



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

Jéssica Regina Sales Felisberto

Estudo químico sazonal do óleo essencial e de neolignanas de *Piper rivinoides* Kunth da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

Jéssica Regina Sales Felisberto

**Estudo químico sazonal do óleo essencial e de neolignananas de *Piper rivinoides* Kunth da
Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro**



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

Orientador: Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Coorientador: Prof. Dr. André Mesquita Marques

Rio de Janeiro

2020

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

F315 Felisberto, Jéssica Regina Sales.
Estudo químico sazonal do óleo essencial e de neolignanas de *Piper rivinoides* Kunth da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro / Jéssica Regina Sales Felisberto. – 2020.
132 f. : il.

Orientador: Davyson de Lima Moreira.

Coorientador: André Mesquita Marques.

Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

I. Piperaceae – Rio de Janeiro (Estado) – Teses. 2. Plantas medicinais - Teses. 3. Essências e óleos essenciais – Teses. 4. Extração (Química) – Teses. I. Moreira, Davyson de Lima. II. Marques, André Mesquita. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582.672(815.3)

Patrícia Bello Meijinhos – CRB7- 5217 - Bibliotecária responsável pela elaboração da ficha catalográfica

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

Assinatura

Data

Jéssica Regina Sales Felisberto

Estudo químico sazonal do óleo essencial e de neolignanas de *Piper rivinoides* Kunth da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro

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

Aprovada em 15 de outubro de 2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. André Mesquita Marque (Coorientador)
Fundação Oswaldo Cruz

Prof^ª. Dra. Helena Regina Pinto Lima
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marco Eduardo do Nascimento Rocha
Universidade Veiga de Almeida

Prof^ª. Dra. Suzana Guimarães Leitão
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico esta qualificação ao meu melhor amigo e também marido **Jorge Luis Pereira da Silva**, que sempre se manteve paciente comigo nos momentos em que foram difíceis à condução dessa Dissertação, sempre me dando seu amor e carinho e me incentivando.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por não me deixar fraquejar e sempre me dar perseverança.

Ao **Universo e suas energias**, que sempre foram positivas comigo e me mantiveram centrada.

Agradeço, especialmente, ao meu orientador **Dr. Davyson de Lima Moreira**, por ter me aceitado como parte de sua equipe e por sempre acreditar em mim e me incentivar a fazer mais. Agradeço pela sua disponibilidade, contribuições, empolgação, ensinamentos e importantes sugestões para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Professor **Dr. Francisco Paumgarten** por possibilitar o desenvolvimento desta Dissertação no laboratório de Toxicologia Analítica da Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ e por seus ensinamentos e incentivos.

Ao colega de grupo **Ygor Jessé Ramos**, meu coorientador de coração, que me ajudou com boa vontade e carinho, me fazendo evoluir nessa jornada com suas críticas e observações.

À meu companheiro, amigo, parceiro, marido, **Jorge Luís Pereira**, que sempre suportou meus surtos de loucuras e lágrimas e nunca me abandonou. Sempre me dando forças, me exaltando, me dando amor, carinho e compreensão.

Ao amigo **George Azevedo** por ser sempre solícito e me passar todos os conhecimentos sobre esse vasto mundo das Piperaceae, contribuindo sempre com muito carinho.

À **Bianka Soares** do LMMP por me apoiar e me ajudar a ingressar nesse curso de Mestrado e me ceder um espaço em seu laboratório, favorecendo o desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos colegas de curso de Pós-Graduação **Tiellen, Vinicius, Ektor e Thaís**, por sempre tornarem as aulas mais animadas e divertidas e por fazerem de cada aula prática uma experiência incrível de aprendizado.

À todos os colegas do Laboratório de Toxicologia Analítica da ENSP/ FIOCRUZ que, de uma maneira geral, me ajudaram a conquistar essa etapa.

Ao **CNPQ** e **FAPERJ** pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

“Estudar as plantas tem nos permitido entender as regras que sustentam o funcionamento da vida, da Natureza.”

Otto R. Gottlieb

RESUMO

FELISBERTO, Jéssica Regina Sales. *Estudo químico sazonal de óleo essencial e neolignanas de Piper rivinoides Kunth da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro*. 132f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

A Organização Mundial de Saúde declarou que é fundamental a condução de pesquisas científicas direcionadas às plantas utilizadas com fins medicinais e de seus princípios ativos para elucidar seus efeitos, afim de garantir a eficácia e segurança de seu uso popular. *Piper rivinoides* Kunth é uma espécie pertencente à família Piperaceae, de uso na medicina popular, de porte arbustivo e nativa da Mata Atlântica. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram excelente atividade leishmanicida e antifúngica para extratos, frações e neolignanas isoladas dessa planta. Com base nessas considerações, esse trabalho teve por objetivo realizar um estudo sazonal do teor quantitativo de neolignanas e da composição química volátil de folhas de *P. rivinoides*. Para isso, folhas da espécie foram coletadas de indivíduos nativos de dois locais distintos da Mata Atlântica (Floresta da Tijuca/ RJ e Serra da Tiririca, Niterói/ RJ). As folhas foram submetidas a processos de secagem, fragmentação e extração para dosagem do teor de neolignanas com base em delineamento fatorial usando diferentes solventes extrativos. Os extratos foram quantificados de acordo com método analítico desenvolvido e validado para este estudo por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Ultravioleta em Rede de Diodos. O óleo essencial de folhas frescas foram obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado e analisados por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, e a identificação das substâncias foi realizada por comparação dos espectros de massas e índices de retenção com dados da literatura. O rendimento dos extratos variou 0,92 a 6,90%. Os teores percentuais de conocarpano (CNC) variaram de 0,04 a 0,13%, de eupomatenoide-6 (EUP-6) de 0,34 a 1,03% e de eupomatenoide-5 (EUP-5) de 2,73 a 4,44%. Portanto, a neolignana mais abundante no extrato foi EUP-5. O indivíduo de Niterói/RJ registrou menores teores percentuais de neolignanas para os meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março (0,09-0,70% CNC; 0,78-1,41% EUP-6 e 2,29-3,30% EUP-5) o que corresponde ao verão e maiores teores em maio, julho, agosto, setembro e outubro (0,79-1,43% CNC; 1,73-2,45% EUP-6 e 4,06-6,13% EUP-5), o que corresponde a parte do inverno e primavera. As três substâncias registraram maiores teores percentuais no mês de julho, inverno. O exemplar da Floresta da Tijuca/RJ demonstrou perfil diferente, registrando os menores valores para junho (0,06% CNC; 0,49% EUP-6 e 1,67% EUP-5) e teores percentuais mais homogêneos para os outros meses. O rendimento do OE extraído das folhas frescas de *P. rivinoides* coletadas na Mata atlântica do Rio de Janeiro foi bastante significativo variando de 0,16 a 1,36% (p/p) e demonstrou composição química similar e relativamente estável, para ambos os acessos, ao longo de um ano de análise. Foi possível identificar 97 substâncias diferentes, sendo os monoterpenos não oxigenados α -pineno (34,78 a 53,87%) e β -pineno (15,24 a 47,71%) os constituintes majoritários, que são substâncias com grande potencial biológico. As variações biossintéticas encontradas em *P. rivinoides* ao longo de um ano sugerem que seu ciclo fenológico exerce maior influência na biossíntese de metabólitos especiais (tanto neolignanas quanto componentes voláteis) do que os fatores abióticos. Os resultados sugerem que há para *P. rivinoides* uma estabilidade fenotípica química nas duas áreas de estudo. Isso é excelente em termos de desenvolvimento de novos fitomedicamentos, uma vez que a maior diversidade fenotípica química requer maior investimento em domesticação do vegetal.

Palavras-chave: Piperaceae. Validação analítica. Eupomatenoide. Conocarpano. Monoterpenos.

ABSTRACT

FELISBERTO, Jéssica Regina Sales. *Seasonal chemical study of essential oil and neolignans of Piper rivinoides Kunth from the Atlantic Forest of the Rio de Janeiro State*. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The World Health Organization has stated that it is essential to carry out investigations of plants used for medicinal purposes and their active principles to elucidate their effects in order to ensure their efficacy and safety. It also highlighted the importance of popular knowledge and the need for scientific involvement for better applicability of plant use and biodiversity. *Piper rivinoides* Kunth is a species belonging to the Piperaceae family, with popular medicinal uses, shrubby and native to the Atlantic Forest. Previous studies conducted by our group have demonstrated excellent leishmanicidal and antifungal activities for extracts, fractions and neolignans isolated from this plant. Based on these considerations, this work aims to conduct a seasonal study of neolignan content and volatile chemical composition of *P. rivinoides* leaves. For this purpose, leaves of the species have been collected from native specimens from two different locations in the Atlantic Forest (Tijuca Forest/ RJ and Serra da Tiririca, Niterói/ RJ). Leaves were submitted to drying, fragmentation and extraction processes to measure the neolignan content with different extractive solvents. The extracts were quantified according to the developed and validated analytical method by High-Performance Liquid Chromatography coupled to Diode-array UV Detector. Fresh leaf essential oil (EO) were obtained by hydrodistillation in a modified Clevenger-type apparatus and analyzed by Mass Spectrometry Coupled to Gas Chromatography, and the compounds identification were performed by comparing mass spectra and retention indices with data from the literature. The yield of the extracts ranged from 0.92 to 6.90%. The percentages of conocarpan (CNC) varied from 0.04 to 0.13%, of eupomatenoid-6 (EUP-6) from 0.34 to 1.03% and of eupomatenoid-5 (EUP-5) from 2.73 to 4.44%. Therefore, the most abundant neolignan in the extract was EUP-5. The specimen from Niterói/ RJ recorded lower percentage levels of neolignans for the months of December, January, February and March (0.09-0.70% CNC; 0.78-1.41% EUP-6 and 2.29-3.30% EUP-5) which corresponds to summer and higher levels in May, July, August, September and October (0.79-1.43% CNC; 1.73-2.45% EUP-6 and 4.06-6.13% EUP-5), which corresponds to winter and spring. The three compounds registered higher percentage levels in July (winter). The specimen from Floresta da Tijuca/ RJ showed a different chemical profile, registering the lowest values for June (0.06% CNC; 0.49% EUP-6 and 1.67% EUP-5) and more homogeneous percentage levels for the other months. The yield of EO extracted from fresh leaves of *P. rivinoides* collected in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro was quite significant, varying from 0.16 to 1.36% (w / w) and demonstrated a similar and relatively stable chemical composition for both sites, over a year of analysis. It was possible to identify 97 different compounds, being the non-oxygenated monoterpenes α -pinene (34.78 to 53.87%) and β -pinene (15.24 to 47.71%) the major constituents, which are substances with great biological potential. The biosynthetic variations found in *P. rivinoides* over the year suggest that its phenological cycle has a greater influence on the biosynthesis of special metabolites (both neolignans and volatile components) than the abiotic factors. The results suggest that for *P. rivinoides* there is a chemical phenotypic stability in the two sites of study. This is excellent in terms of the development of new phytomedicines, since the greater chemical phenotypic diversity requires greater investment in the domestication of the plant.

Keywords: Piperaceae. Analytical validation. Eupomatenoid. Conocarpan. Monoterpenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais fatores que podem influenciar a produção de metabólitos especiais ou secundários em planta	23
Figura 2 –	Fórmula estrutural plana geral de lignanas e de neolignanas, segundo nomenclatura adotada pela IUPAC	25
Figura 3 –	Esquema de derivação biossintética de vários tipos de lignoides	25
Figura 4 –	Fórmulas estruturais planas das neolignanas benzofurânicas eupomatenóide-5 (1), eupomatenóide-6 (2) e conocarpano (3) isoladas de <i>Piper rivinoides</i> Kunth	27
Figura 5 –	Via biossintética resumida de formação de terpenóides e de fenilpropanóides	28
Figura 6 –	Partes aéreas de <i>P. rivinoides</i>	34
Figura 7 –	Fluxograma de atividades desenvolvidas na produção desta dissertação.....	42
Figura 8 –	Cromatógrafo de fase líquida para análise das neolignanas	45
Figura 9 –	Etapas conduzidas no processo de produção e obtenção de extratos brutos a partir de folhas de <i>Piper rivinoides</i>	52
Figura 10 –	Imagem comparativa das folhas de <i>P. rivinoides</i> coletadas no estado do Rio de Janeiro	55
Figura 11 –	Cromatogramas das soluções padrão das neolignanas benzofurânicas bioativas isoladas encontradas em extratos de <i>P. rivinoides</i> Kunth obtidos por CLAE-DAD-UV e seus respectivos espectros de absorção no UV	58
Figura 12 –	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV para determinar a seletividade do método	60
Figura 13 –	Sobreposição de Cromatogramas obtidos de análises de amostra contendo as neolignanas benzofurânicas puras conocarpano, eupomatenóide-6 e eupomatenóide-5, com amostra em branco e com amostra de extrato bruto de <i>P. rivinoides</i> Kunth	61
Figura 14 –	Curvas analíticas obtidas para a quantificação das neolignanas, nos seus respectivos intervalos de concentrações, obtidas em três dias diferentes: eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano	62
Figura 15 –	Cromatogramas das substâncias puras no limite de quantificação (da esquerda para a direita: eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano)	67
Figura 16 –	Cromatogramas das substâncias puras no limite de detecção (da esquerda para a direita: eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano)	67
Figura 17 –	Gráfico de Pareto gerados a partir dos efeitos dos fatores variáveis dependentes sobre as variáveis independentes	74

Figura 18 –	Gráficos de superfície de resposta para o A) rendimento, B) teor de conocarpano C) teor de eupomatenoide-6 e D) teor de eupomatenoide-5 e obtido a partir de extrações da folha de <i>P. rivinoides</i>	75
Figura 19 –	Cromatograma do extrato etanólico bruto de <i>Piper rivinoides</i> do acesso A) Floresta da Tijuca/RJ e B) Serra da Tiririca-Niterói/RJ ..	76
Figura 20 –	Comparações das variações dos rendimentos (%) dos extratos hidroalcoólicos de <i>P. rivinoides</i> coletadas nos acessos da Floresta da Tijuca/RJ e Serra da Tiririca-Niterói/RJ no período de janeiro a dezembro de 2019	77
Figura 21 –	Gráfico de <i>box plot</i> de representação das variações das proporções entre os eupomatenoides e conocarpano, obtidos de extratos alcoólicos de <i>P. rivinoides</i> dos acessos da Floresta da Tijuca/RJ (PRR) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN)	78
Figura 22 –	Variação mensal média para o ano de 2019 dos teores percentuais de conocarpano, eupomatenoide-6 e eupomatenoide-5, nos extratos de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ	80
Figura 23 –	Variação mensal média para o ano de 2019 dos teores percentuais de conocarpano, eupomatenoide-6 e eupomatenoide-5, nos extratos de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Floresta da Tijuca/RJ	81
Figura 24 –	Variação das neolignanas em função da estação do ano e das áreas de coleta	81
Figura 25 –	Gráfico <i>score</i> das 24 variáveis a partir do teor percentual das neolignanas por mês (janeiro a dezembro de 2019), obtidos de extratos alcoólico de <i>P. rivinoides</i> dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de Janeiro (PRR, verde) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN, vermelho), baseado em análise de componente principal (ACP)	82
Figura 26 –	Gráfico <i>score</i> das 8 variáveis a partir do teor percentual das neolignanas por estação do ano (V = verão; O = outono; I = inverno; P = primavera), obtidos de extratos alcoólico de <i>P. rivinoides</i> dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de Janeiro (PRR) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN), baseado em análise de componente principal (ACP)	83
Figura 27 –	Gráfico de <i>box plot</i> de representação das faixas de teor percentual médio de conocarpano (CNC), eupomatenoide-6 (EUP-6) e eupomatenoide-5 (EUP-5) dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de Janeiro (PRR) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN)	83
Figura 28 –	Dendrograma obtido a partir do teor das neolignanas de 12 amostras (janeiro a dezembro de 2019) de extratos alcoólico de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN), baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA	85

Figura 29 –	Dendrograma obtido a partir do teor das neolignanas de 12 amostras (janeiro a dezembro de 2019) de extratos alcoólico de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Floresta da Tijuca (PRR), baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA	85
Figura 30 –	Dendrograma obtido a partir do teor das neolignanas de 12 amostras (janeiro a dezembro de 2019) de extratos alcoólico de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN) e da Floresta da Tijuca/RJ (PRR), baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA	86
Figura 31 –	Dados climatológicos referente as regiões correspondentes aos pontos de coleta	
Figura 32 –	Estruturas químicas das substâncias majoritárias α-pineno, β-pineno, limoneno e biciclogermacreno da esquerda para direita), identificadas nos óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i>	88
Figura 33 –	Varição sazonal das principais substâncias consituíntes dos óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i> Kunth, referente ao período de janeiro a dezembro de 2019	89
Figura 34 –	Comparações das variações dos rendimentos (%) de óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i> coletadas nos acessos da Floresta da Tijuca/RJ (B) e Serra da Tiririca-Niterói/RJ (C) 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	97
Figura 35 –	Varição das classes químicas de substâncias encontradas nos óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i> dos acessos A – Serra da Tiririca-Niterói/RJ e B – Floresta da Tijuca/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2019	99
Figura 36 –	Gráfico <i>score</i> das 24 variáveis a partir das substâncias por mês (janeiro a dezembro de 2019), obtidos do óleo essencial de <i>P. rivinoides</i> dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de janeiro (PRR, verde) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN, vermelho), baseado em análise de componente principal (ACP)	101
Figura 37 –	Dendrograma e gráfico de <i>two-way</i> joining de 11 amostras de óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i> do acesso de Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN), de janeiro a dezembro de 2019, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA	102
Figura 38 –	Dendrograma e gráfico de <i>two-way</i> joining de 11 amostras de óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Floresta da Tijuca/RJ (PRR), de janeiro a dezembro de 2019, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização dos locais de coleta dos acessos de <i>P. rivinoides</i> Kunt, no Rio de Janeiro/ RJ.....	41
Tabela 2 –	Estações do ano e datas das coletas de folhas de <i>P. rivinoides</i> Kunt no Rio de Janeiro/ RJ	41
Tabela 3 –	Concentrações das três neolignanas utilizada para composição da curva analítica	46
Tabela 4 –	Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método cromatográfico de quantificação das neolignanas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano	48
Tabela 5 –	Variáveis independentes do delineamento fatorial 2 ² para o processo de extração de neolignanas a partir das folhas <i>P. rivinoides</i>	50
Tabela 6 –	Delineamento fatorial 2 ² para a extração de neolignanas a partir das folhas <i>P. rivinoides</i>	50
Tabela 7 –	Condições testadas para análise das neolignanas nos extratos brutos de <i>Piper rivinoides</i>	56
Tabela 8 –	Parâmetros cromatográficos obtidos para as neolignanas isoladas de <i>P. rivinoides</i>	57
Tabela 9 –	Descrição das condições cromatográficas para quantificação das neolignanas	57
Tabela 10 –	Fórmulas obtidas por regressão linear e usada para a quantificação das neolignanas.....	62
Tabela 11 –	Avaliação da recuperação das neolignanas em extrato de <i>Piper rivinoides</i> do acesso da Floresta da Tijuca/RJ	63
Tabela 12 –	Avaliação da recuperação das neolignanas em extrato de <i>Piper rivinoides</i> do acesso da Serra da Tiririca – Niterói/RJ	63
Tabela 13 –	Avaliação da precisão do método de análise para eupomatenóide-5..	64
Tabela 14 –	Avaliação da precisão do método de análise para eupomatenóide-6..	64
Tabela 15 –	Avaliação da precisão do método de análise para conocarpano	64
Tabela 16 –	Avaliação da exatidão do método de análise para as neolignanas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano	66

Tabela 17 – Efeitos na absorvância do eupomatenóide-5 causados pela variação das condições do método analítico	68
Tabela 18 – Efeitos na absorvância do eupomatenóide-6 causados pela variação das condições do método analítico	68
Tabela 19 – Efeitos na absorvância do conocarpano causados pela variação das condições do método analítico.....	69
Tabela 20 – Resultados obtidos referentes ao delineamento fatorial para rendimentos dos extratos (%) e teores das substâncias conocarpano (CNC), eupomatenóide-6 (EUP-6) e eupomatenóide-5 (EUP-5) obtidos a partir da extração de folhas de <i>P. rivinoides</i>	71
Tabela 21 – Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis dependentes rendimentos dos extratos, teor de conocarpano, eupomatenóide-6 e eupomatenóide-5 obtidos de folhas de <i>P. rivinoides</i>	72
Tabela 22 – Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes, rendimento, teor de eupomatenóide-6, eupomatenóide-5 e conocarpano em função dos fatores; tipo de solvente e tempo de extração	73
Tabela 23 – Variação anual média das porcentagens das áreas de conocarpano, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6 nos extratos do acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ	79
Tabela 24 – Variação anual média das porcentagens das áreas de conocarpano, eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6 nos extratos do acesso da Floresta da Tijuca/RJ	79
Tabela 25 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e teor percentual das neolignanas presente no extrato de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Serra da Tiririca/ RJ	87
Tabela 26 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e teor percentual das neolignanas presente no extrato de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Floresta da Tijuca/RJ	87
Tabela 27 – Constituição química e dados sobre os óleos essenciais de folhas de <i>P. rivinoides</i> do acesso de Niterói/ RJ nos meses de janeiro a dezembro de 2019	90

Tabela 28 – Constituição química e dados sobre os óleos essenciais de folhas de <i>P. rivinoides</i> do acesso da Floresta da Tijuca/ RJ nos meses de janeiro a dezembro de 2019	93
Tabela 29 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e rendimentos das substâncias majoritárias e classes químicasde óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i> do acesso de Serra da Tiririca-Niterói/RJ.	98
Tabela 30 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e rendimentos das substâncias majoritárias e classes químicasde óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i> do acesso de Floresta da Tijuca/RJ	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius
ABS	Absorbância
a.C	Primeiro milênio antes de Cristo
ACN	Acetonitrila
AAH	Análise de Agrupamento Hierárquico
ACP	Análise de Componente Principal
APS	Atenção Primária à Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCEO	carcinoma de células escamosas oral
CG-DIC	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Detector por Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CL	Cromatografia em Fase Líquida
CLAE-DAD-UV	Cromatografia em Fase Líquida de Alta eficiência acoplada a Detector de Ultravioleta em Rede de Diodos
CLUE-DAD-UV	Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Ultravioleta em Rede de Diodos
cm	Centímetros
CMD	Concentração Média Determinada
CT	Concentração Teórica
CV%	Coefficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
FAL	Fenilalanina Amonia Liase
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
HRJ	Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IR	Índice de Retenção
L	Litros
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m	Metros
min	Minutos
mL	Mililitros
mg	Miligramas
nm	Nanometro
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hídrico
p/p	Peso/peso
PAF	Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SE	Solução Estoque
tR	Tempo de Retenção
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1	Histórico sobre o uso de plantas medicinais	20
1.2	Metabolismo Vegetal	21
1.2.1	<u>Lignoides</u>	24
1.2.2	<u>Óleos essenciais</u>	27
1.3	O gênero Piper L	31
1.3.1	<i>Piper rivinoides</i> Kunt.....	32
1.4	Controle da qualidade de fitoterápicos	34
1.4.1	<u>Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</u>	39
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Material Vegetal	42
3.2	Análises da composição do solo e dados climáticos	44
3.3	Desenvolvimento e Validação do Método de Quantificação das Neolignanas	44
3.3.1	<u>Equipamento</u>	44
3.3.2	<u>Desenvolvimento do método analítico</u>	44
3.3.3	<u>Validação da metodologia analítica por equipamento CLAE-DAD-UV</u>	45
3.4	Extração e Análise das Neolignanas	48
3.4.1	<u>Tratamentos das amostras vegetais para quantificação de neolignanas</u>	48
3.4.2	<u>Solução estoque e obtenção de extratos brutos para quantificação de neolignanas</u>	49
3.4.3	<u>Extração e delineamento fatorial 2²</u>	49
3.4.4	<u>Extração do material vegetal</u>	51
3.4.5	<u>Análise dos extratos produzidos</u>	51
3.5	Extração e Análise do Óleo Essencial	52
3.5.1	<u>Extração</u>	52
3.5.2	<u>Análises dos Óleos Essenciais</u>	53

3.6	Processamentos de Dados e Análises Estatística	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Análise da morfologia macroscópica vegetal	55
4.2	Desenvolvimento e validação do método analítico	56
4.2.1	<u>Condições de análise</u>	56
4.2.2	<u>Validação do método analítico</u>	59
4.3	Otimização do processo extrativo das neolignanas	69
4.4	Quantificação de neolignanas em extratos de <i>P. rivinoides</i>	76
4.4.1	<u>Perfil cromatográfico dos extratos brutos</u>	76
4.4.2	<u>Quantificação sazonal dos extratos e das neolignanas</u>	77
4.5	Óleos essenciais de <i>P. rivinoides</i>	87
4.5.1	<u>Rendimentos e composição química</u>	87
5	DISCUSSÃO	104
5.1	Análise fenológica e morfológica macroscópica	104
5.2	Extração, rendimento das neolignanas e dos extratos	104
5.3	Desenvolvimento e validação do método analítico	107
5.4	Variação sazonal de neolignanas	108
5.5	Rendimento dos óleos essenciais	111
5.6	Composição volátil e variação sazonal do óleo essencial das folhas de <i>P. rivinoides</i>	113
5.7	Análise quimiométrica da variação de constituintes fixo(neolignanas) e voláteis (óleos essenciais)	115
	CONCLUSÃO	117
	REFERÊNCIAS	119
	APÊNDICE A - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos de solventes e o no tempo de extração no rendimento e no teores das substâncias das folhas de <i>P. rivinoides</i>	131
	APÊNDICE B - Tabela demonstrando notável correlação entre a umidade do ambiente e os rendimento dos OE coletados em A) Floresta da Tijuca/RJ e B) Serra da Tiririca-Niterói/RJ.	132

INTRODUÇÃO

De maneira silenciosa e pouco perceptível, existe uma intensa batalha pela sobrevivência entre as espécies do ecossistema terrestre. As plantas, para sobreviver e evoluir, competem por espaço e elaboram mecanismos de resistência, como por exemplo, adaptações às variações do ambiente ao seu redor e proteção contra ataques de herbívoros e de micro-organismos. Desta forma, houve o desenvolvimento de defesas químicas peculiares (FERREIRA; PINTO, 2010).

Ao longo de milhões de anos, através de interações com o ambiente e outros seres vivos, os vegetais passaram a sintetizar substâncias químicas complexas a partir do seu metabolismo principal. Estudos comprovam que essas substâncias garantem a sobrevivência das plantas em cenários desfavoráveis, além de afetar parâmetros no ciclo biológico de predadores, possibilitando sua proteção e vigorosidade (COSTA ALMEIDA; FRATTANI, 2010).

Pode-se afirmar que os vegetais estão intimamente associados à evolução do homem e que, além de serem há muito tempo utilizados como alimentos, estes foram os primeiros recursos disponíveis para promover a cura de enfermidades. Em suas experiências de descobertas sobre o uso terapêutico das plantas, o ser humano alcançou sucessos e fracassos, cura ou a morte, além de experimentar efeitos colaterais severos (LEITE et al., 2015).

Apesar da utilização de plantas com efeito curativo ser popularmente conhecido, o seu uso esteve, por longo tempo, associado às práticas mágicas, místicas e ritualísticas, restringindo a disseminação do conhecimento destas práticas medicinais. Com o passar dos séculos, as propriedades terapêuticas das plantas começaram a despertar interesse em muitos pesquisadores que, por sua vez, se dedicaram a estudá-las e seus efeitos no organismo humano, já que os conhecimentos sobre as propriedades úteis ou nocivas eram completamente empíricos (ALBAN, 2013).

Como exemplo tem-se o ópio, um preparado obtido a partir dos bulbos imaturos de *Papaver somniferum* L., que foi estudada seguindo metodologia científica pelo pesquisador alemão F. W. Serturmer, este conseguiu isolar a morfina (um alcaloide) a partir do ópio, que passou a ser comercializada na forma de medicamento, possibilitando uma nova visão acerca dos produtos naturais e suas atividades farmacológicas (DUARTE, 2005). Este fato é concomitante com o início do aumento de diversas linhas de pesquisas científicas com interesse no potencial e na diversidade química de produtos naturais. Todas com a finalidade de desenvolvimento de novos fármacos (BAKER et al., 2007).

Apesar dos avanços tecnológicos apresentados pela medicina moderna na maior parte do mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que grande parte das pessoas dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para a atenção primária à saúde, considerado um fenômeno verdadeiramente global. O órgão ainda declara que, dentre as estratégias para assegurar a qualidade de vida mundial, destaca-se que é fundamental a realização de investigações de plantas utilizadas com fins medicinais para elucidação de sua composição química, determinação dos princípios ativos e avaliação de atividades biológicas visando garantir sua eficácia e segurança (WHO, 2014). Essas recomendações demonstram maior interesse por parte das autoridades em associar o conhecimento tradicional aos avanços tecnológicos e ao desenvolvimento sustentável para, então, fornecer saúde de qualidade que abranja toda a população de forma igualitária.

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, além de uma rica diversidade étnica e cultural, desta forma, o país conserva um valioso conhecimento tradicional acerca do uso de plantas medicinais, tornando-o potencialmente necessário para o desenvolvimento de pesquisas que resultem em inúmeras e proveitosas preparações terapêuticas (BRASIL, 2016). No entanto, o maior gargalo relacionado à prática da medicina tradicional é a qualidade da matéria-prima nacional. Além disso, faltam estudos pré-clínicos e clínicos que validem o uso tradicional de espécies medicinais garantindo a segurança e eficácia do produto final. Esses estudos são necessários para se conhecer uma possível toxidez bem como uma ação sinérgica (interação com outros fármacos), o que pode levar muitos fitomedicamentos a terem efeitos adversos (FONTANELE; SOUSA; CARVALHO, 2013).

Com base nessas considerações e pelo histórico do uso de plantas medicinais, destacam-se a importância do conhecimento popular e a necessidade de um envolvimento científico para melhor aplicabilidade do uso da biodiversidade. Sendo assim, este trabalho tem por finalidade o estudo químico sazonal de metabólitos especiais (óleo essencial e neolignanais) da espécie *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae) de duas áreas de coleta da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Histórico sobre o uso de plantas medicinais

A interação entre o homem e o ambiente foi estabelecida desde o primeiro momento do surgimento da espécie na Terra, sendo que o uso da natureza com finalidades de melhorias na saúde e para desintoxicações iniciou-se a partir da observação do comportamento de animais e da reprodução de seus atos (LEITE et al., 2015).

Vestígios sobre o uso de plantas com finalidades terapêuticas foram encontrados nas mais antigas civilizações, sendo esta, considerada a prática mais remota utilizada pela humanidade para cura de suas enfermidades. Argenta e cols. (2011) citam registros que descrevem a utilização das plantas para o tratamento de enfermidades desde 5.000 a.C. Tem-se como exemplo o uso de *Papaver somniferum* L., planta cujo princípio ativo é a morfina, utilizada desde então pelos sumerianos. Rocha e cols. (2015) afirmam que os primeiros registros arqueológicos que descreviam plantas culturalmente importantes foram encontrados em sepultamentos humanos localizados no Iraque com data de 60.000 a.C. Os autores ainda citam o uso de espécies psicoativas na Indonésia com data de 11.000 a.C. Firmo e cols. (2011) apontam que as primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem referem-se as escrituras sagradas e ao Papiro de Ebers (1.500 a.C.). Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido em 1890, tendo sido encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II. O papiro descreve aproximadamente 100 doenças, 700 drogas de natureza animal, vegetal ou mineral e 811 prescrições.

Duarte (2006) concorda que a Medicina Tradicional tenha surgido na China, sendo as primeiras formas de utilização de plantas medicinais datadas de 5.000 a.C. no texto chinês que descreve nomes, doses e indicações de uso de plantas para tratamento de doenças. Neste texto há informações sobre o ginseng (*Panax ginseng* L.), planta que outrora fora utilizada pelos imperadores para tratar patologias de modo empírico, e que hoje possui vasta utilidade com seus benefícios cientificamente comprovados como planta adaptogênica (SEQUEIRA, 2013).

Apesar deste vasto e antigo histórico de utilização, o reconhecimento dessas práticas só ocorreu no ano de 1978, devido às discussões na Conferência Internacional sobre Cuidados da Atenção Primária à Saúde (APS), realizada em Alma-Ata (antiga União das Repúblicas Socialistas

Soviéticas). Naquela conferência foi declarada oficialmente pela OMS a legitimidade do uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no tratamento da saúde, com recomendação da difusão dos conhecimentos necessários ao seu uso (ARAÚJO et al., 2015).

Desde então, a OMS reconhece e descreve como planta medicinal, parte ou o todo de determinado vegetal que, aplicado por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica no homem ou animal. Ou seja, é um tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticassem a utilização de princípio ativo isolado(ANVISA, 2014). Cabe destacar que existe uma diferença entre planta medicinal e fitoterápico, o parágrafo primeiro da RDC nº 26 de maio de 2014 define fitoterápico como “todo medicamento produzido com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, de forma que sua eficácia e segurança sejam comprovadas clinicamente. Não são considerados medicamentos fitoterápicos aquele que inclui em sua composição substâncias ativa isolada sintética, nem associação dessas com extratos vegetais.” As diferenças com relação às nomenclaturas que envolvem produtos naturais serão melhor esclarecidas adiante.

No Brasil, o histórico do uso de plantas medicinais tem grande influência das culturas indígena, africana e europeia (BRAZ et al., 2017), no entanto, foram os jesuítas que se encarregaram de catalogar, experimentar e empregar largamente as plantas medicinais brasileiras no século XVI (SILVA; FERREIRA, 2016). Assim sendo, pode-se afirmar que o Brasil, com seu amplo patrimônio genético e diversidade cultural, tem em mãos a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e soberano na área de saúde com o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, que priorize o uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeite os princípios éticos e compromissos internacionais assumidos, promovendo dessa forma a geração de riquezas com inclusão social (GOTLLIEB et al., 1998).

1.2 Metabolismo vegetal

Existem duas vias metabólicas principais nos organismos vegetais, cada uma delas com suas particularidades e relevância. O metabolismo essencial, também denominado metabolismo primário ou basal, inclui todas as substâncias e processos que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de uma planta, abrangendo: processos fotossintéticos; ciclos da glicólise e do ácido cítrico; síntese de ácidos aminados, carboidratos, ácidos graxos, proteínas, enzimas e co-enzimas; duplicação do material estrutural; processos de respiração, absorção de nutrientes, entre

outros. O metabolismo primário é considerado universalmente similar, devido à sua ampla difusão comum em todos os vegetais. Este metabolismo é caracterizado por ter uma função metabólica direta e definida no organismo, destinando-se, principalmente, à manutenção da vida e reprodução da planta (GARCÍA; CARRIL, 2011).

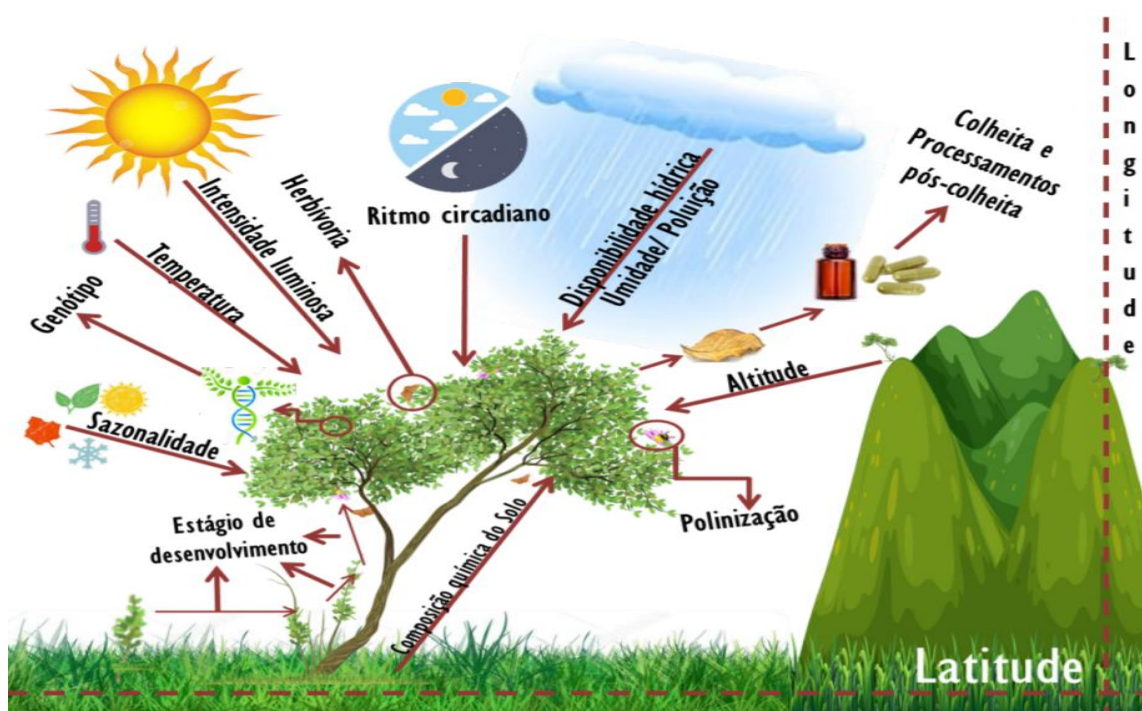
Já o segundo tipo de metabolismo, é denominado de especial ou secundário, este é responsável pela produção de substâncias de altíssima complexidade, as quais são biossintetizadas a partir da necessidade da espécie durante o processo de sinalização intra e interespecies e adaptação às condições do *habitat*. Esse metabolismo inclui todas as substâncias e todos os processos que envolvem a inter-relação do indivíduo com o ambiente ao qual está inserido. Os metabólitos produzidos são, em geral, de baixo peso molecular e restritos, na maioria das vezes, a grupos taxonômicos específicos. No entanto, sabe-se que os micro-organismos também produzem metabólitos especiais e, provavelmente, essas semelhanças têm participação na interação e preservação das espécies (GARCÍA; CARRIL, 2011).

Os resultados do metabolismo especial já foram considerados desperdício fisiológico, produto de desintoxicação vegetal, e produto de excreta. No entanto, hoje é evidente que o metabolismo especial tem funções ecológicas específicas como de defesa contra ataques de predadores, atração de polinizadores e dispersores de sementes, proteção contra radiação ultravioleta, estresse hídrico, variação de temperatura, atua na proteção contra formas radicalares de O₂. participação em interações alelopáticas e, ainda, (CHOU, 2010; GARCÍA; CARRIL, 2011; GOTLIEB et al., 1996). Embora os metabólitos especiais não apresentem função direta no crescimento e desenvolvimento da planta, estes parecem estar relacionados diretamente com a sobrevivência desta, fornecendo uma vantagem competitiva favorável, garantindo a adaptação e perpetuação da espécie em seu ecossistema (WINK, 2010; WATSON, 2014; MOREIRA, 2015). Além disso, geralmente, muitas das substâncias formadas a partir do metabolismo especial, por serem fatores de interações entre diferentes organismos, apresentam efeitos biológicos e farmacológicos de interesse ao homem.

Embora sintetizados a partir do metabolismo essencial, a concentração das substâncias em cada espécie vegetal é determinada por um sistema intrínseco de enzimas que regulam sua síntese e distribuição. Portanto, a concentração dos metabólitos produzidos a partir do metabolismo especial em plantas é frequentemente afetada por diferentes fatores bióticos e abióticos, tais como radiação e intensidade de luz ultravioleta (UV), períodos longos de secas, temperatura, disponibilidade de nutrientes no solo, injúrias e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, ciclo circadiano, estágio de desenvolvimento do vegetal, sazonalidade, altitude,

poluição atmosférica, condições de coleta e ainda estabilização e estocagem do material. Esses fatores podem causar grande alteração na composição final de determinados metabólitos e, conseqüentemente, alterar o valor terapêutico de preparações fitoterápicas (Figura 1) (CHAVES, 2012; RAMOS et al., 2020a).

Figura 1 – Principais fatores que podem influenciar na produção de metabólitos especiais ou secundários em plantas.



Fonte: A autora In. RAMOS et al., 2020a

As particularidades que envolvem a biologia dos metabólitos especiais e interação desses entre os organismos são elementos essenciais na compreensão da biodiversidade. Uma vez que essa forma de interação contribui significativamente na perpetuação dos vegetais e organismos produtores, também podem contribuir na qualidade de vida humana (RAMOS et al., 2020a)

Assim, de acordo com os argumentos supracitados em relação à influência dos fatores abióticos e bióticos na produção de metabólitos especiais, é de notável relevância que ocorra aprimoramento e maior investimento em estudos que ajudem a compreender a biossíntese sazonal de substâncias, neste caso em especial os lignoides e óleos essenciais que são objetos deste estudo.

1.2.1 Lignoides

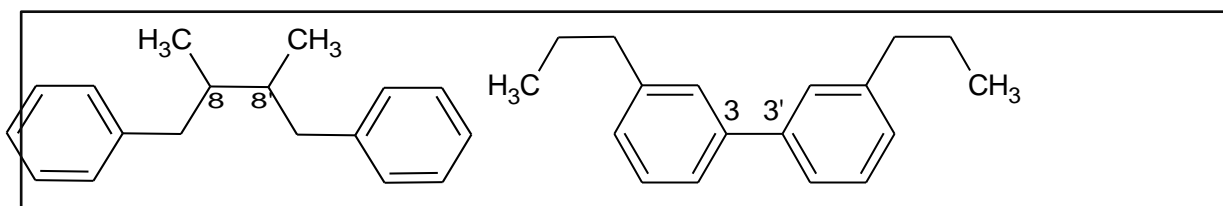
A classe de metabólitos especiais dos lignoides se destaca por sua ampla distribuição no Reino Vegetal e por suas propriedades biológicas variadas, que segundo Gottlieb (1998a), podem estar relacionadas ao desenvolvimento da planta. Os lignoides são fortes indicadores do processo evolutivo em angiospermas, pois desempenham papel relevante na adaptação ecológica, já que estão envolvidos nas interações entre planta-planta, planta-fungo e planta-inseto (GARCÍA; CARRIL, 2011).

Os lignoides são biossintetizados a partir da via do ácido chiquímico e possuem estrutura básica formada exclusivamente por unidades de fenilpropanoides do tipo $(C_6C_3)_n$, onde n é restrito a duas unidades, por exemplo, em lignanas, neolignanas e heterolignanas; e a muitas unidades, como em ligninas. São classificados de acordo com as variações que ocorrem no acoplamento oxidativo entre as unidades C_6-C_3 em lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignoides e heterolignoides (SIMÕES, 2010).

De acordo com Gottlieb (1984), as lignanas se originam da condensação oxidativa de álcoois cinâmílicos entre si ou com ácidos cinâmicos e, portanto, são dímeros de alilfenol e propenilfenol entre si ou cruzados, apresentando o carbono 9 da cadeia lateral oxigenado. No entanto, atualmente, a IUPAC conceitua como neolignanas os dímeros de unidades C_6-C_3 , unidos por outras posições diferentes das ligações 8,8' da cadeia alifática (Figura 2).

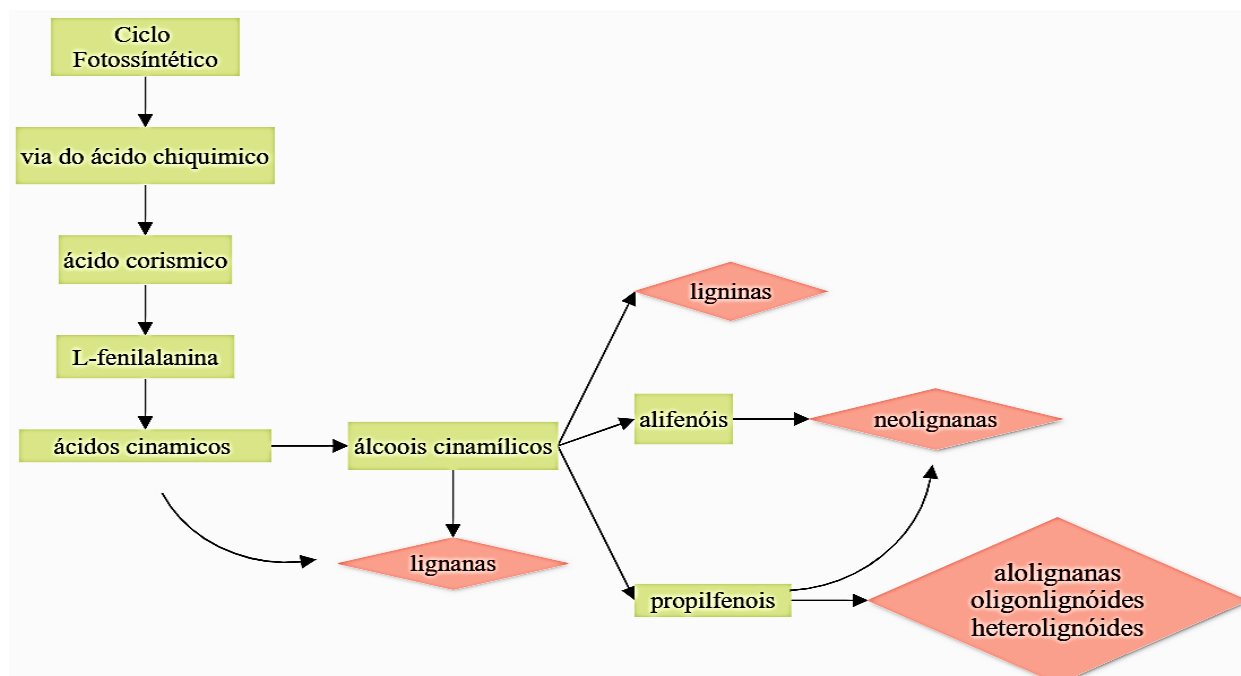
Em relação à biossíntese de lignoides, de maneira resumida, a eritrose 4-fosfato e o fosfoenolpiruvato são intermediários produzidos pela glicólise e que se unem e sofrem reações que levam à formação do ácido 3-dehidrochiquímico. Este, por sua vez, formará o ácido chiquímico que após diversas reações dará origem aos ácidos aminados aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A fenilalanina, quando desaminada pela ação da fenilalanina amônia liase (FAL), origina o ácido cinâmico, o primeiro fenilpropanoide com estrutura C_6-C_3 formado (Figura 3). Os fenilpropanoides subsequentes podem sofrer diversas alterações mediadas por enzimas que levarão à formação de lignanas e de ligninas. Essas substâncias poliméricas originadas da via biossintética do chiquimato podem resultar em estruturas rígidas e duráveis, que em geral, conferem sustentação e resistência mecânica às partes aéreas das plantas, de forma a apoiar grandes quantidades de biomassa (MALAVASSI; DAVIS; MALAVASSI, 2016)

Figura 2 – Fórmula estrutural plana geral de lignanas e de neolignanas, segundo nomenclatura adotada pela IUPAC.



Legenda: (1) lignana (2) neolignana segundo definição da IUPAC.

Figura 3 – Esquema de derivação biossintética de vários tipos de lignoides.



Fonte: a autora, 2020.

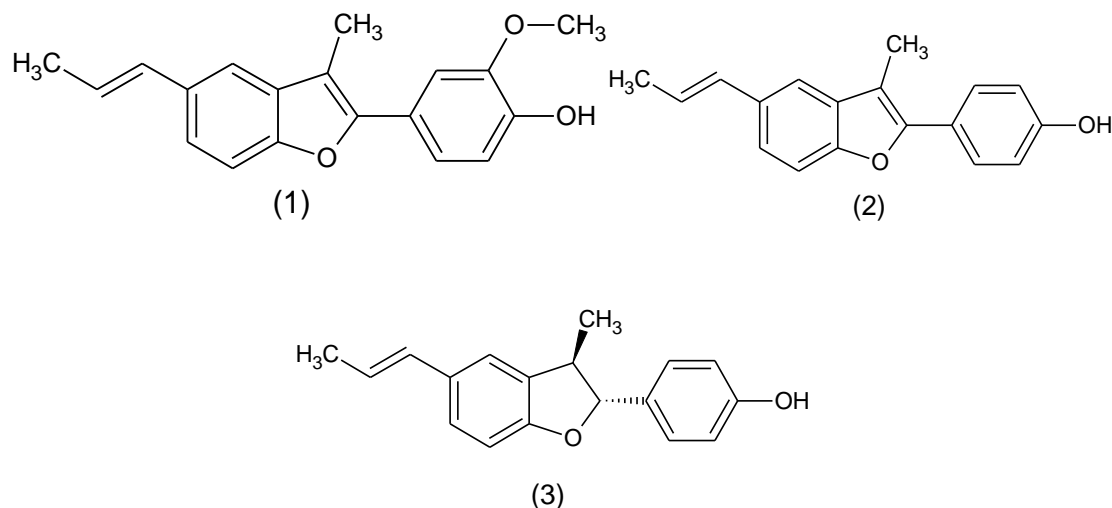
A partir dos ácidos e álcoois cinâmicos, em passos redutivos, são originados os alil- e propenilfenóis que, como mencionado anteriormente, não apresentam o carbono γ (ou 9) oxidado. As neolignanas estão presentes na natureza em menor número do que as lignanas. Embora possuam uma enorme diversidade de esqueletos e funções, as neolignanas formam um singular grupo homogêneo de substâncias naturais, devido às suas variadas atividades biológicas. Dentre as atividades biológicas descritas para substâncias do tipo neolignanas, destacam-se: larvicida (CABRAL et al., 2009), citotóxica (HUANG et al., 2013; SAWASDEE et al., 2013; PONCI, et al., 2015), antibacteriana (MAÇAL et al., 2010), antiparasitária (BARATA et al., 2000),

antifúngica (PESSINI et al., 2005) e anti-inflamatória (CHEN et al., 2008). Em revisão recente feita pelo nosso grupo de pesquisa foram demonstradas as atividades biológicas de neolignananas e as técnicas para o isolamento dessas substâncias no gênero *Piper* (LADEIRA-MACEDO et al., 2017).

As neolignananas eupomatenoide-5 (EUP-5) (1) e eupomatenoide-6 (EUP-6) (2) foram isoladas pela primeira vez de *Eupomatia lairina* R. no ano de 1969, e o conocarpano (CNC) (3) (Figura 4) foi isolado de folhas de *Conocarpus erectus* L. em 1975 (BERNARD et al., 1995). Desde então, essas neolignananas benzofurânicas vem ganhando o interesse da comunidade científica, devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas (SCODRO et al., 2013; McKITTRICK; STEVENSON, 1983; LADEIRA-MACEDO et al., 2017; ROYO, SANTOS; SOUZA, 2003).

No ano de 2010, Foglio e cols. realizaram ensaios de citotoxicidade a partir de extratos em diclorometano obtidos de folhas de *Piper regnellii* C.DC. Os autores descreveram alto potencial citotóxico (antiproliferativo) *in vitro* com linhagens de células tumorais. Após isolamento e elucidação estrutural foi possível identificação da neolignana EUP-5 (1) como responsável pela ação biológica. Além desta, outras bioatividades tais como antituberculose (LOPES et al., 2014; GHIRALDI-LOPES et al., 2017), leishmanicida (GARCIA et al., 2013), anticancerígena (LONGATO et al., 2011), ação tóxica contra *Trypanosoma cruzi* (PELLIZARO-ROCHA et al., 2011; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013) e ação antifúngica (PESSINI et al., 2005; LEMOS et al., 2013) são relacionadas com a presença da neolignana EUP-5(1) em extratos de plantas. Ações biológicas do EUP-6 (2) também têm sido investigadas e descrevem seu potencial antifúngico (PESSINI et al., 2005; XU; LI, 2011; LEMOS et al., 2013;) e larvicida (MACEDO et al., 2018). Com relação ao CNC (3), foram encontrados na literatura atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SILVA, 2007; CAMPOS, 2006; BOHATCH JÚNIOR et al., 2016). Nosso grupo (MOREIRA et al., 2016) descreveu que o CNC possui atividade biológica contra *Candida albicans*, *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, causadoras da candidíase, leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral, respectivamente.

Figura 4 – Fórmulas estruturais planas das neolignan benzofurânicas eupomatenoide-5 (1), eupomatenoide-6 (2) e conocarpano (3) isoladas de *Piper rivinoides* Kunth.



1.2.2 Óleos essenciais

Descreve-se como óleos essenciais (OE) misturas complexas de substâncias lipossolúveis, voláteis, geralmente, aromáticas e odoríferas, produzidas a partir do metabolismo especial geralmente de plantas, que apresentam-se incolores ou levemente amarelados, sendo sua principal característica a volatilidade, diferindo-se assim de óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes)(BIZZO, 2009). A maioria dos óleos voláteis apresenta aroma agradável e intenso, característica que atrai o interesse de indústrias de perfumes e de cosméticos, assim como a indústria de higiene pessoal e de produtos para a saúde (MIRANDA et al., 2016).

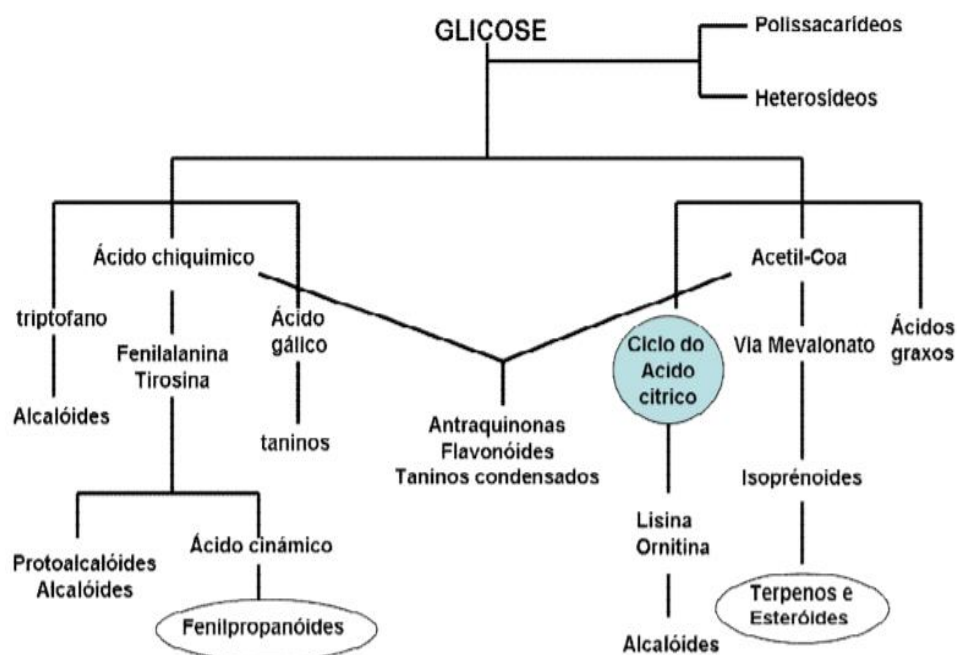
Os OE exercem diversas funções ecológicas, dentre essas estão: alelopatia dada pela volatilização; lixiviação; ações de defesa contra ataques de herbívoros e agentes microbianos; atração de dispersores de sementes e polinizadores; proporcionam efeitos de termo-proteção; preservam contra danos oxidativos; auxiliam na foto-respiração; conferem resistência a baixas concentrações de O₂, além de concederem fotoproteção aos órgãos vegetais em que são armazenados. Portanto, eles são considerados parte integrante das interações entre comunidades de espécies vegetais e animais e, também, fazem parte da adaptação das plantas ao seu ambiente (OOTANI et al., 2013; RAMOS et al., 2020a).

Em geral, a composição química de um OE envolve uma ampla gama de substâncias, sendo os terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos) e arilpropanoides os constituintes majoritários e

álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até substâncias com enxofre menos frequentes (LEE; DING, 2016). Embora terpenoides e arilpropanoides sejam os constituintes majoritários de OE, estes se originam a partir de diferentes precursores metabólicos, por rotas biossintéticas distintas. Os terpenoides são originados da via biossintética do acetato-mevalonato ou metileritritol-fosfato (MEP), sendo constituídos por duas ou mais unidades de isopreno, com os monoterpenos (duas unidades) e sesquiterpenos (três unidades), mais frequentes em OE. Os fenilpropanoides são originados da via biossintética do chiquimato com estrutura do tipo C₆-C₃ (Figura 5) (SIMÕES, 2010, OOTANI et al., 2013).

Os OE são produzidos por estruturas secretoras especializadas tais como glandulares, células diferenciada de parênquima (idioblastos oleíferos), tricomas glandulares e ainda canais oleíferos (GONÇALVES et al., 2017). Podem ser obtidos a partir de diversos órgãos vegetais como flores, frutos, cascas, raízes e tronco e sua extração pode ser conduzida a partir de diferentes técnicas, como as descritas a seguir. (MIRANDA et al., 2016).

Figura 5 – Via biossintética resumida de formação de terpenoides e de fenilpropanoides.



Fonte: OOTANI et. al., 2013

Effleurage

Consiste na extração de OE presentes em flores frescas utilizando gordura vegetal como extrator. As pétalas são depositadas sobre a fina camada de gordura sem odor e por determinado tempo até que esta seja substituída por uma nova. Esse processo é realizado até a saturação da gordura. Após o processo, os OE podem ser retirados da gordura por extração com solvente orgânico. Este método, outrora, fora largamente empregado pela indústria de perfumes, no entanto, devido a necessidade de grande quantidade de mão de obra e a complexidade do método, atualmente, esta técnica não é mais utilizada (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

Prensagem a frio

Método empregado na extração de OE de casca de frutos cítricos, de forma que as cascas são prensadas até a liberação do óleo presente no pericarpo (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

Hidrodestilação

Esta técnica é geralmente conduzida em um aparato do tipo Clevenger, quando empregado em pequena escala. A extração ocorre dentro de um balão com uma mistura do material vegetal e água destilada, onde uma fonte de calor causa a ebulição da água que arrasta o OE a partir da tensão de vapor que é maior que a da água. Esse método é preferencialmente usado para extrair OE de plantas frescas (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

Arraste a vapor

Esta técnica se baseia na tensão de vapor do óleo essencial que é mais elevado que o da água. Neste processo apenas o vapor d'água entra em contato com o material vegetal. A corrente de vapor permeia as folhas em sentido ascendente, arrastando as substâncias voláteis presente no material. Esse vapor contendo as substâncias voláteis passa por um condensador que tonará as substâncias à seu estado líquido. O produto é então conduzido a um tubo coletor onde a água será eliminada do processo, restando apenas o óleo essencial. É geralmente empregado para extração de grandes quantidades de material vegetal (LEAL et al., 2015)

Extração com solvente orgânico

A extração do OE ocorre com solventes orgânicos, preferencialmente, apolares ou de polaridade média, tais como, éter de petróleo, *n*-hexano, éter etílico e diclorometano. Contudo, há a extração de outras substâncias lipofílicas além dos óleos essenciais. Neste caso, o produto obtido raramente possui valor comercial (SMIÕES, 2010).

Extração por headspace

Esta é uma técnica muito sensível, usada em análises de constituintes em baixas concentrações e de materiais sensíveis, como flores. A principal característica da técnica é a possibilidade de determinação de componentes voláteis da amostra com pouca ou nenhuma degradação térmica, já que são usadas fibras para adsorção das substâncias e que não entram em contato com a amostra (as fibras realizam a extração da camada volátil superior do recipiente). As substâncias voláteis são desorvidas da fibra por inserção direta no cromatógrafo de fase gasosa (ORMEÑO; GOLDSTEIN; NIINEMETS, 2011).

Diversas funções biológicas para os OE já foram descritas, no entanto, devido à complexidade química torna-se difícil correlacionar estas propriedades a uma única substância, pois o sinergismo pode atuar como fator determinante para os efeitos biológicos. Algumas atividades podem ser destacadas, tais como atividade antimicrobiana (BASILE et al., 2006; DUARTE, 2007), antifúngica (TULLIO, 2007) anti-inflamatória, antioxidante (RINI; OHTANI; ICHIURA, 2012), anti-viral, efeito citotóxico (OGUNWAND et al., 2005; COLE et al., 2007), efeito analgésico, estimulante do sistema nervoso central (MEHTA et al., 2013), dentre outros (CELESTINO et al., 2016; CHAIEB et al., 2007, MIRANDA et al., 2016).

Plantas ricas em OE são abundantes em angiospermas eudicotiledôneas, nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras. Por isso, nosso grupo de pesquisa tem estudado a composição química volátil de espécies da família Piperaceae, principalmente as da Mata Atlântica e das Restingas do Estado do Rio de Janeiro (MOREIRA et al., 2016; MARQUES et al., 2015; SIQUEIRA et al., 2014; MARQUES; MOREIRA, 2014; MOREIRA et al., 2012; MOREIRA et al., 2010; MARQUES et al., 2018; MARQUES et al., 2017; RAMOS et al., 2020b). Os OE são considerados fontes naturais de interesse para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria de higiene pessoal. Contudo, muitas espécies vegetais ainda não foram estudadas adequadamente do ponto de vista químico para aproveitamento de seus constituintes voláteis.

Com a finalidade de padronizar sistemas de cultivo e produção que visem melhores rendimentos e manutenção uniforme da composição química volátil, são necessários estudos de sazonalidade, assim como os fatores que influenciam no rendimento/produção de voláteis. Como foi descrito anteriormente, espécies da família Piperaceae são excelentes produtoras de OE que, ao serem estudados adequadamente, podem levar à descoberta de novos produtos farmacêuticos, com destaque para *Piper clausenianum* (Miq.) C.DC. (linalool e nerolidol), *Piper hispidinervium* C.DC. (safrol) e *Piper aduncum* L. (quimiotipo dilapiol) (PESSINI et al., 2003; MARQUES et al., 2010; MOREIRA et al., 2012; MARQUES et al., 2018). Nesse contexto, essa Dissertação aborda o estudo sazonal do OE de *P. rivinoides* Kunth para que se aprofunde o conhecimento da composição química e de sua variação ao longo do ano.

Para análise dos OE optou-se pela técnica de Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Detector de Ionização por Chama (CG-DIC) para quantificação e pela técnica Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para identificação. A opção por essas técnicas analíticas se deve ao fato de que os OE são misturas complexas de substâncias voláteis (ADAMS, 2017).

1.3 O gênero *Piper* L.

Piper é um dos 10 maiores gêneros neotropicais de Magnoliidae, e também o gênero mais representativo da família Piperaceae, com cerca de 2.000 espécies descritas que se distribuem geograficamente pelas regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios. Cerca de 300 espécies de *Piper* são encontradas no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020; QUEIROZ et al., 2020). O gênero apresenta uma das maiores diversidades de táxons nos países neotropicais, correspondendo a 2/3 de todas as espécies neles descritas. No Brasil, *Piper* é um dos cinco gêneros mais diversos. Muitas das espécies desse gênero desenvolvem-se em áreas sombrias, úmidas ou na margem de rios, com maior ocorrência em florestas quentes, úmidas e com alto índice pluviométrico (GHOSH et al., 2014). Grande parte das espécies deste gênero são plantas pioneiras envolvidas no processo de regeneração e manutenção da heterogeneidade de matas (ANDRADE et al., 2009).

De modo geral, as espécies de *Piper* são arbustos, subarbustos ou arvoretas, alcançando uma média de 1 a 5 metros de altura. Seus caules apresentam-se nodosos e ramosos podendo ser lignificados. As folhas são alternas com textura membranácea, papirácea ou cartácea quando *in*

natura; as lâminas foliares podem ser aladas com formas e tamanhos variáveis com margem sempre inteira. Possuem inflorescências em espiga ou racemos que podem ser eretas, curvas ou flexuosas, disposta de forma oposta às folhas ou em umbelas axiliares. Suas flores são bissexuais, dispostas em raque glabra, protegidas por bráctea floral de diversas formas. São ainda, providas de pedúnculos delgados ou espessos contendo de 2 a 5 estames e 3 a 4 estigmas, filiformes, curvos, estilosos ou sésseis com ovário ovoide ou sub-ovoide. Seus frutos são drupas que variam entre globosas ovoide, obovoide, trigonal, oblonga ou tetragonal, glabra ou pilosa, pericarpo delgado, estigmas 3-4 com estiletos curto ou sésil (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; QUEIROZ et al., 2020).

Diversas espécies do gênero *Piper* têm aplicação na medicina tradicional, sendo as mais conhecidas mundialmente *Piper methysticum* Forst (kava kava - usada no tratamento de ansiedade), *Piper nigrum* L. (pimenta-do-Reino, usada como condimento e como anti-inflamatório) e *Piper longum* L. (pimenta longa – usada como anti-inflamatório). Muitas espécies possuem importância econômica, relacionada aos seus produtos do metabolismo especial, como amidas de *Piper nigrum* L. (piperina) e, em particular, à presença de OE como a espécie *Piper hispidinervium* C.DC. cultivada no Brasil para produção de safrol (FLORES, 2009; MARQUES et al., 2010; LAPORTE et al., 2011; JUNIOR, 2012; MOREIRA, 2013; OLIVEIRA et al., 2013). Devido à riqueza de aplicações na medicina popular, comprovações de efeitos farmacológicos e biológicos para extratos, frações, óleos essenciais e substâncias isoladas de espécies pertencentes à família Piperaceae, especialmente no gênero *Piper*, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de espécies que ocorrem na Mata Atlântica e na Restinga do Estado do Rio de Janeiro, dentre essas, *Piper rivinoides* Kunth, descrita a seguir.

1.3.1 *Piper rivinoides* Kunth

P. rivinoides é conhecida popularmente como aperta-ruão, murta, ruão ou betis branco. A planta é descrita como um arbusto glabro, ciófilo, que mede entre 3-6m de altura, com caule bem lignificado, suas folhas são brilhantes, ovadas de base simétrica, inflorescência do tipo espiga ereta com ovários de estiletos curto ou sésil. Seus frutos apresentam-se também em forma de espigas eretas, vistosas e trigonais que servem de alimento para outros animais (Figura 6). Floresce e frutifica durante os meses de maio a julho. Endêmica do Brasil, possui registro de ocorrência nas

regiões Norte (Amazonas, Pará), Nordeste (Bahia, Pernambuco), Centro-Oeste (Goiás), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina). É uma espécie que habita o interior da mata próxima a encostas e rios, sempre em locais frescos, úmidos e sombreados, podendo estar presente próxima a clareiras naturais, mas nunca completamente exposta ao sol (FLORA DO BRASIL, 2020; QUEIROZ et al., 2020)

Existem poucos estudos sobre a química de *P. rivinoides* na literatura. Um estudo com os OE dessa planta conduzido por Bernuci e cols. (2016) demonstrou atividade contra *Micobacterium tuberculosis* e *Leishmania amazonensis*. Outro estudo realizado com a espécie demonstrou que seu OE tem potencial antinociceptivo (SOUZA et al., 2014). Trabalhos realizados pelo grupo (MOREIRA et al., 2016) permitiram o isolamento e identificação de neolignanas benzofurânicas (incluindo EUP-3, EUP-5 (1), EUP-6 (2) e CNC (3) (Figura 4) de extratos de *P. rivinoides* Kunth. Esse mesmo trabalho demonstrou o potencial dessas neolignanas contra cepas de *Candida albicans* e de *Leishmania amazonenses*, como descrito anteriormente.

A espécie não é descrita em nenhuma lista que vise sua conservação, não existindo nenhum tipo de produção agrônômica. Além disso, no Brasil, ela é usada em rituais de religiões de matrizes africanas em banhos de purificação com o nome litúrgico de “Èwé Boyí Funfun”. Os membros de religiões afro-brasileiras também fazem usos medicinais de *P. rivinoides* para o tratamento de feridas, úlceras, corrimento vaginal, hemorragias e para problemas bucais. (BARROS; NAPOLEÃO, 2003; BARROS, 2010; BARROS, 2011; MANDARINO; GOMBERG, 2009; ALBUQUERQUE et al. 2007).

Devido à riqueza de seus extratos em neolignanas benzofurânicas que são detentoras de inúmeras atividades biológicas, além de ser rica em OE, essa planta merece ser mais bem estudada dos pontos de vista químico e biológico. No entanto, a transformação de uma matéria-prima vegetal em um fitomedicamento requer a normatização a ser cumprida com a finalidade de garantir a qualidade, de forma a possibilitar um adequado tratamento das enfermidades, com pouco ou nenhum efeito colateral. Assim, será possível garantir à população o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria local (BRASIL, 2014).

Figura 6 – Partes aéreas de *Piper rivinoides* Kunth.



Legenda: **A)** Detalhe do ramo frutífero de *P. rivinoides* em fase de frutificação. **B)** Detalhe das folhas de *P. rivinoides*.

Fonte: A autora

1.4 Controle da qualidade de fitoterápicos

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) de nº 26, de maio de 2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Neste documento são definidos os termos a seguir:

Medicamento fitoterápico: Produto obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico com benefício para o usuário, que deve ter sua eficácia e riscos de uso conhecidos, assim como reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

Produtos tradicionais fitoterápicos: Obtido por uso exclusivo de matérias-primas ativas vegetais que possuem segurança e eficácia baseados em registros de uso seguro e efetivo, e que este esteja publicado na literatura técnico-científica. O fitoterápico tradicional deve ser gerado para ser utilizado sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou monitoramento. Além disso, o produto não deve ser direcionado para doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves e não pode conter matérias-primas em concentrações consideradas de nível tóxico conhecido.

Droga Vegetal: Toda planta descrita como medicinal, ou suas partes, que abriguea(s) substância(s) responsável(is) pela ação terapêutica, após processos de colheita/coleta estabilização, se for aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada.

Derivado vegetal: Produto obtido da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que abrigue a(s) substância(s) responsável(is) pela ação curativa, podendo ocorrer na forma de extrato, óleo fixo e volátil, ceras e outros.

Fitocomplexo: A reunião de todas as substâncias, originadas do metabolismo primário ou secundário, responsáveis, em conjunto pelos efeitos medicamentosos de uma planta medicinal e de seus derivados.

Uma das principais etapas para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico é o rastreamento fitoquímico, que compreende as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos principais constituintes do vegetal, responsáveis ou não pela ação biológica. Esta etapa do desenvolvimento de um fitoterápico é conhecida como *etapa farmacêutica* (BRASIL, 2016). Graças aos avanços tecnológicos analíticos, principalmente com técnicas cromatográficas, é possível efetuar a separação e o isolamento de substâncias de um extrato vegetal com alto grau de confiabilidade. Por conseguinte, as técnicas analíticas mostram-se necessárias tanto para o conhecimento da composição química de uma planta, como também para a determinação de uma substância ou de um grupo de substâncias, que sirva(m) como marcador(es) daquela espécie para o controle qualitativo e quantitativo, propiciando a padronização do material vegetal e produtos relacionados (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

No entanto, é imperioso demonstrar a qualidade de substâncias bioativas pela comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade de dados analíticos. Logo, o objetivo da validação é demonstrar que a metodologia escolhida é adequada para a finalidade pretendida, ou seja, comprovar por meio de testes que é possível a determinação qualitativa, semi-quantitativa, e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos, garantindo assim que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados e reprodutibilidade das análises (DOS SANTOS et al., 2016). Para atingir tal objetivo, as agências reguladoras ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e

Tecnologia (INMETRO) gerenciam no Brasil, através de protocolos e resoluções, as etapas supracitadas a fim de garantir a autenticidade da(s) preparação(ões)/ substância(s).

A ANVISA dispõe uma resolução para validação de métodos analíticos, a RDC n°166 de 24 de julho de 2017, contudo, para este estudo, foi usado o Guia de Validação de Métodos Analíticos DOQ-CGCRE-008/2016 do INMETRO em concordância com *The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). Essa escolha tem fundamento na matriz analítica, pois a RDC 166 é aplicada às matrizes biológicas e, portanto, mais complexas que extratos vegetais.

De acordo com a metodologia proposta pelo INMETRO e que consta no Guia de Validação de Métodos Analíticos DOQ-CGCRE-008/2016, a validação é necessária para: Métodos não normatizados; Métodos criados/desenvolvidos no próprio laboratório; Métodos normatizados usados fora de escopo para os quais foram desenvolvidos e Ampliações e modificações de métodos normatizados. Este somente será considerado válido, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir (parâmetros também elencados na RDC 166/ 2017)

Seletividade

Faz referência à capacidade de detecção do analito na presença de outros componentes da matriz. O método considerado seletivo é aquele que tem capacidade de medir e diferenciar o analito de outros componentes que possam estar presentes na amostra, tais como outros metabólitos, impurezas, substâncias de degradação ou componentes da matriz. Assim, a seletividade de um método analítico é a capacidade de identificação de um analito de forma inequívoca, mesmo na presença de outros componentes na amostra. O método não deve identificar o analito quando o mesmo estiver ausente na matriz e deve ser capaz de identificá-lo quando for adicionado. A seletividade é o primeiro parâmetro a ser avaliado para desenvolvimento e validação de um método analítico. Se a seletividade não for assegurada, os outros parâmetros estarão seriamente comprometidas.

Linearidade / Faixa de trabalho / Sensibilidade

Refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em uma faixa analítica específica, ou seja, é a habilidade de se obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Em uma análise, um mínimo de 5 (cinco) concentrações diferentes são recomendadas para determinar a linearidade, sendo que a concentração média do analito deve estar entre 80% e 120% da concentração que

compõe a curva analítica. Na projeção da curva analítica o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 em se tratando da RDC 166/2017 e 0,99 de acordo com DOQ-CGCRE-008/2016. Os valores de resposta do detector para cada concentração devem apresentar distribuição homocedástica. A linearidade deve ser avaliada em pelo menos 3 dias diferentes, que fornecerá uma equação de regressão linear (concentração x resposta do detector).

Faixa de trabalho considera o intervalo do método entre a menor e a maior concentração de analito na amostra que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. A sensibilidade é a inclinação da curva analítica e faz referência a capacidade do método em distinguir, com nível de confiança determinado, duas concentrações próximas.

Precisão

É o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra. Normalmente as três maneiras mais comuns de expressar a precisão é por meio de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Portanto, representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais (quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea em idênticas condições de ensaio). Esta pode ser considerada em dois níveis: intra-corrida, onde se obtêm concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo e inter-corridas, onde se obtêm concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes. Geralmente, é expressa como o desvio-padrão relativo (DPR), variância ou coeficiente de variação (CV%) de diversas medidas, de acordo com a fórmula:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde DPR é definido como desvio-padrão relativo e CMD como concentração média determinada.

Exatidão

A exatidão de um método analítico determina o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método em estudo e o valor aceito como referência ou verdadeiro. A exatidão deve ser determinada, geralmente, empregando-se 3 (três) concentrações diferentes, uma baixa, uma média e uma alta. Essa avaliação deve ser realizada de forma “intra-dia” e “inter-dia”. A exatidão é dada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente e pode ser expressa pela fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CMDE}/\text{CT}) \times 100$$

Onde, CMDE é igual a concentração média determinada experimentalmente e CT é a concentração teórica esperada.

Limite de detecção

É a menor quantidade na concentração do analito presente na amostra que pode ser detectada pelo método com precisão e exatidão aceitáveis, mas não quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. Este limite pode ser determinado experimentalmente pela avaliação/percepção visual da relação sinal/ ruído, que deve ser 3/1. Pode ser, também, calculado por diversos modos como, por exemplo, estimativa a partir da curva analítica; estimativa pelo desvio padrão do branco e estimativa por meio da curva de desvio-padrão.

Limite de quantificação

Refere-se a menor concentração do analito que pode ser quantitativamente determinada com níveis de exatidão e precisão aceitáveis na amostra. Esse limite pode ser determinado através dos mesmos parâmetros utilizados pelo limite de quantificação. Desvios das médias das concentrações podem ser inferiores ou iguais a 20%.

Robustez

É a medida que define que o método deve permanecer inalterado sob pequenas variações e prover indicação da sua dependência durante o uso normal. A robustez fornece um indicativo de confiabilidade do método durante as aplicações rotineiras. Este é um parâmetro opcional dentro dos estudos de validação. Alguns parâmetros que podem resultar na variação na resposta do método analítico desenvolvido em Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e que podem ser avaliados na determinação da robustez incluem: variação do pH da fase móvel, variação da temperatura, diferentes fabricantes de solventes, variação na composição da fase móvel, variação no fluxo da fase móvel, variação no comprimento de onda de leitura (λ_{max}), entre outros.

Recuperação

A recuperação tem por objetivo avaliar a eficiência do processo de extração de um método analítico, sendo expressa pela porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida pela comparação de resultados analíticos de amostras branco fortificadas com soluções de concentrações conhecidas do padrão de interesse que em seguida são submetidas ao procedimento de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas. Admite-se recuperação entre 85% e 115%, desde que seja exata e precisa.

Um processo de validação bem definido e com todos os seus parâmetros de desempenho documentado é parte integrante para o registro de fitoterápicos e objetiva a garantia de segurança e eficácia do produto resultante, oferecendo às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (MARQUES et al., 2012).

1.4.1 Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um processo físico-químico de separação no qual os analitos interagem de forma diferente com a fase móvel e com a fase estacionária, o que gera migração diferencial dos mesmos. Atualmente, a cromatografia ocupa lugar de destaque em separação de misturas complexas, pois também possibilita a identificação (cromatografia qualitativa) e a quantificação (cromatografia quantitativa), desde que o sistema esteja acoplado a um detector apropriado. Esta técnica é empregada em diversas áreas, como nas indústrias química e farmacêutica, em laboratórios de pesquisa em saúde, em toxicologia e em análises ambientais (LANÇAS, 2009; NOGUEIRA et al., 2011).

A cromatografia em fase líquida (CL) tem como princípio básico a separação de componentes de uma mistura pela distribuição das substâncias em duas fases, uma líquida (móvel) e uma sólida ou líquida (estacionária), que estão em contato íntimo. Essa migração diferencial é dada a partir da afinidade dos analitos por uma das fases. A CL em coluna divide-se em dois tipos: (a) cromatografia em fase líquida “clássica” que é realizada em colunas geralmente de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da fase móvel ocorrendo de acordo com a força da gravidade; e (b) cromatografia em fase líquida “moderna” que utiliza colunas de materiais variados (geralmente, sílica comum ou sílica modificada com diferentes grupos) e altas pressões para

impulsionar a fase móvel pelo sistema. A pressão é alcançada com o auxílio de bombas, o que permite que a fase móvel elua com maior vazão constante e com velocidade linear pela coluna. Uma vez que esse sistema permite maior resolução em termos de números de pratos teóricos, essa técnica é denominada Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises por CLAE são direcionadas à maioria das substâncias não voláteis, que não podem ser analisadas por equipamentos que trabalham com fase móvel gasosa. No entanto, qualquer substância pode ser analisada por CLAE(exceto gases), desde que solúvel na fase móvel e que a detecção seja compatível com o detector. Esse fato confere à CLAE uma enorme versatilidade em termos de análise conforme características do analito, que pode ser sólido, líquido, iônico, e ter baixo peso molecular (como as substâncias do metabolismo especial) ou alto peso molecular (como aquelas do metabolismo essencial) (MALDANER & JARDIM, 2018; NOGUEIRA et al., 2011).

Diversos detectores podem ser usados em CLAE, como por exemplo, Ultravioleta-Visível (UV-Vis), Ultravioleta-Visível em Arranjo de Diodos (UV-Vis-DAD), Espectrometria de Massas (EM), Fluorescência, Índice de Refração, Espalhamento de Luz, dentre outros (BUENDIA, 2009;DAI&MUMPER, 2010; DUTRA et al., 2010; TASIOULA-MARGARI&TSABOLATIDOU, 2015).

Neste estudo, para avaliar a qualidade (presença) e quantidade (teor percentual) de neolignanas nos extratos brutos etanólicos de *P. rivinoides* optou-se pela técnica de CLAE-DAD-UV, já que o laboratório de Toxicologia Ambiental – DCB – ENSP/ FIOCRUZ possui equipamento que permite realizar as análises (descrição em Material e Métodos). A determinação do teor percentual (p/p extrato ou teor %) de neolignanas nos diferentes meses ao longo de um ano e em dois locais de coleta fornecerá subsídios para se estabelecer a melhor época de coleta do material vegetal e, assim, contribuir para a elaboração de derivados vegetais de uso medicinal, além do teor percentual das neolignanas servir de base para uma exploração racional da espécie *P. rivinoides* também para sua conservação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo sazonal da composição química volátil e do teor de neolignanas de folhas de *Piper rivinoides* Kunth, para entender a ecologia e comportamento que regem a química da espécie.

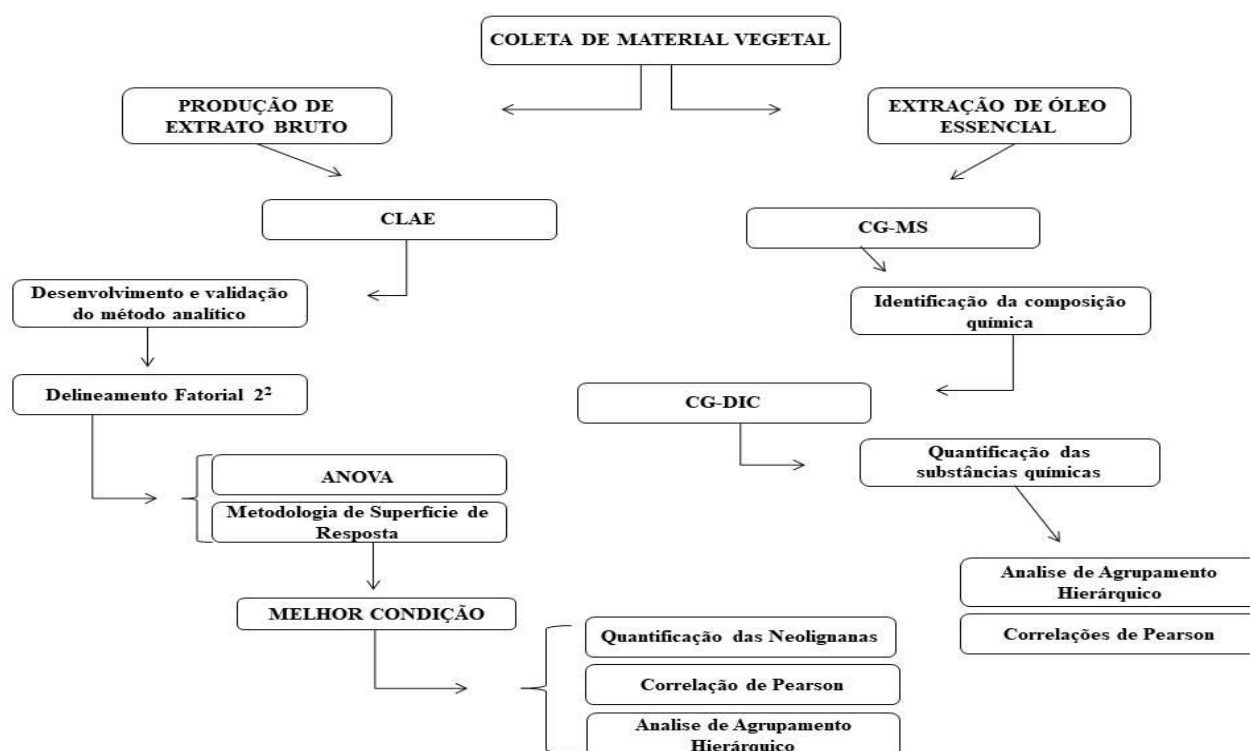
2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar coletas mensais de folhas de *P. rivinoides* Kunth no Parque Nacional da Tijuca - Rio de Janeiro/ RJ, e no Parque Estadual da Serra da Tiririca – Niterói/ RJ, durante doze meses, para quantificação de neolignanas e extração de óleos essenciais;
- ✓ Desenvolver método de análise e quantificação das neolignanas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano por CLAE-DAD-UV;
- ✓ Validar o método desenvolvido segundo recomendações nacionais e internacionais;
- ✓ Definir as melhores condições de extração das neolignanas das folhas;
- ✓ Aplicar o método desenvolvido e validado para quantificação das neolignanas de extratos de *P. rivinoides* coletados mensalmente ao longo de um ano;
- ✓ Extrair, identificar e quantificar os componentes voláteis dos óleos essenciais;
- ✓ Realizar análise por quimiometria em relação ao teor de neolignanas e dos principais componentes voláteis para verificação de possível quimiotipo das duas áreas de estudo;
- ✓ Realizar análises de correlação dos teores de neolignanas e dos principais componentes voláteis com fatores abióticos climáticos e de solo, bem como correlacionar os teores de neolignanas *versus* principais componentes voláteis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A sequência utilizada para a realização das análises cromatográficas, identificação química das substâncias presentes nos óleos essenciais e quantificação das substâncias alvo (neolignanas) (desenho experimental) estão representadas em um fluxograma na figura 7.

Figura 7 – Fluxograma de atividades desenvolvidas para elaboração desta Dissertação.



3.1 Material vegetal

As coletas de folhas de *P. rivinoides* Kunth foram realizadas em duas populações nativas, com indivíduos situados em locais distintos da Mata Atlântica do Estado do Rio de Janeiro. Cabe ressaltar que um único indivíduo de cada região foi submetido aos estudos. Os locais de coletas foram Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro/ RJ (autorização SISBIO n. 57296-1) e Parque Estadual da Serra da Tiririca-Niterói/ RJ (autorização INEA n° 07/0002.4729/2019). As coletas foram realizadas sempre no período da manhã, entre 10:00 e 11:00 horas. A licença para acesso ao Patrimônio Genético para pesquisa e bioprospecção foi concedida pelo CGEN sob o número AE4E953. Esse trabalho foi financiado com recursos CNPq/ PROEP 407845/2017-8.

A identificação botânica do material vegetal foi feita pela Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e as amostras herborizadas foram depositadas no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HRJ). Os números de registro de herborização e caracterização da área estão descritos na tabela 1.

Para a avaliação de influência da sazonalidade sobre o rendimento e composição dos óleos essenciais e quantificação das neolignanais, as folhas foram coletadas de forma aleatória, dos mesmos indivíduos, todos os meses, no período de janeiro a dezembro de 2019, totalizando 12 amostras (Tabela 2). A quantidade de material coletado para as análises variou entre 150 g e 200 g (óleo essencial e quantificação de neolignanais). Durante as coletas foram registradas as atividades fenológicas dos espécimes em estudo, com avaliação de fase reprodutiva (constatação da presença de inflorescências e frutos) e fase vegetativa (sem a presença desses órgãos), além disso observações sobre a integridade macroscópica da folha também foram conduzidas (DEFAVERI et al.,2011).

Tabela 1: Caracterização dos locais de coleta dos acessos de *Piper rivinoides* Kunth no Rio de Janeiro/RJ.

Acesso	Latitude/Longitude	Elevação	Tamanho do indivíduo	Registro no HRJ
Floresta da Tijuca	22°57'09.94"S 43°01'17.19"O	28 m	6 m	13404
Serra da Tiririca	22°97'18.24"S 43°24'23.78"O	205 m	5 m	13403

Tabela 2: Estações do ano e datas das coletas de folhas de *Piper rivinoides* Kunt no Rio de Janeiro/RJ.

Estações	Início e fim da estação	coleta I	coleta II	Coleta III
Verão	21/12/2018 a 20/03/2019	25/01/2019	25/02/2019	18/12/2019
Outono	20/03/2019 a 21/06/2019	24/03/2019	27/04/2019	25/05/2019
Inverno	21/06/2019 a 23/09/2019	23/06/2019	27/07/2019	29/08/2019
Primavera	23/09/2019 a 22/12/2019	28/09/2019	26/10/2019	20/11/2019

3.2 Análises da composição do solo e dados climáticos

Em cada uma das áreas de coleta foram realizadas amostragem de solo em pontos próximos ao acesso de cada espécime, conforme descrito por Arruda e cols. (2014). As amostras foram enviadas para análise química na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Divisão de Solos (EMBRAPA – SOLOS). As análises não ficaram prontas em razão da pandemia COVID-19.

Os dados climáticos das regiões dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2018).

3.3 Desenvolvimento e validação do método de quantificação das neolignanas

3.3.1 Equipamento

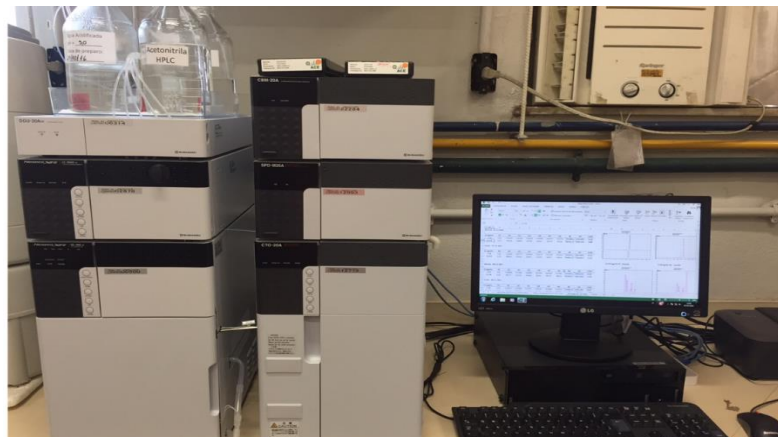
O desenvolvimento e validação do método foram realizados em CLAE-DAD-UV em equipamento Nexera XR (Shimadzu®), equipado com bomba binária LC-20AD, injetor automático SIL-20AF, forno CTO-20A, sistema de detecção por DAD-UV-VIS APD-20MA, degaseificador DGU20A e controlador CBM-20A (Figura 8). A manipulação dos cromatogramas foi feita com uso do programa Shimadzu LabSolutions.

3.3.2 Desenvolvimento do método analítico

A primeira etapa do desenvolvimento do método analítico foi a determinação da fase móvel e da fase estacionária, de acordo com procedimentos de desenvolvimento analítico para CLAE e de acordo com a disponibilidade de materiais do laboratório. Em seguida foram avaliados os espectros de UV do padrão de cada neolignana pura, assim como os parâmetros analíticos de desempenho, incluindo tempo de retenção (t_R), simetria do sinal e fator de retenção ou capacidade

(α) dos analitos. Foram empregadas colunas de sílica modificada C-18, sílica modificada fenil e sílica modificada C-8, com tamanho, diâmetro interno e tamanho de partícula para CLAE.

Figura 8: Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE - Nexera XR -Shimadzu®) para análise das neolignananas.



Fonte: A autora, 2020.

As fases móveis foram testadas, de acordo com as propriedades do analito alvo. Uma vez que o método foi desenvolvido e validado para análise das neolignananas em padrões e nos extratos, de acordo com as normas nacionais (INMETRO, 2016) e internacionais (GUIDELINE-ICH, 2005), os extratos brutos obtidos foram analisados nas mesmas condições.

3.3.3 Validação da metodologia analítica por CLAE-DAD-UV

A validação do método de análise das neolignananas eupomatenóide-5 (EUP-5), eupomatenóide-6 (EUP-6) e conocarpano (CNC) por CLAE-DAD-UV foi realizada de acordo com o Guia para validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008/2016 e de acordo com normas internacionais para validação analítica (INMETRO, 2016; ICH-Q2A, 1995; ICH-Q2B, 1995). Os parâmetros de desempenho analítico avaliados foram *seletividade*, *linearidade*, *precisão*, *exatidão*, *limite de detecção*, *limite de quantificação*, *recuperação* e *robustez*, descritos a seguir.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir da análise individual de soluções contendo as neolignananas EUP-5, EUP-6 e CNCna concentração de 400 µg/mL. O método também foi analisado quanto a sua seletividade para identificação dessas substâncias no extrato bruto.

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da curva analítica obtida para cada uma das neolignananas em uma faixa de seis concentrações, descritas na tabela 3. As concentrações foram analisadas em triplicata, em três dias diferentes. As equações lineares foram obtidas por cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva resposta utilizada para a quantificação de EUP-5, EUP-6 e CNC foi obtida por cálculo da média e do desvio-padrão do coeficiente angular e da interseção com o eixo y das três curvas analíticas obtidas.

Tabela 3 – Concentrações das três neolignananas utilizadas para composição da curva analítica.

Substância	Concentração (µg/ mL)					
	1	2	3	4	5	6
Eupomatenoide-5	3,125	6,250	12,500	25,0	50,0	100,0
Eupomatenoide-6	3,125	6,25	12,5	25,0	50,0	75,0
Conocarpano	1,0	2,0	4,0	8,0	10,0	20,0

Recuperação

A recuperação do procedimento de extração foi avaliada em dois níveis de concentração para cada substância, sendo elas: 2,0 e 10,0 µg/mL para CNC; 6,25 e 50 µg/mL para EUP-5 e EUP-6. Foram analisadas amostras padrão dos extratos fortificadas com as neolignananas e amostras padrão de extrato enriquecidas com as neolignananas e, posteriormente, extraídas. O cálculo da recuperação foi realizado em função da área do padrão extraído e não extraído (100 %).

Precisão

Para avaliar a precisão foram considerados três níveis de concentração para cada uma das neolignananas: a mais baixa da curva analítica, uma intermediária e a mais alta. As três concentrações foram analisadas em triplicatas na parte da manhã, na parte da tarde e na parte da noite do mesmo dia (precisão intra-dia) e em três dias diferentes (precisão inter-dia). Os valores médios de área

foram comparados dentro do mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias diferentes (precisão inter-dia). A precisão é demonstrada através da dispersão dos resultados, com desvio-padrão relativo calculado (DPR).

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em relação a concentração teórica (nominal) e a concentração experimental, ou seja, concentração obtida pela curva analítica, de acordo com a fórmula:

$$\text{Exatidão} = (\text{CMDE} / \text{CT}) \times 100$$

Onde CMDE é a concentração média determinada experimentalmente e CT é a concentração teórica. A avaliação foi feita nos mesmos intervalos de concentração da curva analítica. De acordo com a norma oficial, são aceitos valores entre 85 e 115% de desvio da concentração teórica.

Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção do método foi obtido por avaliação da relação sinal/ruído de concentrações conhecidas e obtidas por diluições sucessivas, a partir da solução estoque de 400 µg/mL. Para ser considerado o limite da detecção do método o sinal da substância deve ser 3 vezes maior que o ruído da linha base.

Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método foi obtido por avaliação da relação sinal/ruído de concentrações conhecidas e obtidas por diluições sucessivas, a partir da solução estoque de 400 µg/mL. Para ser considerado o limite da quantificação do método a relação entre o sinal da substância e o ruído da linha base deve ser 10 vezes maior que o ruído da linha base.

Robustez

A avaliação da robustez do método foi feita com base na análise da influência de 5 parâmetros analíticos (Tabela 4) e suas respectivas variações, que foram analisados isoladamente, ou seja, todo o método se manteve de acordo com a condição 3 de análise, exceto pela variação do parâmetro em questão. A influência da variação de cada parâmetro isolado sobre a qualidade dos

resultados demonstrada pelo método de análise e quantificação das neolignanas foi realizada nas concentrações mais baixa e mais alta da curva analítica de cada substância.

Tabela 4 – Parâmetros analíticos e variações para a avaliação da robustez do método cromatográfico de quantificação das neolignanas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano.

Parâmetros analíticos	Condição nominal	Variação
Fluxo da fase móvel	1,0 mL/ min– A	0,8 mL/ min– a
Temperatura do forno	50 °C – B	48 °C – b
Concentração de acetonitrila na fase móvel	80 % – C	78 % – c
Comprimento de onda no UV para eupomatenóides 5 e 6	256 nm – D	258 nm – d
Comprimento de onda no UV para o conocarpano	264 nm – D	262 nm – d
Marca da acetonitrila	Tedia Brasil® – E	Merck – e

3.4 Extração e análise das neolignanas

3.4.1 Tratamentos das amostras vegetais para quantificação de neolignanas

As folhas coletadas foram desidratadas em estufa equipada com 8 lâmpadas de 1000w durante 24 h no HRJ. Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas cedido pelo Laboratório de Marcadores Moleculares, do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (NBV/UERJ). Após o processamento, as folhas moídas foram armazenadas em *freezer* a -18°C até o momento da extração.

3.4.2 Solução estoque e obtenção de extratos brutos para quantificação de neolignanas

As neolignanas puras EUP-5, EUP-6 e CNC foram cedidas pelo coorientador Dr. André Mesquita Marques, pesquisador de Farmanguinhos/FIOCRUZ. A metodologia de extração, purificação, isolamento e determinação estrutural das neolignanas é detalhada em Moreira et al., 2016. Solução estoque (SE, 400 µg/mL) de cada neolignana foi preparada e armazenada ao abrigo da luz, sob refrigeração e com temperatura variando entre 0 e 5 °C.

Para quantificação das neolignanas no material vegetal foi utilizado o método de extração rápida com auxílio de banho ultrassônico, que propaga ondas ultrassônicas de alta pressão pelo solvente, resultando num fenômeno conhecido como cavitação (AZMIR et al., 2013). O equipamento utilizado foi um banho ultrassônico Unique USC1400, nas condições de temperatura de 22°C, frequência 40 kHz e potência de 120 W. Diferentes solventes foram usados, bem como diferentes tempo de extração, conforme descrito no item 3.4.4, a seguir.

3.4.3 Extração e delineamento fatorial 2²

Foi realizado um delineamento fatorial 2² com a finalidade de avaliar o efeito do solvente e do tempo na extração sobre os rendimentos de extrato e teor percentual de neolignanas a partir de amostras obtidas de folhas de *P. rivinoides*. Essa experiência inicial serviu para a determinação do melhor solvente e tempo de extração a ser aplicado às amostras do estudo de sazonalidade.

O desenho experimental com três pontos centrais foi composto de um total de 11 corridas em triplicata. As variáveis independentes utilizadas foram *tempo de extração* (X1) em 15 (-1), 30 (0) e 45 (+1) minutos e *solução extrativa* (X2) com mistura de **n-hexanoetanol** em 0 (-1), 50 (0) e 100 (+1) % (Tabela 5), enquanto que as variáveis dependentes foram os rendimentos de extratos obtidos e teor das substâncias EUP-5, EUP-6 e CNC (quantificadas pelo método desenvolvido e validado por CLAE). As combinações das variáveis em estudo podem ser observadas na Tabela 6.

Após avaliação do rendimento da extração e quantificação das neolignanas foi possível construir gráficos que representam estatisticamente a melhor condição do modelo. As equações matemáticas obtidas permitiram determinar o melhor solvente e tempo de extração.

Para realizar as investigações estatísticas dessa experiência foi empregado o *software* Statistica® por análise de variância (ANOVA). Os dados obtidos foram analisados em relação às avaliações dos efeitos de interação dos dois fatores (*X1* e *X2*), com adequação à regressão polinomial de segunda ordem contendo coeficientes lineares e quadráticos. Os resultados foram significativos quando os valores de *p* expressos fosse inferiores a 0,05. Com a finalidade avaliar os efeitos dos fatores sobre as variáveis dependentes descritas foram utilizados gráficos de Pareto e Metodologia de Superfície de Resposta (SILVA, 2019).

Tabela 5 - Variáveis independentes do delineamento fatorial 2² para o processo de extração de neolignanas a partir das folhas *Piper rivinoides* Kunth.

Variáveis independentes	Símbolos	Códigos		
		-1	0	1
Tempo de Extração (min)	<i>X1</i>	15	30	45
Concentração de Etanol (%) ¹	<i>X2</i>	0%	50%	100%

Legenda: ¹ Concentração de etanol em solução com *n*-hexano

Tabela 6 - Delineamento fatorial 2² para a extração de neolignanas a partir das folhas de *Piper rivinoides* Kunth.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	<i>X1</i>	<i>X2</i>	Tempo (minutos)	Etanol (%) ¹
A	-1	-1	15	0%
B	1	-1	45	0%
C	-1	1	15	100%
D	1	1	45	100%
E	0	-1	30	0%
F	0	1	30	100%
G	-1	0	15	50%
H	1	0	45	50%
Pontos Centrais	I	0	30	50%
	J	0	30	50%
	L	0	30	50%

Legenda: ¹ Concentração de etanol em solução com *n*-hexano

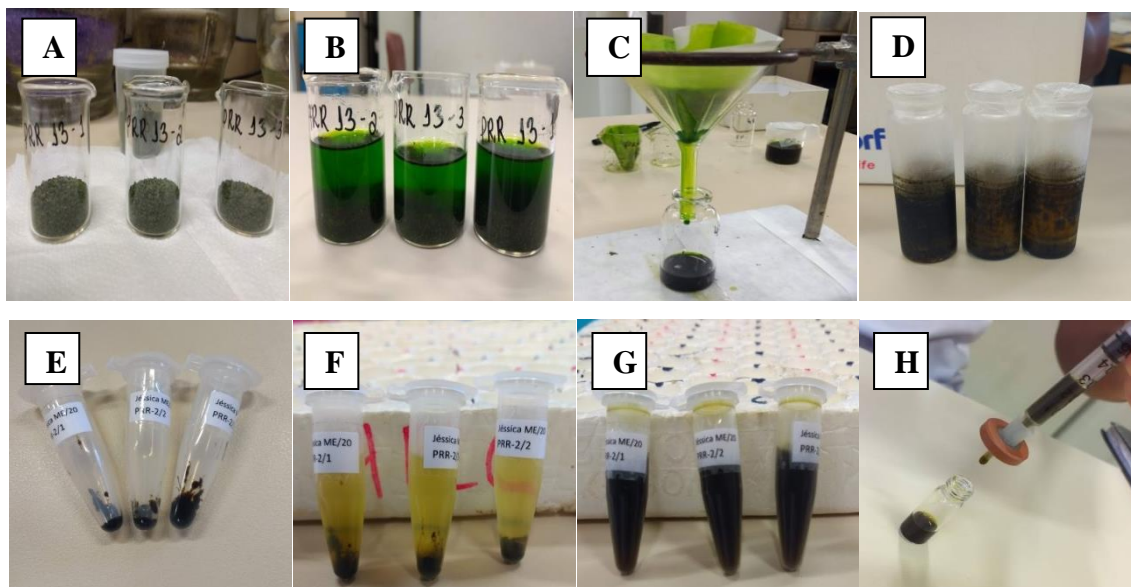
3.4.4 Extração do material vegetal

Cerca de 2,0 g do material vegetal seco e moído foram transferidos para becker e, em seguida, foram adicionados 20 mL da solução com o solvente extrativona proporção de 10% (p/v). O material foi, então, submetido à técnica de extração rápida por ultrassom durante o tempo determinado no delineamento fatorial. O extrato foi filtrado em papel de filtro qualitativo e o filtrado foi recolhido e, em seguida, deixado em capela com auxílio de fluxo de ar para evaporação do solvente. Após evaporação, o extrato resultante foi pesado e armazenado sob refrigeração (0 – 5°C) até o momento da análise. O rendimento foi calculado com base no peso de cada extrato em relação a quantidade de material vegetal usado inicialmente (p/p ou teor percentual). Este procedimento foi conduzido em triplicata para cada material que foi coletado nos doze meses e para cada região de coleta, o que gerou um total de 72 extratos.

3.4.5 Análise dos extratos produzidos

Para que o extrato produzido tivesse condições adequadas para ser analisado por CLAE-DAD-UV foram pesados 10mg de extrato bruto, acrescido de 1mL de metanol (Grau HPLC, Tedia) e, em seguida, a solução resultante foi submetida a banho ultrassônico durante 10 min para melhor solubilização. O extrato diluído foi filtrado com filtro 0,45µm (Sigma-Aldrich®) e submetido à análise por CLAE-DAD-UV (Figura 9). Cabe ressaltar que, quando necessário, o extrato em concentração de 10 mg/mL foi diluído para que as áreas dos sinais das neolignanas ficassem dentro da curva analítica.

Figura 9 – Etapas conduzidas no processo de produção e obtenção de extratos brutos a partir de folhas de *Piper rivinoides* Kunth.



Legenda: A) Cerca de 2g de folhasecas, moídas e pesadas; B) folhas embebidas com solvente extrator; C) filtragem após extração com auxílio de banho ultrassônico; D) extratos brutos obtidos após evaporação do solvente; E) cerca de 10mg de extrato bruto; F) extrato com metanol (HPLC, Tedia) antes do banho com ultrassom; G) extratos dissolvidos após banho com ultrassom; H) filtração dos extratos.

3.5 Extração e análise do óleo essencial

3.5.1 Extração

O procedimento empregado para obtenção dos óleos essenciais (OE) de *P. rivinoides* seguiu metodologia já estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2013b; RAMOS et al., 2019; RAMOS et al., 2020b). De maneira geral, aproximadamente 150g de folhas frescas foram cominuídas manualmente com uso de tesoura e submetidas ao método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado. O material triturado foi transferido para um balão volumétrico de fundo redondo de 2L, no qual foram adicionados 700 mL de água destilada e, em seguida, iniciou-se o aquecimento do balão, com auxílio de manta aquecedora. O processo de hidrodestilação foi realizado por um período de 2 horas. Após finalização do processo, os óleos essenciais puros foram separados da fase aquosa, submetidos à secagem com sulfato de sódio

anidro (Na_2SO_4) e armazenados em frasco âmbar fechado (para evitar possível fotodegradação) em *freezer* a -26°C até o momento das análises. Os rendimentos foram calculados a partir do peso do óleo essencial e o peso em gramas do material vegetal fresco utilizado na extração, multiplicado por 100 para expressar em teor porcentual (p/p).

3.5.2 Análise dos óleos essenciais

Os OE obtidos por hidrodestilação foram solubilizados em diclorometano P.A. (Tedia®, Brasil) até a 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 aquisição dos espectros de massas. Em relação aos dados quantitativos sobre os constituintes presentes nos óleos essenciais e determinação do Índice de Retenção (IR), foram conduzidas análises por Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada ao Detector por Ionização de Chamas (CG-DIC), em equipamento HP-agilent 6890. As duas análises foram feitas na Plataforma Analítica de Farmaguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

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

Os índices de retenção (IR) foram calculados a partir do tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados (C_8 - C_{28} , Sigma-Aldrich, Brasil) obtidos por CG-DIC, nas mesmas condições de análises dos OE (DOLL; KRATZ, 1963). As substâncias presentes nos OE foram identificadas por comparação de seus espectros de massas com registros de banco de dados (WILEY 7n, NIST) e por comparação dos IR calculados com aqueles da literatura (ADAMS, 2007;2017).

3.6 Processamento de dados e análises estatísticas

Os dados advindos das análises cromatográficas foram analisados por testes paramétricos ANOVA a um critério ($p < 0,05$). O teste de Bonferroni com múltiplas comparações foi utilizado para verificar se os valores das médias são significativos entre si. O programa usado para construir os gráficos e fazer as análises estatísticas foi o GRAPHPAD PRISM6®.

Análises quimiométricas foram realizadas para examinar inter-relações da variabilidade da composição química entre os diferentes locais de coleta, variação climática (temperatura, umidade e precipitação), atributos dos solos, bem como comparação com resultados publicados na literatura. Essas análises foram feitas com o *software* Statistica versão 10 (STAT SOFT, 2010), aplicando as Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH). A composição química dos OE e das neolignanas foram tratadas como unidades taxonômicas operacionais (UTO). Para construção de gráficos de ACP e AAH foram utilizados os valores de porcentagem (% área) transformados para arco seno da raiz de p , extraídos dos dados obtidos por CG (óleo essencial) e CLAE-DAD-UV (neolignanas), convertidos em uma matriz, excluindo substâncias que não foram identificadas, porque essas não representam àqueles de interesse (>5% no caso dos OE) (SADGROVE et al., 2014). Análises de Agrupamento Hierárquico (AAH) foram realizadas para verificar semelhanças entre as UTO com base na distribuição das substâncias químicas do OE e teor percentual das neolignanas nas amostras nas duas áreas de estudo e ao longo dos doze meses de coleta. Para obtenção do dendograma foram utilizadas a distância Euclidiana com o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e a correlação de Pearson.

As comparações múltiplas entre os constituintes majoritários do OE e fatores abióticos foram realizadas por correlação de Pearson, assim como os teores de neolignanas *versus* fatores abióticos e neolignanas *versus* constituintes majoritários dos óleos essenciais.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da morfologia macroscópica vegetal

Características comparativas entre os estados de predação dos dois indivíduos, das duas áreas de coleta foram registradas. O espécime do acesso da Floresta da Tijuca/RJ apresentou folhas severamente predadas em contraste com as folhas do espécime da Serra da Tiririca-Niterói/RJ, que apresentou poucas marcas de predação durante todo o período de coleta. Além disso, a superfície foliar do indivíduo de Niterói/ RJ possuía tamanho reduzido se comparado ao outro indivíduo do estudo (Figura 10).

Figura 10 –Imagem das folhas de *Piper rivinoides* Kunth coletadas no Estado do Rio de Janeiro.



Legenda: (A) *Piper rivinoides* espécime de Serra da Tiririca-Niterói/RJ; (B) *Pipe rivinoides* espécime da Floresta da Tijuca/RJ.

4.2 Desenvolvimento e validação do método analítico

4.2.1 Condições de análise

Com o intuito de reduzir o tempo de análise e melhorar a separação entre as substâncias presentes no extrato, foram realizadas alterações nas condições cromatográficas. Os ensaios foram realizados por variação das condições de fases móveis, de acordo com a Tabela 7. Cabe ressaltar que a melhor fase estacionária para análise das neolignananas foi sílica modificada C-18, em termos de resolução, fator de capacidade e simetria de sinal. Portanto, as colunas de sílica modificada fenil e C8 foram descartadas desse estudo.

Tabela 7 – Condições testadas para análise das neolignananas nos extratos brutos de *Piper rivinoides* Kunth.

Condição	Fase Móvel (v/v)
1	Acetonitrila (50%)/Água ultrapura acidificada (50%)
2	Acetonitrila (65%)/Água ultrapura acidificada (35%)
3	Acetonitrila (80%)/Água ultrapura acidificada (20%)

Das condições testadas para análise das neolignananas, **a condição 3** foi a que apresentou a melhor resolução, fator de capacidade/separação, simetria do sinal, e melhor tempo de análise. Os parâmetros cromatográficos específicos para cada analito estão descritos na Tabela 8. As condições cromatográficas definidas para o método analítico utilizado na quantificação das neolignananas estão descritas na Tabela 9.

Tabela 8 – Parâmetros cromatográficos obtidos para as neolignanais isoladas de *Piper rivinoides* Kunth.

Substância	Tempo de Retenção*	Comprimento de onda (λ)	Resolução	Simetria do sinal	Fator de retenção
Eupomatenóide-5	6,80	256	$R_{Eup5-Eup6}$ 3,02	1,0	4,79
Eupomatenóide-6	6,03	256	$R_{Eup6-CNC}$ 3,32	1,1	3,00
Conocarpano	4,60	264	$R_{Eup5-CNC}$ 4,03	1,3	2,71

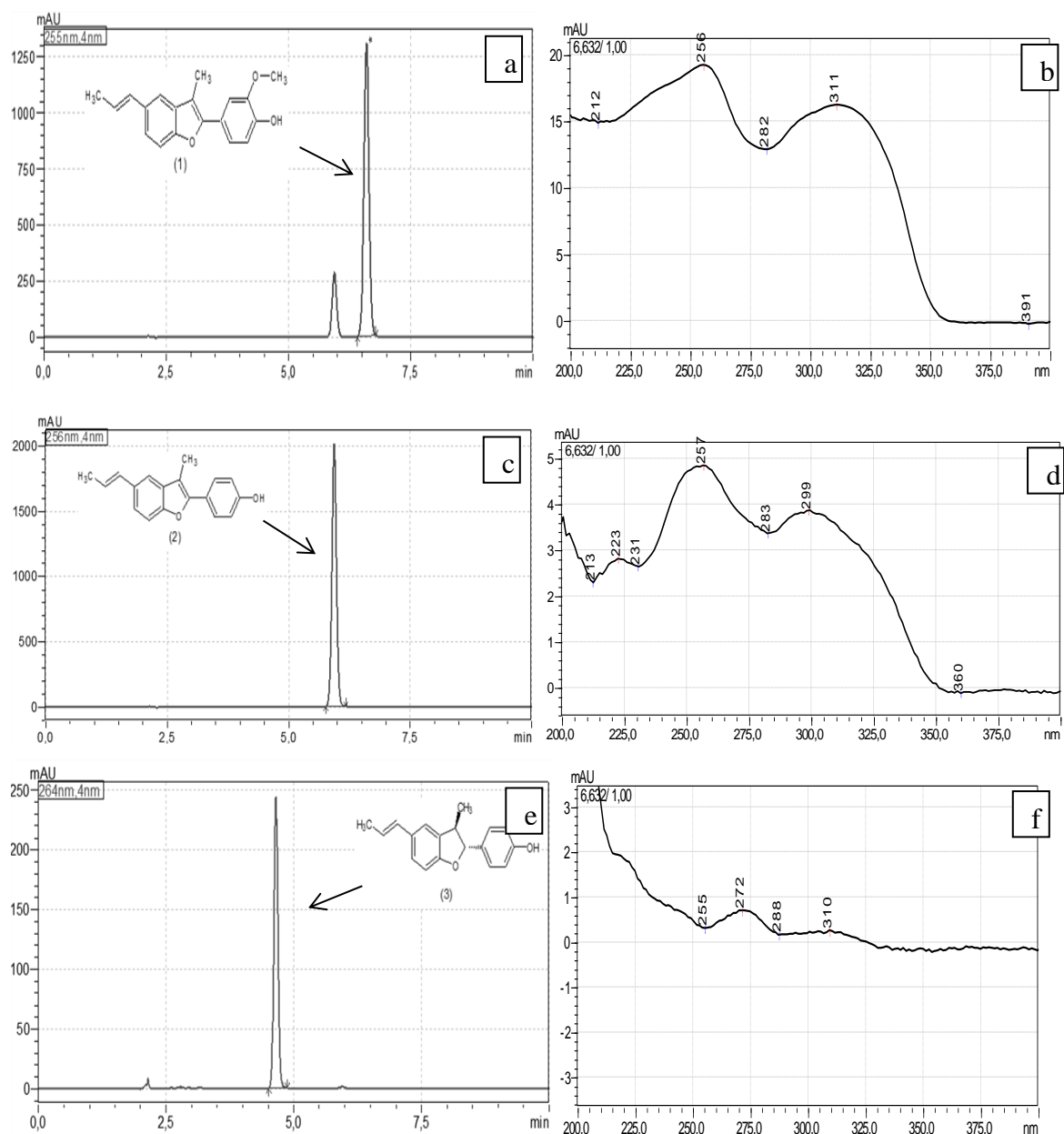
* em minutos; EUP-5 = eupomatenóide-5; EUP-6 = eupomatenóide-6; CNC = conocarpano.

Tabela 9 – Descrição das condições cromatográficas para quantificação das neolignanais.

CONDIÇÃO	DESCRIÇÃO
Concentração do analito	Variável, dependendo do teste de validação
Concentração do extrato	Variável, dependendo dos analitos na matriz
Volume de injeção	20 μ L
Coluna	Sílica C18 250 mm x 4,6mm, 5 μ m (Ascentis, Supelco, Brasil)
Fase móvel	Água acidificada (pH 3,0): Acetonitrila (HPLC, Tedia, Brasil) 20/ 80 (v/v)
Fase móvel	Isocrático
Tempo total de análise	8 min
Fluxo de fase móvel	1 mL/min
Temperatura do forno	50°C

Os comprimentos de onda (λ) que apresentaram maior seletividade e maior absorção para EUP-5, EUP-6 e CNC foram 256 nm, 256 nm e 264 nm, respectivamente. Nas figuras 11A – 11C tem-se os cromatogramas dessas neolignanais, seguido de seus respectivos espectros de absorção no ultravioleta.

Figura 11 – Cromatogramas das soluções padrão das neolignan benzofuranicas Bioativas isoladas encontradas em extratos de *Piper rivinoides* Kunth obtidos por CLAE-DAD-UV e seus respectivos espectros de absorção no UV.



Legenda: **a** – Cromatograma do eupomatenoide-5 (metanol, 100 µg/ mL) obtido por CLAE-DAD-UV (256 nm) na condição 3; **b** – Espectro de UV; **c** – Cromatograma do eupomatenoide-6 (metanol, 100 µg/ mL) obtido por CLAE-DAD-UV (256 nm) na condição 3; **d** – Espectro de UV; **e** – Cromatograma do conocarpano (metanol, 20 µg/ mL) obtido por CLAE-DAD-UV (256 nm) na condição 3; **f** – Espectro de UV.

As condições cromatográficas que apresentaram melhor resultado na análise das soluções com as neolignanas puras foram testadas com o extrato bruto alcoólico de *P. rivinoides*. A condição 3 foi adequada para esta análise, como será demonstrado a seguir.

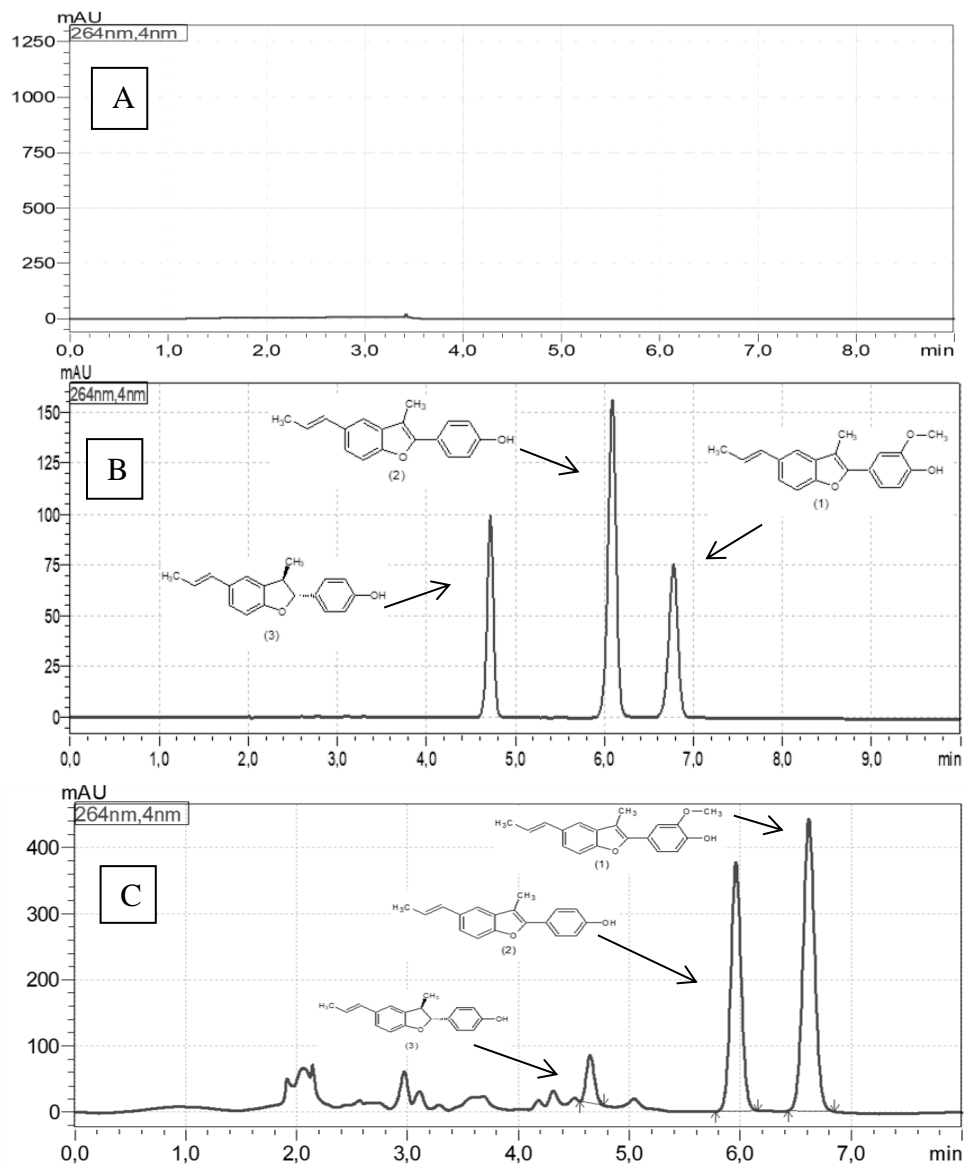
4.2.2 Validação do método analítico

Seletividade

Cada parâmetro de validação foi analisado com um padrão contendo cada neolignana pura e isolada. Sendo assim, todas as análises de amostra branco (água ultrapura) e solução estoque de neolignanas e extrato hidroalcoólico bruto rico em neolignanas permitiu demonstrar a seletividade do método. Na figura 12 tem-se o cromatograma da água com ausência de interferentes na amostra, isto é, amostra branco-água. Os sinais obtidos a partir do extrato hidroalcoólico e da solução estoque podem ser visualizados também na Figura 12.

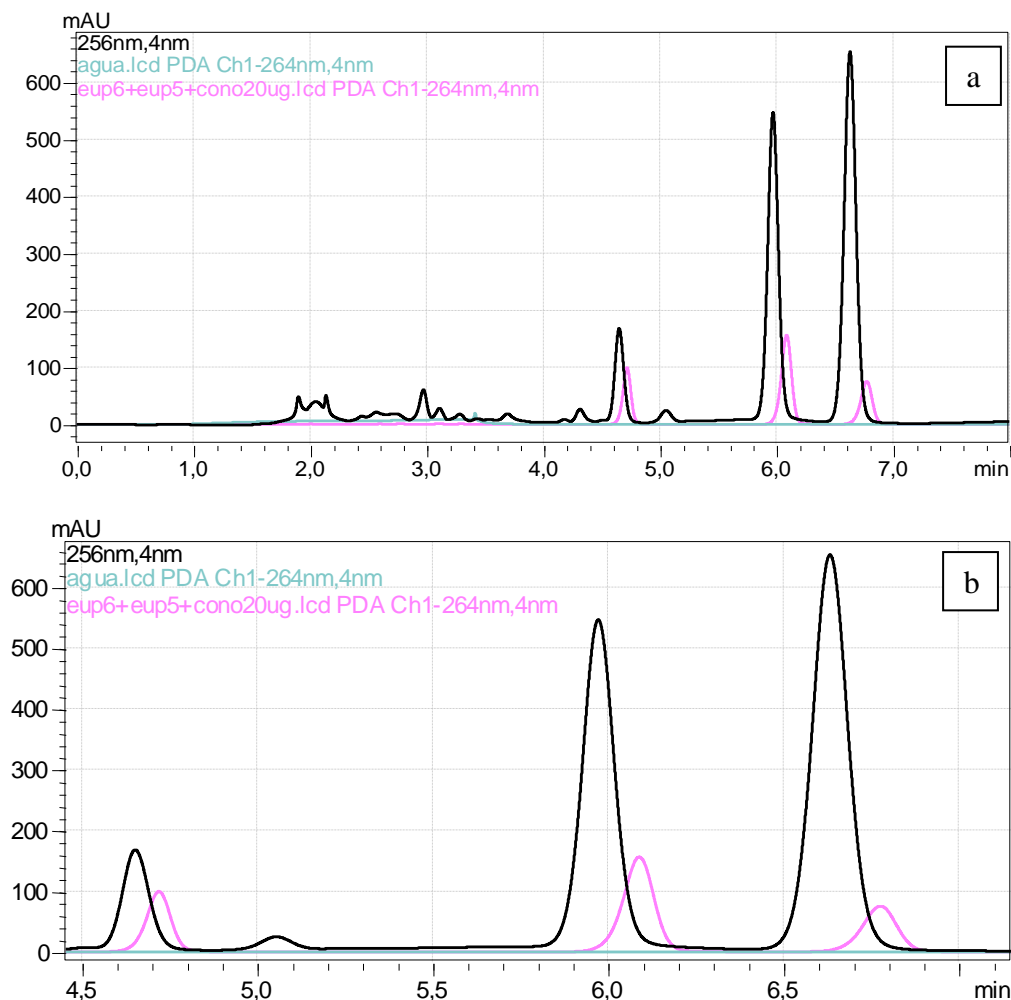
A seletividade do método é melhor demonstrada na sobreposição dos cromatogramas das amostras branco (água ultrapura), amostra com as substâncias puras e extrato bruto de *P. rivinoides* Kunth (Figura 13), pois a sobreposição dos cromatogramas permite observar a total ausência de interferentes do extrato ou da água ultrapura na janela de detecção das três neolignanas, cujo tempos de retenção são descritos na Tabela 8.

Figura 12 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD-UV para determinar a seletividade do método.



Legenda: **A** – Amostra branco (água); **B** – Solução estoque contendo neolignanas; **C** – Amostra de extrato hidroacóico de *Piper rivinoides* Kunth. Seta indica sinal cromatográfico das neolignanas (1) EUP-5, (2) EUP-6 e (3) CNC.

Figura 13 – Sobreposição de Cromatogramas obtidos de análises de amostra contendo as neolignan benzo-furanicas puras conocarpano, eupomateoide-6 e eupomatenoide-5, com amostra em branco e com amostra de extrato bruto de *P. rivinoides* Kunth.



Legenda: **a** – Sobreposição dos cromatogramas das amostras branco (água ultrapura, azul), amostra com as substâncias puras (rosa) e extrato bruto de *Piper rivinoides* (preto); **b** – Ampliação da sobreposição dos cromatogramas (tR 4 – 7 min) das amostras branco (água, azul), amostra com as substâncias puras (rosa) e extrato bruto de *Piper rivinoides* (preto); **Obs:** o não completo alinhamento entre os sinais é esperado, pois pequenas alterações nos tempos de retenção são possíveis em diferentes corridas cromatográficas.

Linearidade

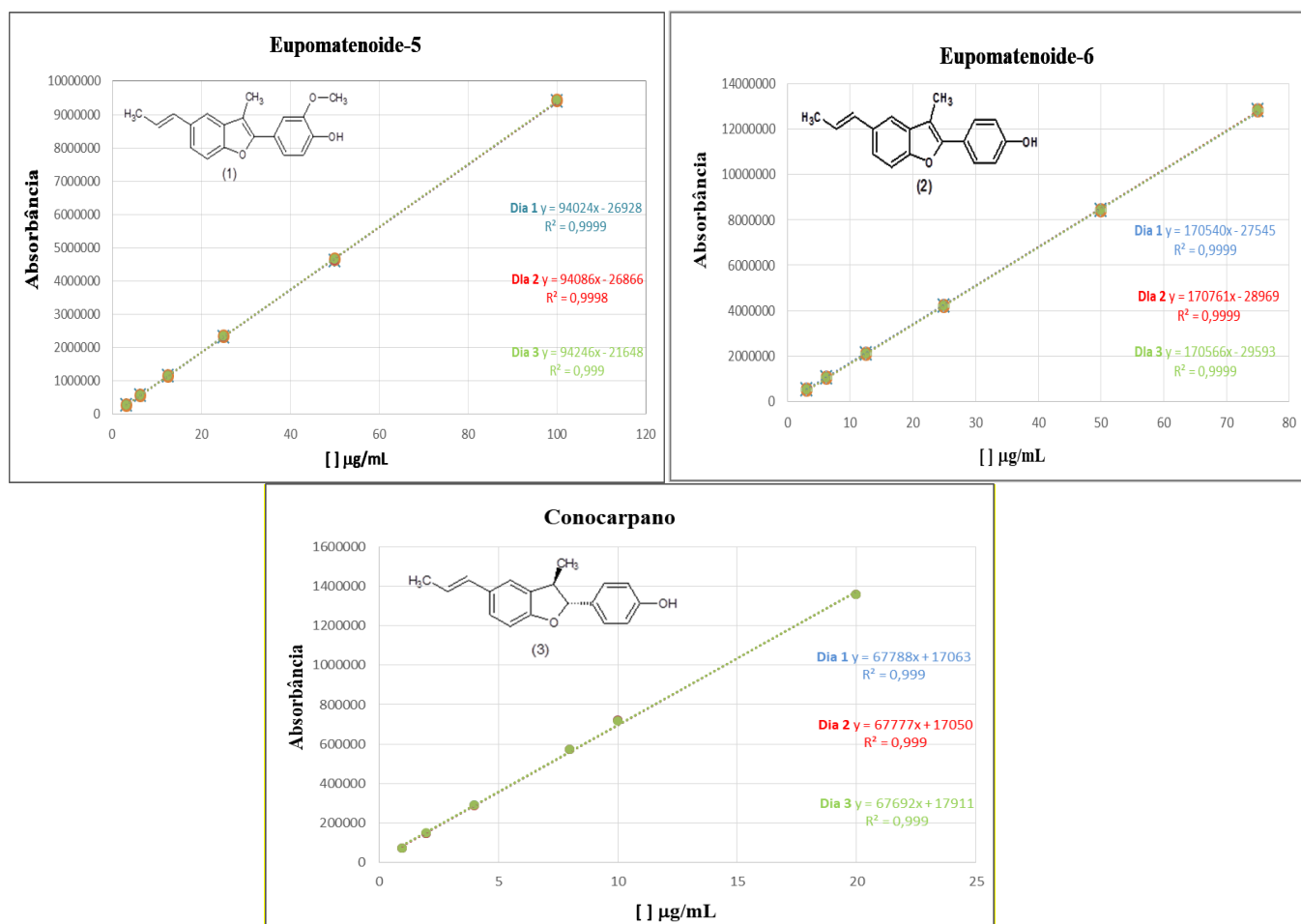
As curvas analíticas obtidas para as neolignanas EUP-5, EUP-6 e CNC foram feitas nos intervalos de concentração de 3,25 a 100 $\mu\text{g/mL}$; 3,125 a 75 $\mu\text{g/mL}$ e de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os resultados obtidos das três curvas analíticas de cada substância estão ilustrados na Figura 14.

As curvas analíticas apresentaram correlação linear positiva, com $r= 0,9999$ para EUP-5; $0,9998$ para EUP-6 e $0,9990$ para CNC. As fórmulas obtidas por regressão linear e utilizadas para a quantificação das três neolignananas nos extratos de *P. rivinoides* são descritas na Tabela 10.

Tabela 10: Fórmulas obtidas por regressão linear e usadas para a quantificação das neolignananas benzofurânicas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano.

Substância	Fórmula
Eupomatenóide-5	Concentração = $(ABS - 26539 \pm 620) / 94138 \pm 147$
Eupomatenóide-6	Concentração = $(ABS - 28702 \pm 1049) / 170551 \pm 204$
Conocarpano	Concentração = $(ABS - 17341 \pm 493) / 67752 \pm 52$

Figura 14 – Curvas analíticas obtidas para a quantificação das neolignananas, nos seus respectivos intervalos de concentrações, obtidas em três dias diferentes.



Recuperação

A recuperação das neolignanas foi avaliada em dois níveis de concentração (baixa e alta) para cada uma das substâncias. Os dados estão dispostos na Tabela 11 para amostras de *P. rivinoides* Floresta da Tijuca/RJ, e na Tabela 12 para amostras de *P. rivinoides* da Serra da Tiririca-Niterói/RJ. Em ambas regiões, todos os níveis de concentração para recuperação foram maiores que 80% e menores que 115%, portanto, dentro das especificações legais (INMETRO, 2016).

Tabela 11 – Avaliação da recuperação das neolignanas em extrato de *Piper rivinoides* Kunth do acesso da Floresta da Tijuca/RJ.

Neolignana	[] µg/mL	Média das áreas (n=3)	Recuperação(%)	CV (%)
Conocarpano	2	292829	88,2	1,9
	10	975336,3	109,2	0,4
Eupomatenóide-5	6,25	2944139	104,1	1,2
	50	6913714	93,1	0,3
Eupomatenóide-6	6,25	3723795	89,2	1,4
	50	11797018	100,5	2,2

Legenda: [] = concentração.

Tabela 12 – Avaliação da recuperação das neolignanas em extrato de *Piper rivinoides* Kunth do acesso da Serra da Tiririca – Niterói/RJ.

Neolignana	[] µg/mL	Média das áreas (n=3)	Recuperação(%)	CV (%)
Conocarpano	2	865215	90,6	0,2
	10	1449784	95,7	3,3
Eupomatenóide-5	6,25	3815822	93,3	0,8
	50	9075370	104,5	0,4
Eupomatenóide-6	6,25	3210328	90,6	1,7
	50	9075370	104,4	0,4

Legenda: [] = Concentração.

Precisão

Os resultados obtidos na avaliação da precisão do método estão demonstrados nas Tabelas 13–15. Foram avaliados três concentrações (baixa, média e alta) para cada substância em triplicata na parte da manhã, tarde e noite do mesmo dia (precisão intra-dia) e em três dias diferentes (precisão inter-dia). Os desvios observados (CV%) foram inferiores ao limite de 15%

(INMETRO, 2016). Ainda, não houve variação entre média intra-dia quando comparada com a média inter-dia ($p < 0,05$). Portanto, o método desenvolvido é preciso (INMETRO, 2016)

Tabela 13 – Avaliação da precisão do método de análise para eupomatenoide-5.

Concentração µg/mL	Intra-dia			Inter-dia		
	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%
3,125	290089	1528,7	0,53	286448	852,7	0,30
25	2397283	10870,9	0,45	2331330	13748,4	0,59
100	9459740	19658,6	0,21	9423086	16987,1	0,18

Legenda: DP: Desvio-padrão; CV: Desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação percentual.

Tabela 14 – Avaliação da precisão do método de análise para eupomatenoide-6.

Concentração µg/ mL	Intra-dia			Inter-dia		
	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%
3,125	522244	624,3	0,12	526425	453,7	0,09
25	4235408	17126,0	0,40	4217754	4267,0	0,10
75	12892719	32164,5	0,25	12818793	13480,0	0,11

Legenda: DP: Desvio-padrão; CV: Desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação percentual.

Tabela 15 – Avaliação da precisão do método de análise para conocarpano.

Concentração µg/ mL	Intra-dia			Inter-dia		
	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%
3,125	75562	56,7	0,08	75205	74,9	0,11
25	572206	943,0	0,16	570656	123,7	1,03
100	1356898	5121,2	0,38	1357430	241,7	0,44

Legenda: M: Média; DP: Desvio-padrão; CV: Desvio-padrão relativo ou coeficiente de variação

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em 6 níveis de concentrações diferentes para cada substância (Tabela 16). Para o EUP-5 os resultados demonstram que a menor variação foi de 99,71% para 100 µg/mL e as maiores foram de 88,00% e 93,00% para 3,125 µg/mL e 6,25 µg/mL, respectivamente. Com relação ao EUP-6 foram observadas variações de 99,99% para 75 µg/mL, considerada a menor variação, sendo a maior divergência observada na concentração de 3,125 µg/mL com 93,39%. Já os resultados obtidos para o CNC mostraram como menor variação a concentração de 4 µg/mL com valor de 99,90%, e a maior variação foi observada em 1 µg/mL com o valor de 86,46%. As variações estão, portanto, dentro dos limites permitidos pelas normas de validação (85 – 115%). Dessa forma, o método desenvolvido pode ser considerado exato (INMETRO, 2016; ICH, 2005).

Tabela 16 – Avaliação da exatidão do método de análise para as neolignan as eupomatenoide-5, eupomatenoide-6 e conocarpano.

EUPOMATENOIDE-5					
Concentração nominal µg/mL	Absorvância média experimental	Concentração experimental µg/mL	Δµg	Δµg %	Δ%
100	9413018	99,71	-0,29	-0,29	99,71
50	4625416	97,71	-1,15	-2,29	97,71
25	2327750	97,78	-0,55	-2,22	97,78
12,5	1152628	95,70	-0,54	-4,30	95,70
6,25	574465	93,13	-0,43	-6,87	93,13
3,125	285426	88,00	-0,37	-12,00	88,00

EUPOMATENOIDE-6					
Concentração nominal µg/mL	Absorvância média experimental	Concentração experimental µg/mL	Δµg	Δµg %	Δ%
75	12818793	74,99	-0,01	-0,01	99,99
50	8432393	49,27	-0,73	-1,45	98,55
25	4217754	24,56	-0,44	-1,75	98,25
12,5	2103454	12,16	-0,34	-2,68	97,32
6,25	1054678	6,02	-0,23	-3,75	96,25
3,125	526425	2,92	-0,21	-6,61	93,39

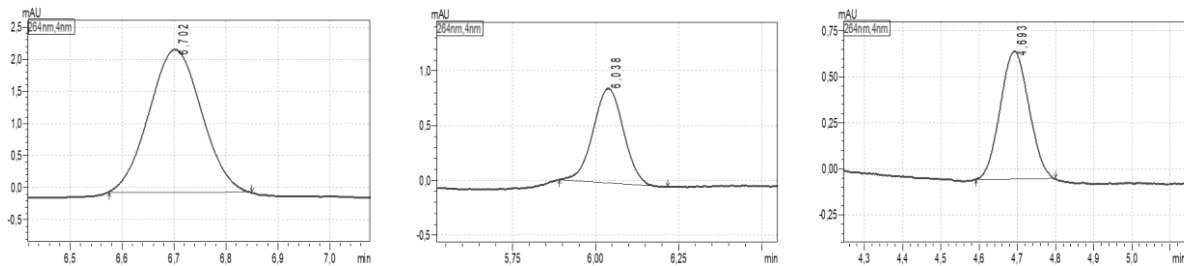
CONOCARPANO					
Concentração nominal µg/mL	Absorbância média experimental	Concentração experimental µg/mL	Δµg	Δµg %	Δ%
20	1357430	19,78	-0,22	-1,10	98,90
10	718358	10,35	0,35	3,447	103,47
8	570656,3	8,17	0,17	2,08	102,08
4	288083,3	4,00	0,00	-0,10	99,90
2	147156	1,92	-0,08	-4,20	95,80
1	758883	0,86	-0,14	-13,59	86,46

Legenda: Δ = diferença

Limite de quantificação (LQ)

O Limite de detecção (LQ) encontrado para as neolignan EUP-5, EUP-6 e CNC foram de 50 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL, respectivamente (Figura 15).

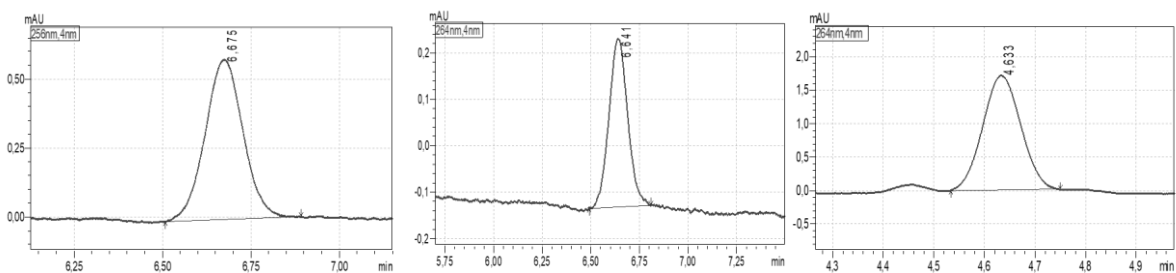
Figura 15 – Cromatogramas das substâncias puras no limite de quantificação (da esquerda para a direita: eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano respectivamente).



Limite de detecção (LD)

O Limite de quantificação (LD) encontrado para as neolignan EUP-5, EUP-6 e CNC foram de 25 ng/mL, 25 ng/mL e 37,5 ng/mL, respectivamente (Figura 16).

Figura 16 – Cromatogramas das substâncias puras no limite de detecção (da esquerda para a direita: eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano, respectivamente).



Robustez

Os efeitos das condições dos parâmetros testados para avaliar a robustez do método de análise das neolignan estão dispostos nas Tabelas 17, 18 e 19. É possível afirmar, a partir dos dados de coeficiente de variação entre as análises realizadas, que as alterações aplicadas no método

analítico pouco influenciaram na média das áreas de ambas as concentrações testadas para todas as neolignanas analisadas. Portanto, o método desenvolvido é robusto.

Tabela 17 – Efeitos na absorvância do eupomatenoide-5 causados pela variação das condições do método analítico.

EUPOMATENOIDE-5						
Variações	ABS(M)	DP	CV%	ABS (M)	DP	CV%
	[] 3,125 µg/mL			[] 100 µg/mL		
Nominal	288583	107,3	0,04	9454758	4041,6	0,17
A	284993	3729	1,31	9426219	14522	0,15
B	277769	5325	1,92	9454922	11873,7	0,13
C	273727	294,4	0,11	9448722	46213	0,49
D	283819	1828	0,64	9416997	20014	0,21
E	270448	5372	1,99	9465719	17302	0,18
Média	279890	7052	2,52	9444556	18828	0,20

Legenda: **condição nominal**: fluxo de 1,0 mL/ min; temperatura do forno em 50°; acetonitrila, ACN,(Tedia Brasil®) na fase móvel em 80%; comprimento de onda em 256nm; Variações→**A**: fluxo de **0,8 mL/min**; **B**: temperatura do forno em **48 °C**; **C**: ACN na fase móvel **78%**; **D**: Comprimento de onda **258nm** ; **E**: Marca da **ACN Merck**; ABS (M) = absorvância média entre triplicatas; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela 18 – Efeitos na absorvância do eupomatenoide-6 causados pela variação das condições do método analítico.

EUPOMATENOIDE-6						
Variações	ABS(M)	DP	CV%	ABS (M)	DP	CV%
	[] 3,125 µg/mL			[] 75 µg/mL		
Nominal	522297	1909	0,37	12855605	27848	0,22
A	528043	2145	0,41	12889256	108313	0,84
B	521014	1133	0,22	12926261	16823	0,13
C	523886	2582	0,49	12904317	14245	0,11
D	522050	527,6	0,10	12917169	22397	0,17
E	521488	221,4	0,04	12943338	33036	0,26
Média	523130	2597	0,50	12905991	30829	0,24

Legenda: **condição nominal**: fluxo de 1,0 mL/ min; temperatura do forno em 50°; acetonitrila, ACN, (Tedia Brasil®) na fase móvel em 80%; comprimento de onda em 256 nm; Variação **A**: fluxo de **0,8 mL/min**; **B**: temperatura do forno em **48 °C**; **C**: ACN na fase móvel **78%**; **D**: Comprimento de onda **258nm** ; **E**: Marca da **ACN Merck**; ABS (M) = absorbância média entre triplicatas; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

Tabela 19– Efeitos na absorvância doconocarpano causados pela variação das condições do método analítico.

CONOCARPANO						
Variações	ABS(M)	DP	CV%	ABS (M)	DP	CV%
[] 1µg/mL			[] 20µg/mL			
Nominal	75625	323,7	0,45	1352663	2096	0,15
A	75712	243,6	0,34	1362517	8723	0,64
B	75561	307,7	0,43	1361942	1216	0,09
C	75830	127,5	0,18	1367896	10280	0,75
D	75897	180,9	0,25	1370097	1080	0,08
E	75787	539	0,76	1367719	9396	0,69
Média	75735	127,7	0,17	1363806	6339	0,46

Legenda: **condição nominal**: fluxo de 1,0 mL/ min; temperatura do forno em 50°; acetonitrila, ACN, (Tedia Brasil®) na fase móvel em 80%; comprimento de onda em 256 nm; Variação **A**: fluxo de **0,8 mL/min**; **B**: temperatura do forno em **48 °C**; **C**: ACN na fase móvel **78%**; **D**: Comprimento de onda **258nm** ; **E**: Marca da **ACN Merck**; ABS (M) = absorbância média entre triplicatas; DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

4.3 Otimização do processo extrativo das neolignanas

O rendimento dos extratos e teores percentuais das neolignanas obtidos das folhas de *P. rivinoides* estão apresentados na Tabela 20. O rendimento dos extratos variou 0,92 a 6,90%. Os teores percentuais deCNC variaram de 0,04 a 0,13%, de EUP-6 de 0,34 a 1,03% e de EUP-5 de 2,73 a 4,44%. Portanto, a neolignana mais abundante no extrato foi EUP-5.

As análises de variância (ANOVA) para o rendimento do extrato e teores das neolignanas são apresentados na Tabela 21. A Tabela 22 apresenta as equações matemáticas dos modelos geradas por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes rendimento de extrato e teor de neolignanas em função dos fatores avaliados: *tempo de extração (X1)* e *tipo de solvente (X2)*.

Os resultados demonstraram que o rendimento de extrato foi significativo para as variáveis dependentes $X1$ e $X2$ e suas interações. Observou-se que as substâncias CNC e EUP-6 apresentaram valor $F > 25$ e $p < 0,05$, o que demonstra que os modelos quadrático e linear são significativos para a variável dependente solvente ($X2$). O modelo quadrático se mostrou mais adequado para representar a variação do teor percentual do EUP-5 em função de $X2$.

A variável dependente tempo de extração ($X1$) no modelo quadrático é significativo apenas para teores de CNC e EUP-6. O modelo linear pode ser aplicado para explicar os teores de EUP-5 e EUP-6. As interações lineares (1L by 2L) entre $X1$ e $X2$ são importantes apenas para o aumento dos teores de EUP-5.

Os gráficos de Pareto estão apresentados na figura 17A-. Este tipo de gráfico mostra o efeito dos fatores das variáveis dependentes sobre as variáveis independentes. O valor de t_{tabelado} utilizado no gráfico de Pareto é obtido através dos graus de liberdade do resíduo apresentado nas Tabelas de ANOVA ao nível de significância de 5%. Como mencionado anteriormente, os rendimentos dos extratos apresentaram significância para todos os modelos. Observa-se que as interações lineares (-8,728) e modelo quadrático tempo de extração (-15,421) entre as variáveis dependentes apresentaram valores negativos, o que denota maior importância para concentração de etanol no processo extrativo para obtenção dos maiores rendimentos de extrato.

Observa-se ainda, que a concentração de etanol é a variável mais importante para obtenção de maiores teores das três neolignanas. Novamente, para EUP-5, o modelo linear demonstrou significância, sendo que essa exerce uma atuação negativa sobre o teor dessa substância, ou seja, quanto menor a concentração de etanol, menor o teor percentual de EUP-5. Para as outras substâncias, CNC e EUP-6, esse comportamento negativo é demonstrado pelo modelo quadrático.

Os resultados obtidos foram também analisados por regressão linear múltipla, e por meio desta, foram gerados modelos ajustados levando em consideração somente os efeitos significativos para as variáveis dependentes rendimento de extrato e teor de neolignanas, independentemente da significância dos coeficientes. Uma relação empírica entre a resposta e as variáveis independentes foi expressa pelos modelos matemáticos apresentado na Tabela 22.

Gráficos de superfície de resposta foram gerados a partir de cada modelo de regressão linear e estão representados na Figura 18. Nas superfícies de resposta, as variáveis dependentes analisadas (rendimento de extrato, teor percentual de CNC, EUP-6) são mostradas no eixo z em função das variáveis independentes (fatores) tempo de extração ($X1$) e tipo de solvente ($X2$). Os

valores de coeficiente de correlação próximos a 0,99 indicam que os modelos utilizados se ajustam perfeitamente aos dados experimentais.

Tabela 20 - Resultados do delineamento fatorial para rendimentos dos extratos (%) e teores das substâncias conocarpano (CNC), eupomatenoide-6 (EUP-6) e eupomatenoide-5 (EUP-5) obtidos a partir da extração de folhas de *Piper rivinoides Kunth*.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes				
	X1	X2	Rendimento	CNC	EUP-6	EUP-5	
			(%)	(%)	(%)	(%)	
A	15	0%	0,92±0,38	0,04±0,00	0,34±0,00	3,20±0,01	
B	45	0%	2,60±0,33	0,05±0,00	0,41±0,00	4,40±0,02	
C	15	100%	6,90±2,67	0,09±0,00	0,70±0,01	2,19±0,04	
D	45	100%	5,38±0,37	0,11±0,00	0,86±0,00	3,09±0,02	
E	30	0%	2,85±0,26	0,06±0,00	0,44±0,00	4,44±0,02	
F	30	100%	5,45±0,35	0,11±0,00	0,84±0,01	2,73±0,03	
G	15	50%	1,80±0,38	0,13±0,00	1,03±0,00	3,40±0,01	
H	45	50%	2,84±0,06	0,12±0,01	0,97±0,01	3,88±0,05	
Pontos centrais	I	30	50%	3,24±0,13	0,10±0,01	0,81±0,01	3,08±0,08
	J	30	50%	3,24±0,12	0,10±0,00	0,84±0,02	3,12±0,07
	L	30	50%	3,42±0,06	0,10±0,00	0,83±0,01	3,13±0,08

Tabela 21– Análise de variância (ANOVA) para as variáveis dependentes rendimentos dos extratos, teor de conocarpano, eupomatenoide-6 e eupomatenoide-5, obtidos de folhas de *Piper rivinoides* Kunth.

Fatores	Rendimento de extrato				
	SQ	G.L.	QM	F - calculado	p-valor
(1)Tempo de Extração (min)(L)	0,31365	1	0,31365	29,047	0,032745
Tempo de Extração (min)(Q)	0,82260	1	0,82260	76,182	0,012874
(2)Concentração Etanol (%) (L)	21,50674	1	21,50674	1991,763	0,000502
Concentração Etanol (%) (Q)	5,44573	1	5,44573	504,335	0,001977
1L by 2L	2,44417	1	2,44417	226,358	0,004389
<i>Lack of Fit</i>	1,86195	3	0,62065	57,479	0,017149
<i>Pure Error</i>	0,02160	2	0,01080		
Total SS	30,24312	10			

Fatores	Conocarpano (%)				
	SQ	G.L.	QM	F - calculado	p-valor
(1)Tempo de Extração (min)(L)	0,000032	1	0,000032	10,830	0,081245
Tempo de Extração (min)(Q)	0,000136	1	0,000136	46,515	0,020829
(2)Concentração Etanol (%) (L)	0,004100	1	0,004100	1400,967	0,000713
Concentração Etanol (%) (Q)	0,002469	1	0,002469	843,511	0,001183
1L by 2L	0,000015	1	0,000015	5,192	0,150347
<i>Lack of Fit</i>	0,000780	3	0,000260	88,833	0,011152
<i>Pure Error</i>	0,000006	2	0,000003		
Total SS	0,007907	10			

Fatores	Eupomatenoide-6 (%)				
	SQ	G.L.	QM	F - calculado	p-valor
(1)Tempo de Extração (min)(L)	0,005411	1	0,005411	29,240	0,032539
Tempo de Extração (min)(Q)	0,006205	1	0,006205	33,532	0,028551
(2)Concentração Etanol (%) (L)	0,242419	1	0,242419	1310,029	0,000762
Concentração Etanol (%) (Q)	0,208926	1	0,208926	1129,032	0,000885
1L by 2L	0,001530	1	0,001530	8,266	0,102680
<i>Lack of Fit</i>	0,046409	3	0,015470	83,597	0,011844
<i>Pure Error</i>	0,000370	2	0,000185		
Total SS	0,543287	10			

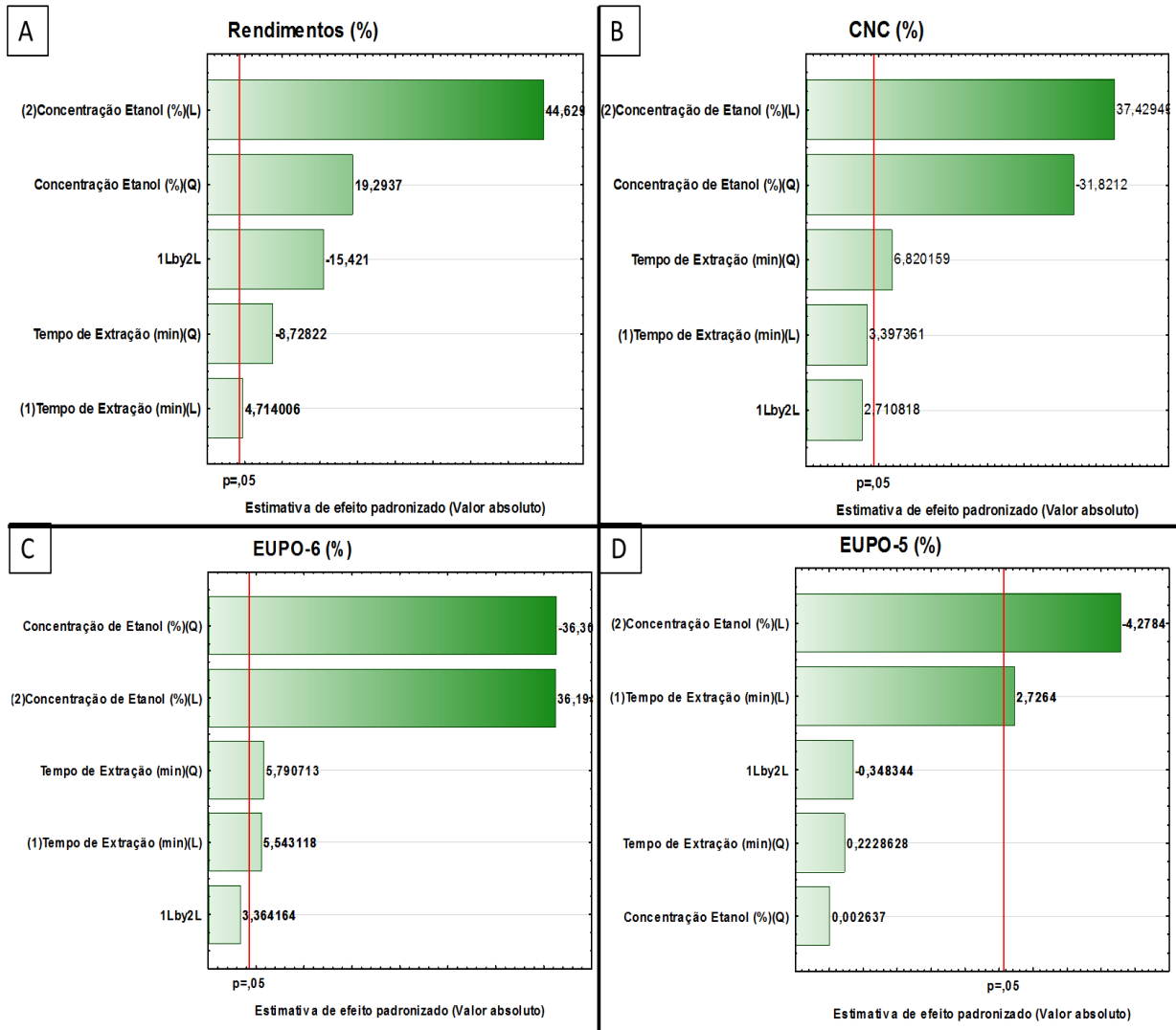
Legenda: Q = quadrático; L = linear; SQ – Soma dos Quadrados; GL – Graus de Liberdade; QM – Quadrado Médio.

Tabela 22 – Modelos gerados por regressão linear múltipla para as variáveis dependentes: rendimento de extrato, teor de eupomatenóide-6, eupomatenóide-5 e conocarpano em função dos fatores: tipo de solvente e tempo de extração.

Equação	Modelo Gerado	Coefficiente de correlação (r^2)
1	$\text{Redimento (\%)} = 1,79 + 0,22 \times 0,0025 \times X1^2 + 0,011 \times X2 + 0,00074 \times X2^2 - 0,0012 \times X1 \times X2$	0,937
2	$\text{CNC (\%)} = 0,13 - 0,0018 \times X1 + 0,000033 \times X1^2 + 0,021 \times X2 + 0,00074 \times X2^2 + 0,02 \times X2 - 0,035 \times X2^2 + 0,00016 \times X1 \times X2$	0,941
3	$\text{EUP - 6 (\%)} = 0,55 - 0,013 \times X1 + 0,00022 \times X1^2 + 0,015 \times X2 - 0,00012 \times X2^2 + 0,00030 \times X1 \times X2$	0,914
4	$\text{EUP - 5 (\%)} = 2,66 - 0,14 \times X1 + 0,00024 \times X1^2 - 0,53 \times X2 + 0,00063 \times X2^2 + 0,0044 \times X1 \times X2$	0,838

Legenda: CNC= conocarpano; EUP-6= eupomatenóide-6; EUP-5= eupomatenóide-5; $X1$ = tempo de extração; $X2$ = tipo de solvente.

Figura 17(A-D) – Gráficos de Pareto gerados a partir dos efeitos dos fatores variáveis dependentes sobre as variáveis independentes.

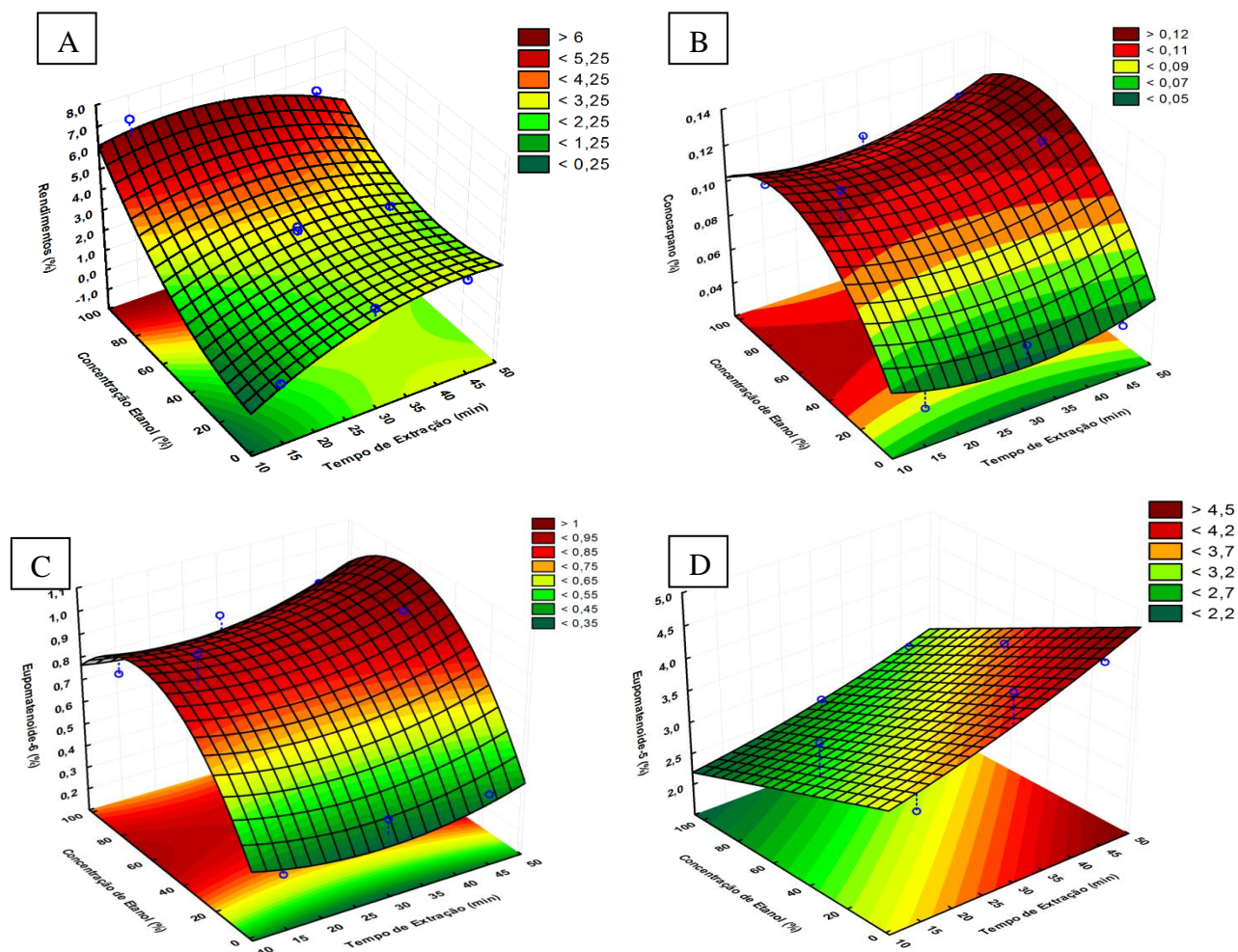


Legenda: CNC = conocarpano; EUPO-5 = eupomatenóide-5; EUPO-6 = eupomatenóide-6; Q = quadrático; L = linear.

O tempo de extração e a concentração de etanol foram críticos para o rendimento do extrato. Com esses parâmetros, o modelo fornece resultados de rendimentos inferiores ao adequado. Os dados demonstram que a solução extrativa contendo concentração de **100% de etanol** e tempo de extração de **30 min** fornece os melhores rendimentos de extrato. As neolignanas CNC e EUP-6 apresentam comportamento similares, de forma que foram obtidos maiores teores com solução extrativa com **50% de etanol e 50% n-hexano** com maior aproveitamento no tempo de extração de **45 min**. Já a variável dependente EUP-5 apresentou

comportamento diferente, no qual o maior rendimento em teor percentual no extrato foi obtido no tempo de **45 min** em com solução extrativa de **100% de *n*-hexano**.

Figura 18 – Gráficos de superfície de resposta para o **A)** rendimento de extrato, **B)** teor de conocarpano **C)** teor de eupomatenoide-6 e **D)** teor de eupomatenoide-5, obtidos a partir da extrações de folhas de *Pipe rivinoides* Kunth.



De acordo com os gráficos da Figura 18, a elevação da concentração do solvente etanol resulta em um aumento no teor do rendimento do extrato. O máximo de extração se deu na faixa de tempo entre 25 e 35 min, ocorrendo uma diminuição do rendimento no tempo máximo de 45 min. As substâncias CNC e EUP-6 demonstraram comportamento similares, de forma que foram obtidos maiores teores na concentração de 50% de etanol e 50% *n*-hexano com maior aproveitamento no tempo de 45 min. Já a variável dependente EUP-5 apresentou comportamento diferente, com maior rendimento em teor percentual no tempo de 45 min de

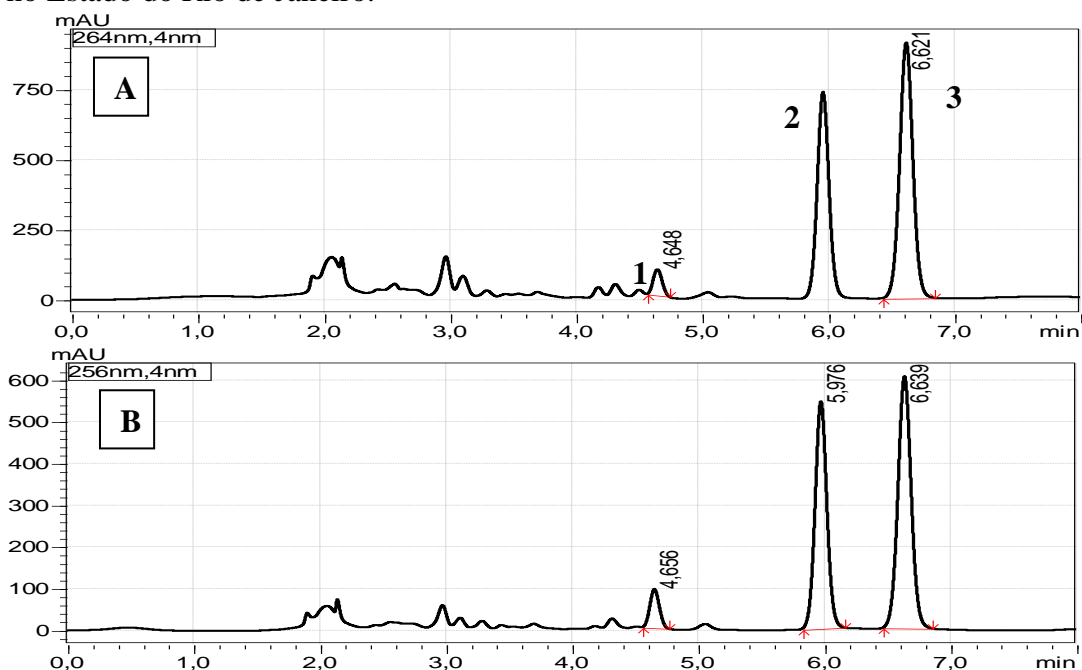
extração em uma solução com 100% de *n*-hexano. Esses dados estão em total acordo com os dados demonstrados nos gráficos de Pareto. Dessa forma, estabeleceu-se como melhores parâmetros para extração das neolignanas solução extrativa composta por **etanol 100%** no tempo de **30 min** (maior rendimento de extrato), ainda que essa concentração de etanol possa significar redução no teor de EUP-5.

4.4 Quantificação de neolignanas em extratos de *P. rivinoides* Kunth

4.4.1 Perfil cromatográfico dos extratos brutos

Os cromatogramas (264 e 256nm) dos extratos etanólicos brutos, em eluição por método isocrático de análise, de ambas as regiões de coleta (Figura 19) apresentam perfil bastante similares (Figura 19), com 2 sinais majoritários nos tR de 6,04 e 6,70 min que representam as neolignanas EUP-6 e EUP-5, respectivamente. Ainda foram observados outros sinais minoritários, com destaque para o tR 4,69 min que corresponde ao CNC.

Figura 19: Cromatograma de extratos etanólicos brutos de *Piper rivinoides* Kunth de dois locais de coleta no Estado do Rio de Janeiro.



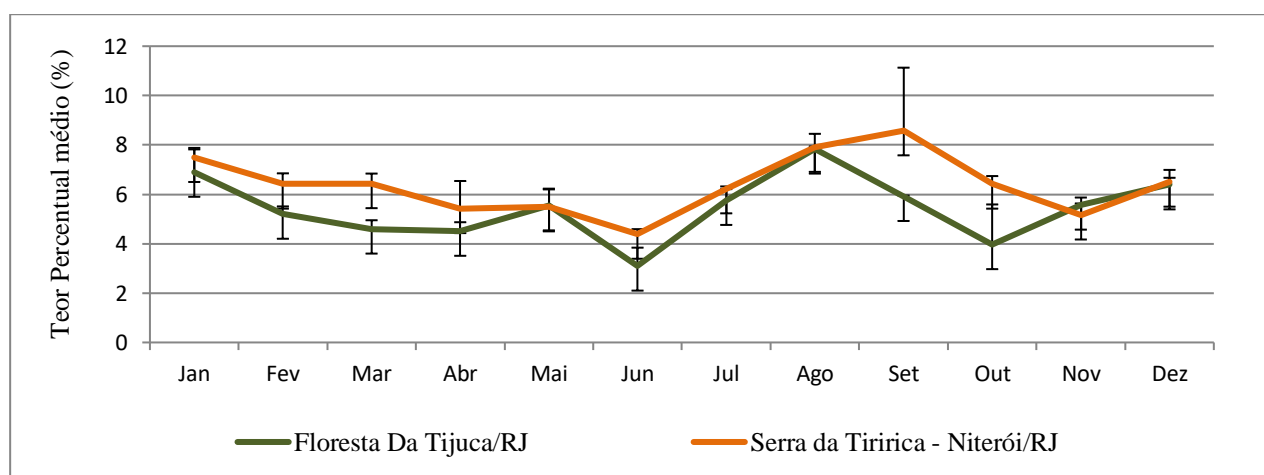
Legenda: **A)** Amostra coletada na Floresta da Tijuca/RJ; **B)** Amostra coletada na Serra da Tiririca-Niterói/RJ. 1 = conocarpano; 2 = eupomatenoide-6; 3 = eupomatenoide-5.

4.4.2 Quantificação sazonal dos extratos e das neolignanais

Os rendimentos dos extratos alcoólicos brutos obtidos a partir das folhas de *P. rivinoides* durante os dozes meses de coleta são apresentados na Figura 20.

Com relação à quantificação das neolignanais, é relevante destacar que, nos cromatogramas, a área conferida ao sinal é um parâmetro que pode indicar a concentração relativa de determinado analito em uma amostra, sendo este proporcional à quantidade do analito que passa pelo detector do cromatógrafo. Sendo assim é possível a quantificação do analito. De posse das curvas analíticas obtidas para cada neolignana, calculou-se o teor percentual nos extratos brutos alcoólicos. As Tabelas 23 e 24 apresentam a variação mensal média das porcentagens das áreas de CNC, EUP-5 e EUP-6 nos extratos dos acessos da Serra da Tiririca-Niterói/RJ e da Floresta da Tijuca/RJ, respectivamente. Para uma melhor visualização da distribuição sazonal do teor das neolignanais nos extratos brutos de ambos os acessos, é exibido também gráficos de barras (Figura 22 e 23). Em todos os cromatogramas obtidos nesse estudo houve a presença dos metabólitos EUP-5 e EUP-6 como sinais majoritários.

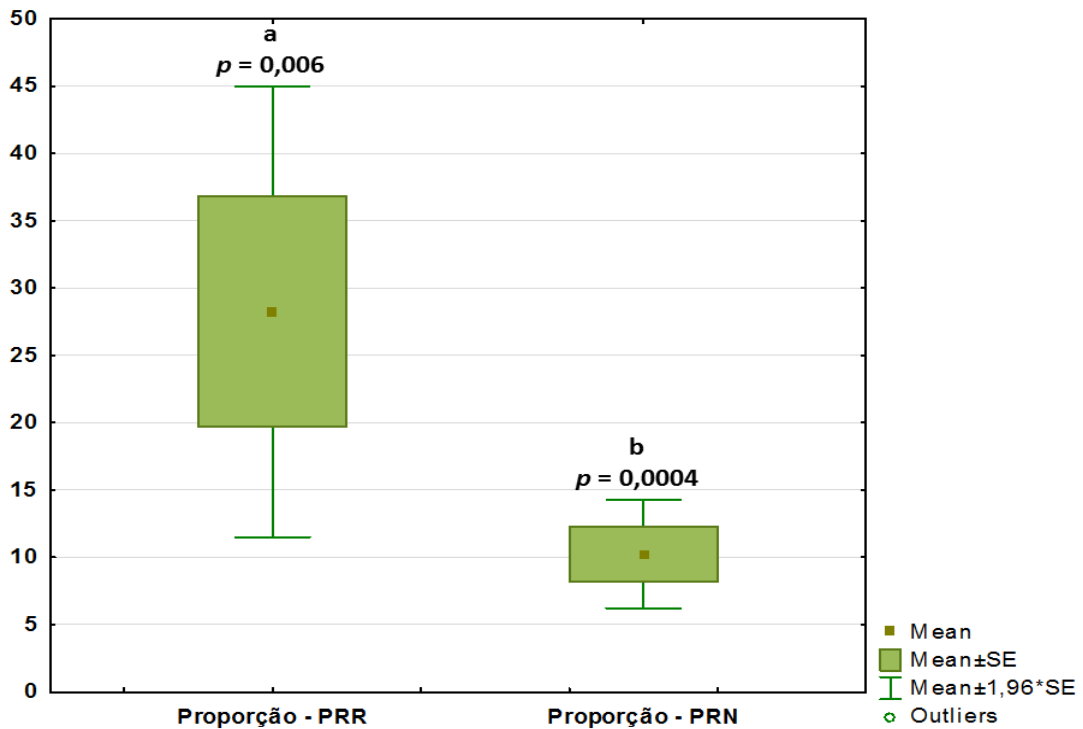
Figura 20 – Comparações das variações dos rendimentos (%) dos extratos alcoólicos brutos de amostras de *Piper rivinoides* Kunth coletadas nos acessos da Floresta da Tijuca/RJ e Serra da Tiririca-Niterói/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2019.



Em geral, as neolignanais demonstraram a mesma proporção entre elas (eupomatenoides/conocarpano) em todos os extratos de amostras de ambos os locais. No entanto houve variação significativa no teor das neolignanais nas duas áreas de estudo (Figura 21). O maior teor percentual

foi observado para EUP-5, seguido do EUP-6 e em uma concentração bem menor, tem-se o CNC(Tabelas 23 e 24).

Figura 21 - Gráfico do tipo *box plot* de representação das variações das proporções entre os eupomatenoides e conocarpano obtidos de extratos alcoólicos de *Piper rivinoides* Kunth dos acessos da Floresta da Tijuca/RJ (PRR) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN).



Legenda: a caixa em verde representa a média, e o risco representa o desvio padrão.

Tabela 23 – Variação mensal média e variação por estação para o ano de 2019 dos teores percentuais para conocarpano, eupomatenoide-6 e eupomatenoide-5 nos extratos de *Piper rivinoides* Kunth do acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ.

Época da coleta	Teor Percentual (%)			Proporção (Eup-6+Eup-5)/CNC
	conocarpano	eupomatenoide-6	eupomatenoide-5	
<i>Janeiro</i>	0,09 ± 0,01^a	0,78 ± 0,03^a	2,58 ± 0,04	29,45#
<i>Fevereiro</i>	0,29 ± 0,01	1,24 ± 0,03	3,30 ± 0,02	12,62
<i>Março</i>	0,70 ± 0,01	1,41 ± 0,04	3,22 ± 0,02	6,01
<i>Abril</i>	0,64 ± 0,02	1,31 ± 0,04	3,28 ± 0,02	6,44
<i>Mai</i>	1,21 ± 0,02	2,42 ± 0,04	5,53 ± 0,04	6,99
<i>Junho</i>	0,53 ± 0,01	1,45 ± 0,05	3,37 ± 0,04	7,81
<i>Julho</i>	1,43 ± 0,01^b	2,65 ± 0,01^b	6,73 ± 0,04^b	7,36
<i>Agosto</i>	1,27 ± 0,04	2,52 ± 0,03	6,13 ± 0,03	7,35
<i>Setembro</i>	1,23 ± 0,02	2,45 ± 0,04	5,50 ± 0,03	6,92
<i>Outubro</i>	0,90 ± 0,30	2,13 ± 0,01	4,78 ± 0,03	7,44
<i>Novembro</i>	0,18 ± 0,01	1,25 ± 0,04	3,18 ± 0,03	18,92
<i>Dezembro</i>	0,49 ± 0,01	1,08 ± 0,03	2,29 ± 0,04^a	5,75*
<i>Verão</i>	0,37 ± 0,31	1,15 ± 0,33	3,04 ± 0,40	9,37
<i>Outono</i>	0,79 ± 0,37	1,73 ± 0,60	4,06 ± 1,27	6,87
<i>Inverno</i>	1,31 ± 0,01	2,54 ± 0,10	6,12 ± 0,62	7,21
<i>Primavera</i>	0,53 ± 0,36	1,49 ± 0,56	3,42 ± 1,26	7,94

Legenda: valores em negrito correspondem ao menor (a) e ao maior teor percentual (b)

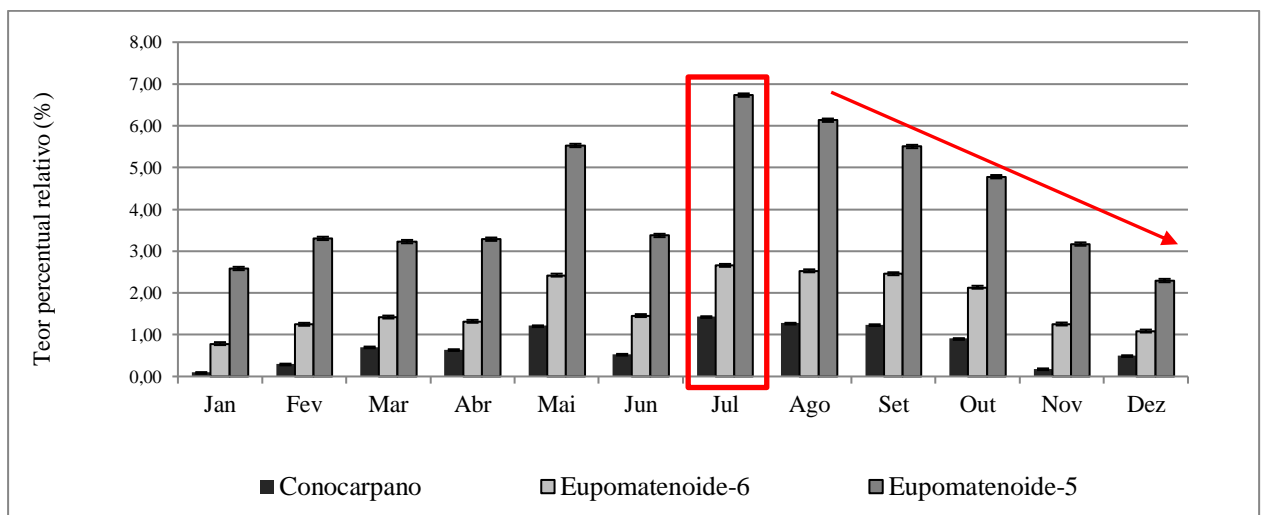
Tabela 24– Variação mensal média e variação por estação para o ano de 2019 dos teores percentuais para conocarpano, eupomatenoide-6 e eupomatenoide-5, nos extratos de *Piper rivinoides* Kunth do acesso da Floresta da Tijuca/RJ.

Época da coleta	Teor Percentual Relativo (%)			(Eup-6+Eup-5)/CNC
	conocarpano	eupomatenoide-6	eupomatenoide-5	
<i>Janeiro</i>	0,10 ± 0,02	0,76 ± 0,01*	3,84 ± 0,04	39,16
<i>Fevereiro</i>	0,03 ± 0,01*	0,84 ± 0,09	3,34 ± 0,03	112,17#
<i>Março</i>	1,03 ± 0,01#	2,19 ± 0,01	5,35 ± 0,03#	7,38*
<i>Abril</i>	0,14 ± 0,01	1,39 ± 0,02	3,87 ± 0,04	29,03
<i>Mai</i>	0,21 ± 0,01	2,25 ± 0,02#	3,87 ± 0,04	20,68
<i>Junho</i>	0,06 ± 0,00	0,49 ± 0,01	1,67 ± 0,03*	28,32
<i>Julho</i>	0,28 ± 0,01	1,09 ± 0,02	3,40 ± 0,01	13,23
<i>Agosto</i>	0,70 ± 0,00	1,84 ± 0,02	4,55 ± 0,03	8,34
<i>Setembro</i>	0,45 ± 0,01	2,14 ± 0,03	5,33 ± 0,01	13,98
<i>Outubro</i>	0,71 ± 0,01	2,00 ± 0,05	4,73 ± 0,02	8,66
<i>Novembro</i>	0,10 ± 0,02	1,25 ± 0,01	4,73 ± 0,02	48,55
<i>Dezembro</i>	0,69 ± 0,01	2,20 ± 0,01	5,08 ± 0,00	9,56
<i>Verão</i>	0,39 ± 0,56	1,26 ± 0,80	4,18 ± 1,05	11,98
<i>Outono</i>	0,14 ± 0,07	1,37 ± 0,88	3,14 ± 1,27	23,80
<i>Inverno</i>	0,47 ± 0,21	1,69 ± 0,54	4,43 ± 0,48	11,12
<i>Primavera</i>	0,50 ± 0,35	1,81 ± 0,50	4,61 ± 0,54	11,03

Legenda: valores em negrito correspondem ao menor* e ao maior teor percentual#.

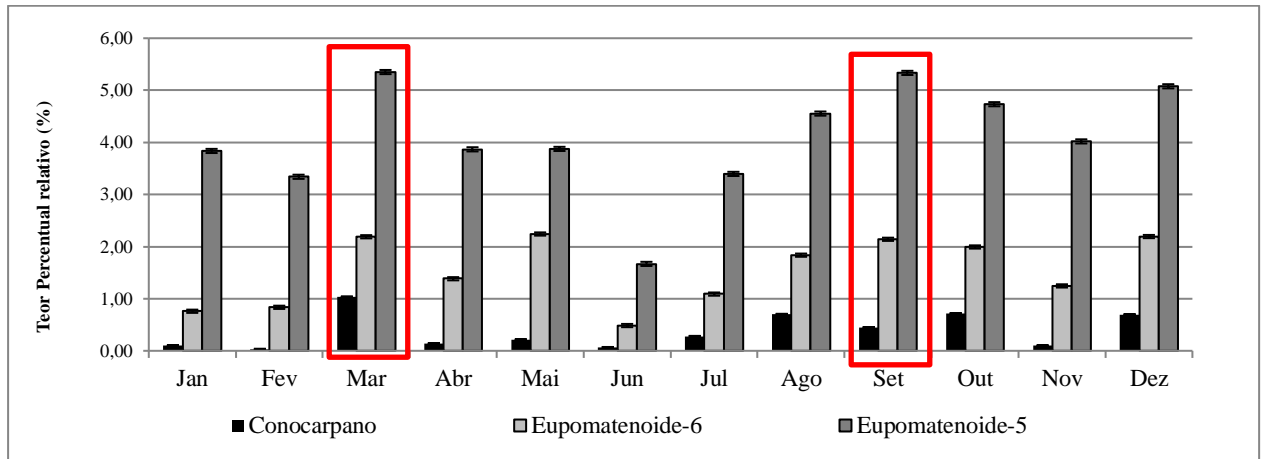
O perfil de distribuição das neolignanas foi diferente entre as amostras dos dois sítios de coleta. O indivíduo de Niterói/RJ registrou menores teores percentuais de neolignanas para os meses de dezembro (0,49% CNC; 1,08 % EUP-6 e 2,29% EUP-5), janeiro (0,09% CNC; 0,78% EUP-6 e 2,58% EUP-5), fevereiro (0,29% CNC; 1,24% EUP-6 e 3,30% EUP-5), março (0,70% CNC; 1,41% EUP-6 e 3,22% EUP-5), o que corresponde ao verão; e maiores teores em maio (1,21% CNC; 2,42% EUP-6 e 5,53% EUP-5), julho (1,43% CNC; 2,65% EUP-6 e 6,73% EUP-5), agosto (1,27% CNC; 2,52% EUP-6 e 6,13% EUP-5), setembro (1,23% CNC; 2,45% EUP-6 e 5,50% EUP-5) e outubro (0,795 CNC; 1,73% EUP-6 e 4,06% EUP-5), o que corresponde a parte do inverno e primavera. As três substâncias registraram maiores teores percentuais no mês de julho, inverno (Tabela 23, Figura 22). O exemplar da Floresta da Tijuca/RJ demonstrou perfil diferente, registrando os menores valores para junho (0,06% CNC; 0,49% EUP-6 e 1,67% EUP-5) e teores percentuais mais homogêneos para os outros meses (Tabela 24, Figura 23). Não foi possível registrar apenas um mês no qual as três neolignanas apresentaram o maior teor percentual para essa área de estudo.

Figura 22 – Variação mensal média para o ano de 2019 dos teores percentuais de conocarpano, eupomatenoide-6 e eupomatenoide-5, nos extratos de *P. rivinoides* Kunth do acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ.



Legenda: da esquerda para direita: Destaque para o mês de maior teor percentual para as três neolignanas. Seta indica teor percentual decrescente do eupomatenoide-5.

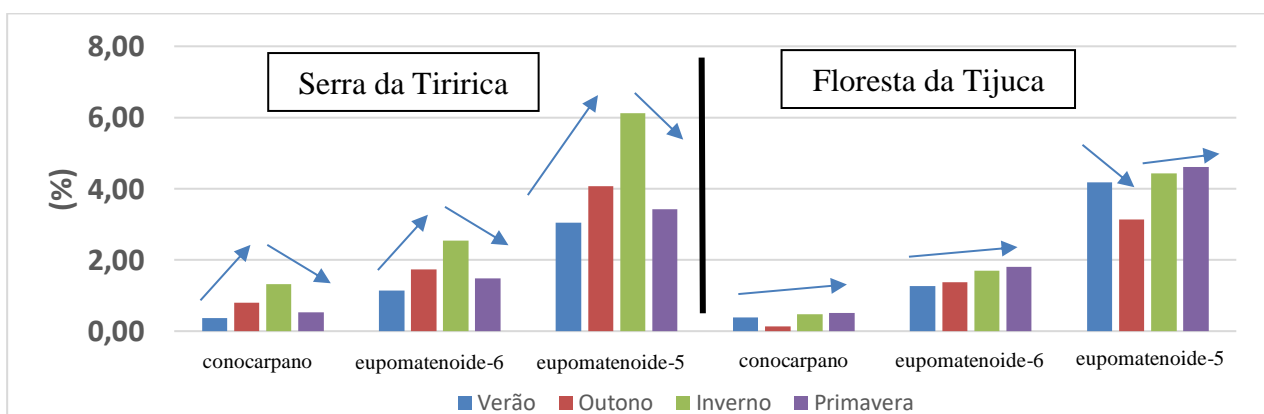
Figura 23– Variação mensal média para o ano de 2019 dos teores percentuais de conocarpano, eupomatenoide-6 e eupomatenoide-5, nos extratos de *P. rivinoides* Kunth do acesso da Floresta da Tijuca/RJ.



Legenda: Destaque para os meses de maior concentração de neolignanas nos extratos.

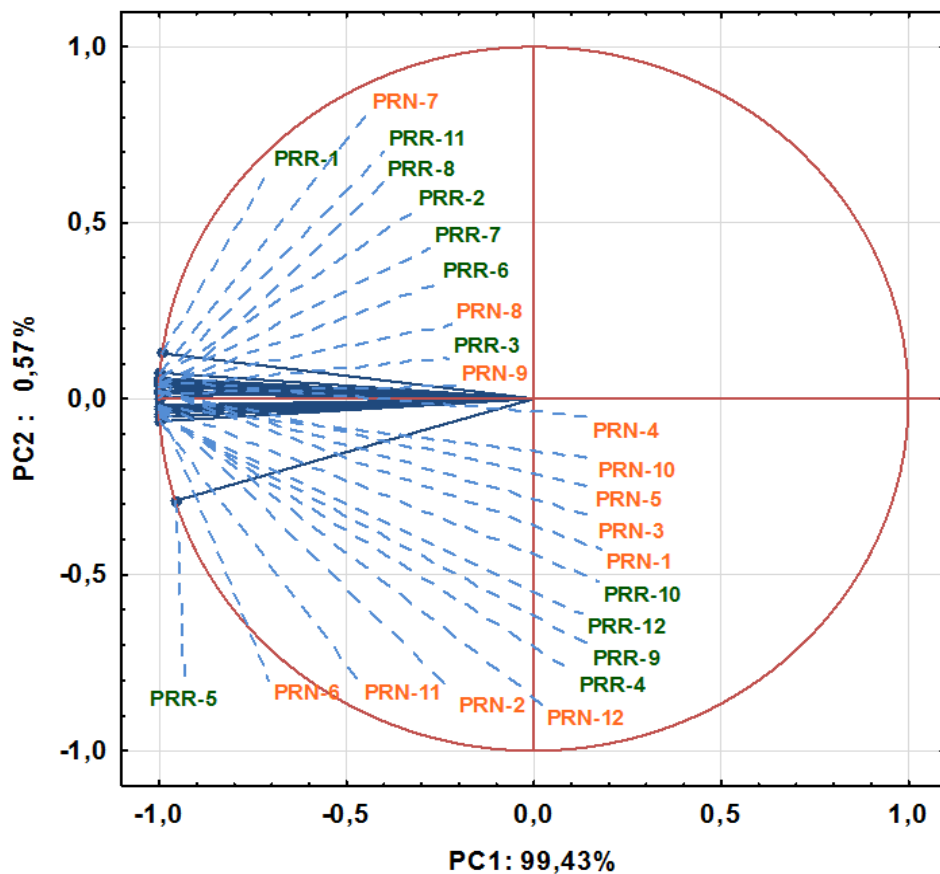
Em relação à estação do ano, é bastante claro que o teor percentual das neolignanas CNC, EUP-6 e EUP-5 foi maior no inverno para o espécime da Serra da Tiririca-Niterói/RJ, inclusive, a variação de teor percentual é menor do que nas outras estações (desvio-padrão em relação à média). Esse fato indica maior homogeneidade na biossíntese dessas neolignanas nos meses que correspondem ao inverno para essa área de estudo. Os teores percentuais de neolignanas CNC, EUP-6 e EUP-5 foram similares em média para todas as estações do ano no espécime da Floresta da Tijuca/RJ, exceto para o CNC que registrou menor teor percentual na estação do outono. A variação do teor percentual das três neolignanas em relação à média nas estações do ano foi bastante alta, o que significa maior oscilação na biossíntese desses metabólitos nos diferentes meses (Tabelas 23 e 24, Figura 24).

Figura 24– Variação das neolignanas em função da estação do ano e das áreas de coleta.



Análises de componente principal (ACP) realizadas para os teores de neolignanas ao longo dos meses e das estações do ano estão demonstradas nas Figuras 25 e 26. Não foi possível separar as duas áreas de estudo pelas análises de ACP. O gráfico de *box plot* que demonstra a faixa de teor percentual médio de CNC, EUP-6 e EUP-5 está representado na Figura 27. Esse gráfico exibe diferenças nos teores percentuais de eupomatenoídeos e conocarpanos em cada área de estudo, porém, não há diferença significativa entre as diferentes áreas.

Figura 25 - Gráfico *score* das 24 variáveis a partir do teor percentual das neolignanas por mês (janeiro a dezembro de 2019), obtidos de extratos alcoólicos de *P. rivinoides* Kunth dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de Janeiro (PRR, verde) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN, vermelho), baseado em análise de componente principal (ACP).



Legenda: números representam meses do ano, começando a partir do 1 para janeiro e terminando em 12 para dezembro.

Figura 26 - Gráfico *score* das 8 variáveis a partir do teor percentual das neolignanas por estação do ano (V = verão; O = outono; I = inverno; P = primavera), obtidos de extratos alcoólico de *P. rivinoideskunth* dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de Janeiro (PRR) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN), baseado em análise de componente principal (ACP).

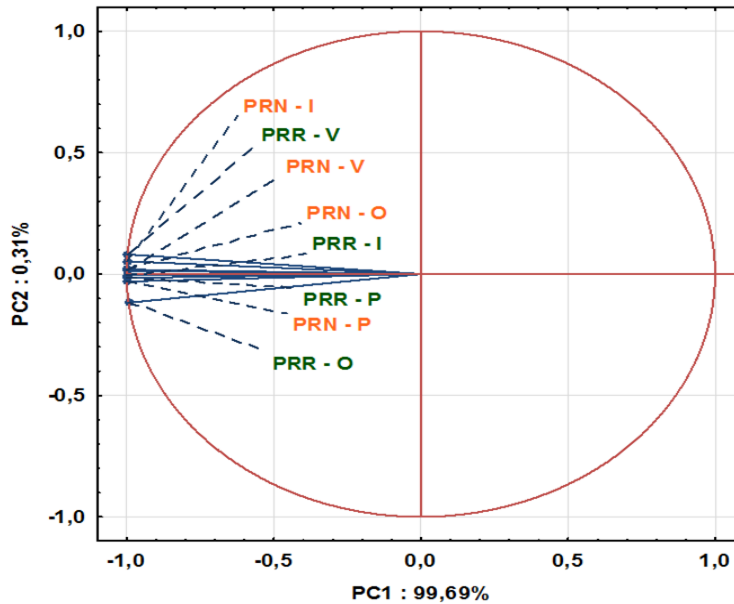
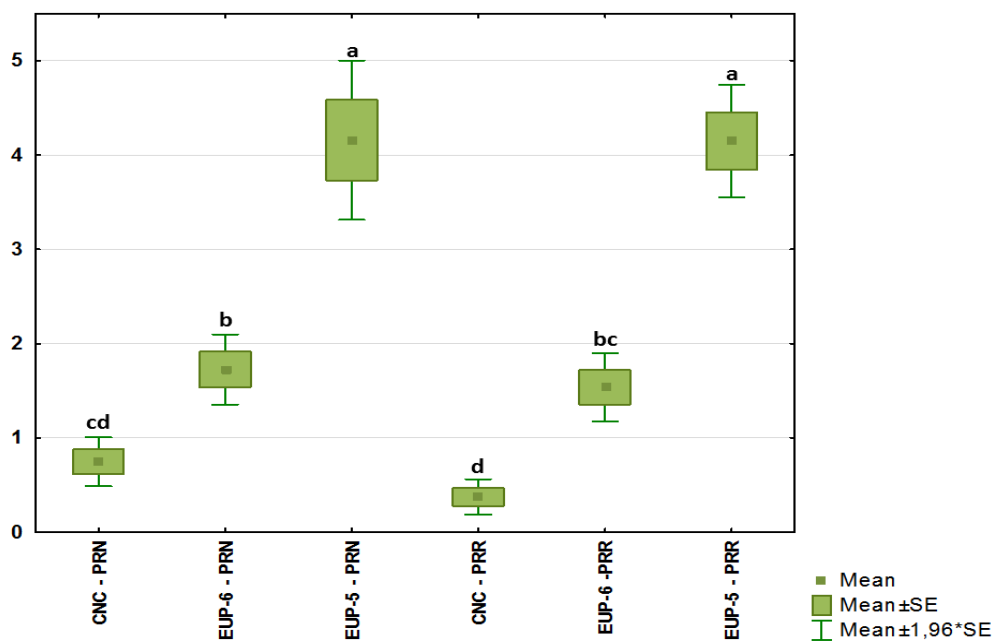


Figura 27 – Gráfico de *box plot* de representação das faixa de teor percentual médio de conocarpano (CNC), eupomatenoide-6 (EUP-6) e eupomatenoide-5 (EUP-5) de folhas de *P. rivinoides* Kunth dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de Janeiro (PRR) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN).



Legenda: letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Análise de agrupamento hierárquico (AAH) foi realizada com a finalidade de observar se existem variações na composição química entre os indivíduos do estudo que permitem algum agrupamento. Os resultados obtidos para as amostras de extratos de *P. rivinoides* coletadas durante os meses de janeiro a dezembro de 2019 na Serra da Tiririca - Niterói e da Floresta da Tijuca são exibidos nas figuras 28 e 29, respectivamente. Para ambas as áreas de estudo, é possível demonstrar pelos dendogramas obtidos a formação de dois *clusters*: um que agrupou os maiores teores de CNC e outro com os maiores teores de EUP-5 e EUP-6.

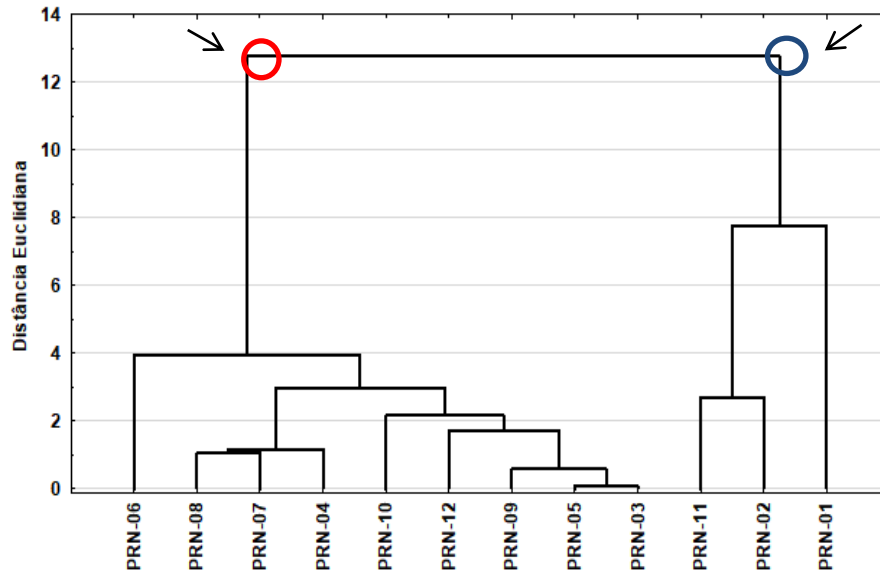
Mesmo em uma análise conduzida a partir dos dados em conjunto de ambos os acessos, o padrão de separação dos *clusters* se manteve idêntico (Figura 30). Pela análise do componente principal (ACP) (Figura 25), em razão das concentrações homogêneas das 3 neolignanas nas amostras, assim como pela baixa variância total, tendo no eixo 1 (99,45 %) e no eixo 2 (0,55 %), é possível afirmar que há uma simetria na distribuição de carga dessas substâncias. Por isso, não existe carga suficiente que seja antagonica para separar a amostra em dois componentes.

As variações intraespecíficas para as amostras da espécie *P. rivinoides* coletadas em diferentes locais não apresentam diferenças significativas para os componentes principais, o que se justifica a partir das análises de correlações de Person, onde existem fortes correlações positivas de dependência entre si para as 3 neolignanas ($r > 0,9$ e $p < 0,05$). Esses dados demonstram uma relação de produção biossintética linear, ou seja, em qualquer ponto de escolha (12 meses estudados), haverá sempre *a mesma proporção das três neolignanas no extrato*.

A Figura 26 apresenta os dados climáticos (precipitação, umidade e temperatura) obtidos para cada região durante o período do estudo. Verifica-se padrão similar entre as duas áreas com relação aos dados climatológicos. As Tabelas 25 e 26 apresentam os resultados referentes às análises de Pearson, que correlacionam o teor percentual encontrado para cada neolignana presente no extrato com fatores ambientais (precipitação, umidade e temperatura) para os indivíduos do acesso de Serra da Tiririca-Niterói/RJ e Floresta da Tijuca/RJ, respectivamente (Figura 31). Correlações entre as neolignanas e a intensidade da radiação, no horário da coleta, também foram realizadas, no entanto estas não se mostraram minimamente dependentes. A correlação de Pearson possibilitou confirmar para a área de estudo Serra da Tiririca – Niterói/RJ que há uma correlação inversamente proporcional entre temperatura e o teor de CNC ($r = -0,7058$), EUP-6 ($r = -0,7545$) e EUP-5 ($r = -0,7079$). Quanto menor a temperatura, maior a biossíntese dessas lignanas. As correlações obtidas para a área de estudo Floresta da Tijuca não demonstraram significância para nenhum dos parâmetros avaliados (precipitação, umidade e temperatura). Este fato pode estar relacionado aos dados climatológicos que foram coletados em estação que fica fora da área de

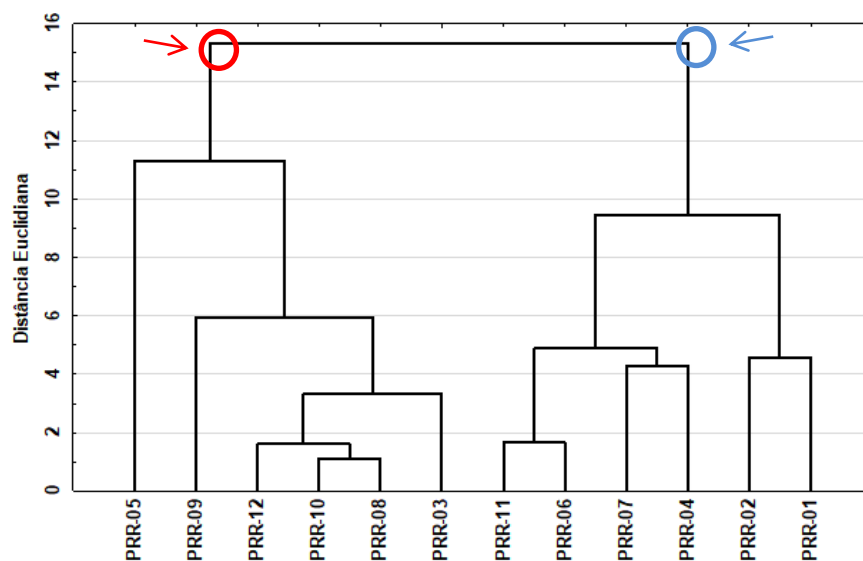
estudo (Copacabana/RJ). Infelizmente, não existe estação de registro climatológico mais próxima à área de coleta.

Figura 28– Dendrograma obtido a partir do teor das neolignanas de 12 amostras (janeiro a dezembro de 2019) de extratos alcoólicos do acesso de *Piper rivinoides* Kunth da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN), baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.



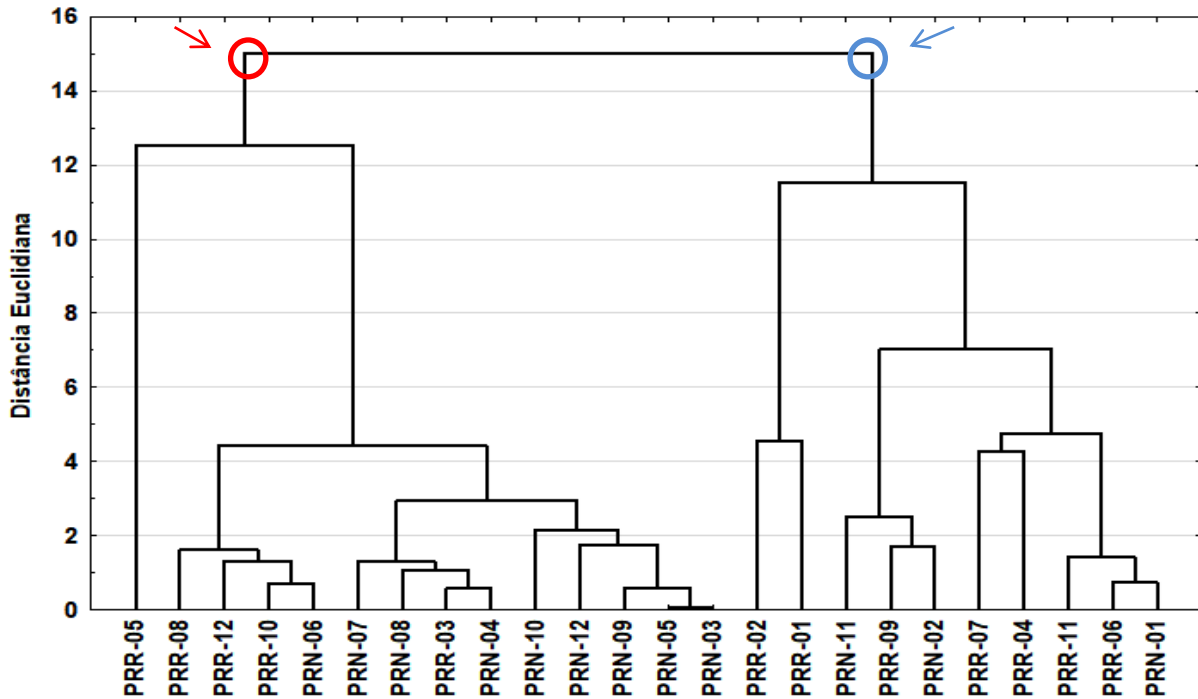
Legenda: cores atribuídas pela predominância em: **vermelho** - de eupomatenoide-5 e eupomatenoide-6; em **azul** predominância de conocarpano.

Figura 29 – Dendrograma obtido a partir do teor das neolignanas de 12 amostras (janeiro a dezembro de 2019) de extratos alcoólicos do acesso de *P. rivinoides* Kunth da Floresta da Tijuca (PRR), baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.



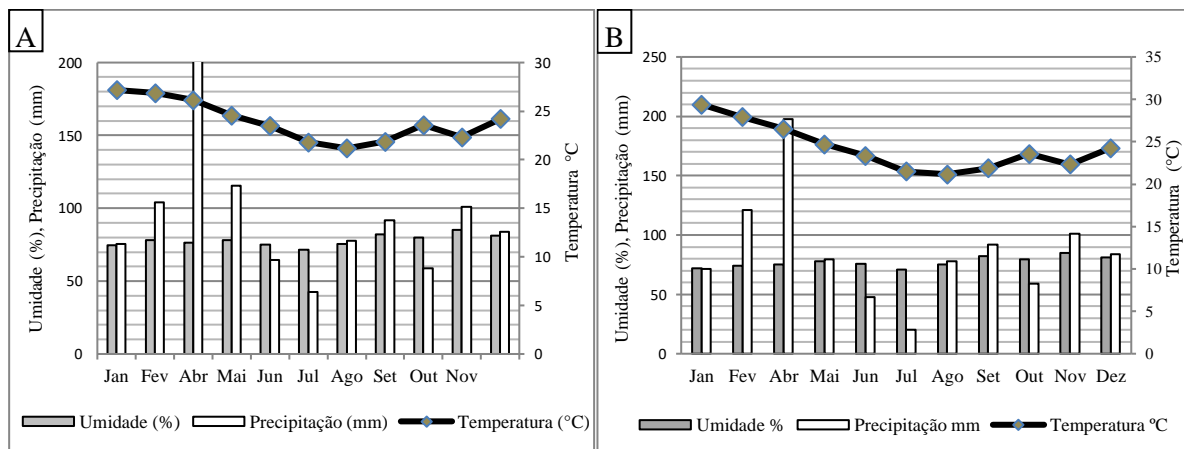
Legenda: cores atribuídas pela predominância em: **vermelho** - de eupomatenoide-5 e eupomatenoide-6; em **azul** predominância de conocarpano.

Figura 30 – Dendrograma obtido a partir do teor das neolignanas de 24 amostras (janeiro a dezembro de 2019) de extratos alcoólicos dos acessos de *Piper rivinoides* Kunth da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN) e da Floresta da Tijuca/RJ (PRR), baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.



Legenda: cores atribuídas pela predominância em: **vermelho** - de eupomatenoide-5 e eupomatenoide-6; em **azul** predominância de conocarpano

Figura 31 – Dados climatológicos referente as regiões correspondente aos pontos de coleta.



Legenda: **A)** Floresta da Tijuca/RJ e **B)** Serra da Tiririca-Niterói/RJ no período de janeiro a dezembro de 2019.

Tabela 25 –Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e teor percentual das neolignanas quantificadas nos extratos do acesso de *Piper rivinoides* Kunth da Serra da Tiririca-Niterói/RJ.

Variáveis analisadas	r^2		
	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
conocarpano	-0,7058*	0,3324	-0,1256
eupomatenóide-6	-0,7545*	0,4408	-0,2015
eupomatenóide-5	-0,7079*	0,3859	-0,2177

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

Tabela 26 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e teor percentual das neolignanas quantificadas no extrato do acesso de *Piper rivinoides* Kunth da Floresta da Tijuca/RJ.

Variáveis analisadas	r^2		
	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
conocarpano	-0,1351	0,1787	0,2726
eupomatenóide-6	-0,1909	0,4619	0,2352
eupomatenóide-5	-0,0583	0,5131	0,2718

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

4.5 Óleos essenciais de *P. rivinoides* Kunth

4.5.1 Rendimentos e composição química

Foram extraídas e analisadas um total de 22 amostras de óleo essencial (OE) de *P. rivinoides* Kunth, Destas 11 referentes ao acesso da Serra da Tiririca-Niterói/ RJ e as outras 11 correspondentes à Floresta da Tijuca/ RJ. Os óleos essenciais das amostras das duas regiões mostraram-se incolores.

As informações sobre a variação sazonal dos OE de ambas as localizações, compreendendo as composições químicas, os rendimentos, os números de substâncias identificadas acima de 1% e as atividades fenológicas estão registrados na Tabela 27.

No OE do espécime coletado no acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ foi possível a identificação de um total de 97 substâncias, sendo o maior número obtido em fevereiro (41) e o menor em janeiro de 2019 (11). Os valores calculados para o rendimento da extração de OE variaram de 0,16 (janeiro) à 1,36 (outubro) (p/p). Com relação ao espécime da Floresta da Tijuca/RJ, 92 substâncias foram identificadas no total, sendo o mês de fevereiro o mais diversificado (38) e o mês de janeiro com menor diversidade (13). Os rendimentos da extração de OE variaram de 0,16 (fevereiro) à 1,18 (outubro) (p/p).

A composição química dos OE das folhas de *P. rivinoides* foi muito semelhante entre os diferentes indivíduos estudados. Ambos os acessos apresentaram-se com uma fração rica em monoterpenos não oxigenados cíclicos e uma fração minoritária de sesquiterpenos, entretanto, algumas substâncias não foram detectadas em todos os indivíduos ocorrendo uma leve variação qualitativa (riqueza) e quantitativa (teor).

As tabelas 27 e 28 reúnem as substâncias identificadas e quantificadas nos OE de *P. rivinoides* da Mata Atlântica do Rio de Janeiro. Na área de coleta da Serra da Tiririca-Niterói/ RJ os monoterpenos majoritários foram identificados como **α -pineno** (34,78 a 53,87%), **β -pineno** (15,24 a 47,71%) e **limoneno** (12,71 a 14,05%). Sesquiterpenos identificados com teor percentual relativo significativo foram **biciclogermacreno** (0,96 a 4,49%), ***E*-cariofileno** (0,41 a 4,28%) e **aromandendreno** (0,03 a 2,38%) (Figuras 32 e 33). Destaca-se o aumento do teor percentual relativo do **β -pineno** nos meses de janeiro (44,30%) e julho (44,39%) e diminuição do teor percentual de limoneno nesses mesmos meses (7,08% e 3,07%, respectivamente). Essa variação não foi observada para o espécime da área de coleta da Floresta da Tijuca/RJ, que, inclusive, apresentou maior uniformidade no teor de α e β -pinenos e variação mais acentuada no teor de limoneno (2,32% em fevereiro a 9,09% em janeiro).

Figura 32 – Estruturas químicas das substâncias majoritárias **α -pineno**, **β -pineno**, **limoneno**, e **biciclogermacreno** (da esquerda para direita), identificadas nos óleos essenciais de *Piper rivinoides* Kunth.

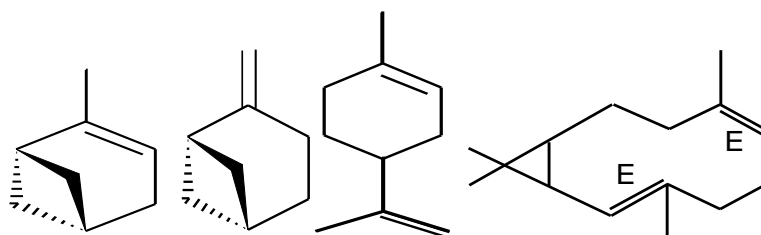
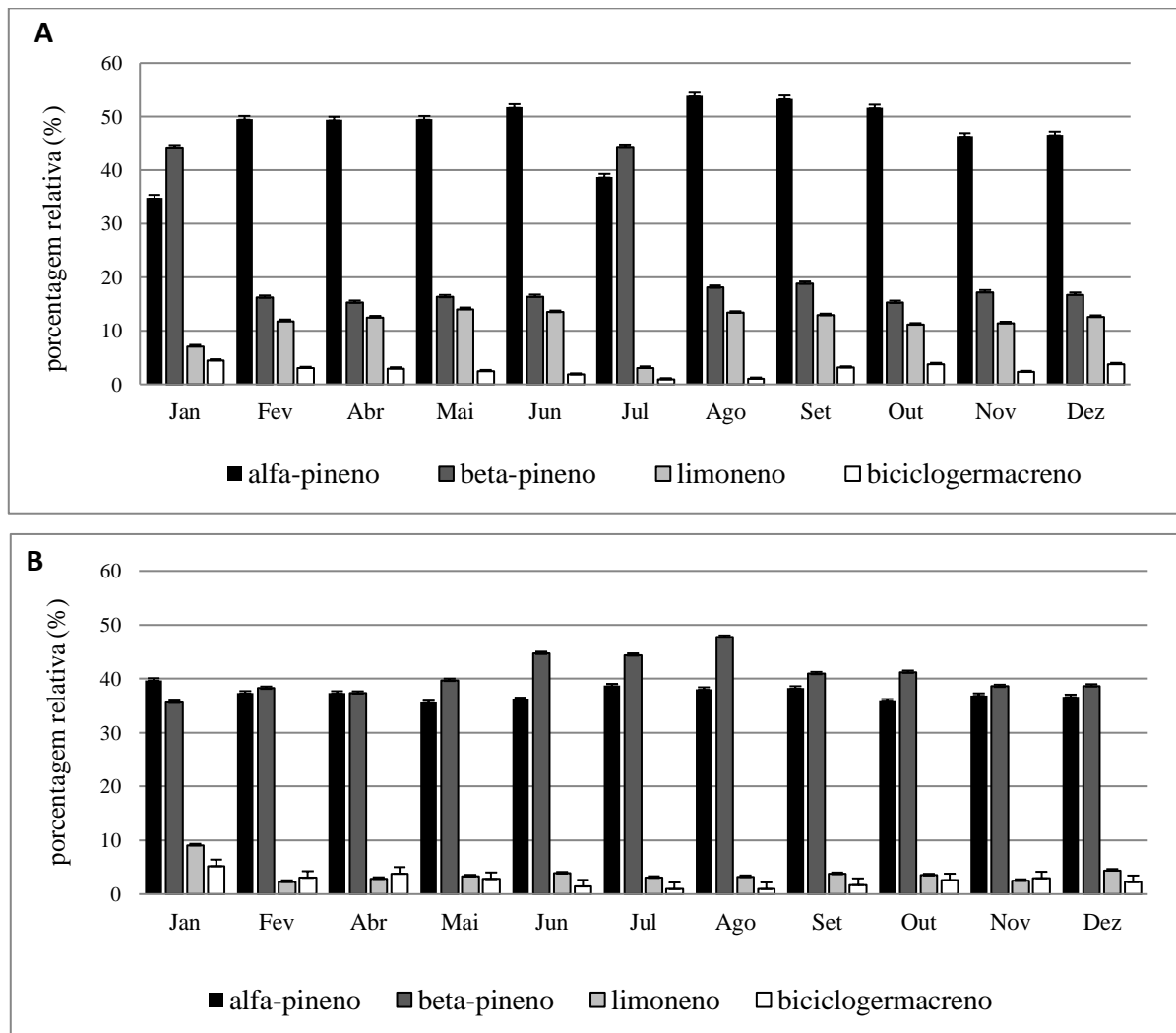


Figura 33 –Variação sazonal das principais substâncias consituíntes dos óleos essenciais de *Piper rivinoides* Kunth, referente ao período de janeiro à dezembro de 2019.



Legenda: **A)** Espécime da Serra da Tiririca-Niterói/RJ; **B)** Espécime da Floresta da Tijuca/RJ.

Tabela 27: Constituição química e dados sobre os óleos essenciais de folhas de *Piper rivinoides* Kunth do acesso de Niterói/ RJ nos meses de janeiro a dezembro de 2019 (conclusão).

Constituintes	IR Lit	IR cal	Porcentagem Relativa (% ± DP)											
			Jan	Fev	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
γ - eudesmol	1630	1634	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Numero de substâncias identificadas			11	41	37	27	29	24	17	20	16	21	14	
Total de substâncias quantificadas			98,74	98,59	97,22	97,56	98,92	97,58	96,32	97,26	98,59	96,08	96,66	
Rendimento de OE % (p/p)			0,16	0,19	0,16	0,24	0,26	0,63	0,77	0,56	1,36	0,98	1,16	
Atividade Fenológica	<i>Fase vegetativo</i>		X	X	X	X	X					X	X	
	<i>Fase reprodutiva</i>						X	X	X	X	X			
Estação do Ano			Verão	Verão	Outono	Outono	Outono	Inverno	Inverno	Inverno	Primavera	Primavera	Primavera	

Legenda:IRlit – Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007;2017); IRcalc -Índices de retenção calculados(variação).

*O teor está em média (%) ± desvio padrão (SD).

Áreas hachuradas em amarelo evidenciam o estado de fase reprodutiva; Áreas hachuradas em azul evidenciam substâncias com teores percentuais relativos (%) relevantes para o estudo.

Tabela 28: Constituição química e dados sobre os óleos essenciais de folhas do acesso de *Piper rivinoides* Kunthda Floresta da Tijuca/ RJ nos meses de janeiro a dezembro de 2019 (continua).

Constituintes	IR Lit	IR cal	Porcentagem Relativa (% ± DP)										
			Jan	Fev	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Monoterpenos Hidrocarbonetos			84,7	81,28	81,26	83,08	90,58	93,08	93,27	89,78	84,9	83,09	85,55
α-tujeno	924	926	-	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	-	0,28 ± 0,07	0,03 ± 0,02	0,12 ± 0,05	-	0,24 ± 0,10	-	-
α-pineno	932	933	39,74±0,16	37,35±0,13	37,33±0,22	35,57 0,02	36,13±0,06	38,70±0,22	38,06 ±0,01	38,26±0,24	35,86±0,21	36,93±0,35	36,7±0,19
canfeno	946	945	1,01 ± 0,01	0,35 ± 0,30	1,03 ± 0,05	1,27 0,03	1,41 ± 0,03	1,01 ± 0,04	1,03 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,64 ± 0,06	2,18 ± 0,02
sabineno	969	970	0,17 ± 0,01	-	0,18 ± 0,13	0,32 0,03	0,53 ± 0,03	0,92 ± 0,06	0,15 ± 0,13	0,98 ± 0,08	0,21 ± 11	0,08 ± 0,01	0,67 ± 0,06
β-pineno	974	975	35,61±0,32	38,23±0,03	37,34±0,22	39,69±0,24	44,70±0,10	44,39±0,14	47,71±0,14	40,95±0,23	41,20±0,27	38,58±0,11	38,67±0,03
mirreno	988	990	1,78 ± 0,08	2,06 ± 0,02	1,93 ± 0,03	2,05 ± 0,11	2,62 ± 0,08	2,78 ± 0,02	2,35 ± 0,12	1,99 ± 0,02	2,46 ± 0,06	2,40 ± 0,18	1,87 ± 0,03
α-felandreno	1002	1002	-	0,18 ± 0,02	-	0,31 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,17 ± 0,01	-	-	-	0,21 ± 0,02	0,88 ± 1,15
δ-3-careno	1008	1010	-	0,11 ± 0,15	0,25 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
α-terpineno	1014	1015	-	0,10 ± 0,01	-	0,14 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,01	-	2,78 ± 0,6	-	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,02
ρ- cimeno	1020	1022	-	0,13 ± 0,05	-	-	0,32 ± 0,02	0,28 ± 0,02	-	0,43 ± 0,14	-	0,23 ± 0,24	-
limoneno	1024	1024	9,09 ± 0,04	2,32 ± 0,01	2,88 ± 0,06	3,33 ± 0,08	3,87 ± 0,05	3,07 ± 0,07	3,22 ± 0,05	3,76 ± 0,07	3,52 ± 0,04	2,51 ± 0,01	4,41±0,03
β-felandreno	1025	1026	-	-	-	-	-	0,24 ± 0,01	-	0,25 ± 0,02	-	0,93 ± 0,01	-
β-ocimeno (Z)	1032	1029	-	0,05 ± 0,02	0,25 ± 0,19	-	-	-	0,63 ± 0,02	-	0,47 ± 0,01	-	-
γ-terpineno	1054	1059	-	-	0,02 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,02	-	0,17 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,03±0,01
terpinoleno	1086	1088	-	0,35 ± 0,05	-	0,12 ± 0,01	-	0,30 ± 0,02	-	0,11 ± 0,01	-	-	-
Monoterpenos Oxigenados			0	1,61	1,28	1,75	1,54	1,54	1,05	0	0	2,55	1,98
linalool	1095	1096	-	0,93 ± 0,05	0,97 ± 0,02	1,11 ± 0,09	1,18 ± 0,02	1,14 ± 0,12	1,05 ± 0,01	-	-	2,55 ± 0,07	1,72±0,02
borneol	1165	1170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
terpinen-4-ol	1174	1172	-	0,32 ± 0,15	-	0,24 ± 0,04	0,17 ± 0,02	-	-	-	-	-	0,13±0,01
α-terpineol	1186	1188	-	0,22 ± 0,09	0,17 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,07 ± 0,05	0,25 ± 0,01	-	-	-	-	0,10±0,02
E-anetol	1282	1280	-	0,14 ± 0,25	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,01	-	-	-	-	-
acetato de <i>t</i> -sabinol	1289	1296	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos			9,99	11,35	13,06	10,57	4,92	2,83	3,8	7,47	8,36	11,32	9,4
δ-elemeno	1335	1335	0,98 ± 0,34	2,41 ± 0,18	2,20 ± 0,02	1,49 ± 0,26	1,17 ± 0,03	0,20 ± 0,01	-	2,67 ± 0,07	2,85 ± 0,09	0,39 ± 0,44	0,99 ± 0,03
δ-elemeno	1339	1401	-	0,03 ± 0,01	-	-	0,09 ± 0,01	-	-	-	-	-	1,13 ± 0,02

Tabela 28: Constituição química e dados sobre os óleos essenciais de folhas de *Piper rivinoides* Kunthdo acesso da Floresta da Tijuca/ RJ nos meses de janeiro a dezembro de 2019 (continuação).

Constituintes	IR Lit	IR cal	Porcentagem Relativa (% ± DP)											
			Jan	Fev	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
α -gurjuneno	1409	1416	-	0,41 ± 0,02	-	0,05 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E</i> -carifileno	1417	1420	0,99±0,07	2,03 ± 0,02	2,89 ± 0,01	2,87 ± 0,24	1,51 ± 0,02	0,82 ± 0,02	0,81 ± 0,10	2,12 ± 0,05	2,40 ± 0,05	4,28 ± 0,16	3,85 ± 0,15	
β - cedreno	1419	1023	-	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	
β - duprezianeno	1421	1426	-	0,11 ± 0,09	0,06 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	
aromadendreno	1439	1440	2,22±0,01	1,62 ± 0,04	2,38 ± 0,05	2,33 ± 0,12	0,70 ± 0,10	0,53 ± 0,03	2,02 ± 0,04	0,81 ± 0,06	0,86 ± 0,03	2,84 ± 0,19	1,18 ± 0,04	
β -barbateno	1440	1440	-	-	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	-	
α - humuleno	1452	1455	-	0,16 ± 0,05	0,36 ± 0,47	0,20 ± 0,26	-	-	-	-	-	-	-	
<i>allo</i> - aromadendreno	1458	1460	0,59±0,03	0,02 ± 0,05	-	0,27 ± 0,06	-	0,32 ± 0,01	-	0,15 ± 0,02	0,43 ± 0,32	0,63 ± 0,03	-	
γ - gurjuneno	1475	1485	-	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	
γ - muuroleno	1478	1486	-	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	
δ -selineno	1492	1495	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
biciclogermacreno	1500	1506	5,21±0,04	3,06 ± 0,03	3,82 ± 0,02	2,82 ± 0,15	1,45 ± 0,13	0,96 ± 0,05	0,97 ± 0,01	1,72 ± 0,02	2,60 ± 0,16	2,96 ± 0,02	2,25 ± 1,20	
β - bisaboleno	1505	1508	-	0,42 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01	-	-	-	-	-	0,13 ± 0,01	-	
δ - amorpheno	1511	1514	-	0,71 ± 0,01	-	0,20 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	
β - curcumeno	1514	1419	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7- <i>epi</i> - α -selineno	1520	1525	-	-	0,77 ± 0,57	0,11 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	-	
δ - cadineno	1522	1528	-	0,15 ± 0,21	-	-	-	-	-	-	-	0,09 ± 0,01	-	
<i>E</i> - γ -bisaboleno	1528	1533	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sesquiterpenos Oxigenados			1,91	2,98	2,99	3,14	1,14	2,35	1,09	1,39	2,8	1,76	1,67	
espatulenol	1577	1582	0,65±0,09	1,10 ± 0,05	1,34 ± 0,01	1,05 ± 0,08	1,14 ± 0,03	0,96 ± 0,05	0,44 ± 0,01	0,63 ± 0,04	1,55 ± 0,32	0,81 ± 0,05	1,67 ± 0,02	
viridiflorol	1592	1595	1,26±0,07	1,60 ± 0,16	1,48 ± 0,01	1,53 ± 0,30	-	1,05 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,76 ± 0,04	1,25 ± 0,07	0,87 ± 0,05	-	
carotol	1594	1598	-	0,03 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,01	-	-	-	-	-	0,08 ± 0,01	-	
rosifoliol	1600	1605	-	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,03	-	-	-	-	-	-	-	
β -atlantol	1608	1614	-	0,10 ± 0,01	-	-	-	0,34 ± 0,05	-	-	-	-	-	
10- <i>epi</i> - γ -eudesmol	1622	1628	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627	1631	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
γ - eudesmol	1630	1634	-	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,3 ± 0,03	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 28: Constituição química e dados sobre os óleos essenciais de folhas de *Piper rivinoides* Kunthdo acesso da Floresta da Tijuca/ RJ nos meses de janeiro a dezembro de 2019 (conclusão).

	<i>Jan</i>	<i>Fev</i>	<i>Abr</i>	<i>Mai</i>	<i>Jun</i>	<i>Jul</i>	<i>Ago</i>	<i>Set</i>	<i>Out</i>	<i>Nov</i>	<i>Dez</i>	
Numero de substâncias identificadas	13	38	30	30	21	24	14	18	16	22	18	
Total de substâncias quantificadas	96,6	97,22	98,59	98,54	98,18	99,8	99,21	98,64	96,06	98,72	98,6	
Rendimento OE %	0,17	0,16	0,19	0,48	0,31	0,55	0,72	0,66	1,18	0,87	1,15	
Atividade Fenológica	<i>Fase vegetativo</i>	X	X	X	X	X					X	X
	<i>Fase reprodutiva</i>						X	X	X	X		
Estação do Ano	Verão	Verão	Outono	Outono	Outono	Inverno	Inverno	Inverno	Primavera	Primavera	Primavera	

Legenda:IRlit – Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007;2017); IRcalc -Índices de retenção calculados(variação).

*O teor está em média (%) ± desvio padrão (SD).

Áreas hachuradas em amarelo evidenciam o estado de fase reprodutiva; Áreas hachuradas em azul evidenciam substâncias com teores percentuais relativos (%) relevantes para o estudo.

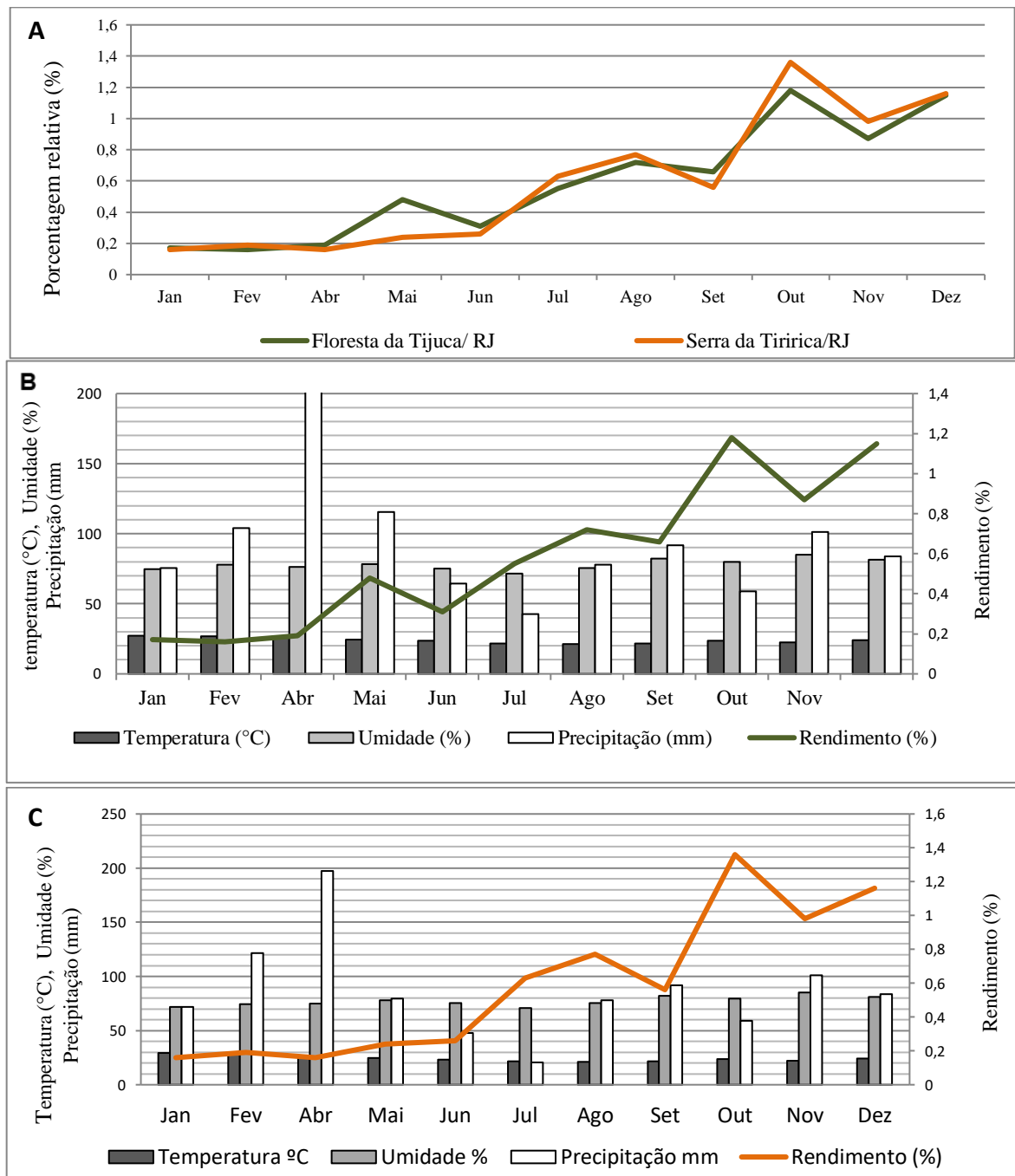
Os dados correspondentes à normal climatológica dos fatores ambientais de precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C) das cidades de Niterói/RJ e Rio de Janeiro/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2019, são apresentados nas Figuras 34A - C. O perfil das médias mensais são muito semelhantes entre os dois locais, embora exista uma pequena diferença na altitude.

A Figura 34A apresenta uma comparação entre os rendimentos dos OE de cada espécime, na qual pode-se observar que os rendimentos mensais nos dois locais de coleta oscilam de forma similar, não sendo observado predominância de um rendimento em relação ao outro. Os maiores rendimentos foram registrados no mês de outubro, que corresponde à primavera e ao início do período de frutificação da planta. Nos dois locais, o rendimento de OE foi notavelmente mais baixo em janeiro, fevereiro e abril, meses que correspondem ao verão.

Nas Tabelas 29 e 30 são apresentados os resultados referentes às análises de Pearson, que correlacionam as substâncias majoritárias e as classes químicas com fatores ambientais (precipitação, umidade e temperatura) para os indivíduos do acesso de Serra da Tiririca-Niterói/RJ e Floresta da Tijuca/RJ, respectivamente. Essas análises demonstraram correlação positiva ($r=0,6774; p<0,05$) para o teor de biciclogermacreno com a temperatura na área de coleta Serra da Tiririca-Niterói/RJ. Outras substâncias presentes no OE também demonstraram se correlacionar com fatores ambientais, porém, essas substâncias estão em pequeno teor percentual relativo. As outras substâncias com relevante teor no OE (α e β -pinenos e limoneno) desse local de coleta não demonstraram sofrer interferência de fatores ambientais. As classes químicas de monoterpenos e sesquiterpenos também não demonstraram correlação significativa com fatores ambientais (precipitação, umidade e temperatura) na Serra da Tiririca-Niterói/RJ (Tabela 29).

Em se tratando da área de coleta Floresta da Tijuca/RJ, novamente, a substância biciclogermacreno demonstrou sofrer alteração com aumento da temperatura ($r=0,8376; p<0,05$). A correlação de Pearson demonstrou resultados interessantes para as classes químicas dos monoterpenos e dos sesquiterpenos para o espécime de *P. rivinoides* da Floresta da Tijuca/RJ. O teor percentual de monoterpenos revelou sofrer influência negativa da temperatura ($r=-0,7813; p<0,05$), enquanto que o teor de sesquiterpenos variou positivamente com a temperatura ($r=0,7236; p<0,05$) e precipitação ($r=0,6055; p<0,05$).

Figura 34—Comparações das variações dos rendimentos (%) de óleos essenciais de *Piper rivinoides* Kunth da Mata Atlântica/RJ e suas relações com as médias mensais dos fatores ambientais precipitação (mm), umidade (%) e temperatura média (°C), no período de janeiro à dezembro de 2019.



Legenda: A – Comparação dos rendimentos entre os dois indivíduos de estudo; B – Correlação entre as variáveis ambientais e os rendimentos mensais do espécime coletado na Floresta da Tijuca/ RJ; C – Correlação entre as variáveis ambientais e os rendimentos mensais do espécime coletado na Serra da Tiririca-Niterói/ RJ.

Tabela 29 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e rendimentos, substâncias majoritárias e classes químicas de óleos essenciais do acesso de *Piper rivinoides* Kunth da Serra da Tirrica-Niterói/RJ.

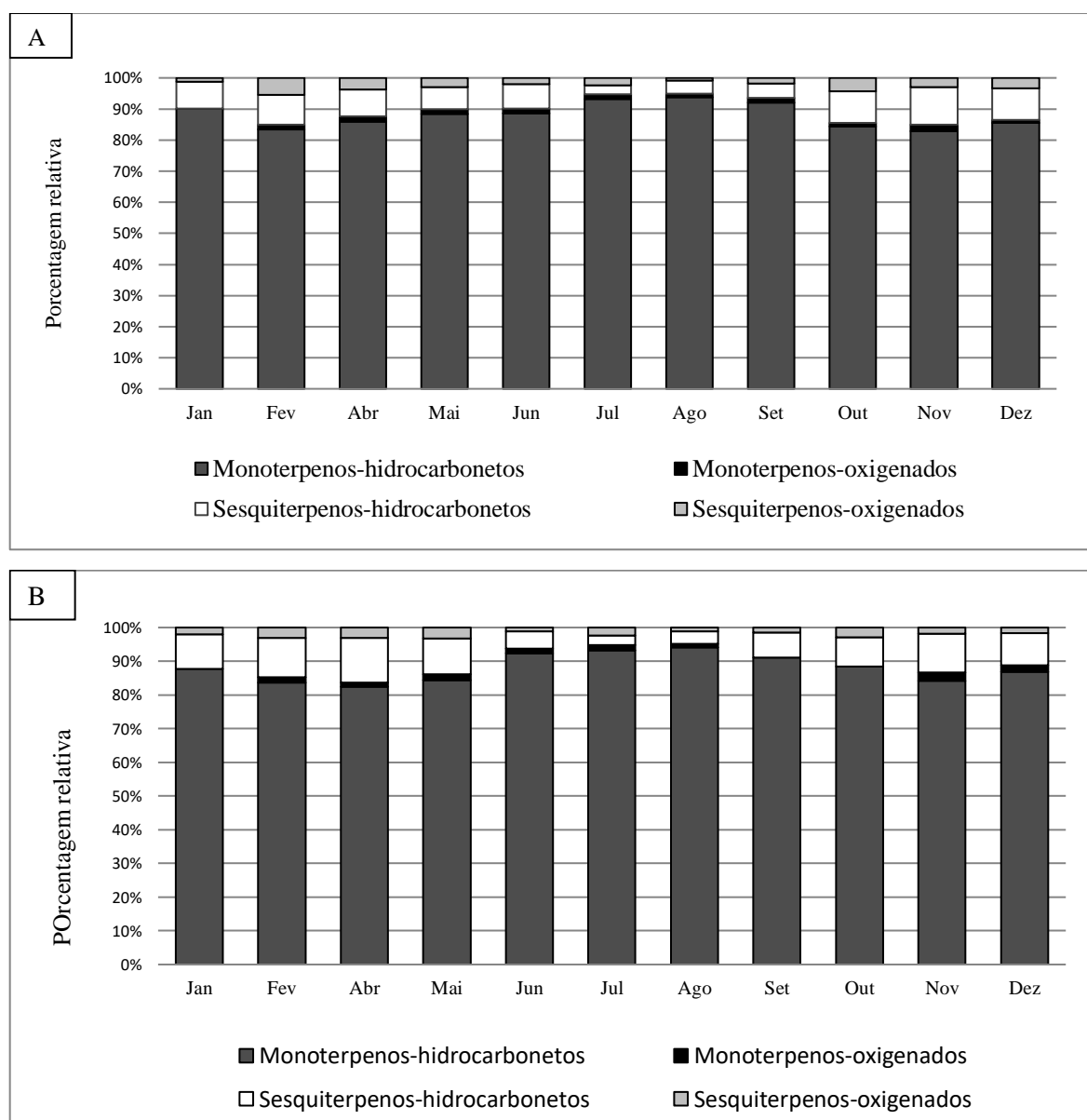
Variáveis analisadas	r^2		
	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
α -pineno	-0,4082	0,4566	0,2609
β -pineno	-0,1107	0,1013	0,1535
canfeno	0,1717	-0,6098*	-0,4593
mirceno	-0,3450	-0,2948	0,0590
limoneno	-0,0607	0,5280	0,4302
linalool	-0,6786*	0,6943	0,0435
γ -elemeno	-0,0582	0,4813	0,0560
<i>E</i> -cariofileno	0,2796	0,3093	0,1168
aromadendreno	0,7186*	-0,2615	0,2678
biciclogermacreno	0,6774*	0,2034	0,2848
<i>E</i> -bisaboleno	-0,0950	0,5177	0,2590
espatulenol	-0,4207	0,7503*	0,1625
viridiflorol	0,5100	-0,0445	0,1749
Monoterpenos	-0,3497	0,5401	-0,4906
Sesquiterpenos	0,4794	0,3670	0,4149

Tabela 30 – Análise de correlação de Pearson entre variáveis ambientais e rendimentos das substâncias majoritárias e classes químicas de óleos essenciais do acesso de *Piper rivinoides* Kunth da Floresta da Tijuca/RJ.

Variáveis analisadas	r^2		
	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
α -pineno	0,0532	-0,3737	-0,0644
β -pineno	0,0817	-0,2049	-0,0073
canfeno	-0,7721*	-0,3624	-0,3989
mirceno	-0,6338*	-0,2856	-0,4073
α -terpineno	-0,3488	0,3579	-0,0958
limoneno	0,4137	-0,2444	-0,2045
linalool	-0,2358	0,3036	0,0626
γ -elemeno	0,3928	0,2872	0,3040
<i>E</i> -cariofileno	0,0750	0,8176*	0,3061
aromadendreno	0,3306	0,2506	0,4618
biciclogermacreno	0,8376*	0,1022	0,4033
espatulenol	0,3170	0,1374	0,2262
viridiflorol	0,4794	0,1374	0,2262
Monoterpenos	-0,7813*	-0,3918	-0,4985
Sesquiterpenos	0,7236*	-0,4176	0,6055*

As Figuras 35A e 35B apresentam as variações das diferentes classes químicas que compõe os OE de *P. rivinoides* das áreas em estudo. Ambas as amostras são ricas em monoterpenos, não havendo grandes diferenças na composição química do OE entre os dois espécimes, bem como em relação aos meses de estudo.

Figura 35– Variação das classes químicas de substâncias encontradas nos óleos essenciais de *Pipe rivinoides* Kunth dos acessos da Serra da Tiririca-Niterói/RJ e da Floresta da Tijuca/RJ, no período de janeiro a dezembro de 2019.



Legenda: A – Dados correspondente ao espécime coletado na Serra da Tiririca-Niterói/RJ e da Floresta da Tijuca/RJ; B – – Dados correspondente ao espécime da Floresta da Tijuca/RJ

Uma vez que as amostras de *P. rivinoides* foram coletadas no mesmo dia para estudo do teor de neolignanas e de óleos essenciais, realizou-se análise de Pearson entre as neolignanas quantificadas (CNC, EUP-6 e EUP-5), as substâncias majoritárias identificadas nos OE e as classes químicas (Tabelas 30 e 31). A única correlação estatisticamente significativa e relevante é demonstrada entre **os teores percentuais de α -pineno** com os **teores percentuais das neolignanas** na área de coleta Floresta da Tijuca/RJ (correlações positivas com CNC e correlação negativa com EUP-6 e EUP-5). Outras correlações encontradas não são relevantes.

Tabela 30 – Análise de correlação de Pearson entre neolignanas, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de *P. rivinoides* Kunth do acesso da Floresta da Tijuca/RJ.

Variáveis analisadas	r^2		
	Conocarpano	Eupomatenoide-6	Eupomatenoide-5
α -pineno	0,7273*	-0,7148*	-0,7003*
β -pineno	-0,4496	-0,4626	-0,4146
limoneno	-0,4167	0,3960	0,4099
biciclogermacreno	-0,4459	-0,4061	0,3801
Monoterpenos	0,2455	0,1590	0,2336
Sesquiterpenos	-0,3250	-0,2463	-0,3326

Tabela 31 – Análise de correlação de Pearson entre neolignanas, substâncias majoritárias e classes químicas dos óleos essenciais de *P. rivinoides* Kunth do acesso de Floresta da Tijuca/RJ.

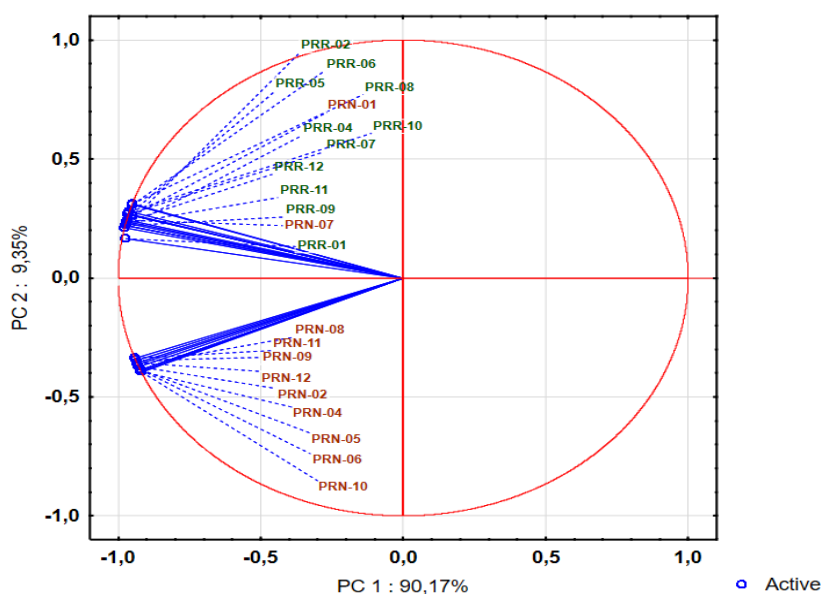
Variáveis analisadas	r^2		
	Conocarpano	Eupomatenoide-6	Eupomatenoide-5
α -pineno	0,0745	-0,5949	-0,4085
β -pineno	0,1881	-0,254	-0,4264
limoneno	-0,2908	0,2939	0,0186
biciclogermacreno	0,1528	0,0009	0,4251
Monoterpenos	0,3251	-0,013	0,1247
Sesquiterpenos	-0,3650	0,0816	0,1441

As análises de agrupamento hierárquico são apresentadas nas Figuras 36 e 37 (A-B) para amostras da composição química dos OE de *P. rivinoides* Kunth da Serra da Tiririca-Niterói/RJ e Floresta da Tijuca/RJ, respectivamente, coletadas durante os meses de janeiro a dezembro de 2019.

Essa análise demonstrou que há uma composição rica do monoterpene α -pineno nos OE do acesso da Serra da Tiririca-Niterói/RJ e que sua variabilidade sazonal é evidenciada pelos componentes em menor concentração (Figura 36). A partir da formação do dendograma, dois *clusters* foram originados: um com os maiores teores de β -pineno (janeiro e julho) e outro com maiores teores de α -pineno e limoneno.

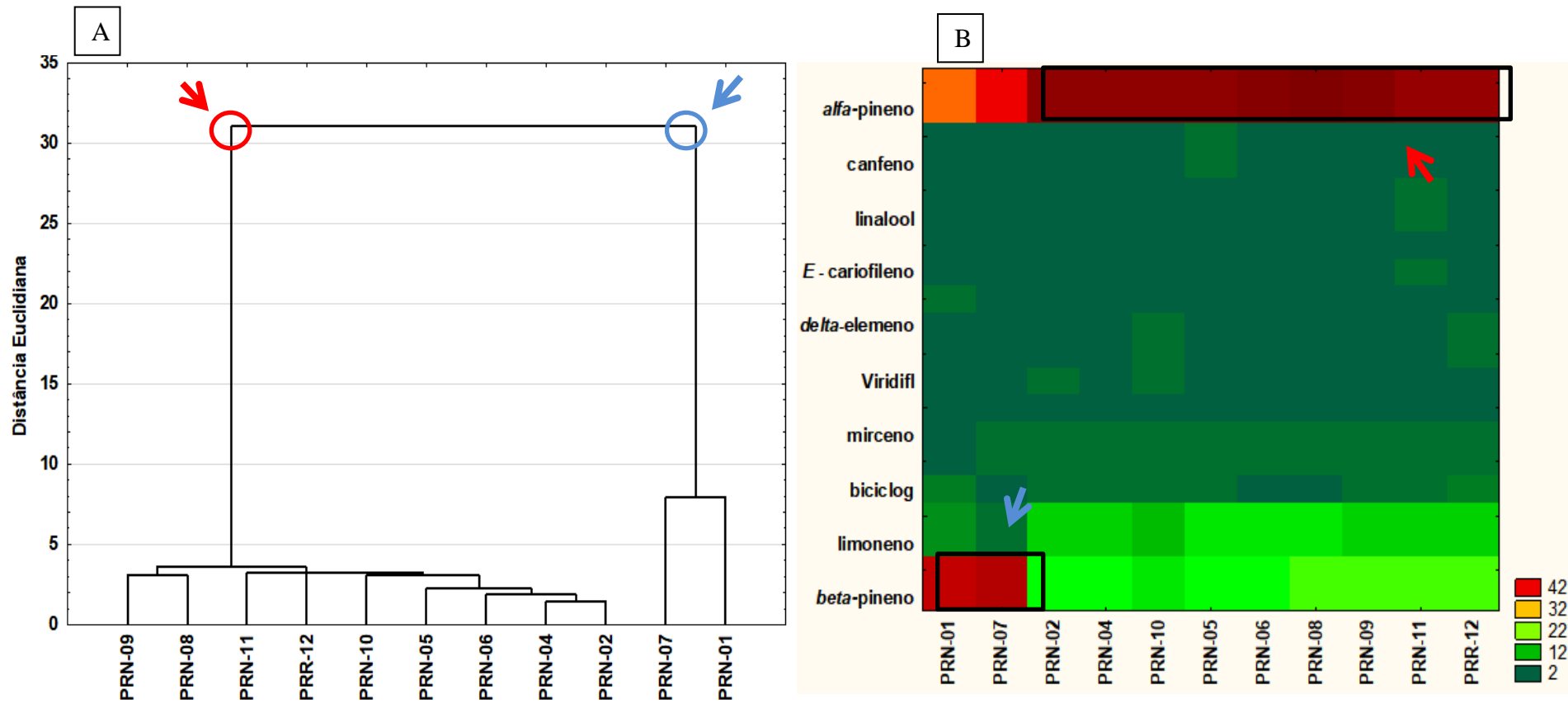
Para as amostras da Floresta da Tijuca/RJ (Figuras 37 A e B) os gráficos foram ligeiramente similares, formando um grande *cluster* com os maiores teores percentuais relativos de β -pineno. Cabe ressaltar que houve a formação de um *cluster* menor onde a concentração de β -pineno foi ainda maior, compreendido pelos meses de julho, agosto e setembro. Esses meses correspondem ao período mais frio do ano. Neste gráfico ficou destacado apenas a amostra que possuía maiores concentrações de limoneno (janeiro).

Figura 36 - Gráfico *score* das 24 variáveis a partir das substâncias por mês (janeiro a dezembro de 2019), obtidos do óleo essencial de *P. rivinoides* Kunth dos acessos da Floresta da Tijuca – Rio de Janeiro (PRR, verde) e da Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN, vermelho), baseado em análise de componente principal (ACP).



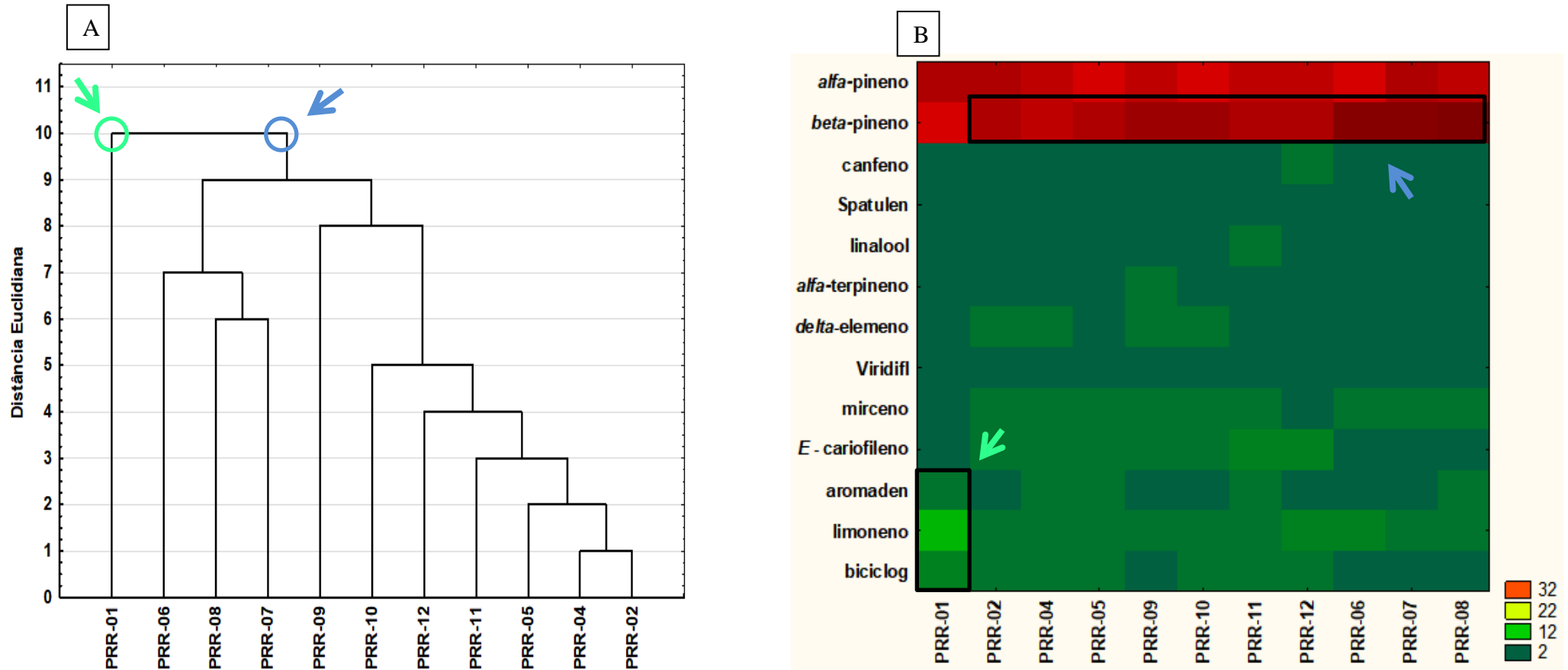
Legenda: números representam meses do ano, começando a partir do 1 para janeiro e terminando em 12 para dezembro.

Figura 37 –Dendrograma e gráfico de *two-way* joining de 11 amostras de óleos essenciais de *P. rivinoides* Kunthdo acesso de Serra da Tiririca-Niterói/RJ (PRN), de janeiro a dezembro de 2019, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.



Legenda: *O programa não suporta o uso de símbolos; Dendrograma (A) e gráfico de *two-way* joining (B); #As setas demonstram semelhanças entre as amostras e as cores das setas representam: **azul** - composição com elevado teor de β -pineno ; **vermelho** - composição com elevado teor de α -pineno.

Figura 38 – Dendrograma e gráfico de two-way joining de 11 amostras de óleos essenciais de *P. rivinoides* Kunthdo acesso da Floresta da Tijuca/RJ (PRR), de janeiro a dezembro de 2019, baseado em análise de agrupamento pelo método UPGMA.



Legenda: *O programa não suporta o uso de símbolos; Dendrograma (A) e gráfico de *two-way* joining (B); #As setas demonstram semelhanças entre as amostras e as cores das setas representam: **verde** - composição com elevado teor de limoneno; **azul** – composição com elevado teor de β -pineno.

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise fenológica e morfológica macroscópica

Os espécimes do estudo apresentaram-se em fase reprodutiva nos meses de julho, agosto e setembro, período ligeiramente diferente dos resultados encontrados na literatura que demonstram floração de maio a julho (QUEIROZ et al., 2020). Esse resultado pode ser justificado pelos fatores abióticos como temperatura e precipitação, pois julho marca o início do inverno, com temperaturas mais baixas. De acordo com os dados obtidos pelo INMET para esta Dissertação, em ambas as regiões de coleta, os meses de julho, agosto e setembro apresentaram queda na temperatura com valores médios de 21 °C e um aumento notável na pluviosidade, o que não aconteceu em maio e junho. Os argumentos supracitados são embasados na teoria de que *P. rivinoides* é descrita na literatura como uma planta de regiões úmidas (QUEIROZ et al., 2020; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Com relação aos ataques de herbívoros, ambas as plantas encontraram-se com as folhas predadas. No entanto, o espécime da Floresta da Tijuca foi o mais afetado. Isto pode ser justificado devido à este indivíduo estar em local de interior de mata densa, diferente do outro espécime que se encontra mais próximo da área de borda da floresta. Sendo assim, de acordo com a teoria da biogeografia de ilhas proposta por Primack & Rodrigues (2001) o interior da mata fechada possui riqueza biológica muito maior que aquela encontrada na região de borda, desta forma é possível que haja mais predadores no interior da mata do que na região periférica. A predação pode trazer consequências para o vegetal que, para se defender, usa estratégias de adaptação que passam por alteração na produção de metabólitos especiais (RAMOS et al., 2020a; GOTLLIEB, 1998; FERREIRA; PINTO, 2010; BEZERRA, 2017).

5.2 Extração, rendimento das neolignanas e dos extratos

De acordo com os modelos gerados por regressão linear múltipla para avaliação/determinação da melhor condição de extração a ser seguida no processo de obtenção de neolignanas o comportamento demonstrado pelas substâncias CNC e EUP-6 é interessante. A variável concentração de etanol é a mais importante para os itens rendimento do extrato e teor de CNC e EUP-6, ou seja, quanto maior a concentração desse solvente extrator, serão obtidos maiores teores em biomassa de extrato e concentração das duas neolignanas. Este fato se

correlaciona com as forças intramoleculares, pois devido às características físico-químicas do etanol há capacidade de extrair desde substâncias apolares, de polaridade média e alta polaridade. Além disso o etanol é o solvente extrator mais comumente usado em inúmeros processos de extração de matrizes vegetais, devido suas características extrativas (como mencionado), fácil obtenção, ser obtido de fonte renovável, baixo custo, baixa toxicidade, entre outros (COSTA et al., 2016; Farmacopeia Brasileira, 2019; ANVISA, 2011; LI, 2020). No entanto, o teor percentual do EUP-5 diminui com o aumento da concentração de etanol, sendo o *n*-hexano 100% o solvente ideal para extração dessa neolignana. Assim, considerando-se misturas de *n*-hexano e etanol, tem-se que a partir de 50% desses dois solventes haverá excelente extração de CNC e EUP-6 (com aumento de etanol), e diminuindo-se a concentração de etanol, maiores teores percentuais de EUP-5 serão obtidos.

Assim sendo, com o método de 45 minutos contendo etanol hexano (1:1) é possível priorizar o enriquecimento dessas duas substâncias no extrato pois, uma vez que a concentração do EUP-5 é muito maior no extrato do que essas duas substâncias, é possível enriquecer a fração nas substâncias minoritárias ajudando o isolamento final. Pois, durante um possível processo de produção industrial a partir destes extratos, será de maior valor para a Indústria uma única extração que utilize somente um solvente num lote único.

Avaliação das estruturas dessas neolignanas e a ordem de eluição por CLAE-DAD-UV pela metodologia de quantificação desenvolvida e validada, tem-se que em termos de lipofilicidade o CNC < EUP-6 < EUP-5. De fato, a lipofilicidade dessas substâncias estimada teoricamente pelo LogP e publicada por Estrada (2019) é CNC 4,23; EUP-6 5,04 e EUP-5 5,05. Cabe ressaltar que o *n*-hexano foi escolhido como solvente em combinação com etanol porque as neolignanas CNC, EUP-5 e EUP-6 foram isoladas por Moreirae cols. (2016) da partição em *n*-hexano do extrato etanólico de *P. rivinoides*. No entanto, em se tratando do desenvolvimento de fitomedicamentos, não se deve pensar no uso de solventes como o *n*-hexano numa indústria, devido seu custo, maior volatilização do que o etanol e maior toxicidade para o ser humano e para o meio ambiente.

A técnica de extração assistida por ultrassom é inovadora, pois possibilita extração em menor tempo e com menor quantidade de solvente extrator, o que contribui para a preservação do meio ambiente. A desvantagem óbvia é o rendimento que é maior quando se aplica a técnica de percolação ou maceração (SILVA et al., 2016). No entanto, como o intuito do projeto foi avaliar o teor de neolignanas ao longo dos meses do ano, a técnica de extração assistida por

ultrassom é adequada por ser rápida e demandar menor quantidade de solvente extrator, como mencionado anteriormente.

Lemos e cols. (2012) avaliaram a eficiência de duas técnicas extrativas (Soxhlet e fluído supercrítico) para obtenção das neolignanas CNC e EUP-5 em extratos de *Piper regnelli* (Miq) C. DC. Os autores registraram valores de 7,5% de rendimento em biomassa pela técnica de Soxhlet com solvente diclorometano e valores que variaram entre 0,65 a 2,39% em diferentes programações de pressão e temperatura na extração com fluído supercrítico. Os rendimento dos extratos obtidos nesta Dissertação variaram de 2,85 a 5,45%, portanto, são maiores que os obtidos a partir da técnica de fluído supercrítico empregada por Lemos e cols. (2012). Embora os rendimentos obtidos pela extração por Soxhlet tenham sido maiores que os alcançados neste estudo, de acordo com teorias de solventes verdes foi demonstrado que álcoois simples como o etanol, são solventes mais ambientalmente preferíveis em comparação a acetonitrila, formaldeídos, diclorometano e dioxanos. Cabe ressaltar que o conceito de solvente verde reflete a intenção de diminuir o impacto ambiental resultante do uso de solventes nos processos químicos (MUSTAFA; TURNER, 2011; CAPELLO, 2007).

O uso de “solventes verdes” nos processos químicos vem sendo amplamente difundido para obtenção de substâncias bioativas a partir de plantas e alimentos, como por exemplo, mistura de metanol/ água usada para a extração de capsaicinóides de pimentão; metanol, usado para a extração de tocoferóis e tocotrienóis em cereais e mistura de etanol/ água utilizada para a extração de isoflavonas da soja (MUSTAFA; TURNER, 2011), bem como extração com mistura de etanol/água de inúmeras drogas vegetais que constam no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2018). Portanto, a escolha do solvente em um processo extrativo define grande parte do desempenho do processo e deve ser levado em consideração questões relacionadas ao impacto ambiental, a segurança e a saúde. Sendo assim, os processos extrativos definidos nesta Dissertação são considerados de baixo impacto ambiental, excelentes no tempo de extração, baixo custo e de poucas etapas.

5.3 Desenvolvimento e validação do método analítico

No desenvolvimento das condições cromatográficas adequadas para a separação das três neolignanas benzofurânicas por CLAE-DAD-UV buscou-se utilizar condições mais simples e reprodutíveis que pudessem ser realizadas de forma rápida, com menor custo e maior eficiência. Com um tempo total de 8 min de análise, o método desenvolvido e validado nesta Dissertação é vantajoso, pois desta forma tem-se menor gasto com solventes e maior otimização do tempo, o que possibilita a realização de inúmeras análises em um único dia. A escolha da fase móvel foi adequada para garantir a separação dos sinais com boa resolução ($\sim 3,0$), simetria do sinal (~ 1) e fator de retenção ($> 2,7$). A ausência de interferência na janela de tempo de retenção para as neolignanas confirma a seletividade do método. Os limites de quantificação (< 25 ng/mL) e identificação (< 50 ng/mL) determinados estão dentro da faixa de operação do detector de UV (10^{-9}) e são excelentes se comparados a outros limites encontrados na literatura que estão na faixa do mg/mL ou $\mu\text{g/mL}$ para métodos analíticos de substâncias presentes em extratos de plantas (VECHIA, 2016; PEREIRA, 2013; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, 2019; SHAH, 2013; MAHFOUDHI, 2014).

A revisão na literatura revelou um método analítico desenvolvido e validado para a quantificação das três neolignanas (CNC, EUP-5 e EUP-6) em extrato hidroalcoólico de *Piper regnelli* (FELIPE et al., 2006). Esse método consiste no uso de coluna Metasil ODS (150 mm x 4,6 mm i.d. x 5 μm de tamanho de partícula), em fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada (60:40 v/v) em uma corrida de 25 min, com sistema de eluição isocrático. No entanto, os dados referentes à validação das neolignanas EUP-5 e EUP-6 não foram descritos no artigo; apenas são descritos os parâmetros para a validação do método referente ao CNC. Desta forma é evidente que o método desenvolvido e validado neste trabalho é muito mais eficiente por ter apresentado os parâmetros de validação para as três neolignanas bioativas, além do menor tempo de análise (8 min), o que possibilita maior número de análises diárias do que o método previamente publicado. Outro ponto de destaque são os LD (< 25 ng/mL) e LQ (< 50 ng/mL), definidos neste estudo, que permitem analisar amostras com baixíssimas concentrações das neolignanas, ao contrário do método publicado por Felipe e cols., (2006), que apresenta limites na faixa do $\mu\text{g/mL}$. Devido à composição de fase móvel e a coluna utilizada nesta análise, o presente método desenvolvido e validado é de baixo custo e rentável, principalmente em

laboratórios de controle da qualidade em indústrias de fitomedicamentos, caso seja desenvolvido um produto contendo as neolignanas bioativas obtidas de *P. rivinoides*.

Em resumo, o método analítico recentemente desenvolvido e validado para quantificação de três neolignanas bioativas em extratos de *P. rivinoides* Kunth é confiável e mostrou-se seletivo, linear, preciso, exato e robusto (BRITO et al., 2003; GUIDELINE-ICH, 2005; INMETRO, 2016). Os resultados obtidos contribuem para análises fitoquímicas adequadas, bem como para o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade dos extratos e preparações fitoterápicas com *P. rivinoides*.

5.4 Variação sazonal das neolignanas

A amplitude das variações na biossíntese das neolignanas benzofurânicas **eupomatenóide-5, eupomatenóide-6 e conocarpano** é bastante acentuada nos dois indivíduos, entretanto, os maiores teores percentuais dos metabólitos foram encontrados para o espécime da Serra da Tiririca-Niterói/RJ durante o segundo semestre do ano (principalmente no mês de julho), correspondendo ao inverno (temperaturas mais baixas) e também ao período de floração de *P. rivinoides*. Os menores teores percentuais são descritos para o início do ano, período de verão, de maior temperatura e fase vegetativa. Esses resultados foram confirmados pela análise de Pearson, que demonstrou correlação negativa entre a temperatura e a produção de neolignanas para o espécime da Serra da Tiririca-Niterói/RJ. Uma hipótese para a correlação negativa entre a temperatura e o teor de CNC, EUP-5 e EUP-6 pode residir na biossíntese de lignóides e no metabolismo primário do vegetal. Em períodos mais quentes, a rota biossintética pode estar deslocada para produção de lignina que constitui a parede celular para crescimento do vegetal e evitar perda de água, principalmente em angiospermas basais, como Piperaceae. Portanto, as unidades C₆-C₃ produzidas a partir da rota biossintética do chiquimato seriam destinadas para lignificação e não para a síntese de neolignanas. (GOTTLIEB et al., 1996)

Plantas que crescem próximas a linha do Equador tendem a ser mais arbóreas, ou seja, a rota biossintética do chiquimato está induzida nessas regiões e desviada para maior lignificação (GOTTLIEB, et al, 1996; GOTTLIEB; BORIN 1998b). Esse fato corrobora com a hipótese proposta. No entanto, para o indivíduo da Floresta da Tijuca, essa hipótese de lignificação com o aumento da temperatura não se confirma de pleno. Registrou-se uma

oscilação na amplitude dos teores percentuais, de forma a ocorrer dois momentos de pico na produção das neolignananas, sendo um no início do ano (março e abril), correspondendo ao fim do verão e início do outono (temperaturas ainda altas), e o outro no segundo semestre (julho a setembro), período de temperaturas mais baixas e que corresponde a floração. Esses dois momentos de maior produção de neolignananas no espécime da Floresta da Tijuca podem estar relacionado com a maior herbivoria, floração do espécime além, é claro, das temperaturas mais baixas. A relação entre temperatura e teor das três neolignananas não foi confirmada pela correlação de Pearson para a área de estudo Floresta da Tijuca. Porém, como mencionado anteriormente, os dados climatológicos para essa área foram obtidos de estação que fica em Copacabana/RJ, portanto, distantes da Floresta. Nova investigação deve ser realizada para as duas áreas considerando o microclima, com medidas de temperatura, umidade, precipitação e radiação próxima aos espécimes investigados, no sentido de se confirmar a hipótese aventada (aumento do teor de neolignananas com a diminuição da temperatura). Em relação à altitude, qualquer avaliação fica prejudicada, uma vez que os dois indivíduos estão a apenas 200 m de altura de diferença. De acordo com Bernal e cols(2013) as neolignananas presentes nas folhas de *Buxus sempervirens* L. variam com a altitude, mas não com a intensidade de UV-A e UV-B. Esse é um fato que deve ser abordado para *P. rivinoides* no futuro.

Considerando o desenvolvimento de um fitomedicamento a partir de frações ou extratos de *P. rivinoides*, de uma forma geral, é possível inferir que há maior biossíntese mensal (refletida no teor percentual) de neolignananas no indivíduo da Serra da Tiririca-Niterói/ RJ em relação ao espécime da Floresta da Tijuca/ RJ. O melhor mês para obtenção de uma fração rica em neolignananas a partir de *P. rivinoides* coletada na Serra da Tiririca-Niterói/RJ é em **julho**. Já na Floresta da Tijuca/RJ é em **março**, porém, bons teores percentuais das três neolignananas também podem ser obtidos dessa área em **agosto, setembro, outubro e dezembro**. No entanto, em se tratando de coletas nas diferentes estações do ano (verão, outono, inverno e primavera) e da amplitude de variação, os teores percentuais de neolignananas das duas áreas não são diferentes estatisticamente. O desenvolvimento de fitomedicamentos ou a obtenção de substâncias de origem natural para modificação sintética requer cultivo do vegetal para que a coleta em grande quantidade não o ameace em seu *habitat*. Em termos de cultivo para produção das três neolignananas, há de se pensar na propagação de estacas do espécime da Serra da Tiririca-Niterói/ RJ, uma vez que este apresentou maiores teores percentuais das neolignananas em relação aos diferentes meses, bem como maior homogeneidade na proporção desses metabólitos. Comunico que desde 2017 a espécie encontra-se inserida na PAF da FIOCRUZ para estudos fitoquímicos

caso seja necessário. Foi realizada a inserção e identificação botânica. Duas coletas de 400g já foram realizadas apresentando perfil ricos nessas neolignans as quais foram isoladas dessas amostras da pAF. O melhor mês para coleta do espécime da Serra da Tiririca-Niterói/ RJ é julho, como demonstrado nos resultados aqui descritos. Sabe-se que diversos fatores vão influenciar na produção desses metabólitos, como solo, microclima, entre outros, que podem alterar, inclusive, a fase reprodutiva de *P. rivinoides* e com isso a química do vegetal. Portanto, é de extrema relevância um estudo do cultivo dessa planta e acompanhamento da produção de neolignanas em condições controladas.

Chama atenção que a neolignana bioativa EUP-5 foi identificada em alto teor percentual durante todos os meses de análise nos extratos de *P. rivinoides* de ambas as áreas de coleta, com destaque para o mês de julho que registrou elevados 6,73% no espécime da Serra da Tiririca-Niterói/RJ. Essa substância possui inúmeras atividades biológicas descritas na literatura, incluindo antitumoral e antiparasitária (SCODRO, 2013; PELIZZARO-ROCHA et al. 2011; LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; LADEIRA-MACEDO et al., 2017; FOGGIO et al., 2010; LOPES et al., 2014; GHIRALDI-LOPES et al., 2017; MOREIRA et al., 2016; GARCIA et al., 2013; PESSINI et al., 2005; LEMOS et al., 2013). Dessa forma, *P. rivinoides* Kunthse confirma como promissora fonte para obtenção da neolignana benzofurânica EUP-5, seja para testes de toxidez, farmacocinética, para modificações químicas, dentre outros.

De acordo com as análises de Pearson as três neolignanas possuem correlações positivas entre si, ou seja, a medida que uma é produzida as outras também são para a maioria dos meses. Isso confere que há simetria na distribuição de cargas na biossíntese dessas neolignanas no metabolismo de *P. rivinoides* das duas áreas de investigação da Mata Atlântico do Estado do Rio de Janeiro. Ou seja, a formação do EUP-6 a partir dos precursores C₆-C₃ que se acoplam por via radicalar (acoplamento oxidativo radicalar), leva à biossíntese do EUP-5 (hidroxilação e posterior metilação da hidroxila) e à biossíntese do CNC (redução da ligação dupla do anel furânico), proporcionalmente. Esse achado pode ser confirmado a partir das análises de componente principal e pelo gráfico *box plot*, realizadas neste trabalho.

Por que maiores teores percentuais de EUP-5 são produzidos pelos espécimes de ambas as áreas de estudo? Uma hipótese plausível reside na atividade antioxidante das três neolignanas. Segundo Jaidee e cols. (2018), a atividade antioxidante frente ao radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) é EUP-5 (38.7 ± 0.8) >> EUP-6 (354.3 ± 7.7) >>>> CNC (Inativo até a maior concentração testada). O registro da atividade antioxidante dessas neolignanas pode contribuir para evitar o estresse oxidativo em *P. rivinoides* e explicar,

em parte, porque maiores teores de EUP-5 são produzidos. Cabe ressaltar que, como demonstrado por Moreira e cols. (2016), as atividades antimicrobiana e antiparasitária do CNC é muito superior ao das neolignananas EUP-5 e EUP-6. Registros da literatura demonstram, ainda, a participação dessas neolignananas na defesa química. Ramos & Kato (2013) demonstraram potencial inseticida para neolignananas benzofurânicas de *P. regnellii*. Portanto, parece que a atividade antioxidante é um fator mais importante para essa planta do que atividade biológica para sua defesa, em se tratando das neolignananas EUP-5, EUP-6 e CNC. No entanto, para elucidar a questão da maior produção de EUP-5 serão necessários estudos das relações ecológicas e de interação inseto-planta e planta-planta que cercam *P. rivinoides*.

Os dendogramas gerados pelas análises de agrupamento hierárquico demonstram que há formação de *clusters* que estão relacionados com a separação devido aos teores de eupomatenoídes e conocarpano, ainda que as distâncias euclidianas sejam baixas. Dessa forma, confirmando as análises de componente principal, os dendogramas gerados não permitem separar *clusters* em relação às duas áreas de estudo. O máximo que as análises de agrupamento hierárquico denotam é melhor época de coleta para obtenção de eupomatenoídes ou conocarpano, ainda que questionável. Por estes motivos, não foi possível separar as duas áreas em relação à biossíntese de neolignananas pelas abordagens de quimiometria, o que demonstra que *P. rivinoides* mantém uma estabilidade fenotípicaquímica nas duas áreas de estudo. Isso é excelente em termos de desenvolvimento de novos fitomedicamentos, uma vez que a maior diversidade fenotípica química, tal como registrado para *Piper mollicomum* Kunth (RAMOS et al., 2020b), requer maior investimento em domesticação do vegetal.

5.5 Rendimento dos óleos essenciais

A espécie *P. rivinoides* estudada nesta Dissertação mostrou também padrão distinto de rendimento dos OE daqueles encontrados na literatura, onde registra-se que, geralmente, os teores de OE são maiores em temperaturas mais elevadas, com perda de rendimento com diminuição progressiva da temperatura (LIMA et al., 2003). Estudos realizados com *Dalbergia frutescens* (Fabaceae), *Lippia alba* (Mill.) (Verbenaceae), *Peperomia galioides* Kunth (Piperaceae), *Piper cernuum* Vell. e *Piper mollicomum* Kunth correlacionaram o aumento na biossíntese de substâncias voláteis com o aumento das temperaturas e/ou grande exposição ao sol, de forma a se obter menor rendimento em períodos mais frios e com menor intensidade

luminosa (MENDES et al. 2002; BARROS et al. 2009; RAMOS et al., 2019, RAMOS et al. 2020b; GASPARETO et al., 2016). Sendo assim, esses resultados não estão de acordo com os obtidos no presente estudo, no qual registrou-se maior rendimento no mês de outubro, que corresponde a primavera e ao início do período de frutificação da planta. Nos dois locais de estudo, o rendimento de OE foi mais baixo nos meses mais quentes do verão (janeiro, fevereiro e abril). Este é o primeiro estudo que descreve a variação sazonal da composição volátil de *P. rivinoides*. Os rendimentos encontrados para *P. rivinoides* neste estudo são maiores que outros já descritos na literatura (SOUZA, 2014; PERIGO, 2016).

A análise mais aprofundada em relação aos rendimentos dos OE de *P. rivinoides* da Mata Atlântica do Rio de Janeiro quanto à influência do clima, demonstra semelhança no perfil de rendimento em ambos os acessos. Há um aumento considerável no rendimento de OE nos meses de julho, agosto, setembro e outubro (meses que correspondem ao inverno e início da primavera, além de fase reprodutiva da planta). É possível notar que há uma tendência no aumento do rendimento à medida em que a temperatura média é reduzida. As análises de Pearson não demonstraram correlações para os fatores pluviosidade e temperatura, no entanto, houve moderada correlação do rendimento com a umidade em ambos os locais ($r = 0,5954$ Serra da Tiririca e $r = 0,6588$ Floresta da Tijuca). Contudo, essa correlação foi significativa apenas para os resultados da Floresta da Tijuca ($p < 0,05$) (Apêndice 2). De acordo com a literatura, em ambientes úmidos em que a água não seja um fator limitante, como em Florestas Ombrófilas, há um aumento na taxa de transpiração vegetal, o que explica essa correlação, pois quando a taxa de metabolização aumenta a taxa de volatilização diminui, o rendimento do OE é diretamente afetado (QUEIROZ et al., 2017). Portanto, não houve um padrão claro de correlação entre os dados climáticos e a biossíntese de voláteis para *P. rivinoides*, o que indica que a tendência no aumento do rendimento dos OE pode estar mais conectada ao ciclo vegetativo que as variações climáticas (GOBBO-NETO, 2007). O mesmo padrão foi observado em relação à biossíntese de neolignanas, descrito anteriormente. No caso de *P. rivinoides* da Mata Atlântica do Rio de Janeiro há um direcionamento biossintético para constituintes voláteis monoterpênicos nos meses em que o vegetal encontra-se em período reprodutivo.

5.6 Composição volátil e variação sazonal do óleo essencial das folhas de *P. rivinoides*

A análise dos componentes ao longo das diferentes estações do ano demonstrou que a variação intra-específica na composição química volátil de *P. rivinoides* coletada nas duas áreas de estudo é baixa, principalmente no OE do mês de janeiro de 2019. Variações maiores ocorreram com os componentes majoritários do local de coleta Serra da Tiririca-Niterói/RJ, ainda que não tão relevantes. Esse resultado é importante do ponto de vista industrial, pois garante a uniformidade para produção de um fitomedicamento.

Com relação a variação sazonal, foi possível determinar duas substâncias majoritárias principais nas duas áreas de estudo, o α -pineno e o β -pineno, além de teores percentuais relevantes de terpenos cíclicos não oxigenados (**biciclogermacreno** e **limoneno**). Ambos os OE apresentaram, também, uma fração composta por sesquiterpenos. Esses resultados são ligeiramente diferentes dos encontrados por Perigo e cols. (2016), que avaliaram o perfil de voláteis de folhas de *P. rivinoides* coletadas em Ubatuba/SP. Esse estudo registrou uma fração volátil composta exclusivamente por monoterpenos. Os autores descreveram o elevado percentual de α -pineno (73,2%) e menor de β -pineno (5,2%). No entanto, não foi descrita a presença de limoneno. Resultados diferentes foram encontrados por Bernucie cols. (2016) que investigaram o OE de folhas de *P. rivinoides* coletadas em Antonina/PR. também foram registrados no OE, porém, mas uma vez, o monoterpeno limoneno não foi identificado.

Outro estudo conduzido com *P. rivinoides* cultivada na Plataforma Agroecológica de Fitomedicamentos (PAF) da FIOCRUZ/RJ foi realizado sob coordenação de Souza e cols. (2014). Os autores identificaram no OE das folhas os monoterpenos α -pineno (32,9%) e β -pineno (20,9%) como majoritários e ainda, o limoneno (3,22%) em quantidade significativa. Esses dados estão de acordo com os encontrados nas áreas de coleta da Serra da Tiririca-Niterói/RJ e na Floresta da Tijuca/RJ. Cabe ressaltar que esses locais de coleta são fragmentos da Mata Atlântica, assim como o exemplar cultivado na PAF, que teve como matriz de cultivo espécime de origem na Mata Atlântica dos arredores. É notório que metabólitos da via do acetato-mevalonato são exclusivos para a produção de OE em ambas as plantas estudadas nesta Dissertação, pois estas não foram detectadas, em sua composição volátil, substâncias oriundas de outras vias metabólicas que são comuns em Piperaceae, como por exemplo, via do chiquimato (arilpropanóides) encontrados para *P. rivinoides* coletada na reserva biológica do Bom Jesus no Paraná/PR. Esse estudo revelou uma constituição química completamente diferente das outras já descritas anteriormente para o OE de *P. rivinoides*, tendo

como constituinte majoritário o fenilpropanoide ***E*-isoelemicina**(40,81%), seguido dos monoterpenos hidrocarbonetos **δ -3-careno**(16,88%) e o sesquiterpeno hidrocarboneto **α -muuroleno** (12,45%). Nessa investigação não foram detectadas as substâncias **α -pineno**, **β -pineno** ou **limoneno** (LEAL et al., 2019). Estes resultados sugerem possíveis quimiotipos ou geotipos para essa espécie de Piperaceae. Porém, será preciso uma investigação mais aprofundada com o estudo dos voláteis de matrizes de diferentes partes do Brasil a campo e sob cultivo, no sentido de se determinar entre quimiotipo ou geotipo para *P. rivinoides*. Os resultados desta Dissertação poderão contribuir para algum esclarecimento.

A presença de **α -pineno** e **β -pineno** em altos teores percentuais no OE de *P. rivinoides* do Rio de Janeiro é de grande relevância, pois estudos conduzidos com esses terpenos evidenciam atividades como citotóxica e interrupção do ciclo celular de carcinoma hepatocelular (CHEN et al. 2015; XU et al. 2018). Ainda, com relação ao **α -pineno**, foi descrito que dentre 97 substâncias avaliadas quanto a atividade nematocida contra *Bursaphelenchus xylophilus*, um patógeno que ataca pinheiros na Ásia e na Europa, este monoterpeno hidrocarboneto mostrou maior atividade (KANG et al. 2013). Investigações com OE de *Baccharis reticulata* Ruiz & Pav. demonstraram ótimo potencial antibacteriano. Os autores concluíram que o efeito estaria relacionado à presença de **α -pineno** em elevadas concentrações na amostra (FREITAS et al., 2020).

Com relação ao **β -pineno**, há pouca informação descrita na literatura sobre suas atividades biológicas. Leite e cols., (2007) evidenciaram a atividade de ambos os monoterpenos **α -pineno** e **β -pineno** em inibir o crescimento de cepas de bactérias Gram-positivas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. Também é descrito para o **β -pineno** atividade inibidora contra o vírus da bronquite infecciosa (YANG et al. 2011). Um estudo que avaliou atividade microbicida dos enantiômeros (**$-$**)- **α -pineno**/ (**$+$**)- **α -pineno** e (**$-$**)- **β -pineno**/ (**$+$**)- **β -pineno** demonstrou que apenas os enantiômeros dextrogiros possuem atividade contra cepas de *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans*, *Rhizoctonia oryzae* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina. Esse estudo mostrou também efeitos sinérgicos entre os pinenos e antimicrobianos comerciais (SILVA et al., 2012).

Cabe destacar que as substâncias encontradas em teores majoritários para os OE de *P. rivinoides* neste estudo são frequentemente encontradas em elevados teores nos OE obtidos de espécies pertencentes a família Piperaceae, como por exemplo, *P. anonifolium* Kunt (45,0% **α -pineno** e 18,0% **β -pineno**), *P. bredemeyeri* Jacq. (20,3% **α -pineno** e 32,3% **β -pineno**), *P. ovatum* Vahl. (23,1% **α -pineno** e 14,2% **β -pineno**) (DA SILVA et al., 2017), *P. solisium* C.

DC (22,7% α -pineno e 3,5% β -pineno), *P. amplum* Kunt (18,1% α -pineno e 0,9 % β -pineno)(PERIGO et al., 2013) e também em baixas concentrações como em *P. fimbriulatum* C. DC. (1,5% α -pineno e 2,1% β -pineno), *P. arboreum* Aubl. (4,3% α -pineno e 6,6% β -pineno) (MUNDINA et al., 1998), *Peperomia blanda* Kunt (1,5% α -pineno e 1,7% β -pineno) (DOS SANTOS et al., 2001) dentre diversas outras espécies da família (MONZETO et al. 2010; OLIVEIRA et al., 2013; BERNUCI et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; RAMOS, 2020b).

5.7 Análise quimiométrica da variação de constituintes fixos (neolignanas) e voláteis (óleos essenciais)

Embora as análises de Pearson não tenham sido significativas para o conjunto de dados referentes à variação sazonal em *P. rivinoides*, observa-se um aumento nas concentrações de monoterpenos nos períodos que coincidem com a floração e frutificação em ambos os espécimes. O aumento dos constituintes voláteis no vegetal em períodos férteis podem estar relacionado com a atração de polinizadores e dispersores, dentre outros fatores (RAMOS et al., 2020a; PAVARINI; LOPES, 2016; WINK, 2019).

Em relação aos dendogramas gerados pelas análises de agrupamento hierárquico, é notável que há formação de *clusters* que se separam devido aos teores de α -pineno e β -pineno na amostra, ainda que as distâncias euclidianas sejam baixas. Dessa forma, confirmam-se as análises de componente principal, pois os dendogramas gerados não permitem separar *clusters* em relação às duas áreas de estudo. Sendo assim, essas análises de agrupamento hierárquico denotam que, em se tratando do monoterpeno β -pineno, a melhor época de coleta para obtenção dessa substância é no mês de julho/agosto e para o α -pineno o melhor período seria em janeiro, em ambas as áreas de acesso. Por estes motivos, não foi possível separar as duas áreas em relação à biossíntese de substâncias presentes no OE pelas abordagens de quimiometria, o que novamente representa que *P. rivinoides* possui uma estabilidade fenotípica química em ambos os locais de coleta. Por isso, cabe ressaltar mais uma vez que estes resultados são excelentes em termos de desenvolvimento de preparações fitoterápicas, pois a baixa diversidade fenotípica química requer menos investimentos em domesticação do vegetal.

CONCLUSÕES

Os objetivos propostos inicialmente para este estudo foram alcançados e os resultados obtidos permitem concluir que:

- (a) O planejamento experimental realizado permitiu otimizar o método de extração por ultrassom para fornecer maiores rendimentos de extrato, bem como teores de neolignanas principalmente, de conocarpano e eupomatenóide-6 em menor tempo e com solvente adequado.
- (b) Foi possível o desenvolvimento e validação de um método inédito por CLAE-DAD-UV para quantificação de três neolignanas benzofurânicas presentes nos extratos de *P. rivinoides* com excelente simetria de sinal, fator de retenção, resolução e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e recuperação. Esse método tem baixo custo e pode ser usado em controle da qualidade de preparações contendo extratos de *P. rivinoides*;
- (c) Os extratos alcoólicos obtidos a partir de folhas de *P. rivinoides* coletadas em dois locais da Mata Atlântica do Rio de Janeiro demonstraram elevada concentração das neolignanas benzofurânicas bioativas eupomatenóide-5 e eupomatenóide-6, sendo encontrados teores percentuais menores de conocarpano. A proporção dessas três neolignanas tende a se manter a mesma ao longo de 12 meses, o que é excelente em termos de desenvolvimento de fitomedicamentos a partir de extratos ou frações que possuem substância com atividade biológica e alguma interação sinérgica ou complementar. De acordo com as informações da literatura sobre os efeitos biológicos descritos para essas três neolignanas, os extratos dos espécimes dos dois locais estudados possui alto valor agregado e, portanto, podem ser usados em pesquisas para desenvolvimento de um fitomedicamento ou para fornecimento de substâncias para síntese;
- (d) O óleo essencial extraído das folhas frescas de *P. rivinoides* coletadas na Mata Atlântica do Rio de Janeiro demonstrou composição química relativamente estável ao longo de um ano de análise, sendo rico nos monoterpenos α -pineno e β -pineno, que são substâncias com grande potencial biológico;
- (e) As variações biossintéticas encontradas em *P. rivinoides* ao longo de um ano sugerem que seu ciclo fenológico exerce maior influência na biossíntese de metabólitos especiais (tanto neolignanas quanto componentes voláteis) do que os fatores abióticos. Exceto

para temperatura, que parece ter alguma influência na biossíntese de neolignanas no espécime da Serra da Tiririca-Niterói/ RJ;

- (f) Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre o teor de neolignanas e o teor percentual relativo dos constituintes majoritários do óleo essencial, bem como em relação às classes químicas, exceto para a correlação negativa entre α -pineno e os eupomatenoídeos e positiva entre esse monoterpene e conocarpano. Essas correlações biossintéticas não expressam qualquer significado;
- (g) Análises por quimiometria não permitiram separar os indivíduos das duas áreas de estudo, devido semelhança na produção de metabólitos especiais, embora as áreas de coleta estejam cerca de 50 km de distância, possuem altitudes um pouco diferentes, o indivíduo de uma área seja mais predado do que o da outra área e um esteja localizado na borda e o outro no interior da mata. Esse achado faz supor que *P. rivinoides* conserva suas características de produção de metabólitos especiais (baixa variabilidade fenotípica química) nas duas áreas, apesar das variações do meio ambiente, das estações do ano e da presença de predadores;
- (h) Esta Dissertação apresenta dados inéditos sobre a validação de metodologia analítica de neolignanas benzofurânicas, além de variação sazonal de neolignanas e de constituintes voláteis de uma planta nativa do Brasil (Mata Atlântica) com alto potencial medicinal. Os resultados encontrados irão contribuir para a etapa farmacêutica do desenvolvimento de fitoterápicos a partir de *P. rivinoides*, além de fornecer subsídios para estudos de ecologia química e conservação do vegetal.

Os resultados encontrados irão contribuir para a etapa farmacêutica do desenvolvimento de fitoterápicos a partir de *P. rivinoides*, além de fornecer subsídios para estudos de ecologia química e conservação do vegetal.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4^a ed. Allured Publishing Corporation, 2007.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, 4.1^a ed. Allured Publishing Corporation, 2017.
- ALBAN, A.A; CURTI, M ; BARBOSA, g.p. Plantas medicinais: se não cultivar hoje amanhã não haverá remédio. **Scientia Agraria Paranaensis - SAP**, v. 12, n. 10, p. 368-370, 2013.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76-91, 2007.
- ANDRADE, EH de A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia. Belém, **FEQ/UFPA**. 448p, 2009.
- ARAÚJO, M. S.; DA COSTA , J. W. ; DA COSTA, A. A.. A utilização de plantas medicinais e da fitoterapia em comunidades assistidas pela Estratégia Saúde da Família.. **Revista Brasileira de Pesquisa e Saúde**. Vitória, v. 17, n. 4, p. 6-16, out - dez 2015.
- ARGENTA, S.C *et al.* Plantas Medicinais: Cultura popular versus ciência . **Vivências** , Rio Grande do Sul, v. 7, n. 12, p. 51-60, 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 / Embrapa Amazônia Ocidental, n. 115, v. 18 , 2014.
- AZMIR, Jannatul et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013. Disponível em; <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877413000277>> acesso em 17 de jun. 2019.
- BAKER, D. D. et. al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural product reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.
- BARATA, L. E.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H. . Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, nov 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00240-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00240-5). Acesso em:13 jun. 2019.
- BARROS, A. J. **Ossaim O Orixá E Nossos Chás Volume Único**. Clube de Autores (managed), p. 333, São Paulo, 2010.
- BARROS, J. F. P.; NAPOLEÃO, E. **Ewé òrìsà: uso litúrgico e terapêutico dos vegetais nas casas de candomblé Jêje-Nagô**. Bertrand Brasil 2ed. Rio de Janeiro 2003.
- BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities in *sideritis italica* (miller) greuter et burdet essential oils. **journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 240–248, 2006.
- BERNAL, M. et al. Altitudinal and seasonal changes of phenolic compounds in *Buxus sempervirens* leaves and cuticles. **Plant physiology and biochemistry**, v. 70, p. 471-482, 2013.

BERNARD, C. B. ; KRISHNAMURTY, I. H.; CHAURET, D. . Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics . **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 6, p. 801–814, 1995. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02033462>. Acesso em: 13 jun. 2019.

BERNUCI, K; IWANAGA, C; FERNANDEZ-ANDRADE, C. Evaluation of chemical composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of piper species. **Molecules**, V. 21, 2016.

BEZERRA, R. H. S.. **Voláteis induzidos por herbivoria em plantas de mandioca e atratividade a ácaros (acari: tetranychidae: phytoseiidae)**. 2017. 67 F. Dissertação (pós-graduação em ecologia e conservação) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2017.

BIZZO, H.; REZENDE, A. M. . Óleos essenciais no brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectiva. **Química Nova**, V. 32, N. 3, P. 588-594, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a05v32n3>> Acesso em: 17 mar. 2019.

BOHATCH JÚNIOR , M. S.; ESMERINO, L. A.; SILVA, Rosi Z.. Efeitos Da Atividade Antimicrobiana Do Extrato Bruto Etanólico Da *Piper solmsianum* & *Equisetum arvense*. **Electronic Journal of Pharmacy**, vol, v. XIII, n. 2, p. 100 - 106, 2016. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/35822/pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC Nº 26 de 13 de Maio de 2014**. Guia para o registro de fitoterápico.

BRAZ, L. ; ALMEIDA, R. ; CAMPOS , I. . Levantamento etnobotânico na região de Sumé, Cariri paraibano: bioprospecção e conservação de plantas utilizáveis em biofarmacologia . In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO SOCIAL, 9º. 2017. **Anais...** Campina Grande. Disponível em: <<http://www.eneds.net/anais/index.php/edicoes/eneds2012/paper/view/228>>. Acesso em: 9 abr. 2019.

BRITO, Natilene Mesquita et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

BUENDIA, B. et al. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3916-3926, 2009.

CABRAL, M. M.; ALENCAR, G. A.; GUIMARÃES, A. E.. Larvicidal Activity of Grandisin Against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 1, p. 103-105, 2009. Disponível em: <https://bioone.org/journals/Journal-of-the-American-Mosquito-Control-Association/volume-25/issue-1/08-5828.1/Larvicidal-Activity-of-Grandisin-Against-span-classgenus-speciesAedes-aegyptispan/10.2987/08-5828.1.short>. Acesso em: 13 jun. 2019.

CAMPOS, M. P.. **Analysis of antimicrobial potential of extract, fractions and pure compounds obtained from *piper solmsianum* c. Dc. Var. *Solmsianum* (piperaceae)**.. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

CAPELLO, Christian; FISCHER, Ulrich; HUNGERBÜHLER, Konrad. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 927-934, 2007.

CELESTINO, C.O.; VARÃO, C.A.R.; VELUDO, H.H.; BRAGA, A.G.S.; LIMA, R.A. Ação inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Jacq.). **South Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v.3, n.2, p.03-09, 2016.

CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *eugenia caryophyllata* (*syzigium aromaticum* l. myrtaceae): a short review. **phytotherapy**, v. 506, p. 501–506, 2007.

CHAVES, T. P.. **Variação sazonal na produção de metabólitos secundários e na atividade antimicrobiana de espécies vegetais do semiárido brasileiro**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012.

CHEN, J. ; WANG, T. ; HWANG, T. . Neolignans, a Coumarinolignan, Lignan Derivatives, and a Chromene: Anti-inflammatory Constituents from *Zanthoxylum avicennae*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 212-217, jan 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np070594k>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

CHEN, W *et al.* Anti-tumor effect of a-pinene on human hepatoma cell lines through Q6 inducing G2/M cell cycle arrest. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. xxx, p. 1-7, 12 fev 2015.

CHOU, C.. Biochemical interactions among plants: Allelopathy as ecosystem regulator. **Medical and health sciences**, v. V, p. 187, 2010. Disponível em: <<http://www.eolss.net/sample-chapters/c03/E6-54-10-05.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

COLE, R. A. et al. Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *eugenia zuchowskiae* from monteverde, costa rica. **journal of natural medicines**, v. 61, n. 4, p. 414–417, 2007.

COSTA, S.S; ALMEIDA, A.P; FRATTANI, F. Metabólitos Secundários de Origem Vegetal: Uma Fonte Potencia de Fármacos Antitrombóticos. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 172-180, 2010. Disponível em:<https://www.researchgate.net/profile/Douglas_Siqueira_Chaves/publication/262548305_Secondary_metabolites_from_vegetal_origin_A_potential_source_of_antithrombotic_drugs/links/0f31753b54c9592d23000000.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2019.

DA SILVA, J. K. *et al.* Essential Oils from Neotropical Piper Species and Their Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, dez 2017.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DE BARROS, F.; ZAMBARDA , E.; HEINZMANN, B.. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) n.e. brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861 - 867, 06 03 2009.

DEFAVERI, A. C.; SATO, A.; BORRÉ, L. B.; AGUIAR, D. L.; SAN GIL, R. A.; ARRUDA, R. C.; RIEHL, C. A. *Eugenia neonitida* Sobral and *Eugenia rotundifolia* Casar.(Myrtaceae) essential oils: composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1531-1538, 2011

DOLL, H. V. D.; KRATZ, P. D. A. generalization of retention index system including linear temperature programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p.463-471, 1963.

- DOS SANTOS, E. C.; COSTA-BARROS, D. A.; DE OLIVEIRA, S. R. . Validação de Métodos Analíticos na Indústria Farmacêutica . **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 2, n. 1, 2016. Disponível em:<<http://revistas.unifan.edu.br/index.php/RevistaICS/article/view/202/148>>. Acesso em: 20 mai. 2019
- DOS SANTOS, P. R; MOREIRA, D. L; GUIMARÃES, E. F. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547 - 551, mar 2001.
- DUARTE, D.F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Revista Brasileira Anestesiol** . Florianópolis - SC , v. 55, n. 1, p. 135-146, jan-fev 2005.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.
- DUARTE, M. C. T. et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.
- DUTRA, F. L.; HOFFMANN-RIBANI, R; RIBANI, M. Determination of phenolic compounds by isocratic high performance liquid chromatographic method during storage of yerba-mate. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123, 2010.
- ESTRADA, C.S.D. **Relação estrutura-atividade e descritores admetox de neolignanas isoladas de piper rivinoides kunth (piperaceae) com atividade antileishmania e caracterização de um potencial alvo**. trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, 2019, 64pp.
- FELIPE, D. F. et al. Analysis of neolignans compounds of Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck by HPLC. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 41, n. 4, p. 1371-1375, 2006.
- FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829-1829, 2010.
- FIRMO, W. C *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais . **Caderno de Pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 90-95, dez 2011.
- Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>> . Acesso em: 25 Jun. 2019
- FLORES, N. et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 621-627, 2009.
- FOGLIO, M. A.; LONGATO, G. B; SOUZA, I. M.. Identification of eupomatenoïd-5 neolignans isolated of Piper regnellii(Miq.) C. DC. Var regnellii with in vitro anticancer activity. In: Annual Meeting Of The Brazilian Chemical Society Chemistry Making A Better Future, Brazil. 33. ed. **Anais...** BRASIL, 2010. Disponível em:<https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:42035254>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- FONTENELE, R.P; SOUSA, D.M; CARVALHO, A.L. Fitoterapia na Atenção Básica: olhares dos gestores e profissionais da Estratégia Saúde da Família de Teresina (PI), Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 8, p. 2385-2394, 2013.
- FREITAS, P. R. et al. GC-MS-FID and potentiation of the antibiotic activity of the essential oil of Baccharis reticulata (ruiz & pav.) pers. and α -pinene. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112106, 2020

- GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca (biologia)**, v. 2, n. 3, 2011
- GARCIA, F. P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; UEDA-NAKAMURA, T.. Eupomatenoid-5 Isolated from Leaves of Piper regnellii Induces Apoptosis in Leishmania amazonensis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 11, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/940531/cta/>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- GASPARETTO, A. et al. Seasonal variation in the chemical composition, antimicrobial and mutagenic potential of essential oils from piper cernuum. **industrial crops and products**, v. 95, p. 256-263, 2017.
- GHIRALDI-LOPES, L. D.; CAMPANERUT-SÁ, P. A.; MENEGUELLO, J. E. . Proteomic profile of Mycobacterium tuberculosis after eupomatenoid-5 induction reveals potential drug targets. **Future Microbiology**, v. 12, n. 10, 2017. ISSN (online): 1746-0921. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fmb-2017-0023>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- GHOSH, R. et al. An overview of various piper species for their biological activities. **international journal of pharma research & review**, V. 3, N. 1, P. 67-75, 2014.
- GOBBO-NETO, L.; LOPPE, N. P.. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GONÇALVES, J. Estudo Químico de Óleos Essenciais . **Mostra Científica de Farmácia**, Quixada – CE v. 4, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/mostracientificafarmacia/article/view/1996/1695>>. Acesso em: 15 mar. 2019.
- GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Rosa M. et al. Validation of an HPLC-DAD method for the determination of plant phenolics. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 5, p. 689-693, 2019.
- GOTTLIEB, O. R. et. al. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, p. 97-102, 1998a. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81231998000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 10 jun. 2019.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R MB. Review Article Number 132 Evolution of Angiosperms via Modulation of Antagonisms. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 1-15, 1998b
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R.. Biodiversidade: um enfoque químico-biológico. **editora UFRJ**, 1996.
- GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides, com atenção especial à química das neolignanais. **Química Nova**, v. 7, p. 250-273, 1984.
- GUIDELINE, ICH Harmonised Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In: **International conference on harmonization, Geneva, Switzerland**. 2005. p. 11-12.
- GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C.. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

- HUANG, X. ; ZHOU, C.; LI, L. Cytotoxic and antioxidant dihydrobenzofuran neolignans from the seeds of *Crataegus pinnatifida*. **Fitoterapia**, v. 91, Dezembro 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X13002463>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- INMET. In: “Instituto Nacional de Meteorologia” – Dados climatológicos. Disponível em: . Acesso em 29 de jun. 2020.<http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE8_02.pdf>
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008 – **Orientação sobre validação de Métodos analíticos**. Revisão 05, 2016. Disponível em:
- JUNIOR, C. R. et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Piper aduncum* L.(Piperaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 21, p. 3800-3805, 2012
- KANG, J. S. et al. Inhibition of acetylcholinesterases of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, by phytochemicals from plant essential oils. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 105, n. 1, p. 50-56, 2013.
- LADEIRA-MACEDO, A. *et al.* An Overview of Neolignans of the Genus *Piper* L.: Isolation Methods and Biological Activities. **Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 693-720, 2017.
- LANÇAS, F.M.; A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**. VOL. 1 (2), 2009.
- LAPORTE, E. et al. Neurocognitive effects of kava (*Piper methysticum*): a systematic review. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 26, n. 2, p. 102-111, 2011.
- LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTIA, V.; UEDA-NAKAMURA, T.. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoïd-5: Confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radical Biology and Medicine** , v. 60, p. 17-28, jul 2013. Disponível em:<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584913000099>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- LEAL, A. L. et al. Chemical identification and antimicrobial potential of essential oil of *Piper rivinoides* kunth (BETIS-WHITE). **Food and Chemical Toxicology**, v. 131, p. 110559, 2019.
- LEAL, T. C. A. S et al. Extração laboratorial simplificada de óleo essencial de capim-cidreira por arraste a vapor/simplified laboratory extraction of lemon grass essential oil by steam distillation. **Ceres**, v. 48, n. 280, 2015.
- LEE, Yee Ling; DING, Phebe. Production of essential oil in plants: ontogeny, secretory structures and seasonal variations. **Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews**, v. 2, n. 1, 2016
- LEITE, A. M. et al. Efeito inibitório de eugenol, beta-pineno e alfa-pineno sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 121-126, 2007.
- LEITE, A.; MORAES, A.; SILVA DO Ó, K. A. Etnobotânica de Plantas Medicinais do Município de São José de Espinahas. **Revista Biodiversidade**.Rondonópolis - MT, v. 14, n. 1, p. 22, 2015.
- LEMONS, C. et al. Supercritical extraction of neolignans from *Piper regnelli* var. *pallenscens*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 64-70, 2012.

LEMOS, C.; SVIDZINSK, T. I.; BAEZA, L.. Evaluation of antifungal activity of extracts of *Piper regnellii* obtained by supercritical fluid extraction. **Natural Product Research** , v. 27, 2013.

LI, W. et al. Influence of ethanol concentration of extraction solvent on metabolite profiling for *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract by ¹H NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Process Biochemistry**, 2020.

LIMA, H. R.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V.. Influência de fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas . **FLORAM**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003. Disponível em: <https://www.floram.org/article/588e2205e710ab87018b4600>. Acesso em: 7 Ago. 2019.

LONGATO, G. B.; RIZZO, L. Y; SOUSA, I. M. In vitro and In vivo Anticancer Activity of Extracts, Fractions, and Eupomatenoid-5 Obtained from *Piper regnellii* Leaves. **Planta Médica** , v. 77, n. 13, 2011. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0030-1270889>. Acesso em: 13 jun. 2019.

LOPES, M. A.; FERRACIOLI, K. R.; SIQUEIRA, V. L . In vitro interaction of eupomatenoid-5 from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* and anti-tuberculosis drugs. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 12, p. 1513-1515, 2014. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtd/2014/00000018/00000012/art00023>. Acesso em: 13 jun. 2019.

MAÇAL, J.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.. Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2060-2069, 2010. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/15/4/2060>. Acesso em: 13 jun. 2019

MACEDO, Arthur Ladeira et al. Isolation of a larvicidal compound from *Piper solmsianum* C. DC.(Piperaceae). **Natural product research**, v. 32, n. 22, p. 2701-2704, 2018.

MALAVASI, U. C; DAVIS, A.; MALAVASI, M. M.. Lignina em Plantas Lenhosas sob Estresse Hídrico: Uma Revisão. **Floresta e Ambiente**, v. 23, n. 4, p. 589-597, 2016.

MALDANER, L.; JARDIM, I.. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANDARINO, A. C.; GOMBERG, E.. Água e ancestralidade Jeje-Nagô: possibilidade de existências. **Textos de história**, v. 17, n. 1, p. 143-162, 2009.

MARQUES, A. M. ; MOREIRA, D. L. . Development of Phyto-therapeutic Medicines from Native Species from the Brazilian Atlantic Forest. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, p. 71-77, 2014.

MARQUES, A. M. et al.Larvicidal activity of *Ottonia anisum* metabolites against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 54, p. 61, 2017.

MARQUES, A. M. et al. Chemistry and biological activity of essential oils from *Piper clausenianum* (Piperaceae). **Natural product communications**, v. 5, n. 11, p. 1934578X1000501131, 2010.

MARQUES, A. M. et al.Separation of Volatile Metabolites from the Leaf-Derived Essential Oil of *Piper mollicomum* Kunth (Piperaceae) by High-Speed Countercurrent Chromatography. **MOLECULES**, v. 23, p. 3064, 2018.

- MARQUES, A. M. et al. Hypoglycemic Effect of the Methanol flower Extract of *Piper Clausenianum* and the Major Constituent 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone in Streptozotocin Diabetic Rats.. **INDIAN J PHARM SCI**, v. 77, p. 237-243, 2015.
- MARQUES, G.S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides em folhas *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v.35, n.3, p.517-522, 2012.
- McKITTRICK, B. A. ; STEVENSON, R. . Natural Benzofurans. Synthesis of Eupomatenoids-I, -3, -4, -5, -6, -7, and -13. **Journal of the chemical society**, v. 1, n. 475, 1983.
- MEDEIROS, Vivianne Marcelino et al. Chemical composition and modulation of bacterial drug resistance of the essential oil from leaves of *Croton grewoides*. **Microbial pathogenesis**, v. 111, p. 468-471, 2017.
- MEHTA, A. K. et al. The effect of the essential oil of *eugenia caryophyllata* in animal models of depression and locomotor activity. **nutritional neuroscience**, v. 16, n. 5, p. 233– 238, 2013.
- MENDES, C. E. et al. Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422012000900016&script=sci_arttext&tlng=es. Acesso em: 7 Ago. 2019.
- MIRANDA, C. A. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza - CE, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.
- MONZOTE, L et al. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, mar 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762010000200010&script=sci_arttext&tlng=es. Acesso em: 8 Ago. 2019
- MOREIRA, D. L. et al. Estudo Químico e da Atividade leishmanicida de frações de *Piper cabralanum* C.DC. (Piperaceae). **Revista Fitos (ALANAC)**, v. 5, p. 92-98, 2010.
- MOREIRA, D. L. et al. Bioactive Neolignans from the Leaves of *Piper rivinoides* Kunth (Piperaceae). **Records of Natural Products**, V. 10, P. 472-484, 2016.
- MOREIRA, D. L. et al. Antimicrobial activity of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 6, p. 3800-3805, 2012.
- MOREIRA, F.. **Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae)**. São Paulo, 2015. Tese (Botânica) - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-09032016-084046/en.php>. Acesso em: 10 jun. 2019.
- MUNDINA, M. et al. Leaf essential oils of three panamanian piper species. **Phytochemistry**, Great Britain, v. 47, n. 7, p. 1277 - 1288, 1998.
- MUSTAFA, A; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica chimica acta**, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.
- NOGUEIRA, N.M.; SOARES, B.T.M.; ANDRADE, A.B.N.; SINGH, A.K.; Méritos comparativos da cromatografia em fase líquida de alta eficiência em escala convencional e minituarizada. **Revista Brasileira de Farmácia** Vol. 92 (2):44-50, 2011.

- OGUNWAND, E. I. A. et al. Studies on the essential oils composition de *Eugenia uniflora*, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 147–152, 2005.
- OLIVEIRA, G. L. et al. 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. et al. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Impresso), v. 24, p. 288-292, 2014.
- OLIVEIRA, G.L. et. al. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 743-753, 2013b.
- OOTANI, M. A. et al. Use of Essential Oils in Agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 2, p. 162-174, mai 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Marcio_Ootani/publication/296484491_Journal_of_Biotechnology_and_Biodiversity_Use_of_Essential_Oils_in_Agriculture/links/56d5b9f808aee73df6c0500a.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2019.
- ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, Ü. Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. **trends in analytical chemistry**, v. 30, n. 7, p. 978–989, 2011.
- PAVARINI, D. P.; LOPES, N. P. A ecologia química e a biossíntese dos terpenos voláteis das “arnicas-da-serra”(Lychnophora spp.). **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 242-261, 2016
- PELLIZZARO-ROCHA, K. J.; VEIGA-SANTOSB, P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 13, nov 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457911001420>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- PEREIRA, N. L. F. et al. Antibacterial activity and antibiotic modulating potential of the essential oil obtained from *Eugenia jambolana* in association with led lights. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 174, p. 144-149, 2017
- PEREIRA, Olívia R. et al. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1773-1780, 2013.
- PERIGO, C.V *et al.* 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. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016306082. Acesso em: 8 Ago. 2019.
- PESSINI, G. L. et al. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.

- PESSINI, G. L.; FILHOIL, B. P.; NAKAMURA, C. V.. Antifungal activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6, nov-dez 2005. On-line version ISSN 1678-4790. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532005000700007&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 13 jun. 2019.
- PONCI, V.; FIGUEIREDO, C. R. ; MASSAOKA , M. H.. Neolignans from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) Display in vitro Cytotoxic Activity and Induce Apoptosis in Leukemia Cells. **Molecules**, v. 20, n. 7, 2015. Disponível em:<https://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/12757>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. Londrina. **Planta**, v. 656, 2001.
- QUEIROZ, George Azevedo de; BARROS, Ana Angélica Monteiro de; GUIMARÃES, Elsie Franklin. Piper (Piperaceae) from Serra da Tiririca State Park, Niterói/Maricá, RJ, Brazil. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.
- QUEIROZ, T. B.; PEREIRA, N. N. D. J.; SILVA, J. C. R. L.; FONSECA, F. S. A. D.; MARTINS, E. Influence of water regime on initial growth and essential oil of *Eucalyptus globulus*. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, 2017.
- RAMOS, C.S. & KATO, M.J. Metabolism of neolignans from *P. regnellii* (Piperaceae) in the beetle *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae). **Chemoecology** v. 23, p. 143–148, 2013.
- RAMOS, Y. J. et al. Chemical composition of the essential oils of circadian rhythm and of different vegetative parts from *Piper mollicomum* Kunth-A medicinal plant from Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 92, p. 104116, 2020b
- RAMOS, Y. J. Seasonal Study of Essential Oil from Aerial Parts of *Peperomia galioides* Kunth (Piperaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, 2019.
- RAMOS, Y.J; FELISBERTO, J.R.S et al. Produção e variações químicas de óleos essenciais: uma breve revisão sobre os fatores que afetam a qualidade e a quantidade In: ANDRÉ LUIZ FRANCISCO (Org) Avanços Científicos, Tecnológicos e de Inovação na Botânica. E-book: Atenas, , p78 a 104.2020a.
- RINI, P.; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of melaleuca leucadendron linn . leaf oils. **The journal wood science**, v. 58, p. 429–436, 2012.
- ROCHA, F.A.G. et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**, v. 1, p. 49-61, 2015.
- ROYO, V.A.; SANTOS, F.F. ; SOUZA, V.A.. Biological activity evaluation of dibenzilbutirolactones lignans derivatives against *Leishmania braziliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 13, n. 2, 2003. Disponível em:http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2003000400007&script=sci_arttext. Acesso em: 13 jun. 2019.
- SADGROVE, Nicholas J.; GONÇALVES-MARTINS, Maximilien; JONES, Graham L. Chemogeography and antimicrobial activity of essential oils from *Geijera parviflora* and *Geijera salicifolia* (Rutaceae): Two traditional Australian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 104, p. 60-71, 2014

- SAWASDEEA, K.; CHAOWASKUB, T.; LIPIPUN, V.. New neolignans and a lignan from *Miliusa fragrans*, and their anti-herpetic and cytotoxic activities. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 32, p. 4259-4263, Ago 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403913009350>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- SCODRO, R. B. L. et al. Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 600-604, 2013.
- SEQUEIRA, E. B. Plantas com ação adaptogénica usadas no combate ao stress: Panax ginseng e Rhodiola rósea (Tese) – Universidade de Coimbra. Portugal. 2013.
- SHAH, S.; et al.. Validated HPLC method for identification and quantification of p-hydroxy benzoic acid and agnuside in *Vitex negundo* and *Vitex trifolia*. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 3, n. 6, p. 500-508, 2013.
- SILVA, A. C. R. da et al. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6305-6316, 2012
- SILVA, C.; GARCIA, V.A.S.; FRANCISCO, L.M.S.S. Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das cascas de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.) **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.18, n.1, Jan/Jun 2016.
- SILVA, D. D.. **Atividade antimicrobiana do conocarpano seus derivados e análogos frente a cepas resistentes de *staphylococcus aureus***. Itajaí, f. 67. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ, 2007. Disponível em: <https://siaiap39.univali.br/repositorio/handle/repositorio/1449>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- SILVA, W.; FERREIRA, A.. Utilização de plantas medicinais pela comunidade periférica do município de Ipameri - Goiás. In: CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG, III. 2016. **Anais eletrônicos...**Pirenópolis. Disponível em: <http://www.anais.ueg.br/index.php/cepe/article/view/7356>. Acesso em: 9 abr. 2019.
- SIMÕES, C.; et. al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis, 2010. 1104p.
- SIQUEIRA, M.R.P. et. al.. Atividade larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies de Piperaceae do Estado do Rio de Janeiro. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, p. 28-35, 2014.
- SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 435-440, 2010.
- SOUZA, S; VALVERDE, S; COSTA, N.. Chemical composition and antinociceptive activity of the essential oil of piper mollicomum and *Piper rivinoides* **Journal of Medicinal Plant**, V. 8, N. 22, P. 788-793, JUN 2014.
- TASIOULA-MARGARI, M.; TSABOLATIDOU, E.. Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Antioxidants**, v. 4, n. 3, p. 548-562, 2015.
- TULLIO, V. et al. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1544-1550, 2007.

VECHIA, C.A.D.; et al. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae) **Journal of Pharmaceutical Analysis** v. 3, Issue 6, p. 500-508, Dez 2016.

WATSON, R. R. (Ed.). **Polyphenols in plants: isolation, purification and extract preparation**. London: Academic Press, 2014. 331p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. Geneva: **WHO**, 2002.

WINK, M.. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. **Annual plant reviews**, v. 40, p. 1-19, 26 mar 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781444320503.ch1>. Acesso em: 10 jun. 2019.

XU, Q. et al. α -pinene regulates miR-221 and induces G2/M phase cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 6, dez 2018. Disponível em: <http://www.bioscirep.org/content/38/6/BSR20180980>. Acesso em: 20 Ago. 2019.

XU, W.; LI, X. Antifungal Compounds from Piper Species. **Current Bioactive Compounds**, v. 7, n. 4, p. 226-227, 2011. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cbc/2011/00000007/00000004/art00004>. Acesso em: 13 jun. 2019.

YANG, Z. et al. Comparative anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of (-)-pinene: effect on nucleocapsid (N) protein. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1044-1054, 2011.

APÊNDICES A – Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta (MSR) para avaliar os efeitos de solventes e o no tempo de extração no rendimento e no teores das substâncias das folhas de *P. rivinoides*.

Fatores	Rendimento					
	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	- 95% Confiança	+ 95% Confiança
Mean/Interc.	3,136735	0,304347	10,30643	0,000148	2,35439	3,919085
(1)Tempo de Extração (min)(L)	0,199978	0,484413	0,82565	0,446593	-0,84527	1,645180
Tempo de Extração (min)(Q)	-0,569834	0,745496	-1,52874	0,186874	-3,05603	0,776691
(2)Concentração Etanol (%) (L)	1,893266	0,484413	7,81674	0,000549	2,54131	5,031756
Concentração Etanol (%) (Q)	1,259615	0,745496	3,37927	0,019690	0,60287	4,435588
1L by 2L	-0,801218	0,593282	-2,70097	0,042735	-3,12752	-0,077354
	Conocarpano					
Mean/Interc.	0,106462	0,000878	121,3093	0,000068	0,102686	0,110238
(1)Tempo de Extração (min)(L)	0,002373	0,001397	3,3974	0,076793	-0,001265	0,010756
Tempo de Extração (min)(Q)	0,007331	0,002150	6,8202	0,020829	0,005412	0,023911
(2)Concentração Etanol (%) (L)	0,026142	0,001397	37,4295	0,000713	0,046273	0,058293
Concentração Etanol (%) (Q)	-0,034203	0,002150	-31,8212	0,000986	-0,077655	-0,059156
1L by 2L	0,002319	0,001711	2,7108	0,113398	-0,002723	0,011998
	Eupomatenoídes 6					
Mean/Interc.	0,875622	0,049319	17,75439	0,000010	0,748845	1,002400
(1)Tempo de Extração (min)(L)	0,030784	0,078498	0,78432	0,468363	-0,140217	0,263352
Tempo de Extração (min)(Q)	0,049491	0,120805	0,81936	0,449860	-0,211558	0,409523
(2)Concentração Etanol (%) (L)	0,201005	0,078498	5,12131	0,003703	0,200226	0,603796
Concentração Etanol (%) (Q)	-0,310259	0,120805	-5,13650	0,003656	-0,931058	-0,309977
1L by 2L	0,022882	0,096140	0,47601	0,654138	-0,201371	0,292899
	Eupomatenoídes 5					
Mean/Interc.	3,301500	0,015633	211,1816	0,000022	3,23423	3,36877
(1)Tempo de Extração (min)(L)	0,424591	0,024883	34,1271	0,000858	0,74212	0,95624
Tempo de Extração (min)(Q)	0,053414	0,038294	2,7897	0,108065	-0,05794	0,27159
(2)Concentração Etanol (%) (L)	-0,666298	0,024883	-53,5546	0,000348	-1,43966	-1,22553
Concentração Etanol (%) (Q)	0,000632	0,038294	0,0330	0,976666	-0,16350	0,16603
1L by 2L	-0,066442	0,030475	-4,3604	0,048780	-0,26401	-0,00176

APÊNDICE B –Tabela demonstrando notável correlação entre a umidade do ambiente e os rendimento dos OE coletados em A) Floresta da Tijuca/RJ e B) Serra da Tiririca-Niterói/RJ.

