₆C₆)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cadinano	0,0	0,6	1,5	3,8	6,6	7,3	6,5	0,0	6,4	58,0	0,0	5,5	16,8	19,7	25,1	5,5
Carano	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cariofilano	4,3	18,1	10,5	7,7	8,9	12,1	19,3	0,0	1,7	4,3	17,8	5,7	10,7	12,1	3,7	5,7
Cromano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Copaano	0,4	0,5	0,5	0,2	6,3	0,0	0,5	0,0	0,0	2,1	0,0	6,4	3,3	0,1	0,0	6,4
Cubebano	1,5	0,8	1,4	1,5	12,1	2,4	3,7	0,0	45, 3	6,9	0,0	12,3	6,2	7,1	0,0	12,3
Daucane	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,2	6,3	0,0	0,0
Elemano	0,0	0,0	2,0	1,0	6,1	2,1	0,5	0,0	10, 1	0,0	0,0	11,3	0,0	0,0	0,0	11,3
Eremofilano	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0
Eudesmano	0,0	4,1	5,6	7,1	4,5	33,2	12,6	13,3	1,2	0,0	0,0	1,7	2,2	2,6	28,4	1,7
Farnesano	0,0	4,1	22,4	23,5	5,1	3,1	4,4	0,0	0,0	4,0	5,0	5,2	6,5	7,6	5,3	5,2
Germacrano	4,2	1,3	3,7	0,5	22,6	5,8	0,9	0,0	4,3	0,0	0,0	22,7	1,8	1,9	0,0	22,7
Guiano	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0
Hidrocarbonetes	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0
Himalachane	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Humulano	10,9	38,6	19,0	23,6	3,6	13,3	32,0	0,0	2,2	0,0	0,0	3,7	3,2	1,9	0,0	3,7
Ishwarano	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Longifolano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Longipinano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mentano	0,0	0,5	0,8	0,1	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0
Mircano	0,0	6,1	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,8	5,7	0,0	0,0
Pinano	0,0	7,6	3,1	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	22,8	2,2	11,7	0,0	0,0	2,2
Tujopsano	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Legenda: tr = traço (substâncias <0,05).

APÊNDICE B - Artigos publicados

Vol. 15(9), pp. 413-422, September, 2021
 DOI: 10.5897/JMPR2021.7168
 Article Number: 6131FA667774
 ISSN 1996-0875
 Copyright © 2021
 Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/JMPR>



Journal of Medicinal Plants
 Research

Full Length Research Paper

Piper multinodum* C.DC. (Piperaceae) essential oils chemical variation and biological activity against *Mycobacterium tuberculosis

Ygor Jessé Ramos^{1,2,4}, Claudete Costa-Oliveira³, Irene Candido Fonseca³, Diego da Silva Marcelino^{2,4}, Marlon Heggdorne-Araujo⁵, Elena B. Lassounskaia⁶, Michelle F. Muzitano⁵, George A. Queiroz², Elsie F. Guimarães² and Davyson de Lima Moreira^{1,2,3*}

¹Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Pós-graduação em Biologia Vegetal, Rio de Janeiro, RJ, Maracanã, 20550-013, Brazil.

²Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Jardim Botânico, Rio de Janeiro, RJ, 22460-030, Brazil.

³Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, 21041-250, Brazil.

⁴Universidade Castelo Branco, Escola de Ciências da Saúde e Meio Ambiente, Realengo, Rio de Janeiro - RJ, 21710-255, Brazil.

⁵Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Produtos Bioativos, Campus Macaé, Novo Cavaleiros, Macaé-RJ, 27930-560, Brazil.

⁶Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biotecnologia, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes-RJ, 28013-602, Brazil.

Received 5 August, 2021; Accepted 14 September, 2021

Piper multinodum C.DC. belongs to the Piperaceae family, and is known as "Jaborandi-mansô". This species has no reported botanical, chemical, pharmacological and/or toxicological scientific studies, and has restricted occurrence in degraded Brazilian biomes. The *Piper* genus is known to be aromatic, the essential oils (EO) obtained from different organs have demonstrated significant biological activities, and can be an important tool for chemophenetic and ecological definitions. The present study aimed to characterize the chemical profile of the EO from different parts of *P. multinodum* and their activity against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC, 25618). The EO were obtained by hydrodistillation and characterized by GC-MS and GC-FID. Chemical composition of the volatile mixture showed a great diversity of compounds that diverged between the vegetative and reproductive parts. The α -pinene compound was identified as being the most predominant in the leaves, infructescences and inflorescences (32.49, 67.23 and 40.23%, respectively). The branches (secondary stem) showed to be rich in sesquiterpenes and monoterpenes: α -copaene (13.24%), *E-caryophyllene* (12.32%), α -pinene (20.34%), and myrcene (11.23%). The chemical profile of stems and roots showed a low percentage of monoterpenes and sesquiterpenes, but a high percentage of arylpropanoids, with *E*-methyl-isoegenol (77.58%) registered in the stems and eusarone (81.34%) in the root. The antimycobacterial activity showed the highest activities recorded for the EO from roots (78.51 μ g/mL) and infructescences (85.91 μ g/mL). In addition to the findings related to biological activity, the determination of chemical diversification between the different parts of *P. multinodum* may help to understand the ecological issues of the Piperaceae family as well as to improve the chemotaxonomic knowledge of the genus *Piper*.

Key words: *Piper multinodum*; essential oils; antimycobacterial activity; chemical composition.

<https://doi.org/10.5897/JMPR2021.7168>

Article

Advanced Chemophenetic Analysis of Essential Oil from Leaves of *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) Using a New Reduction-Oxidation Index to Explore Seasonal and Circadian Rhythms

Ygor Jessé Ramos ^{1,2,3,4} , Claudete da Costa-Oliveira ⁴, Irene Candido-Fonseca ⁴, George Azevedo de Queiroz ³, Elsie Franklin Guimarães ², Anna C. Antunes e Defaveri ³, Nicholas John Sadgrove ⁵ , and Davyson de Lima Moreira ^{1,2,4,*}

¹ Instituto de Biologia, Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Maracanã, Rio de Janeiro 20550-013, Brazil; ygorjesse@gmail.com

² Diretoria de Pesquisa do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Jardim Botânico, Rio de Janeiro 22460-030, Brazil; elsie.guimaraes@jbrj.gov.br

³ Centro de Responsabilidade Socioambiental do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Jardim Botânico, Rio de Janeiro 22460-030, Brazil; georgeazevedo08@gmail.com (G.A.d.Q.); anna.defaveri@gmail.com (A.C.A.e.D.)

⁴ Fundação Oswaldo Cruz, Farmanguinhos, Manguinhos, Rio de Janeiro 21041-250, Brazil; deteoliveira@hotmail.com (C.d.C.-O.); irene.fonseca2903@gmail.com (I.C.-F.)

⁵ Jodrell Science Laboratory, Royal Botanic Gardens Kew, Richmond TW9 3DS, UK; n.sadgrove@kew.org

* Correspondence: davysonmoreira@hotmail.com



Citation: Ramos, Y.J.;

Costa-Oliveira, C.d.;

Candido-Fonseca, I.; Queiroz, G.A.d.;

Guimarães, E.F.; Defaveri, A.C.A.e.;

Sadgrove, N.J.; Moreira, D.d.L.

Advanced Chemophenetic Analysis of Essential Oil from Leaves of *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae)

Using a New Reduction-Oxidation Index to Explore Seasonal and Circadian Rhythms. *Plants* **2021**, *10*, 2116. <https://doi.org/10.3390/plants10102116>

Academic Editor: Milena Popova

Received: 16 September 2021

Accepted: 28 September 2021

Published: 6 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license ([https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

Abstract: The aromatic species *Piper gaudichaudianum* Kunth (Piperaceae) is widely used in Brazil for medicinal and ritualistic applications. In the current study, chemophenetic patterns were realized across season and circadian rhythm based on the chemical profile of essential oils (EOs) from leaves. Hydrodistilled essential oils were analyzed by GC-MS and GC-FID, and a new calculation of metabolite oxidation level, averaged for each individual molecule component of the EO, was used to explore the patterns of metabolism/biosynthesis. This new index used an intermediate calculation, the 'weighted average redox standard' (S_{RO}), to enable a value for mixtures of metabolites to be generated, the 'general mixture redox index' (GM_{OR}). The indices were subjected to a proof-of-concept approach by making comparison to outcomes from multivariate analyses, i.e., PCA and HCA. Chemical analysis demonstrated that the essential oils were dominated by sesquiterpenes, constructed of 15 classes of compound (C-skeletons), and 4 C-skeletons were recognized in the monoterpene group, giving a total of 19. The variation of chemical profiles was distinct at different phenological stages, but stronger chemical variation was evident between day and night as compared to season. Furthermore, due to comprehensive sampling across different regions, nine chemotypes were recognized, including those previously reported. The S_{RO} and GM_{RO} indices demonstrate that phenological variation of chemistry is mainly an outcome of redox fluctuations in terpene biosynthesis, changing from day to night. These indices also corroborate that chemical diversity is increased with oxidative metabolism. Lastly, the current study demonstrates pronounced phenotypic plasticity in *P. gaudichaudianum*, which makes it a suitable candidate to help further our understanding of chemophenetics and chemical ecology.

Keywords: *Piper*; medicinal plant; terpenoids; chemodiversity; chemophenetic

1. Introduction

Piper gaudichaudianum Kunth (Sin. *Artanthe gaudichaudiana* (Kunth) Miq.; *Piper obscurum* C.DC.) is a native South American member of Piperaceae that is widely distributed in Brazil, mainly in the Atlantic Forest [1,2]. The fruit from this ecologically important