

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
PARA RECURSOS AMAZÔNICOS (PPGCTRA).**

**VANESSA FARIAS DOS SANTOS AYRES**

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO  
ESSENCIAL, EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Piper callosum* RUIZ  
& PAV (PIPERACEAE).**

**ITACOATIARA-AM**

**2020**

**VANESSA FARIAS DOS SANTOS AYRES**

**Estudo químico e atividades biológicas do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum* Ruiz & Pav (Piperaceae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos**, da Universidade Federal do Amazonas, ICET-Itacoatiara como pré-requisito para obtenção do título de Mestre. Área: Desenvolvimento Científico para Recursos Amazônicos.

**Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr. Renata Takeara Hattori**  
**Coorientador Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães**

**ITACOATIARA-AM**

**2020**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A985e Ayres, Vanessa Farias dos Santos  
Estudo químico e atividades biológicas do óleo essencial, extrato  
bruto e frações de Piper callosum Ruiz & Pav (Piperaceae) /  
Vanessa Farias dos Santos Ayres . 2020  
95 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Renata Takeara Hattori  
Coorientadora: Anderson Cavalcante Guimarães  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos  
Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Metabólitos secundários. 2. Raiiella indica. 3. Suidasia  
pontifica. 4. Antioxidante. I. Hattori, Renata Takeara. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Vanessa Farias dos Santos Ayres

Estudo Químico e Atividades Biológicas do Óleo Essencial,  
Extrato Bruto e Frações de *Piper callosum* Ruiz & Pav  
(Piperaceae).

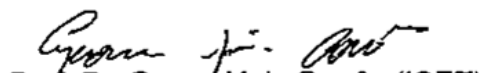
Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia para Recursos Amazônicos  
da Universidade Federal do Amazonas,  
como parte do requisito para obtenção  
do título de Mestre em Ciência e  
Tecnologia para Recursos Amazônicos,  
área de concentração Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico em Recursos  
Amazônicos.

Aprovado(a) em 11 de março de 2020.

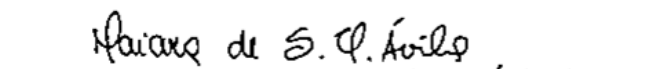
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Renata Takeara Hattori (PPGCTRA) (Presidente)  
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. Geone Maia Corrêa (ICET)  
Universidade Federal do Amazonas



Profa. Dra. Maiara de Souza Nunes Ávila (ICET)  
Universidade Federal do Amazonas

*Ao Senhor Jesus, digno de toda honra, glória e  
louvor, pelos séculos dos séculos.*

*À minha mãe e meus filhos com muito amor.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder força e sabedoria para concluir este trabalho.

À minha mãe (Doracy), que esteve ao meu lado durante toda esta caminhada me dando apoio e cuidando dos meus filhos e de mim.

Aos meus filhos (Anderson Ayres, Milena Guedes e Andrew Ayres) por fazer parte da minha vida, pelos quais busco um futuro melhor.

Aos meus irmãos (Ana Paula, Paulo, Maicon e Alex) pelo incentivo.

Aos meus tios (Zilene, Dagmar e Herley), minha cunhada (Luana) e meus sobrinhos (Ana Maria, Gean Rafael e Maria Paula) pelo apoio recebido.

Às minhas colegas e irmãs na fé Naira Rodrigues e Adriana Gões pelo incentivo e apoio nas horas difíceis.

As colegas Regiane Gonçalves e Clycia Anaíze, parceiras de PIBIC e congressos científicos.

Aos alunos de PIBIC do Laboratório de Produtos Naturais: Análise Química e Atividades Biológicas do ICET, pela parceria e contribuição.

As novas amigas estabelecidas do Laboratório Q-BIOMA, especialmente a Sara Flores e Thais Sampaio, pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus pastores (Ednelson e Lina) e líder de célula (Eriete) que estiveram em oração para que tudo desse certo nas etapas deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Takeara Hattori, mulher virtuosa, corajosa, paciente, inteligente e delicada. Palavras seriam poucas para descrever a orientação recebida, foi excelente. Muito obrigada por está ao meu lado durante todos esses anos na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães, que mesmo enfrentando os percalços da vida, me orientou com paciência e presteza e sempre me incentivou a nunca desistir.

Ao Prof. Dr. Geone Maia Côrrea e Prof.<sup>a</sup> Dra. Mayara de Souza Nunes Ávila que gentilmente aceitaram participar da avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Geraldo José Nascimento Vasconcelos pela parceria na realização dos ensaios acaricida.

Ao Centro Acadêmico Disciplinar-Central Analítica- da Universidade Federal do Amazonas pelas análises realizadas.

À Universidade Federal do Amazonas por proporcionar a oportunidade de cursar o Mestrado na cidade onde resido. Além de todo conhecimento adquirido durante a realização do Mestrado.

À FAPEAM pelo apoio financeiro.

*“Ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”*

*1 Coríntios 13:2*

## RESUMO

*Piper callosum* (Piperaceae) é uma espécie medicinal endêmica da região Amazônica, conhecida como “óleo elétrico”, utilizada pela população como afrodisíaco, adstringente, digestiva, antidiarreica, hemostática local, antileucorreica, em picadas de mosquito. Os estudos quanto ao seu perfil químico e atividade biológica ainda são escassos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar rendimento, perfil químico, atividade acaricida e antioxidante do óleo essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum*, a fim de fornecer dados científicos que contribuam com a ação biológica desta espécie medicinal amazônica. Os rendimentos dos óleos essenciais obtidos no período de chuva (janeiro de 2018-2019) e período de seca (outubro de 2018-2019) não sofreram influência da época de coleta. O fenilpronoide foi a classe de substâncias química majoritária nos óleos essenciais identificadas por CG-EM e os seus constituintes majoritários foram o safrol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno. A ação fumigante mostrou que o percentual de mortalidade de *Suidasia pontifica* aumentou com o tempo de exposição e concentração para os óleos essenciais avaliados. Quanto as concentrações respostas (CL<sub>25%</sub> e CL<sub>50%</sub>), as mesmas foram significativas com  $p \leq 1,39.10^{-4}$ . As análises do perfil químico do extrato bruto e frações em tubos de ensaios, mostraram a presença de saponinas, esteroides livres, flavanonol, flavanóis, taninos flobabênicos, xantonas e catequinas. Através do método fotolorimétrico de radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) foi possível obter CI<sub>50</sub> de 89 e 91  $\mu\text{g/mL}$  para as frações butanólica e hidroalcóolica, respectivamente. O extrato bruto e frações mostraram, também, mortalidade corrigida maior que 50%, para *Raoiella indica*, em 24 h de exposição na concentração de 5 mg/mL. Para todas as amostras e tempos avaliados as inclinações das linhas de respostas (CL<sub>25%</sub> e CL<sub>50%</sub>) foram significativas com  $p \leq 8,14.10^{-04}$ , indicando letalidade na população de *R. indica*. Quanto ao isolamento das substâncias químicas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, a mesma permitiu identificar o ácido clorogênico, neoclorogênico e/ou seu derivado estereoisomérico. Portanto, a espécie *P. callosum*, torna-se uma fonte promissora de metabólitos secundários de interesse para a indústria de alimentos, cosméticos, perfumarias, agroquímicos e entre outros.

**Palavras-chave:** Metabólitos secundários, *Raoiella indica*, *Suidasia pontifica*, Antioxidante.



## ABSTRACT

*Piper callosum* (Piperaceae) is a medicinal species endemic to the Amazon region, known as “electric oil”, used by the population as an aphrodisiac, astringent, digestive, antidiarrheal, local hemostatic, antileukorrheic, in mosquito bites. This species has still been little studied regarding its chemical profile and biological activity. Thus, the objective of this work was to evaluate yield, chemical profile, acaricidal and antioxidant activity of essential oil, crude extract and fractions of *Piper callosum*, in order to provide scientific data that contribute to the biological action of this Amazonian medicinal species. The yields of essential oils obtained in the rainy season (January 2018-2019) and dry season (October 2018-2019) were not influenced by the collection period. Phenylpropanoid was the major chemical substance class in essential oils identified by CG-EM and its major constituents were safrole,  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene. The fumigant action showed that the mortality percentage of *Suidasia pontifica* increased with the time of exposure and concentration for the evaluated essential oils. As for the response concentrations (LC<sub>25%</sub> and LC<sub>50%</sub>), they were significant with  $p \leq 1.39 \cdot 10^{-4}$ . The analysis of the chemical profile of the crude extract and fractions in test tubes, showed the presence of saponins, free steroids, flavanone, flavanols, flobaphenol tannins, xanthones and catechins. Through the DPPH free radical photometric method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) it was possible to obtain CI<sub>50</sub> of 89 and 91  $\mu\text{g/mL}$  for the butanolic and hydroalcoholic fractions, respectively. The crude extract and fractions also showed corrected mortality greater than 50%, for *Raoiella indica*, in 24 h of exposure in the concentration of 5 mg/mL. For all samples and times evaluated, the slopes of the response lines (LC<sub>25%</sub> and LC<sub>50%</sub>) were significant with  $p \leq 8.14 \cdot 10^{-04}$ , indicating lethality in the population of *R. indica*. As for the isolation of chemical substances by High Performance Liquid Chromatography, it allowed the identification of chlorogenic, neochlorogenic acid and / or its stereoisomeric derivative. Therefore, the species *P. callosum*, becomes a promising source of secondary metabolites of interest to the food, cosmetics, perfumery, agrochemicals and other industries.

**Keywords:** Secondary metabolites, *Raoiella indica*, *Suidasia pontifica*, Antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav. ....	21
Figura 2 - Substâncias majoritárias presentes no óleo essencial de <i>P. callosum</i> .....	21
Figura 3 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabolitos secundários em planta. ....	25
Figura 4 - Fluxograma de obtenção do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> . ....	32
Figura 5 - Rendimento do óleo essencial das folhas de <i>P. callosum</i> em função da temperatura (°C).....	46
Figura 6 - Rendimento do óleo essencial em função da precipitação pluviométrica. Dados do Instituto de Meteorologia – INMET .....	47
Figura 7 - Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial, mais denso (OE1), de <i>P. callosum</i> (31/01/2019).....	48
Figura 8 - Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial menos denso (OE2) de <i>P. callosum</i> (31/01/2019).....	48
Figura 9 - Área (%) do safrol, $\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno obtidos das partes aéreas de <i>P. callosum</i> . ....	53
Figura 10 - Espectros de massas do Safrol .....	54
Figura 11 - Espectro de massas e estrutura do $\alpha$ -pineno .....	55
Figura 12 - Espectro de massas e estrutura do $\beta$ -pineno .....	55
Figura 13 - Substâncias fenólicas reveladas por meio de Cromatografia em Camada Delgada. ....	57
Figura 14 - Substâncias terpênicas e fenólicas reveladas em Cromatografia em Camada Delgada.....	58
Figura 15 - Atividade antioxidante por meio de Cromatografia em Camada Delgada .....	61
Figura 16 - Sistemas de partição S4 e S2. ....	73
Figura 17 - Sistemas de partição S6, S3, S1.....	74
Figura 18 - Perfil das subfrações obtidas da fração FBU em HPCCC .....	74
Figura 19 - Fluxograma de rendimentos das subfrações reunidas, obtidas por HPCCC. ....	75
Figura 20 - Subfrações reunidas das 6 corridas em HPCCC.....	76
Figura 21 - Cromatograma da Fração FBU-5 por CLAE-UV.....	77
Figura 22 - Substâncias isoladas da FBU-5.....	77
Figura 23 - Espectro de massas da substância 1 .....	78

Figura 24 - Mecanismo de fragmentação do ácido clorogênico.....	79
Figura 25 - Espectro de massas da substância 2.....	80
Figura 26 - Espectro de massa da substância 3 .....	81
Figura 27 - Etapas de fragmentação proposto para os isômeros do ácido clorogênico.....	82
Figura 28 - Estruturas dos compostos fenólicos utilizados neste estudo.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Identificação dos constituintes em pH 3; 8,5 e 11.....	33
Tabela 2- Identificação dos constituintes em pH 3 e 11.....	34
Tabela 3- Sistemas de solventes utilizados em CCC.....	41
Tabela 4- Rendimentos do óleo essencial de <i>P. callosum</i> .....	45
Tabela 5- Constituintes químicos identificados dos óleos essenciais de <i>P. callosum</i> .....	50
Tabela 6- Massa e rendimento do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> .....	56
Tabela 7- Fitoquímicos analisados do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> .....	60
Tabela 8- Atividade antioxidante, CI50 e fenóis totais do extrato bruto, frações e subfrações de <i>P. callosum</i> .....	62
Tabela 9- Mortalidade corrigida (média $\pm$ desvio padrão) de <i>S. pontifica</i> em diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações de três óleos essenciais de <i>P. callosum</i> aplicados por fumigação.....	63
Tabela 10- Inclinações das linhas de respostas ( $\pm$ desvio padrão), concentração letal média (CL), Intervalo de confiança inferior (Mín.) e superior (Máx.) para testes com 24, 48 e 72 h de exposição de uma população de <i>S. pontifica</i> a óleos essenciais de <i>P. callosum</i> aplicados por fumigação.....	66
Tabela 11- Mortalidade corrigida (média $\pm$ desvio padrão) de <i>R. indica</i> em diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> avaliando o efeito residual.....	69
Tabela 12- Coeficientes de inclinação da linha de resposta (Incl.), $\pm$ desvio padrão, concentração letal média (CL), inferior (Mín.) e superior (Máx.) para testes com 24, 48 e 72 h após avaliar o efeito residual do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> sobre uma população de <i>R. indica</i> .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

AA – Atividade antioxidante	HPCCC- Cromatografia em contra corrente de alto desempenho
AcOEt - Acetato de etila	I- Fase inferior
CCC- Cromatografia contracorrente	IC- Intervalo de confiança
CCD- Cromatografia em camada delgada	IK- Índice de Kovat's
CG/EM- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	INMET- Instituto nacional de meteorologia
CH <sub>3</sub> COOH- Ácido acético	IA- Índice de aritmético
CH <sub>3</sub> O <sub>2</sub> - Ácido fórmico	NM- Nanômetro
CI <sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% (de DPPH)	NP- 2-aminoetil difenilborinate
CL- Concentração letal média	OE- Óleo essencial
CLAE- Cromatografia líquida de alto desempenho	OE1- Óleo essencial transparente, mais denso que a água
DMSO- Dimetil sulfoxido	OE2- Óleo essencial, amarelo claro, menos que a água
DP- Desvio padrão	OE3- Óleo essencial, transparente, menos denso que a água
DPPH- 2,2-difenil-picril-hidrazil	PEG- Polietileno glicol
EXTB- Extrato bruto	RF- Fator de retenção
FAC- Fração acetato de etila	Rpm – Rotações por minuto
FBU- Fração butanol	S - Fase superior
FCL- Fração clorofórmio	USP – Universidade de São Paulo
FHD- Fração hidroalcoólica	UV – Ultravioleta
FHEX- Fração hexano	

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. Família Piperaceae .....	20
2.2. <i>Piper callosum</i> .....	20
2.3. Metabolitos Secundários .....	22
2.4. Óleo Essencial.....	22
2.5. Variação sazonal .....	24
2.6. Ácaro Fitófago: <i>Raoiella indica</i> .....	25
2.7. Ácaro de Produtos Armazenados: <i>Suidasia pontifica</i> Oudemans. ....	26
2.8. Antioxidantes .....	26
2.9. Cromatografia Contra Corrente – CCC .....	27
3. METODOLOGIA .....	29
3.1. Materiais e equipamentos utilizados.....	29
3.2. Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial.....	29
3.3. Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais. ....	30
3.4. Extração e Fracionamento das Folhas de <i>Piper callosum</i> .....	31
3.5. Prospecção fitoquímica para caracterização de fenóis e taninos. ....	33
3.6. Prospecção fitoquímica para caracterização de triterpenoides e esteroides (Lieberman-Buchard).....	34
3.7. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de Saponinas .....	34
3.8. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de Alcaloides .....	35
3.9. Avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD).....	35
3.10. Ação fumigante de óleos essenciais sobre <i>Suidasia pontifica</i> . ....	36
3.11. Ação residual de contato dos extratos brutos e suas respectivas frações sob <i>Raoiella indica</i> .....	37

3.12. Análise de dados da ação fumigante e residual de contato.....	38
3.13. Ensaio de Atividade Antioxidante .....	38
3.13.1. Qualitativo .....	38
3.13.2. Quantitativo .....	39
3.13.3. Determinação de Fenóis Totais .....	39
3.14. Separação dos Constituintes Químicos por Cromatografia em Contra Corrente de Alto Desempenho – HPLC (High Performance Counter Current Chromatography) .....	40
3.15. Avaliação dos Constituintes Químicos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho – CLAE .....	42
3.16. Isolamento dos Constituintes Químicos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho - CLAE.....	42
3.17. Espectrometria de Massas das Substâncias Isoladas .....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1. Rendimento do óleo essencial de <i>P. callosum</i> em função da sazonalidade.....	44
4.2. Rendimento do óleo essencial de <i>P. callosum</i> em função da temperatura (°C).....	45
4.3. Rendimento do óleo essencial de <i>P. callosum</i> em função do volume hídrico.....	46
4.4. Determinação da composição química do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas – CG/EM .....	47
4.5. Perfil químico do extrato bruto e das frações por cromatografia em camada delgada.....	55
4.6. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de Grupos Fenólicos .....	58
4.7. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de terpenoides e esteroides .....	59
4.8. Teste para Saponinas .....	59
4.9. Ensaio antioxidante qualitativo in vitro do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> ...	60
4.9.1. Ensaio antioxidante quantitativo .....	61
4.10. Ação fumigante de óleos essenciais sobre <i>Suidasia pontifica</i> .....	62
4.10.1. Mortalidade (%) do óleo essencial de <i>P. callosum</i> .....	62
4.10.2. Concentração Letal do óleo essencial de <i>P. callosum</i> frente <i>S. pontifica</i> .....	64

4.11. Efeito residual do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> sobre <i>R. indica</i> .....	67
4.11.1. Mortalidade (%) do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> .....	67
4.11.2. Concentração letal (CL) do extrato bruto e frações de <i>P. callosum</i> .....	70
4.12. Fracionamento em HPCCC .....	73
4.13. Isolamento e Identificação .....	76
4.13.1. Substância 1 .....	78
4.13.2. Substância 2 .....	79
4.13.3. Substância 3 .....	80
5. CONCLUSÃO .....	85
REFERENCIAS .....	87



## 1. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica vegetal com aproximadamente 250 mil espécies data de 90 a 130 milhões de anos (LAMBADEIRA *et al.*, 1994). Essa enorme diversidade da flora é comparável com a diversidade estrutural de metabólitos secundários, um número estimado em mais de 200 mil, incluindo compostos fenólicos em geral, isoprenoides, alcaloides, policetideos, dentre outros (DIXON, 2001; TAKEARA *et al.*, 2017). A biossíntese, acúmulo e flutuação do conteúdo desses metabólitos secundários estão relacionados diretamente a fatores genéticos, ontogênicos, morfogenéticos e ambientais (GOBBO-NETO, 2007; VERMA & SHUKLA, 2015).

Existe também uma infinidade de substâncias químicas com propriedades tóxicas utilizadas como inseticidas botânicos no controle de pragas na agricultura (ZOUBIRI & BAALIOUAMER, 2014). Estudos relatam que os metabólitos vegetais podem ter efeitos repelente, fumigante, de toxicidade de contato, de inibição de processos enzimáticos e de alteração de variáveis reprodutivas, que matam ou reduzem o desempenho reprodutivo de ácaros (LABORDA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2015). Em sua maioria apresentam propriedades neurotóxicas, atuando em alvos no sistema nervoso central, como os canais iônicos de membrana, na enzima acetilcolinesterase e os receptores de neurotransmissores (RATTAN, 2010).

Os metabólitos secundários apresentam, também, propriedades antioxidantes combatendo radicais livres no interior do organismo humano ou quando estão sendo usados como aditivos alimentares. Assim, a ingestão de antioxidantes derivados de plantas está envolvida na prevenção de doenças degenerativas, causada por estresse oxidativo, como o câncer, Parkinson, Alzheimer ou aterosclerose (MOHARRAM & YOUSSEF, 2014; JAMWAL *et al.*, 2017). Seu mecanismo de ação está relacionado à quelação de íons metálicos, inibição de enzimas produtoras de radicais livres, ativação de antioxidante enzimático endógeno, prevenção da peroxidação lipídica de dano ao DNA e de modificação de proteína e destruição de açúcar (CAROCHO *et al.*, 2018).

As plantas medicinais são riquíssimas em metabólitos secundários e pouco tem sido investigado quanto ao seu potencial acaricida. No entanto, há alguns exemplos que demonstram que as plantas podem ser uma fonte promissora de novos agentes com atividade acaricida. Como, por exemplo, o óleo essencial obtido das folhas de *Xylopiya sericea*, coletada em Itapuama-PE, apresentou ação fumigante contra *Tetranychus urticae* Koch, com valor de CL<sub>50</sub>

de 4,08  $\mu\text{L} / \text{L}$  de ar por um período 72 h de exposição (PONTES *et al.*, 2006). Ferraz et al (2017) avaliaram o extrato aquoso das folhas de *Ziziphus joazeiro*, coletada na região de Serra Talhada-PE, quanto à toxicidade, repelência, eficiência e fitotoxicidade contra o ácaro vermelho *Tetranychus ludeni* e os resultados se mostraram promissores para o controle da infestação deste ácaro.

Os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia uniflora*, *Eugenia uvalha*, *Melaleuca leucadendra*, *Piper marginatum* e *Schinus terebinthifolius*, também foram investigados quanto ao potencial fumigante frente aos ácaros *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) e *Suidasia pontifica* Oudemans. Os resultados foram promissores no controle desses ácaros, sugerindo que os mesmos podem ser uma alternativa aos produtos sintéticos convencionais e parte de uma nova geração de compostos biologicamente ativos com potencial para uso em manejo de pragas de produtos armazenados (ASSIS *et al.*, 2011).

Ao longo do tempo, vários metabólitos secundários foram utilizados como inseticidas naturais, dentre eles podemos citar a rotenona e os rotenóides isolados das raízes de *Derris lonchocarpus* e *Tephrosia spp* (VIEGAS JUNIOR, 2003). Diferentes monoterpenos, como  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, 3-careno, mirceno, limoleno,  $\alpha$ -terpineno e canfeno, também foram isolados e apresentaram toxicidade frente a diferentes insetos (VIEGAS JUNIOR, 2003). No entanto, mais recentemente, a azadiractina, isolada de várias espécies da família Meliaceae, apresentou ação fagoibidora, e é o principal componente do inseticida Margosan-O<sup>®</sup> (STONE, 1992).

Diferentes metabolitos secundários, isolados de espécies vegetais, apresentam propriedade antioxidante. Por exemplo, cumarinas, lignanas, chalconas, flavonoides, ligninas e xantonas, que além de serem antioxidantes, possuem outras atividades biológicas, como anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral (KUMAR & PANDEY, 2013; SAHA & VERMA, 2015). Mas ainda, são poucos os relatos sobre o potencial antioxidante das espécies pertencentes ao gênero *Piper*, principalmente do bioma amazônico, dentre eles podemos citar o óleo essencial de *Piper aleyreanum* (SILVA *et al.*, 2014), os extratos de *Piper auritum* Kunth (CONDE-HERNÁNDEZ, 2014) e *Piper nigrum* (SAHA & VERMA, 2015).

Tendo em vista a importância dos compostos voláteis e fixos presentes nas espécies de *Piper* nativa da região amazônica e do potencial inseticida e farmacológico apresentado, o estudo com *P. callosum* pode contribuir fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novos acaricidas naturais para combater ácaros filófagos e de grãos armazenados, assim como, medicamentos ou aditivos alimentares com propriedades antioxidantes. Diante do exposto, objetivou avaliar o rendimento, perfil químico, atividade acaricida e antioxidante do óleo

essencial, extrato bruto e frações de *Piper callosum*, a fim de fornecer dados científicos que contribuam com a ação biológica desta espécie medicinal amazônica. Quanto aos objetivos específicos, os mesmos foram: i) avaliar o rendimento e composição química dos óleos essenciais em diferentes épocas do ano; ii) caracterizar quimicamente a(s) substância(s) dos óleos essenciais por CG-EM; iii) estudar o perfil químico do extrato bruto e das frações por meio de ensaios em tubos e cromatografia em camada delgada; iv) avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial, extrato bruto e frações através da inibição do radical DPPH; v) avaliar a toxicidade do extrato bruto e frações frente ao ácaro *Raoiella indica*; vi) testar a ação fumigante do óleo essencial sobre o ácaro *Suidasia pontifica*; e vii) identificar as substâncias químicas presentes no extrato bruto e frações.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Família Piperaceae

Compondo a enorme diversidade da flora está presente a família Piperaceae representada pelos gêneros *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Piper* e *Peperomia* (SAMAIN *et al.*, 2010). A família é muito importante como fonte de substâncias com atividades farmacológicas, especialmente do gênero *Piper*, o mais estudado do ponto de vista químico (DI STASI, 2002). Muitas substâncias químicas já foram encontradas: amidas, fenilpropanoides, cromonas, lignanas, neolignanas (MARTINS *et al.* 2003) e alcaloides (GUTIERREZ, *et al.* 2013). Outra grande importância do gênero *Piper* está baseada não somente na utilização de suas inúmeras espécies como plantas medicinais, mas também como fonte de matéria-prima para a indústria farmacêutica, de cosmético e de perfumarias (LEAL, 2000).

O gênero *Piper* também é conhecido por produzir substâncias com atividade inseticida (DURANT-ARCHIBOLD *et al.*, 2018). Outras atividades foram atribuídas para as espécies do gênero, como fungicida (VIEIRA *et al.*, 2011), anti-inflamatória (TASLEEM *et al.*, 2014; EMRIZAL *et al.*, 2008), analgésica (TASLEEM *et al.*, 2014), enzimática (KHAN *et al.*, 2012), tripanossomicida (VILLAMIZAR *et al.*, 2017), anticâncer (PRASHANT *et al.*, 2017), antioxidante (CORPES *et al.*, 2017), antimicrobiana (GAMBOA *et al.*, 2018), antidepressiva, ansiolítico (HRITCU *et al.*, 2015), antidiabética (NJERI & NJAGI, 2017), nematoide (NILE *et al.*, 2017), herbicida (DAYAN *et al.*, 2015), antiofídica, antiplasmodica, antiturbeculose, moluscicida, antilesmanhia, anti-*Helicobacter pylori* (NASCIMENTO, 2012) e esquitossomicida (GONÇALVES *et al.*, 2019).

### 2.2. *Piper callosum*

*P. callosum* é um arbusto de caule e ramos nodosos, folhas alternas, oblongas acuminadas, de nervuras salientes na face dorsal, flores diminutas, amareladas, dispostas em espigas carnosas (ANDRADE *et al.*, 2009). Essa espécie é utilizada como afrodisíaco, adstringente, digestiva, antidiarreica, hemostática local, antileucorreica, em picadas de mosquito. Ela é popularmente conhecida como ‘panquilé’, “João Brandim”, “elixir-paregórico”, “ventre-livre”, “óleo-elétrico” e entre outros nomes (ANDRADE *et al.*, 2009).

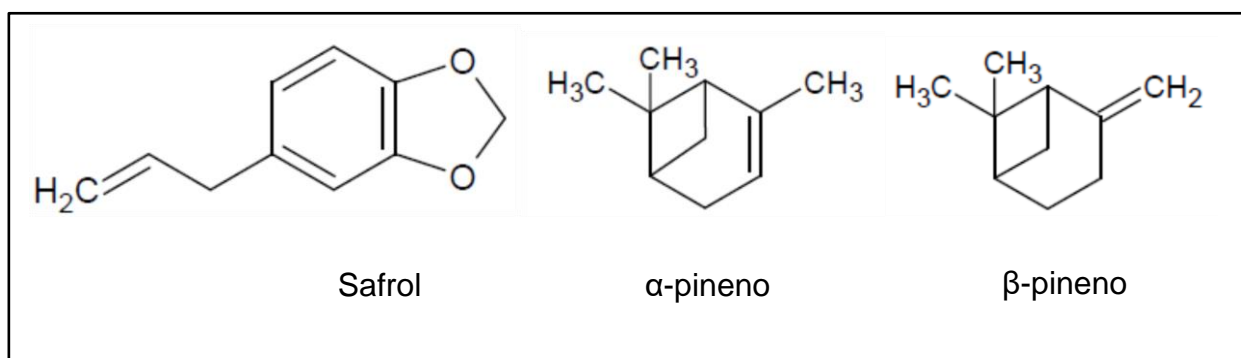
O óleo essencial extraído das folhas secas de *P. callosum* contém safrol,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno (MAIA *et al.*, 1987; ALMEIDA *et al.*, 2018). Estudos químicos com extratos das raízes mostraram presença de amidas (PRING, 1982) e sitosterol (PARMAR *et al.*, 1997). Os estudos biológicos relatados para o óleo essencial obtidos das folhas desta espécie indicam atividades fungicida (SILVA & BASTOS, 2007), larvicida, inseticida (ANDRADE *et al.*, 2009; SOUTO *et al.*, 2011) e esquitossomicida (GONÇALVES *et al.*, 2019). Além de ser avaliado frente a diversos microrganismos como *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora palmivora*, *P. capsici* e *Rhizopus oryzae* (SILVA & BASTOS, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2018), *Anopheles marajoara*, *Estegomyia aegypti* e *Solenopsis saevissima* (ANDRANDE *et al.*, 2009; SOUTO *et al.*, 2011).

Figura 1 - *Piper callosum* Ruiz & Pav.



Fonte: Os autores (2020).

Figura 2 - Substâncias majoritárias presentes no óleo essencial de *P. callosum*.



Fonte: Os autores (2020).

### 2.3. Metabolitos Secundários

O reino vegetal produz mais de 100.000 mil metabólitos secundários restritos em sua distribuição em vários órgãos, assim como, nas diferentes espécies de plantas (VERMA & SHUKLA, 2015). No passado foram considerados produtos de dejetos, sabe-se agora que os metabólitos secundários são importantes para a sobrevivência e propagação das plantas que os produzem (SIMÕES *et al.*, 2007). Muitos deles funcionam como sinais químicos, que permitem à planta responder a estímulos do ambiente. Outros funcionam como defesa das plantas contra herbívoros, patógenos ou competidores. Alguns fornecem proteção contra a radiação solar, enquanto outros contribuem para a dispersão de pólen e sementes (RAVEN *et al.*, 2011).

A produção dos metabólitos secundários nas plantas se originam a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. Esses dois intermediários originam uma diversidade estrutural distribuídas em classes químicas distintas que incluem os alcaloides, flavonoides e os terpenoides. Este último compõe em sua maioria os óleos essenciais. Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Do ponto de vista farmacêutico, o maior interesse deriva principalmente do grande número de substâncias farmacologicamente ativas (SIMÕES *et al.*, 2007; THAKUR *et al.*, 2019; TAKSHAK & AGRAWAL, 2019).

### 2.4. Óleo Essencial

Óleos voláteis, essenciais ou óleos etéreos são princípios ativos presentes em plantas aromáticas constituídos de uma mistura de substâncias voláteis e hidrofóbicas. Eles são obtidos através da destilação por arraste a vapor d'água proveniente de algum material vegetal ou por pressão dos pericarpos de frutos cítricos (ISO, 2013). Suas características mais peculiares são cor, aroma agradável, sabor, volatilidade, insolubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (ADORJAN & BUCHBAUER, 2010; SIMÕES *et al.*, 2007). Além disso, apresentam índice de refração, sendo opticamente ativos, propriedades estas utilizadas na identificação e no controle de qualidade desses produtos. (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais possuem aroma típico produzidos e armazenados em estruturas secretoras especializadas das plantas, tais como glândulas, pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou bolsas lisígenas ou esquizolisígenas,

dependendo da família a que pertence à espécie em questão (OLIVEIRA & AKISSUE, 2009). Eles podem ocorrer em pelos glandulares no caso das Lamiaceae, em células parenquimáticas diferenciadas em Lauraceae, Piperaceae e Poaceae, ou em canais oleíferos, característico de Pinaceae, Rutaceae e Apiaceae (SIMÕES *et al.*, 2007). Estas estruturas secretoras estão localizadas em diferentes órgãos dos vegetais como flores, brotos, sementes, folhas, ramos, casca, ervas, madeira, frutas e raízes (SADGROVE & JONES, 2015). Além disso, eles são usados na defesa das plantas contra herbívoros, fungos, bactérias, raios UV, atração de polinizadores ou dispersão de sementes, bem como participação em alelopatias (HARKAT-MADOURI *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2007; ADORJAN & BUCHBAUER, 2010; TAKSHAK & AGRAWAL, 2019).

A produção de óleos essenciais nas plantas se origina a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e do acetato. A partir do ácido chiquímico são produzidos os fenilpropanoides e do intermediário acetato são formados os terpenoides. Os compostos de terpenos podem ser divididos em duas categorias principais: terpenos com uma estrutura de hidrocarbonetos, principalmente os mono, sesqui e diterpenos e seus derivados, por exemplo, álcoois, óxidos, aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos, ésteres e lactonas. Quanto aos fenilpropanoides, são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligado ao anel aromático (MOGHADDAM & MEHDIZADEH, 2017; SIMÕES *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais apresentam atividades farmacológicas e biológicas diversificadas como fungicida, inseticida, larvicida, moluscicida (ADORJAN & BUCHBAUER, 2010) e bactericida (CAZELLA *et al.*, 2019). Foi relatado também, que o uso do óleo essencial de lavanda e laranja promoveu a diminuição da fadiga em pacientes de hemodiálise (AHMADY *et al.*, 2019). Os sesquiterpenos encontrados em espécies de *Piper* da Amazônia apresentam atividades antioxidante, antifúngica e anti-colinesterase (SILVA *et al.*, 2014). Muitos óleos essenciais apresentam propriedade inseticida, sendo usados como fumigante em produtos armazenados (ASSIS *et al.*, 2011) e até mesmo como repelentes de insetos, diminuindo os riscos dos produtos convencionais à saúde humana (ADORJAN & BUCHBAUER *et al.*, 2010).

Em todo mundo os óleos essenciais são utilizados em diversas indústrias químicas, incluindo, alimentos, cosméticos e medicamentos. Na indústria de alimentos são usados como flavorizantes de massas, pizzas, sorvetes, doces, compotas e sucos. Na indústria de cosméticos são usados em produtos de higiene e como fixador de perfumes. Além disso, várias drogas vegetais, ricas em óleos essenciais, são utilizadas como aromatizantes de formas farmacêuticas,

destinadas a uso oral, devido a suas propriedades terapêuticas (ADORJAN & BUCHBAUER *et al.*, 20010; SIMÕES *et al.*, 2007).

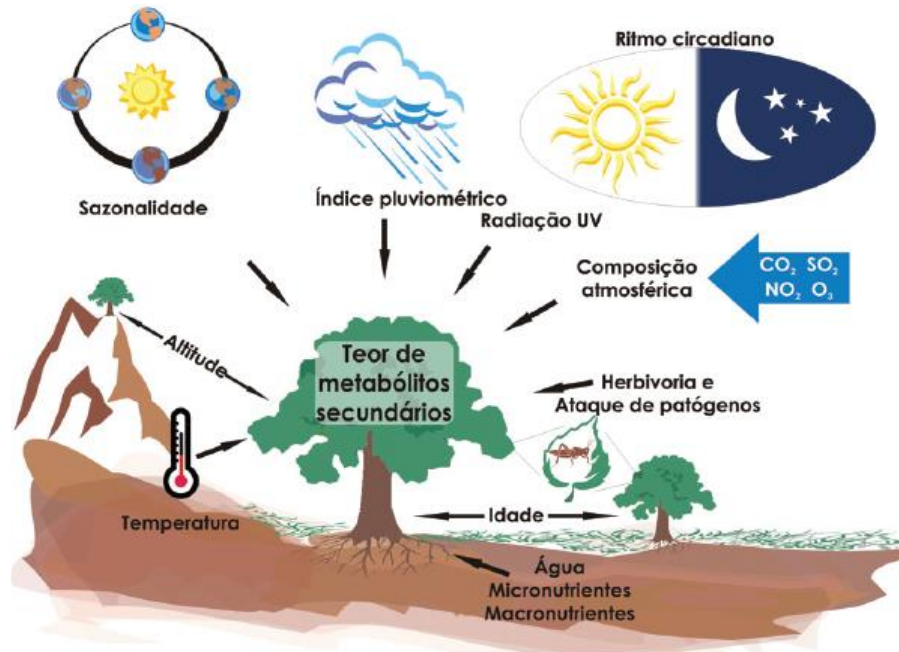
## 2.5. Variação sazonal

A variação da composição química e o rendimento dos metabólitos secundários estão diretamente relacionados com a época de colheita das espécies vegetais, as quais podem levar a produção elevada de substâncias ativas com maior valor agregado (BARRA, 2009). Dentre essas substâncias ativas, estão presentes os óleos essenciais, que tem sua composição química influenciada por diferentes fatores, como os genéticos, ontogênicos, morfogenéticos e ambientais. Dentre os fatores ambientais, podemos citar os bióticos que incluem a ação dos fungos, bactérias, vírus e parasitas. Em relação aos fatores abióticos se destaca a influência da luz, água, solo, radiação UV, temperatura, variação geográfica e produtos químicos (Figura 3) (GOBBO-NETO, 2007; VERMA & SHUKLA, 2015).

Os óleos essenciais de *Piper xylopioides* Kunth, coletada no Paraná, sofreu variação do rendimento em função da sazonalidade, obtendo maior rendimento na época do verão (1,37%) em relação ao período de inverno (0,94%) (DELQUIQUI *et al.*, 2019). As substâncias majoritárias *trans*-diidroaganofurano e  $\beta$ -eudesmol foram obtidas nas estações de verão e primavera, já nas amostras de outono e inverno as substâncias predominantes foram  $\alpha$ -pineno, 4-epi-cis-diidroaganofurano e elemol no óleo essencial de *Piper cernuum* coletada em Santa Catarina (GASPARETTO *et al.*, 2016).



Figura 3 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.



Fonte: Gobbo Netto, 2007.

## 2.6. Ácaro Fitófago: *Raoiella indica*

O ácaro-vermelho-das-palmeiras, *Raoiella indica* Hirst 1924 (Acari: Tenuipalpidae), é um pequeno artrópode de coloração vermelha. Os adultos medem de 0,25 mm a 0,32 mm de comprimento e pode ser visto a olho nu, principalmente devido à sua coloração. Estes ácaros formam colônias, onde são encontrados indivíduos adultos, formas jovens (larva, protoninfa e deutoninfa) e ovos. Eles vivem principalmente na superfície inferior das folhas (abaxial), principalmente aquelas mais velhas (MORAIS, 2011).

O ácaro-vermelho-das-palmeiras, foi descrito pela primeira a partir de ácaros coletados na Índia (TEODORO *et al.*, 2016). Essa espécie é considerada de importância econômica nos países onde está presente (MENDONÇA *et al.*, 2005; MORAES & FLECHTMANN, 2008). No Brasil, *R. indica*, já foi registrado nos Estados de Roraima (GÓMEZ-MOYA *et al.*, 2017), Mato Grosso do Sul (SUEKANNE *et al.*, 2012), São Paulo (OLIVEIRA *et al.*, 2016), Amazonas (RODRIGUES & ANTONY, 2011), Alagoas, Ceará, Sergipe, Paraná e Pará (TEODORO *et al.*, 2016). Recentemente foi encontrado na Bahia e no Rio Grande do Norte,

podendo dispersar-se por outros estados do país em decorrência de seu alto potencial como praga invasora (TEODORO *et al.*, 2016).

*Raoiella indica* ataca espécies de palmeiras nativas e exóticas de maior importância no Brasil (MENDONÇA *et al.*, 2005). Esta praga ataca principalmente o coco, (*Cocos nucifera* L.), palma real anã (*Veitchia merrillii* (Becc) H. E. Moore), palma calda de peixe (*Caryota mitis* Lour.) pertencentes a família Arecaceae e são relatados também em bananeiras (*Musa spp.*) (RODRIGUES & ANTONY, 2011; RAMOS-LIMA *et al.*, 2017; BALSAS *et al.*, 2015). Eles se alimentam dos fluidos celulares das plantas, causando amarelecimento e ressecamento completo das folhas e quando suas populações são altas podem causar a morte da planta jovem. O seu controle torna-se difícil pela altura e idade da planta, além do efeito de pesticidas e acaricidas que causam impacto ecológico (MENDONÇA *et al.*, 2005).

## 2.7. Ácaro de Produtos Armazenados: *Suidasia pontifica* Oudemans.

O ácaro, *Suidasia pontifica* Oudemans, 1905 (Acari: Sarcoptiformes) é uma espécie cosmopolita presente em produtos armazenados no Brasil (MORAES & FLECHTMANN, 2008; SOUZA *et al.*, 2005). Seu alimento preferencial é o germe de trigo, o ciclo evolutivo completo é de 16 a 18 dias, a temperatura ideal para o seu desenvolvimento é de 23 °C e 87% de umidade do ar (FLECHTMANN, 1986). Também tem sido encontrado em rações fareladas e granuladas, assim como em peixes seco e salgado (FLECHTMANN & CASTELO, 1982). Além de preferir produtos já infestados por fungos, sua alta reprodução pode ter consequências econômicas (BAGGIO *et al.*, 1987; ASSIS *et al.*, 2011). Eles também causam reações alérgicas em humanos (GELLER *et al.*, 2009; HO & WU, 2002) e disseminam fungos toxigênicos (HUBERT *et al.*, 2004).

## 2.8. Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que ajudam a retardar ou prevenir os danos oxidativos causados pelos radicais livres (CHAND *et al.*, 2017). Os radicais livres são espécies altamente reativas porque possui na sua camada externa um elétron desemparelhado que reage rapidamente com as membranas das células causando degeneração e finalmente a sua morte (SINDHI *et al.*, 2013). Esse estresse oxidativo está diretamente relacionado a doenças degenerativas como o câncer, Parkinson, Alzheimer, aterosclerose (MOHARRAM &

YOUSSEF, 2014; JAMWAL *et al.*, 2017) e diabetes (SINDHI *et al.*, 2013). Para lidar com esses radicais, o organismo vivo produz muitos antioxidantes ou leva a necessidade de ingestão desses suplementos (SINDHI *et al.*, 2013).

O reino vegetal é o maior produtor de substância com propriedades antioxidantes (SIMÕES *et al.*, 2007). As substâncias fenólicas como o ácido gálico, elágico (RANILLA *et al.*, 2010) e flavonoides (KUMAR & PANDEY, 2013) possuem comprovação como antioxidantes naturais. Sua ação deve-se a capacidade redutora e estrutura química. Eles desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição por agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, tendo como resultado intermediários relativamente estáveis formados pela ação de antioxidantes fenólicos, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUZA *et al.*, 2007; PISOSCHI & NEGULESCU, 2011).

## **2.9. Cromatografia Contra Corrente – CCC**

A Cromatografia Contracorrente (CCC) é uma técnica de cromatografia que se baseia na partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária líquida retida no equipamento não necessita de um suporte sólido (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006; LEITÃO, 2005). A fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM) são líquidos imiscíveis, obtidas a partir de uma mistura de solventes previamente equilibrados. A proporção relativa dos solutos da amostra em cada uma das fases está relacionada aos respectivos coeficientes de partição (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006; COSTA & LEITÃO, 2010). Está técnica apresenta potencial ilimitado, sendo usada na obtenção de padrões fitoquímicos de alta pureza, com rapidez, eficiência e economia de solvente. Além de isolar várias classes de substâncias do metabolismo secundário de plantas (LEITÃO, 2005).

As principais vantagens desta técnica inclui versatilidade, velocidade, boa resolução, economia, reprodutibilidade e recuperação total da amostra sem modificações químicas ou perda de atividade biológica em fracionamentos guiados por bioensaio (COSTA & LEITÃO, 2010). O equipamento é constituído por uma coluna tubular enrolada em uma bobina que está presa à engrenagem do equipamento e gira em movimento planetário. Esse movimento faz com que os solventes contidos na coluna sejam submetidos a velocidades variáveis, além de permitir que a fase estacionária seja mantida dentro da coluna. A fase móvel, que contem os

componentes da amostra, é bombeada para fora da coluna (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006; SILVA & VILEGAS, 2012).

Vários tipos de CCC são conhecidos, como a Cromatografia contracorrente de gotejamento (DCCC), cromatografia contracorrente de rotação nocular (RLCCC), cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC) e cromatografia de partição centrífuga (CPC) (HOSTETTMANN et al., 2001). Mais recentemente, surgiu a cromatografia contracorrente de alto desempenho (HPCCC, do inglês *High Performance Countercurrent Chromatography*), que apresenta maior velocidade de rotação e campo gravitacional, com isso aumentando a retenção da fase estacionária na coluna, o que proporciona aumento na eficiência e tempos de análise mais curtos, destacando-se, dessa forma, frente as demais técnicas de CCC (SUTHERLAND & FISHER, 2009; YAO *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2018).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Materiais e equipamentos utilizados

Acetato de etila P.A. (Dinâmica); n-hexano P.A. (Vetec); clorofórmio P.A. (Vetec); álcool butílico normal P.A. (Dinâmica); álcool metílico P.A. (*Synth*); sulfato de sódio anidro P.A. (Vetec); cloreto férrico P.A. (Dinâmica); anidrido acético P.A. (Vetec); ácido sulfúrico P.A. (*Synth*); ácido clorídrico P.A. (*synth*); hidróxido de sódio em lentilhas P.A. (*Synth*); ácido acético glacial P.A. (Vetec); vanilina P.A. (Vetec); polietilenoglicol 400 U.S.P. (*Synth*), 2-aminoetildifenilborinato (Sigma-Aldrich); acetona P.A. (*Synth*); 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH P.A. (Sigma-Aldrich); carbonato de sódio P.A. (*Synth*); dimetilsulfóxido P.A. (Nuclear); álcool metílico grau HPLC (Panreac); acetonitrila grau HPLC (Panreac); placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 (Merck); balança semi analítica (Marte); balança analítica (Shimadzu); manta aquecedora 12000ML (Fisatom); rotaevaporador (Fisatom); ultrassom (Quimis); Capela de exaustão (Quimis); bomba de vácuo - sl 061 (Solab); câmara escura UV (Biothec); centrífuga 80-2b (Centribio); banho maria sl 150 (Solab); banho ultratermostato com circulação de água (Quimis); Moinho de Facas (Solab); estufa de secagem TTL (THOLZ); Cromatografo a gás GC-2010 Plus (Shimadzu) acoplado a espectrômetro de massas QP2010 (Shimadzu) com coluna DB-5MS (Agilent); detector multimodo DTX 800 (Beckman Coulter); HPLCC Spectrum (Dinâmica Extração); Chiller Smart H150-1500 (Lab Tec); Bomba Isocrática 10 plus (Alpha); Equipamento CLAE (Thermo Scientific) acoplado a espectrômetro de massa íon trap LCQ Fleet (Thermo Scientific); software ChemSketch (01.sk2); software Xcalibur; software LC Solution 1.21 SP1; coluna de guarda Drop-in Hypersil ODS C18 (LUNA); LC-20AT HPLC (Shimadzu); coluna analítica Prep-ODS Coluna C18 (Shim – Pack); Camag (TLC VISUALIZER).

#### 3.2. Coleta do material vegetal e extração do óleo essencial

*Piper callosum* Ruiz & Pav (Piperaceae) foi coletada no Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia de Itacoatiara-AM (S 58°26'54.3" W 3°8'28,8"), Estado do Amazonas, Brasil. A espécie foi identificada pelo Professor Dr. Ari de Freitas Hidalgo (Faculdade de Ciências

Agrárias - UFAM). A exsicata do vegetal foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM/UFAM), sob número de tomo 11650.

Os óleos essenciais dos galhos, folhas e inflorescências de *P. callosum* foram obtidos por hidrodestilação do material fresco ( $\pm 300,0$  g) em aparelho de Clevenger (6 h) durante as análises de sazonalidade. O material botânico foi colocado em balão de destilação contendo 6L de água destilada. Foi observada a separação do óleo na coluna do aparelho de Clevenger, coletando-se três amostras denominadas de OE1, OE2 e OE3. Em seguida, o óleo essencial juntamente com a água foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 3500 rotações por minutos (rpm) para separação e retirada da água. Os óleos essenciais obtidos foram mantidos em frascos âmbar tampados sob refrigeração e enviados a Faculdade de Ciências Farmacêuticas em Ribeirão Preto-SP para a identificação dos constituintes químicos. Os rendimentos obtidos dos óleos essenciais foram calculados baseados no peso das folhas  $((v/m)*100)$ . Tanto o rendimento do óleo essencial quanto os constituintes químicos foram avaliados, quanto à variação sazonal, no período de 2018 a 2019. No período da coleta foram anotados alguns parâmetros, tais como a temperatura e precipitação do local de coleta fornecido pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), para correlacionar com a variação do rendimento e composição química dos óleos essenciais.

### **3.3. Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais.**

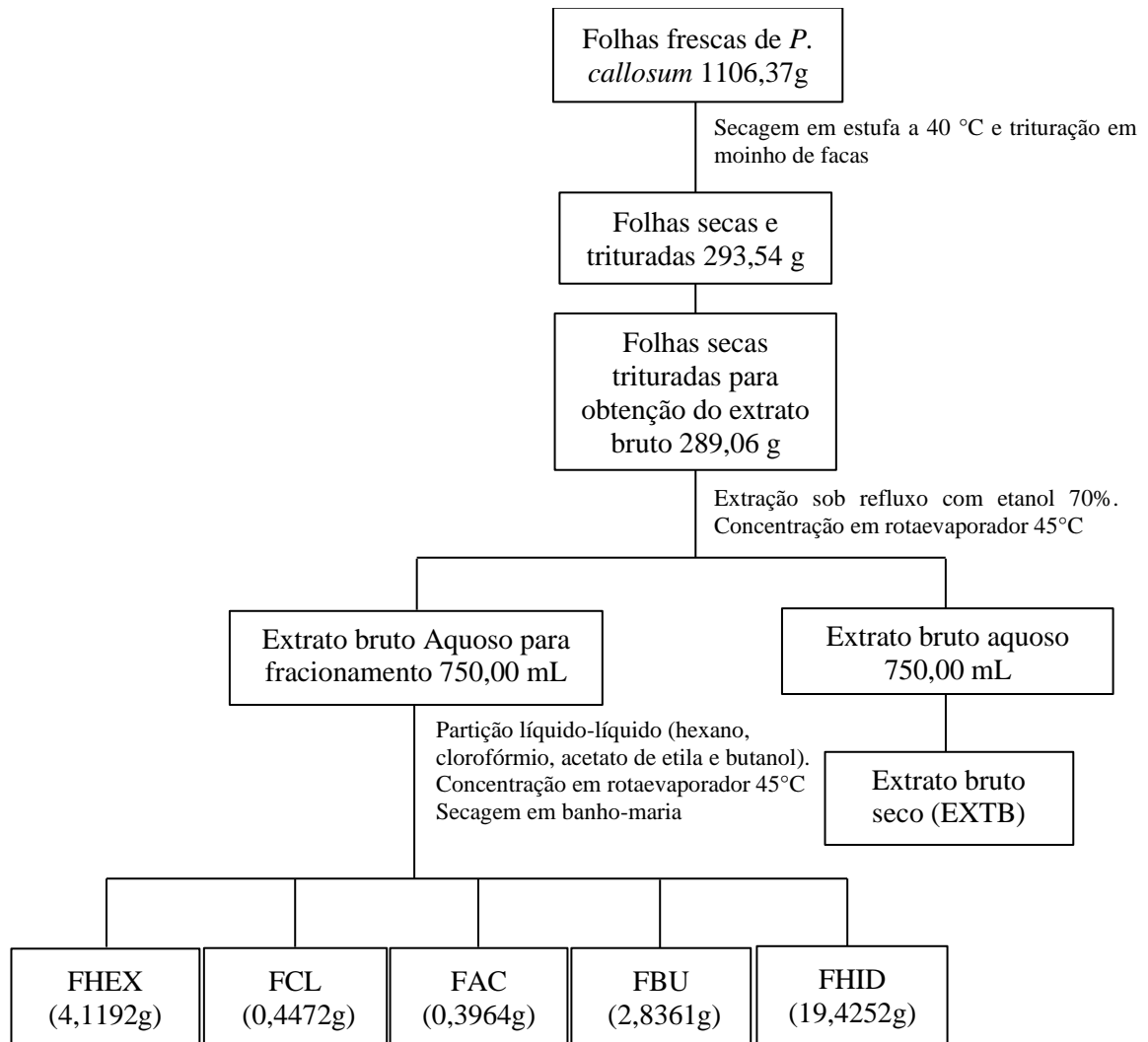
As análises para identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (CG – EM), SHIMADZU QP – 2010. Para cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30m x 0,25mm, espessura do filme interno de 0,25  $\mu$ m, modo de ionização de impacto de elétrons, injetor a 250°C (3°C/min), interface a 250°C, com variação de temperatura de 60° a 240°C (3°C/min) sendo hélio o gás de arraste (1,3 ml/min). A identificação dos constituintes foi feita por interpretação de seus respectivos espectros de massas, cálculo do Índice Aritmético e por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007). Para realização dessas análises, foi utilizado equipamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

### 3.4. Extração e Fracionamento das Folhas de *Piper callosum*

As folhas frescas de *P. callosum* (1106,37 g) foram coletadas no dia 10/07/2018 às 08 h da manhã na área experimental do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET/UFAM. Em seguida, as folhas foram secas em estufa a 40 °C por 72 h, obtendo-se 293,54 g. O material seco e moído (289,06 g) foi extraído com etanol 70% sob refluxo e depois foi concentrado até remoção do etanol em evaporador rotatório. Depois da retirada do álcool em rotaevaporador, o extrato aquoso (1,5 L) foi dividido em duas partes iguais (750 mL), sendo que uma delas foi seca em banho-maria (75 °C) e a outra parte do extrato aquoso foi fracionada com solventes em ordem crescente de polaridade. Por fim, foi calculado o rendimento do extrato bruto (m/m).

O fracionamento do extrato bruto foi realizado pelo processo de partição líquido-líquido utilizando solventes em ordem crescente de polaridade como, hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol e por fim ficando a fração hidroalcolólica para obter as amostras FHEX, FCL, FAC, FBU e FHID. Em seguida, as frações foram concentradas até remoção de todo o solvente em evaporador rotatório, secas em banho-maria (75 °C) e calculados seus rendimentos (m/m) (Figura 7). As etapas de obtenção do extrato bruto e frações estão descritos na figura 4.

Figura 4 - Fluxograma de obtenção do extrato bruto e frações de *P. callosum*.



Fonte: Os autores (2020).



### 3.5. Prospecção fitoquímica para caracterização de fenóis e taninos.

Para detecção de grupos fenólicos, o extrato bruto (EXTB) e as frações acetato de etila (FAC), butanol (FBU) e hidroalcoólica (FHID) foram analisados através do ensaio em tubos com cloreto férrico e diferentes valores de pH, segundo a metodologia descrita por Matos (2009).

Inicialmente foram pesados 500 mg de extrato bruto e realizadas 3 extrações com 10 ml de clorofórmio cada. Ao material insolúvel em clorofórmio foram acrescentados 50 mL de metanol (70%). Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml e o volume foi completado com metanol a 70%. Esta amostra foi utilizada como solução estoque. Para as FAC, FBU e FBU foram pesados 30 mg de cada amostra e solubilizados em 50 mL de metanol (70%), transferindo cada solução para balão de 100 mL e completando o volume com metanol (70%). Estas amostras foram utilizadas como soluções estoque.

Depois das soluções estoque prontas, numerou-se 19 tubos de ensaio de 1 a 6 em triplicata e um tubo com a solução padrão para posterior comparação. Os tubos de ensaio numerados foram preparados para o extrato bruto e as frações. Em seguida foram adicionados 3 ml de solução estoque dentro de cada um dos tubos de ensaio. No tubo 1 foram colocadas três gotas de cloreto férrico (1%). Nos tubos 2 e 5 o pH foi ajustado para 3 com solução de ácido clorídrico ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). No tubo 3 o pH foi ajustado para 8,5 com solução de hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). Nos tubos 4 e 6 o pH foi ajustado para 11, também com solução de hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). As soluções contidas nos tubos foram comparadas com o tubo contendo a solução padrão para avaliar se houve ou não mudança de coloração sugestiva das classes de substâncias descritas na tabela 1.

Tabela 1- Identificação dos constituintes em pH 3; 8,5 e 11

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido pH 3	Alcalino pH 8,5	Alcalino pH 11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul Púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	--	--	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	--	Vermelha púrpura
Flavanonóis			Vermelha laranja

Fonte: Matos (2009).

Os tubos 5 (pH 3) e 6 (pH 11) foram aquecidos na chama do bico de bunsen por três minutos e comparados com o tubo contendo a solução padrão, também observando se houve mudança de coloração segundo a tabela 2.

Tabela 2- Identificação dos constituintes em pH 3 e 11

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido pH 3Δ	Alcalino pH 11Δ
Leucoantocianidinas	Vermelho	--
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo amarela	--
Flavanonas	--	Vermelho alaranjado

Fonte: Matos (2009).

### 3.6. Prospecção fitoquímica para caracterização de triterpenoides e esteroides (Lieberman-Buchard).

Para detecção de esteroides e triterpenoides foi realizado o ensaio de Lieberman-Burchard, segundo metodologia de Matos (2009). Foram pesados 15 mg de cada fração (FHEX e FCL) e dissolvidos em 30 mL de clorofórmio. A solução das frações e do EXTB (preparado anteriormente), foram transferidos e filtrados em papel filtro. O material insolúvel de cada amostra foi guardado em bequer e as soluções geradas foram acondicionadas em béqueres de 50 mL. Em seguida foi retirado 4 ml de cada solução, transferindo para tubos de ensaio completamente secos. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de anidrido acético e agitado suavemente. Em seguida, adicionou-se cuidadosamente, três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a cada tubo, tornando a agitar suavemente. O desenvolvimento de cores, que varia do azul evanescente ao verde persistente indica resultado positivo (MATOS, 2009).

### 3.7. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de Saponinas

Foram pesados 100 mg do EXTB, FAC, FBU e FHID, no EXTB foram realizadas 3 lavagens de 5 mL cada com CHCl<sub>3</sub> para a retirada das substâncias apolares. Logo depois, acrescentou 5 mL de água deslilada em cada amostra. Em seguida, as amostras foram filtradas, através de funil contendo algodão, para tubos de ensaio e agitadas vigorosamente por 3 minutos. A formação de espuma abundante e persistente por dois a três minutos é indicativo de resultado

positivo. Para o teste confirmatório adicionou-se 2 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado ao filtrado e levou-se para o banho-maria (70 °C) por 1 hora. Após resfriamento, a solução foi neutralizada com hidróxido de sódio (3 mol.L<sup>-1</sup>), deixou-se descansando por 24 h, depois agitou-se e observou se houve ou não a formação de espuma e presença de precipitado. A não formação de espuma e presença de precipitado é confirmatório para saponinas (MATOS, 2009).

### **3.8. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de Alcaloides**

Pesou-se em balança analítica 500 mg do EXTB e 200 mg das frações FBU e FHID. Em seguida realizaram-se três extrações com 7 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), somente com o EXTB para retirada de substâncias apolares e filtrou-se em papel filtro para um béquer. Preparou-se água acidificada em pH 4 com HCl a 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Com a amostra do extrato bruto insolúvel em CHCl<sub>3</sub> adicionaram-se 30 mL de água acidificada, homogeneizou-se a amostra e filtrou-se novamente para um tubo de ensaio. Esse mesmo procedimento foi realizado com as frações.

Basificou-se a solução filtrada com hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> até que fosse alcançado o pH 11. Adicionaram-se 7 mL de CHCl<sub>3</sub>, retirando a fase orgânica e adicionando em outro tubo de ensaio. Realizou-se novamente a acidificação para pH 4 e em seguida basificou-se o meio para pH 11. Realizando assim a segunda extração com 7 mL de CHCl<sub>3</sub>, retirando a fase orgânica e adicionando no tubo contendo a primeira extração da fase orgânica.

Na fase orgânica, adicionou-se HCl a 0,1 mol.L<sup>-1</sup> para atingir o pH 2. Após esse ajuste de pH, formaram-se duas fases: a fase orgânica (inferior) e a fase aquosa (superior). Retirou-se a fase aquosa e separou-se em outro tubo de ensaio e acrescentaram-se 3 gotas do reagente de Dragendorff.

### **3.9. Avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD)**

O extrato bruto e frações de *P. callosum* foram analisados através de CCD em placas de alumínio pré-fabricadas (Merck) recobertas com sílica gel 60 GF 254, segundo a metodologia descrita por Guimarães (2005). Inicialmente foi pesado em um frasco 1 mg da amostra do extrato seco e solubilizado em 1 mL de metanol. Após a solubilização o extrato foi aplicado

nas placas com o auxílio de capilar de vidro de 10 µL. As placas foram eluídas no sistema de fase móvel butanol: ácido acético: água (BAW) (4:1:5) e reveladas com reveladores químicos específicos tais como Vanilina Sulfúrica para revelar terpenos, NP/Peg (2-Aminoetil difenilborinato/Polietilenoglicol) para revelar flavonoides, cloreto férrico para revelar fenólicos e Dragendorff para revelar alcaloides. As manchas, para identificação de substâncias fenólicas e flavonoides, foram detectadas por meio de luz UV no comprimento de onda de 365 nm. Para a revelação de terpenos as placas foram aquecidas a uma temperatura de 80 °C por 10 minutos e observadas em luz natural. Enquanto que, para a observação de mudança de coloração na placa borrifada com cloreto férrico e Dragendorff foi em luz natural.

### **3.10. Ação fumigante de óleos essenciais sobre *Suidasia pontifica*.**

A criação de *S. pontifica* foi iniciada com indivíduos coletados de farinha de trigo adquirida em um comércio no município de Itacoatiara-AM. O processamento deste material e os demais estudos foram realizados no Laboratório de Botânica do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET/UFAM. Uma porção de trigo infestado foi transferida para unidade semelhante à mencionada por Freire et al. (2007), consistindo de recipiente plástico cilíndrico de 500 mL, com 5 perfurações cilíndricas para ventilação, vedadas por um tecido com malha de 0,2 mm. Em seguida, foram colocados cerca de 150 g de farinha de trigo para servir de fonte de alimento para os ácaros. Quinzenalmente, o alimento em cada unidade de criação foi renovado.

A metodologia para avaliar a ação fumigante dos óleos essenciais sobre os ácaros foi adaptada de Aslan *et al.* (2004). Recipientes de vidro com tampa hermética e capacidade de 2,5 L foram usados como câmaras de fumigação. Em cada câmara foram postas três unidades experimentais constituídas por frascos de vidro (5 mL). Dentro dos frascos foram colocados 5 mg de farinha de trigo e 30 fêmeas adultas de *S. pontifica*. A extremidade superior de cada unidade foi fechada com uma malha de 0,2 mm para permitir a troca de ar da unidade com a câmara de fumigação, mas sem permitir fuga dos ácaros. Dentro da câmara de fumigação também foi colocado um chumaço de algodão (aproximadamente 1,0 cm) umedecido com água destilada para manter a umidade na câmara, evitando a dissecação dos ácaros.

Os óleos essenciais, OE1, OE2 e OE3 obtidos em outubro/2018, foram aplicados, com auxílio de pipeta automática, em tiras de papéis de filtro presas à superfície inferior da tampa

dos recipientes. As doses aplicadas foram de 5, 10, 15, 20 e 25 µl de cada óleo essencial, o que corresponde a uma concentração de 2, 4, 6, 8 e 10 µL/L de ar. O tratamento controle foi mantido sem aplicação de óleo. O período de exposição a cada óleo foi de 24, 48 e 72 horas. Após a primeira abertura, em cada tempo de avaliação, as câmaras foram descartadas. Para cada dose e tempo de exposição foram utilizadas três câmaras. Foram considerados mortos os ácaros que não apresentaram nenhum movimento após um leve toque com pincel de cerdas finas.

### **3.11. Ação residual de contato dos extratos brutos e suas respectivas frações sob *Raoiella indica*.**

As coletas de folíolos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) com e sem infestação de *R. indica* foram realizadas na orla de Itacoatiara-AM. O processamento deste material e os demais estudos também foram realizados no Laboratório de Botânica do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – ICET/UFAM.

Os tratamentos para avaliar o efeito residual de contato das amostras de EXTB, FHEX, FCL, FBV e FHID de *P. callosum* sob *R. indica* foram preparados diluindo o extrato bruto e frações polares (5, 10, 50 e 100 mg) em água destilada e as frações apolares solubilizadas em água destilada e acetona (2:1). Para o extrato bruto e frações foram obtidos tratamentos nas concentrações de 0,5, 1, 5 e 10%. Como controle negativo foram utilizados água destilada e acetona e para controle positivo abamectina (100 mL/100 L<sub>água</sub>).

Folíolos de coqueiro de 5 cm de comprimento foram imersos por 5 segundos em placas de Petri contendo um dos tratamentos, assim como seus respectivos controles. Depois de secos os folíolos foram colocados com a superfície abaxial voltada para cima sobre papel filtro sobreposta à espuma de polietileno umedecida com água destilada, dentro de uma placa de Petri, constituindo a unidade experimental. Posteriormente, 10 fêmeas adultas de *R. indica* foram transferidas para a unidade experimental com auxílio de um pincel de cerdas finas. Para cada tratamento foram feitas 8 repetições. Cada unidade foi avaliada a cada 24 h por três dias consecutivos, contabilizando o número de fêmeas mortas e a quantidade de ovos postos. A temperatura e umidade relativa do ar foram registradas durante o período do teste.

### 3.12. Análise de dados da ação fumigante e residual de contato

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Para cada amostra do óleo essencial, extrato e frações de *P. callosum* foi calculada a mortalidade corrigida em função da mortalidade natural da população, determinada através do tratamento controle. O valor da mortalidade corrigida para cada tratamento foi determinado como sugerido por Abbott (1925), pela fórmula:

$$\text{Mortalidade corrigida} = [(\text{percentual de mortalidade no tratamento} - \text{percentual de mortalidade no controle}) / (100 - \text{percentual de mortalidade no controle})] * 100.$$

Desta forma o efeito foi estimado através da determinação das médias da mortalidade corrigida, as quais foram submetidas à ANOVA. Quando o valor  $F_{ANOVA}$  foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Para o óleo essencial, extrato ou frações onde houve, em pelo menos uma das concentrações, média de mortalidade corrigida maior ou igual a 50%, foi determinada a Concentração Letal (CL) deste óleo essencial, extrato ou frações. As  $CL_{25\%}$  e  $CL_{50\%}$  foram determinadas pelo método de análise de Probit (Finney, 1971). Os intervalos de confiança a 95% ( $IC_{95\%}$ ) de probabilidade, associados a cada  $CL_{25\%}$  e  $CL_{50\%}$ , foram calculados e utilizados para comparação entre estas (WELCH, 1938).

Todas as análises foram realizadas com auxílio do Software R versão 3.5.1, adotando um nível de significância de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.13. Ensaio de Atividade Antioxidante

#### 3.13.1. Qualitativo

Foram diluídos em metanol 1 mg de EXTB, frações (FAC, FBU e FHID) e subfrações (FBU-5, FBU-7, FBU-10 e FBU-16) obtidas da fração FBU. Em seguida 10  $\mu$ L de cada amostra foram aplicados em forma de banda em placas cromatográficas de sílica Gel 60 F254 eluindo-se em BAW (4: 1: 5) (FAC, FBU e FHID), AcOEt:  $CH_3COOH$ :  $CH_2O_2$  (60: 1: 10) (FBU-5, FBUT-7, FBU-10 e FBUT-16) revelado com DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) 0,2% em metanol, deixando-se à temperatura ambiente durante 30 min e observou-se o resultado.

### 3.13.2. Quantitativo

Foram pesados em eppendorf 1 mg do EXTB, frações FBU e FHID e subfrações FBU-5, FBUT-7, FBUT-10 e FBU-16 da FBUT e diluídos em 1 mL de DMSO, denominada solução estoque. Dessa solução foram transferidas 30 µL de cada amostra para microplacas de poços e completou o volume acrescentando 270 µL de DMSO para obter um volume final de 300 µL. Em seguida, a solução preparada anteriormente, foram transferidas para poços em triplicata (30 µL em cada poço) e completou a solução com 270 µL de DMSO. Logo depois, foi transferida a solução de DPPH (100 µg/mL) para cada poço, as microplacas contendo as soluções foram incubadas em uma caixa escura para promover a reação da amostra com o radical DPPH. Após 30 min, os valores de absorbância foram medidos em 518 nm em um detector multimodo DTX 800, em seguida foi convertida a atividade antioxidante (AA) para percentagem com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância controle}] \times 100$$

Das amostras que apresentaram 50% de inibição do radical DPPH, foram realizadas diluições seriadas das amostras (1,0 mg/mL) até às concentrações finais de 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/mL, em etanol. Etanol (1,0 ml) e solução de extrato da amostra foi usado como branco. A solução de DPPH (1 mL; mM) mais etanol foi usada como controle negativo. Os controles positivos foram aqueles que utilizaram as soluções padrão. Os valores por CI50 foram calculados por regressão linear de parcelas onde a abcissa representa a concentração das amostras testadas e ordenada a porcentagem média de atividade antioxidante de três testes separados (MENSOR *et al.*, 2001).

### 3.13.3. Determinação de Fenóis Totais

Foram preparadas soluções do EXTB, frações (FBU e FHID) e subfrações (FBU-5, FBU-7, FBU-10 e FBU-16) da FBU, padrão de ácido gálico com concentrações de (1 mg/mL) dissolvidos em DMSO. 10 µL das amostras e do padrão de ácido gálico foram diluídos em 50 µL de reagente de Folin Ciocalteu 10% e acondicionados em microplacas. Posteriormente foram incubadas em câmara escura por 8 min. Em seguida, adicionaram-se 240 µL de carbonato de sódio a cada amostra, sendo incubada novamente por 3 min. A leitura foi feita em detector multimodo DTX 800 em 620 nm. Os resultados foram expressos em µg de ácido gálico/mL conforme descrito por McDONALD *et al.*, (2001) com modificações.

O ensaio de atividade antioxidante foi realizado no Laboratório da Faculdade de Farmácia da UFAM em Manaus, com a supervisão do professor Emerson Silva Lima.

### **3.14. Separação dos Constituintes Químicos por Cromatografia em Contra Corrente de Alto Desempenho – HPCCC (High Performance Counter Current Chromatography)**

A cromatografia analítica e preparativa foi realizada em equipamento de cromatografia em contra corrente de alto desempenho modelo HPCCC Spectrum da Marca Dinâmica Extração. O aparelho consiste em duas bobinas com colunas de 22 – 132 mL de volume, com fluxo de injeção variando de 0,5 – 10 mL/min., com uma carga máxima de até 2 g por corrida, com uma velocidade de rotação de até 1600 rpm e com um tempo de eluição de 20 minutos para um coeficiente de partição de 1, mantendo a temperatura em 30 °C. O HPCCC foi conectado a um Chiller da marca Lab Tec modelo Smart H150-1500 para manter a temperatura da água em 8 °C, com uma bomba da marca Alpha, onde o fluxo pode variar de 0-10 mL/min.

Baseado no rendimento, atividade acaricida e antioxidante, escolheu a fração FBU para ser fracionada e purificada em HPCCC. Os sistemas testados em bancada foram: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13 e 17 (Tabela 3), todos avaliados em CCD.



Tabela 3- Sistemas de solventes utilizados em CCC.

Sistema	Polaridade	Hexano	acetato de etila	Metanol	Butanol	Água
1		0	0	0	5	5
2		0	1	0	4	5
3		0	2	0	3	5
4		0	3	0	2	5
5		0	4	0	1	5
6		0	1	0	0	1
7		1	19	1	0	19
8		1	9	1	0	9
9		1	6	1	0	6
10		1	5	1	0	5
11		1	4	1	0	4
12		1	3	1	0	3
13		2	5	2	0	5
14		1	2	1	0	2
15		2	3	2	0	3
16		5	6	5	0	6
17		1	1	1	0	1
18		6	5	6	0	5
19		3	2	3	0	2
20		2	1	2	0	1
21		5	2	5	0	2
22		3	1	3	0	1
23		4	1	4	0	1
24		5	1	5	0	1
25		6	1	6	0	1
26		9	1	9	0	1
27		19	1	19	0	1
28		1	0	1	0	0

Fonte: Berthold/Garrard (2005).

As análises no HPCCC foram realizadas inicialmente no modo analítico, tanto em fase normal como em fase reversa. Foram pesados 20 mg da fração FBU, em seguida diluídos em 1 mL de mistura 1:1 da fase superior e inferior, descritos na Tabela 3. Para a corrida de fase normal diluiu a amostra com 500  $\mu$ L de fase inferior (fase estacionária) e 500  $\mu$ L de fase superior (fase móvel) na proporção de (1:1) dos sistemas 6 e 3 descritos na Tabela 3. Para a corrida de fase reversa diluiu 500  $\mu$ L de fase superior e 500  $\mu$ L de fase inferior na proporção de 1:1 dos sistemas 2 e 4 da Tabela 3. Em seguida, injetou 1 mL na coluna analítica para observar o comportamento da amostra. O fluxo de injeção foi de 1 mL/min., em ambos os sistemas de corrida.

Para a separação na coluna preparativa foram pesados 300 mg da amostra FBU e diluída em 6 mL da fase móvel (FS – S2) e fase estacionária (FI – S4) na proporção 1:1 (Tabela 4). Os perfis das substâncias presentes nas amostras foram analisadas com auxílio da CCD.

### **3.15. Avaliação dos Constituintes Químicos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho – CLAE**

O método analítico da fração FBU-5 obtida na HPLC, foi realizado no Laboratório Q-BIOMA, em aparelho Shimadzu LC-20AT HPLC e coluna analítica Shim – Pack Prep-ODS Coluna C18 (150 x 4,6 mm de comprimento, tamanho da partícula 5 µm) mantida a 28 °C. O sistema de eluição foi realizado no modo isocrático formado pela mistura de acetonitrila (10%) e água (90%). A água ultra pura acidificada com ácido fórmico a pH 2 com um fluxo de 1,0 mL/min e injeção de 10 µL de amostra solubilizadas em 1000 µL de MetOH grau HPLC. Os comprimentos de ondas utilizados para análise da fração FBU foram 254, 328, 354 e 364 nm. A aquisição de dados foi analisada no software LCQ Fleet (versão 2.7.0.1103 SP1).

### **3.16. Isolamento dos Constituintes Químicos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho - CLAE**

A separação das substâncias químicas foi realizada na Central Analítica da UFAM, em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAE) composto por aparelho LC-20AT Shimadzu (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão) equipado com controlador de sistema CBM-20A, detector SPD-M20A UV-vis, bomba LC- 6AD, auto injector SIL 20A, desgaseificador DGU-20A5, e estação de trabalho Shimadzu LC-solução.

Depois de definir o sistema de eluição para a fração FBU-5, pesou 350 mg e diluiu em 200 µL de DMSO e 300 µL de metanol. Realizou três injeções de 150 µL na coluna preparativa (Shim – Pack Prep-ODS Coluna C18 (4,6 mm de diâmetro x 250 mm de comprimento, tamanho da partícula 5 µm). O sistema de eluição foi no modo isocrático formado pela mistura de Acetonitrila (10%) e água (90%) ultra pura acidificada em pH 2, com um fluxo de 10,0 mL/min. Os comprimentos de ondas utilizados para acompanhar a eluição das substâncias foram de 328 e 354 nm.

### **3.17. Espectrometria de Massas das Substâncias Isoladas**

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no laboratório LABCEM (Central Analítica da UFAM/ Setor Norte), utilizando o espectrômetro da Thermo Scientific LCQ Flet com fonte de ionização por APCI no modo negativo. Voltagens de 20 – 35 V e fluxo 10 $\mu$ L/min. As amostras foram solubilizadas em metanol (grau HPLC) na concentração final de 10 ppm, em seguida, foram injetadas manualmente 10  $\mu$ L de amostra no espectrômetro. As análises dos espectros de massas obtidos foram realizadas por meio do software Xcalibur (versão 2.2 SP1. 48).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Rendimento do óleo essencial de *P. callosum* em função da sazonalidade.

Os rendimentos dos óleos essenciais das amostras de *P. callosum* correspondem às coletas realizadas nos meses de janeiro (período de chuva) e outubro (período de seca) de 2018 e 2019. Para as coletas realizadas no mês de janeiro de 2018 e 2019 foram obtidos dois óleos com características diferentes, sendo um deles incolor e mais denso que a água (OE1) e o outro amarelo claro e menos denso que a água (OE2). Na coleta realizada no mês outubro de 2018 foram obtidos três óleos, sendo que, os dois primeiros foram semelhantes aos da coleta dos meses anteriores, diferenciando apenas o terceiro óleo que foi transparente e menos denso que a água (OE3). Enquanto que, no mês de outubro de 2019 os óleos essenciais obtidos foram semelhantes aos da coleta de janeiro de 2018-2019. O rendimento do óleo essencial obtido no mês de out-2018 foi de 0,60%, maior que rendimento do o óleo essencial obtido no mês de out-2019 de 0,36% e nos meses de jan/2018 e jan/2019, com valores de 0,43 e 0,40%, respectivamente (Tabela 4). Portanto, a sazonalidade não influenciou no rendimento do óleo essencial.

Os rendimentos dos óleos essenciais, obtidos neste estudo, foram relativamente maiores que o rendimento do óleo essencial de *P. callosum*, coletada na Amazônia Peruana, sendo 0,35% (VAN GENDEREN *et al.*, 1999). Porém, quando comparado com o rendimento do óleo essencial obtido de partes aéreas secas (1,9%) coletada na Amazônia Brasileira, os rendimentos foram menores (MAIA *et al.*, 1987). Os rendimentos dos óleos essenciais obtidos neste estudo, também, foram maiores que os de *Piper mosenii* (0,28% - inverno), *Piper gaudichaudianum* (0,13% - inverno e 0,05% - verão) e *Piper diospyrifolium* (0,13% - inverno) (DEL QUIQUI *et al.*, 2019).

Tabela 4- Rendimentos do óleo essencial de *P. callosum*.

Data da coleta	Massa (g) da amostra	Código das amostras	Rendimentos (%)	Rendimento total (%)
Janeiro 17.01.18	365,8	OE1	0,28	0,43
		OE2	0,15	
Outubro 25.10.18	320,20	OE1	0,16	0,60
		OE2	0,17	
		OE3	0,27	
Janeiro 31.01.19	326,27	OE1	0,27	0,40
		OE2	0,13	
Outubro 08.10.19	298,70	OE1	0,10	0,36
		OE2	0,26	

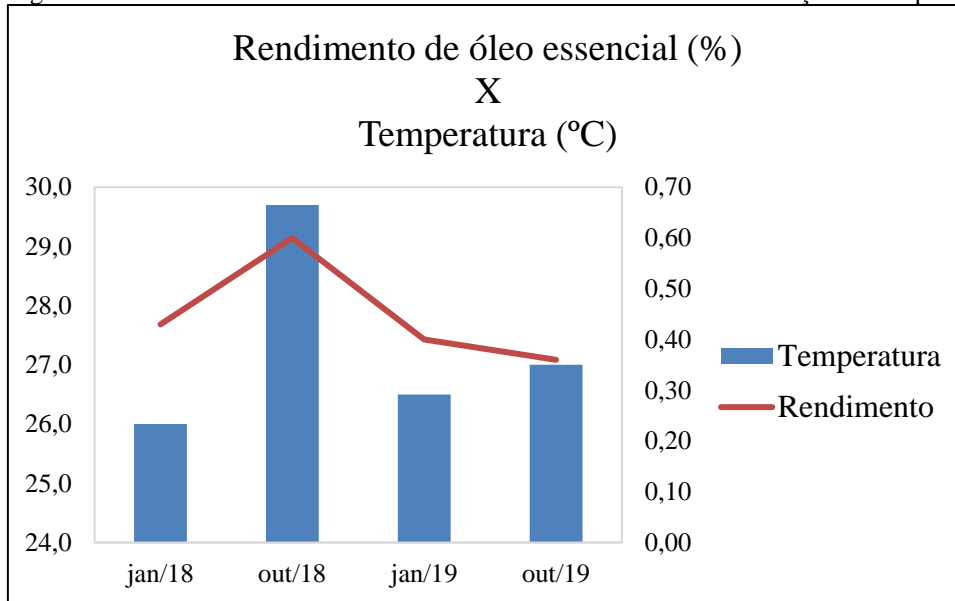
OE1: Óleo mais denso que a água, transparente claro; OE2: Óleo menos denso que a água, amarelo claro; OE3: Óleo menos denso que a água, transparente claro.

#### 4.2. Rendimento do óleo essencial de *P. callosum* em função da temperatura (°C)

A composição e concentração das substâncias químicas, assim como os rendimentos dos óleos essenciais, estão diretamente relacionados a fatores genéticos, ontogênicos, morfogenéticos e ambientais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; BARRA, 2009; VERMA & SHUKLA, 2015; MOGHADDAM, 2017). Neste estudo avaliou-se o rendimento do óleo essencial de *P. callosum*, coletada na região de Itacoatiara no período de 01/2018 a 10/2019, em função da temperatura e do volume de precipitação, dados obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET.

Na figura 5 observa-se que a temperatura influenciou diretamente no rendimento do óleo essencial, pois o maior rendimento (0,60%) foi obtido no mês de out/2018, período de seca intensa, quando a temperatura atingiu 29,7 °C. Enquanto que, em jan/2018, jan-2019 e out/2019, a temperatura variou de 26,0 a 27,0 °C e foram obtidos os menores rendimentos (0,40; 0,36 e 0,43%). Para o óleo essencial de *Piper cernuum*, o maior rendimento (2,07%) foi obtido no verão, porém foram utilizadas folhas secas (GASPARETTO, 2016). No estudo realizado por Del Quiqui *et al.*, (2019) com as espécies *Piper gaudichaudianum*, *Piper xylopioides* e *Piper diospyrifolium*, os rendimentos médios foram de 0,05; 1,37 e 0,38, respectivamente, em temperaturas médias acima de 22 °C.

Figura 5 - Rendimento do óleo essencial das folhas de *P. callosum* em função da temperatura (°C).

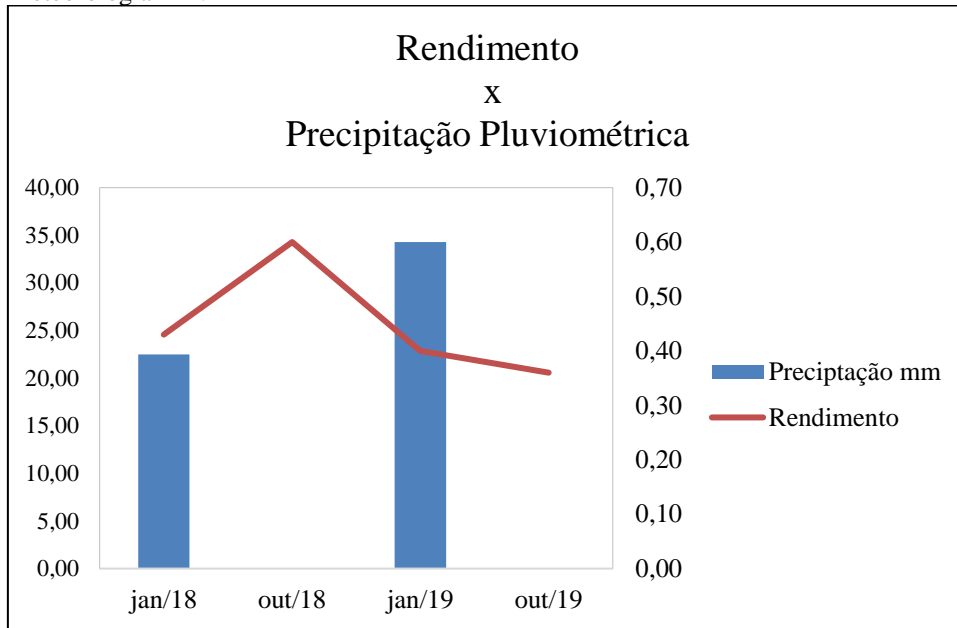


Fonte: Os autores (2020).

#### 4.3. Rendimento do óleo essencial de *P. callosum* em função do volume hídrico

Na figura 6 observa-se que o rendimento do óleo essencial de *P. callosum* não apresentou relação direta com o volume de precipitação. Uma vez que, nos meses de outubro de 2018-2019 foram obtidos rendimentos de óleo essencial semelhantes (0,43 e 0,40%, respectivamente), sendo o volume de precipitação de 22,50 e 34,30 mm. Esses rendimentos foram menores em relação ao óleo essencial (0,60%) obtido no mês de outubro de 2018 e maiores em relação ao obtido (0,36%) no mês de outubro de 2019, quando a precipitação pluviométrica foi de 0,00 mm. Diferentemente deste estudo, o óleo essencial de *Piper cernuum* (1,49%) (GASPARETTO et al., 2016) e *Piper xylopioides* (0,94%) (DEL QUIQUI et al., 2019) apresentaram maiores rendimentos nas coletas realizadas durante o inverno. Porém, para o óleo essencial de *Piper permucromatum* o rendimento foi de 0,23% na coleta realizada no outono (TORQUILHO et al., 1999). No entanto, os óleos essenciais de *Piper mosenii*, *Piper gaudichaudianum* e *Piper diospyrifolium* apresentaram rendimentos médios de 0,28; 0,13 e 0,13%, respectivamente, na época de inverno em que a precipitação média anual é de 1,200 a 1,400 mm (DEL QUIQUI et al., 2019), menor que a precipitação encontrada neste estudo.

Figura 6 - Rendimento do óleo essencial em função da precipitação pluviométrica. Dados do Instituto de Meteorologia – INMET



Fonte: Os autores (2020).

#### 4.4. Determinação da composição química do Óleo Essencial por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas – CG/EM

As figuras 7 (OE1) e 8 (OE2) mostram os cromatogramas dos óleos essenciais, obtidos da mesma coleta realizada em 31/01/2019. A análise do cromatograma da amostra OE1 permitiu detectar 23 substâncias e da amostra OE2 37 substâncias.

Figura 7 - Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial, mais denso (OE1), de *P. callosum* (31/01/2019)

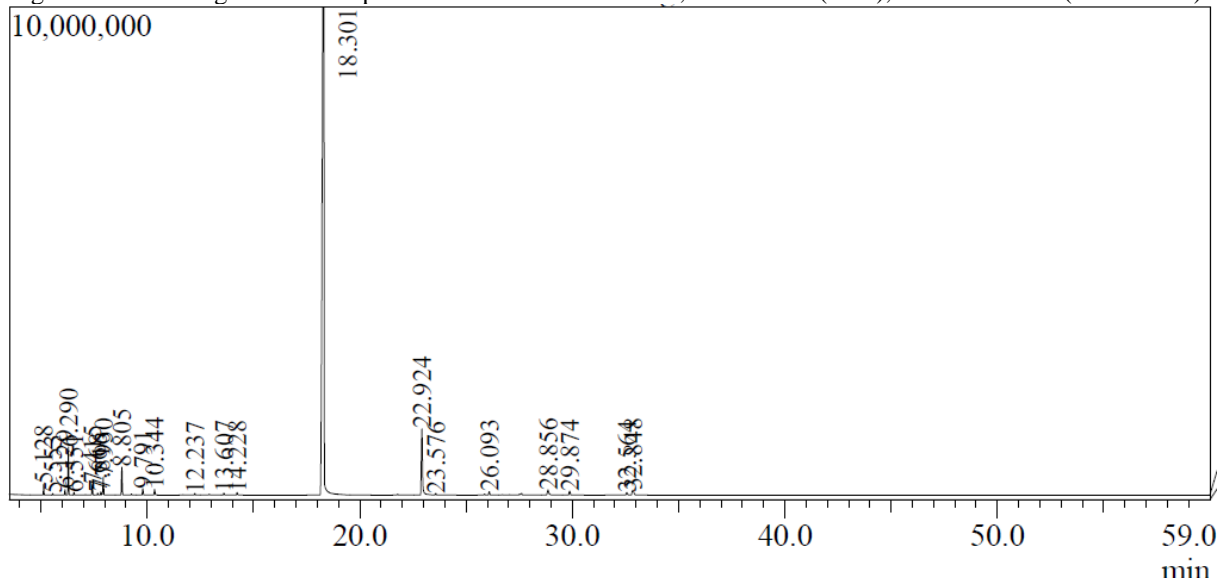
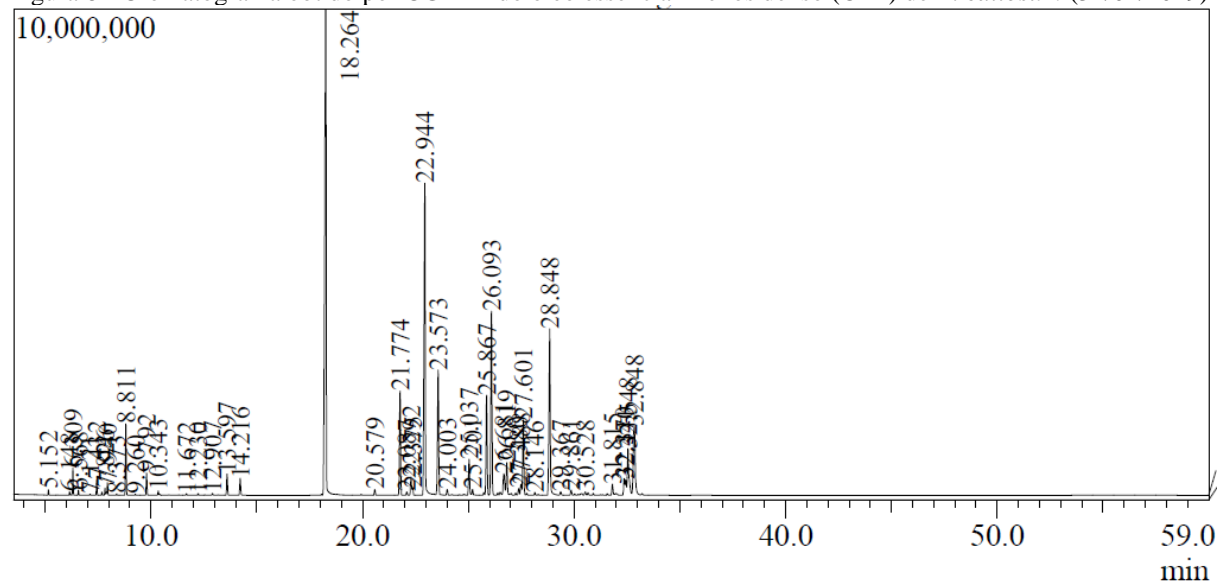


Figura 8 - Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial menos denso (OE2) de *P. callosum* (31/01/2019)



Na Tabela 5 é possível observar que os óleos essenciais obtidos no período de seca apresentaram maior quantidade de substâncias químicas em relação aos obtidos no período de chuva. Em out/2018 foi possível identificar 23 substâncias químicas na amostra OE1, 43 em OE2 e 36 em OE3. No óleo essencial obtido em out/2019, foram identificadas 39 substâncias químicas na amostra OE1 e 45 em OE2. No óleo essencial obtido em jan/2018 foram identificadas 28 substâncias químicas na amostra OE1 e 22 em OE2. Em jan/2019 foi possível identificar 23 substâncias químicas na amostra OE1 e 37 em OE2. A composição química dos



óleos essenciais de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característico para o seu estágio de desenvolvimento, no entanto as condições do ambiente são capazes de causar variações significativas (SIMÕES *et al.*, 2007). A temperatura e a precipitação pluviométrica são fatores extrínsecos capazes de influenciar no conteúdo dos óleos essenciais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007), semelhante ao observado nesta pesquisa, em que o maior teor de óleo essencial e número de substâncias químicas foram encontradas no período de maior temperatura e nenhuma precipitação.

Considerando os monoterpenos e sesquiterpenos separadamente, o fenilpropanoide foi a classe de substância química predominante na maioria das amostras analisadas. Os monoterpenos apresentaram maior rendimento nas amostras OE1 obtidas em jan-2018 (50,17%) e OE2 obtida em out-2019 (46,24%). Os sesquiterpenos apresentaram menor rendimento que os monoterpenos e fenilpropanoides na maioria das amostras analisadas, exceto para o óleo OE2 (35,94%) obtido em jan-2019, quando comparado com os monoterpenos da amostra OE2 (5,62%), obtido no mesmo período. Os resultados da presente pesquisa estão de acordo com os dados relatados na literatura para a espécie *P. callosum*, sendo que o fenilpropanoide foi a classe de substância predominante, seguida por monoterpenos e sesquiterpenos (MAIA *et al.*, 1987; van GENDEREN, *et al.*, 1999; SILVA & BASTOS, 2007, ALMEIDA *et al.*, 2018).

Tabela 5- Constituintes químicos identificados dos óleos essenciais de *P. callosum*.

Nº	Componentes	IR (Exp)	IR (Exp)	17.01.18		25.10.18			31.01.19		08.10.19		Fórmula Molecular
				OE1	OE2	OE1	OE2	OE3	OE1	OE2	OE1	OE2	
1	$\alpha$ -Pinoeno	932	932	<b>2,01</b>	<b>7,38</b>	<b>2,71</b>	<b>20,94</b>	<b>10,09</b>	<b>0,46</b>	<b>0,10</b>	<b>0,63</b>	<b>10,51</b>	C10 H16
2	Canfeno	947	946	0,20	0,44	0,24	0,68	0,53	0,05	-	0,08	0,91	C10 H16
3	Sabineno	972	969	0,31	0,79	1,34	3,39	2,96	0,25	0,07	0,51	4,17	C10 H16
4	$\beta$ -pinoeno	976	974	<b>6,55</b>	<b>12,47</b>	<b>4,90</b>	<b>12,84</b>	<b>10,97</b>	<b>2,45</b>	<b>0,68</b>	<b>1,79</b>	<b>11,22</b>	C10 H16
5	Mirceno	990	988	0,18	0,64	0,31	1,24	0,74	0,12	0,10	0,14	1,40	C10 H16
6	$\alpha$ -Felandreno	1005	1002	-	0,13	0,05	0,25	0,13	-	0,02	0,02	0,32	C10 H16
7	$\alpha$ -Terpineno	1016	1014	1,20	2,39	0,56	1,51	1,15	0,54	0,38	0,33	2,13	C10 H16
8	p-Cimeno	1024	1020	-	0,56	0,22	0,32	0,28	0,08	-	0,11	0,53	C10 H14
9	Limoneno	1028	1024	0,25	0,74	0,43	1,44	0,90	0,16	0,19	0,18	1,40	C10 H16
10	$\beta$ -Felandreno	1029	1025	-	0,27	-	-	-	-	-	-	-	C10 H16
11	1,8-Cineol	1030	1026	1,34	0,27	5,98	1,70	4,23	1,04	0,39	3,30	4,35	C10 H18 O
12	( <i>E</i> ) $\beta$ -Ocimeno	1046	1044	-	-	0,03	0,07	0,06	-	0,03	0,02	0,35	C10 H16
13	$\gamma$ -Terpineno	1057	1054	2,74	5,94	1,47	3,72	2,83	1,67	2,16	0,94	4,69	C10 H16
14	Hidrato de Cis-sabineno	1069	1065	-	-	-	-	-	-	-	0,18	0,15	C10 H8
15	Terpinoleno	1088	1086	0,61	1,51	-	0,92	0,68	0,40	0,67	0,28	1,38	C10 H16
16	Linalool	1100	1095	0,22	-	0,80	0,09	0,44	0,34	0,11	0,82	0,37	C10 H18 O
17	Canfor	1144	1141	0,07	-	0,13	-	0,10	0,09	0,05	0,17	0,12	C10 H16 O
18	Isoborneol	1156	1155	-	-	0,23	0,08	0,19	-	0,05	0,27	0,22	C10 H18 O
19	$\delta$ -Terpineol	1167	1162	-	-	-	-	0,07	-	-	0,03	0,10	C10 H18 O
20	Terpinen-4-ol	1177	1174	0,06	0,19	0,31	1,28	0,66	0,09	0,72	0,30	1,06	C10 H18 O
21	$\alpha$ -Terpineol	1191	1186	0,11	0,29	0,41	0,62	0,58	0,17	0,57	0,53	0,86	C10 H18 O
22	Safrol	1292	1285	<b>78,75</b>	<b>29,77</b>	<b>74,24</b>	<b>22,23</b>	<b>51,49</b>	<b>84,42</b>	<b>29,52</b>	<b>77,71</b>	<b>26,34</b>	C10 H10 O2
23	$\alpha$ -Cubebeno	1349	1348	-	-	-	0,07	-	-	0,20	0,04	0,14	C15 H24
24	$\alpha$ -Copaeno	1375	1374	-	1,88	0,03	1,83	0,27	-	4,33	0,07	1,65	C15 H24
25	$\beta$ -Bourboneno	1384	1387	-	-	-	0,06	-	-	0,10	-	0,07	C15 H24

26	$\beta$ -Cubebeno	1390	1387	-	-	-	0,23	-	-	0,26	0,08	0,36	C15 H24
27	$\beta$ -Elemeno	1392	1389	-	-	-	0,06	-	-	-	-	0,13	C15 H24
28	metil-eugenol	1407	1403	<b>4,14</b>	<b>12,29</b>	<b>3,50</b>	<b>6,75</b>	<b>5,39</b>	<b>5,75</b>	<b>14,23</b>	<b>6,58</b>	<b>6,93</b>	C11 H14 O2
29	Z-Cariofileno	1415	1408	-	-	-	-	-	0,10	-	-	-	C15 H24
30	E-Cariofileno	1418	1417	-	2,37	-	1,85	0,30	-	5,53	0,11	1,80	C15 H24
31	$\alpha$ -Humuleno	1452	1452	-	0,57	-	0,49	0,08	-	1,53	0,03	0,53	C15 H24
32	Allo-	1460	1458	-	-	-	0,06	-	-	0,23	-	0,08	C15 H24
	Aromadendreno												
33	$\gamma$ -Muuroleno	1476	1478	-	2,43	-	1,40	0,22	-	4,37	0,06	1,19	C15 H24
34	Germacreno D	1480	1480	0,11	4,20	-	3,08	0,73	0,23	8,36	0,22	3,00	C15 H24
35	Biciclogremacreno	1496	1500	-	0,39	-	0,20	-	-	-	-	0,39	C15 H24
36	$\alpha$ -muuroleno	1500	1500	-	0,73	-	0,43	0,05	-	1,45	-	0,49	C15 H24
37	Pentadecano	1500	1500	-	-	-	-	-	-	-	0,24	0,07	C15 H32
38	$\gamma$ -Cadineno	1513	1513	-	-	-	0,08	-	-	0,20	0,09	0,11	C15 H24
39	Cubebol	1515	1514	-	-	-	0,20	0,14	-	0,38	0,08	0,16	C15 H26 O
40	$\delta$ -Cadineno	1523	1522	0,10	1,31	-	1,11	0,24	-	3,14	0,23	1,09	C15 H24
41	Elemol	1550	1548	-	-	-	0,24	0,12	-	-	0,45	0,79	C15 H26 O
42	Elemicina	1560	1555	<b>0,14</b>	<b>3,13</b>	-	<b>3,33</b>	<b>0,98</b>	<b>0,49</b>	<b>8,00</b>	<b>1,25</b>	<b>2,53</b>	C12 H16 O3
43	E-Nerolidol	1564	1561	-	-	-	0,10	-	-	0,13	0,03	0,11	C15 H26 O
44	Germacreno D-4-ol	1575	1574	0,09	-	0,21	0,04	0,17	0,29	0,18	0,17	-	C15 H26 O
45	Veridiflorol	1591	1592	-	-	-	0,05	-	-	0,13	-	0,05	C15 H26 O
46	1-epi-Cubenol	1628	1627	-	-	-	0,23	-	-	0,39	-	0,15	C15 H26 O
47	$\alpha$ -Muurulol	1643	1644	0,16	0,69	0,14	0,94	0,44	0,17	-	0,33	0,97	C15 H26 O
48	$\beta$ -Eudesmol	1650	1649	0,54	4,48	0,26	1,00	0,57	0,64	5,03	1,24	-	C15 H26 O
49	$\alpha$ -Eudesmol	1653	1652	-	-	-	-	0,13	-	-	-	2,59	C15 H26 O
50	$\alpha$ -Cadinol	1655	1652	-	-	-	1,41	0,36	-	-	-	-	C15 H26 O

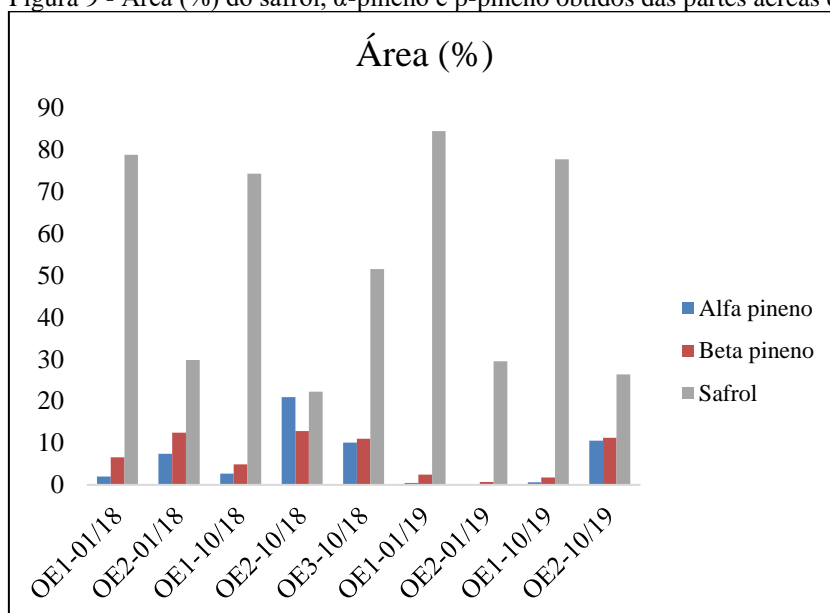
*Classe de  
compostos*

Monoterpeno hidrocarbonetos	46,4	12,26	31,32	33,26	13,78	6,18	3,73	4,09	39,16
Monoterpeno oxigenados	3,77	7,86	2,04	0,75	1,8	1,73	1,89	5,42	7,08
<b>Total monoterpenos</b>	<b>50,17</b>	<b>20,12</b>	<b>33,36</b>	<b>34,01</b>	<b>15,58</b>	<b>7,86</b>	<b>5,62</b>	<b>9,51</b>	<b>46,24</b>
Sesquiterpeno hidrocarbonetos	10,95	0,00	1,89	13,88	0,21	0,33	29,70	1,13	11,10
Sesquiterpeno oxigenados	3,77	0,61	2,93	5,17	0,79	1,10	6,24	2,30	4,82
<b>Total sesquiterpenos</b>	<b>14,72</b>	<b>0,61</b>	<b>4,82</b>	<b>17,17</b>	<b>1,00</b>	<b>1,43</b>	<b>35,94</b>	<b>3,43</b>	<b>15,92</b>
<b>Fenilpropanoides</b>	<b>32,31</b>	<b>77,74</b>	<b>57,86</b>	<b>45,19</b>	<b>83,03</b>	<b>90,66</b>	<b>51,75</b>	<b>85,62</b>	<b>35,8</b>
Total identificados	97,2	98,47	96,04	96,37	99,61	99,95	93,31	98,56	97,96

IR (exp) = Índice de Retenção relativo à série de alcanos (C9-C20) na coluna DB-5MS. IR (lit) = Índice de Retenção da literatura (ADAMS, 2007). IR = Índice de Retenção.

O safrol foi a substância com maior porcentagem em área dentre aquelas identificadas no óleo essencial das partes aéreas de *P. callosum*. Após o safrol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno apresentaram os maiores percentuais em área.  $\alpha$ -pineno (20,94%) na amostra OE2 obtida em out-2018, apresentou maior concentração em área em relação ao  $\beta$ -pineno (12,84%), diferente das outras amostras. Os menores teores de  $\alpha$ -pineno (OE1-0,46%; OE2-0,10% e OE1-0,63%) e  $\beta$ -pineno (OE2-0,68%) foram obtidos em janeiro-2019 e outubro-2019. O conteúdo dos óleos essenciais pode sofrer influência de diferentes fatores bióticos e abióticos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). De modo geral, os teores das substâncias químicas presentes neste estudo não sofreram influência direta da sazonalidade (Figura 9).

Figura 9 - Área (%) do safrol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno obtidos das partes aéreas de *P. callosum*.



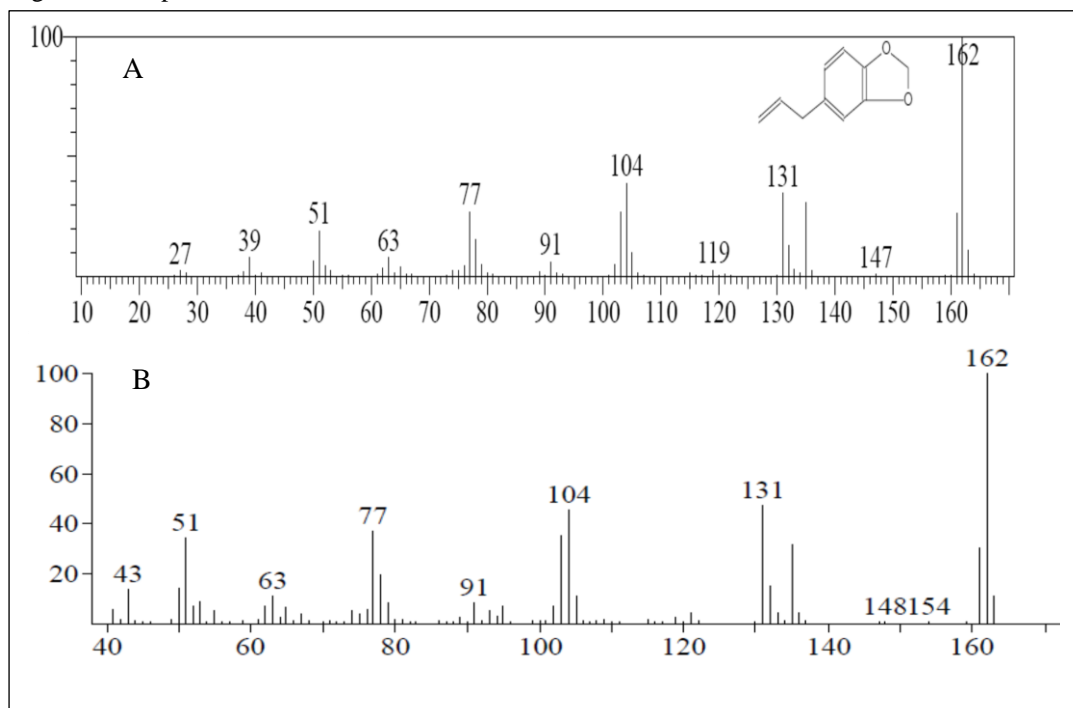
Fonte: Os autores (2020).

Legenda. OE1: óleo transparente mais denso que a água. OE2: óleo, amarelo claro, menos denso que a água. OE3: óleo transparente e menos denso que a água.

A figura 10 mostra o espectro de massas do safrol (1,3-Benzodioxol) (A) em comparação com espectro de massas da literatura (Adams, 2007) (B). O íon molecular do safrol  $[C_{10}H_{10}O_2 + H^+]$   $m/z = 162$  é equivalente ao pico base (abundância 100%), logo representa a molécula como um todo. Outros picos com valores de  $m/z$  131, 104, 77 e 51 são semelhantes tanto no espectro de massas da molécula, como no da literatura confirmando a presença do safrol no óleo essencial de *P. callosum*.

O safrol, substância majoritária presente em todos os óleos essenciais obtidos neste trabalho, é importante para a indústria, pois apresenta em sua molécula o grupo piperonila, a partir do qual, com pequenas transformações, obtém-se compostos orgânicos como o ácido piperonílico e o piperonal utilizados na indústria de alimentos, inseticidas, farmacêutica e no comércio de perfumes e cosméticos (MAIA, 1987; DA SILVA, 1987). Diversas substâncias químicas com distinta propriedade farmacológica foram sintetizadas a partir do safrol, dentre elas podemos citar a cinoxacina um antimicrobiano utilizado para prevenir e tratar infecções do trato urinário, assim como a levodopa, um fármaco usado no tratamento da síndrome parkinsoniana (LIMA, 2015). Pelo alto teor de safrol apresentado nas partes aéreas de *P. callosum*, esta espécie torna-se uma provável substituta para a exploração econômica do safrol na região.

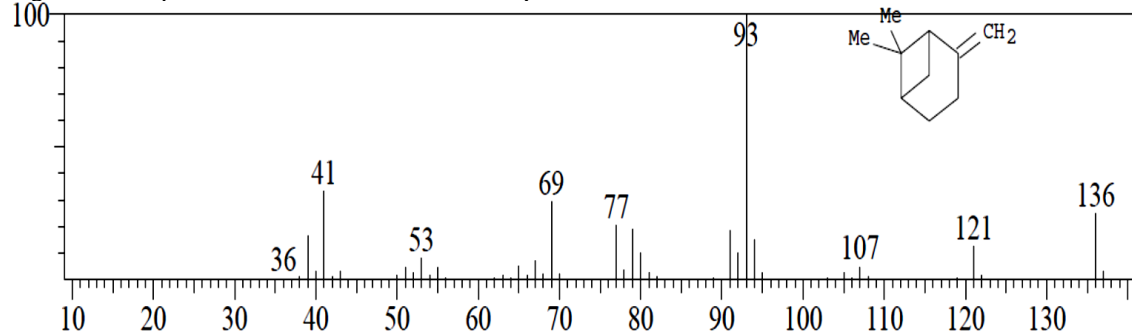
Figura 10 - Espectros de massas do Safrol



Legenda. A: espectro de massas do safrol obtido do óleo essencial mais denso que a água (31/01/2019). B: espectro de massa da literatura (ADAMS, 2007).

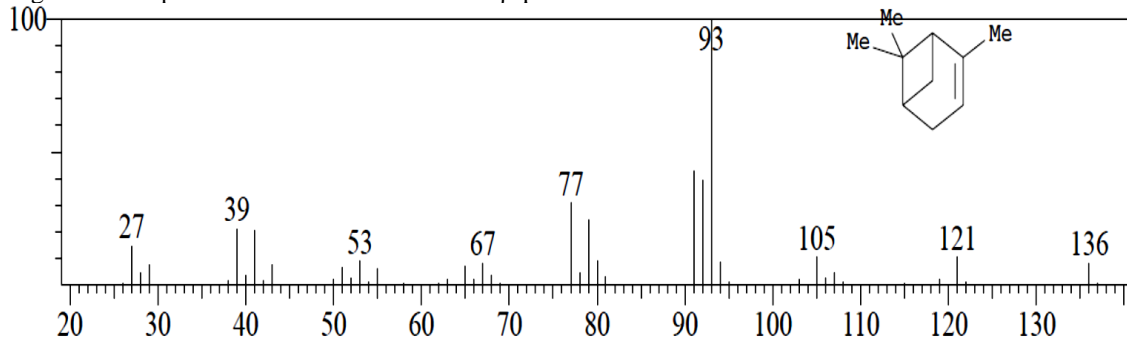
Os espectros de massas obtidos por CG/EM do  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno encontram-se nas figuras 11 e 12. O íon molecular do  $\alpha$ -pineno [ $C_{10}H_{16} + H^+$ ]  $m/z = 137$ , fragmentos [ $C_9H_{13}^+$ ]  $m/z = 121$  e o pico base [ $C_7H_9^+$ ]  $m/z = 93$  referentes à perda de três radicais metilas estão presentes nos espectros.

Figura 11 - Espectro de massas e estrutura do  $\alpha$ -pineno



Legenda: espectro de massas  $\alpha$ -pineno obtido do óleo essencial mais denso que a água (31/01/2019)

Figura 12 - Espectro de massas e estrutura do  $\beta$ -pineno



Legenda: espectro de massas do  $\beta$ -pineno obtido do óleo essencial mais denso que a água (31/01/2019).

#### 4.5. Perfil químico do extrato bruto e das frações por cromatografia em camada delgada

O processo de extração constitui uma das etapas mais importantes no processo de separação e caracterização das substâncias químicas de interesse (SIMÕES et al., 2007). Extrato bruto (EXTB) e frações: hexano (FHEX), clorofórmio (FCL), acetato de etila (FAC), butanol (FBU) e hidroalcolólica (FHID) das folhas de *P. callosum* foram preparados afim de obter as

mais variadas classes de substâncias bioativas. Os rendimentos obtidos estão descritos na tabela 6.

Tabela 6- Massa e rendimento do extrato bruto e frações de *P. callosum*.

Códigos	Massa do extrato e frações (g)	Rendimento (%)
EXTB + Frações	26,7461	-
FHEX	4,1192	15,13
FCL	0,4472	1,64
FAC	0,3964	1,45
FBU	2,8361	10,41
FHID	19,4252	71,35

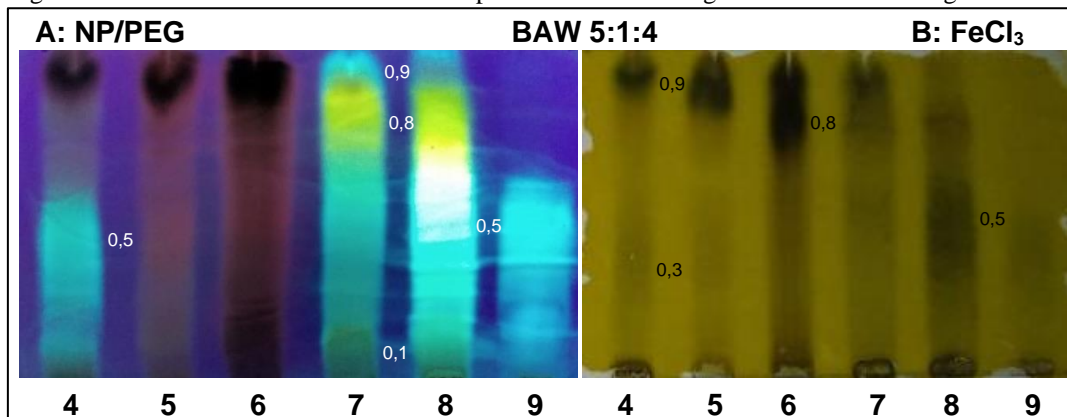
EXTB: extrato bruto; FHEX: fração hexano; FCL: fração clorofórmio; FAC: fração acetato; FBU: fração butanol; FHID: fração hidroalcolica.

A mudança de coloração de uma reação química é determinada pela composição química presente nas plantas (REZVANIAN *et al.*, 2016). O extrato bruto e as frações FAC, FBU e FHID das folhas de *P. callosum* apresentaram manchas de cor verde com Rf 0,1 e 0,5 na placa cromatográfica para detecção de grupos fenólicos (FIGURA 13). As frações FBU e FHID também apresentaram mancha de cor verde com Rf 0,5. As frações em FAC e FBU apresentaram mancha de cor verde com Rf 0,9. As frações em FAC e FBU apresentaram mancha de coloração amarela, característica da presença de flavonoides, com Rf 0,8. A Figura 13 B mostra a placa revelada com cloreto férrico, onde foi possível observar várias manchas escuras, com diferentes Rfs, sugerindo a presença de substâncias fenólicas. Os Rfs dessas manchas estão semelhantes aos observados na placa revelada com NP/PEG (FIGURA 13 A) (WAGNER, 1996; GUIMARÃES, 2005).

Esses resultados corroboram com a literatura, uma vez que, no estudo histoquímico realizado por Silva (2017), foi verificada a presença de substâncias fenólicas e flavonoides nas folhas, pecíolos e estames de *P. callosum*. O extrato dos frutos de *P. nigrum* apresentou grupos fenólicos na análise por cromatografia em camada delgada, indicado pela coloração amarela após reação com cloreto férrico (REZVANIAN *et al.*, 2016). O extrato aquoso das folhas de *P. betle* apresentou substâncias fenólicas com Rfs 0,82 e 0,91 semelhantes aos encontrados neste estudo (NALINA & RAHIM, 2007). Tanto as substâncias fenólicas como os flavonoides, de espécies vegetais, apresentam propriedade antioxidante, sendo capazes de inibir a ação dos radicais livres (SIMÕES *et al.*, 2007; RANILLA *et al.*, 2010; KUMAR & PANDEY, 2013; CHEN & CHUNG, 2019).



Figura 13 - Substancias fenólicas reveladas por meio de Cromatografia em Camada Delgada.

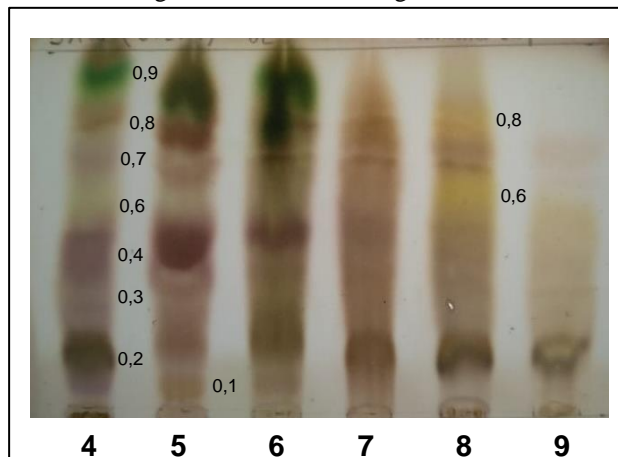


Fonte: Os autores (2020).

Legenda. Revelador: A: NP/PEG; B: Cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). Eluente: BAW: Butanol, ácido acético e água. 4: Extrato bruto. 5: Fração hexano. 6: Fração clorofórmio. 7: Fração acetato de etila. 8: Fração

Na placa revelada com Vanilina Sulfúrica (FIGURA 14) foram detectadas manchas de coloração amarela com Rfs 0,6 e 0,8 nas amostras EXTB, FAC, FBU e FHID, indicando a presença de flavonoides. Nesta placa ainda foram observadas manchas de coloração verde, vermelho, marrom e cinza, características da presença de terpenos, derivados fenilpropanoides e fenóis. Além disso, foram observadas nas amostras EXTB, FHEX, FCL, FAC, FBU e FHID manchas de coloração verde com Rfs 0,2 e 0,9. As amostras EXTB, FHEX e FCL apresentaram manchas de coloração violeta com Rfs 0,3 e 0,4. As amostras EXTB, FHEX, FCL, FAC, FBU e FHID apresentaram manchas de coloração marrom com Rf 0,8. As amostras EXTB, FHEX e FCL ainda apresentaram mancha de coloração cinza com Rfs 0,1 e 0,7. A placa revelada com Dragendorff e Orcinol Sulfúrico, para a detecção de alcaloides e substâncias glicosiladas, não apresentou mancha característica da presença deste grupo de metabólito (WAGNER, 1996; GUIMARÃES, 2005).

Figura 14 - Substâncias terpênicas e fenólicas reveladas em Cromatografia em Camada Delgada.



Fonte: Os autores (2020).

Revelador: Vanilina sulfúrica. Eluente: BAW: Butano, ácido acético e água. 4: Extrato bruto. 5: Fração hexano. 6: Fração clorofórmio. 7: Fração acetato de etila. 8: Fração butanol. 9: Fração hidroalcolólica.

#### 4.6. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de Grupos Fenólicos

Para confirmar a presença de substâncias fenólicas e flavonoides no teste de cromatografia em camada delgada, realizou-se o ensaio do perfil químico em tubos de ensaio com as amostras EXTB, FAC, FBU e FHID, adicionando cloreto férrico e soluções com diferentes valores de pH. As cores observadas variaram conforme o núcleo, o número e a disposição dos substituintes hidroxilados, sendo possível distinguir as diversas classes de flavonoides (SIMÕES *et al.*, 2007). As amostras EXTB, FAC, FBU e FHID apresentaram taninos flobabênicos, demonstrado na reação com cloreto férrico, formando precipitado escuro de tonalidade verde. A amostra EXTB apresentou flavanonol em pH 11 observando-se a coloração vermelho laranja. As frações FAC, FBU e FHID apresentaram flavonas, flavonóis e xantonas em pH 11, observando-se a coloração amarela. Somente na fração FHID houve presença de catequinas (taninos catéquicos) em pH 3 aquecido, quando a coloração foi pardo-amarelado. Esses resultados confirmam a presença de substâncias fenólicas e flavonoides observados nas placas cromatográficas com coloração verde brilhante, amarelo e verde escuro. Em estudo histoquímico das folhas, pecíolos e estames de *P. callosum*, coletada em Manaus-

AM e Belém-PA, observou-se a presença de substâncias fenólicas e flavonoides (SILVA *et al.*, 2017), corroborando com os resultados encontrados.

Em outras espécies de *Piper*, como nos extratos polares das folhas e frutos de *Piper nigrum*, os resultados mostraram a presença de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas e compostos fenólicos (NARENDRA *et al.*, 2018; AHMAD *et al.*, 2015). O extrato cetônico de *P. umbellatum* apresentou flavonoides e taninos (NIYAZI *et al.*, 2017). Vários flavonoides foram isolados, como o 5,3',4'-triidroxí-7-metoxiflavona; 5,3'-diidroxí-7-4'-dimetoxiflavona e 5,4'-diidroxí-7-metoxiflavona das partes aéreas de *Piper carnicconnectivum* C.DC (ALVES *et al.*, 2010). Os flavonoides 2',4'-Diidroxí-3,3',6'-trimetoxichalcona e 2',3',5-Triidroxí-4',6',3'-trimetoxichalcona foram isolados das folhas de *Piper delineatum* Trel. (MARTÍN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2015). Foram isoladas também, cromenos de *P. mollicomum* e lignanas das espécies *P. cernunn* e *P. cabralanum* (MACEDO *et al.*, 2019). Muitos destes flavonoides apresentaram propriedades biológicas importantes como antimicrobiana (MARTÍN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2015) e anticâncer (MACEDO *et al.*, 2019).

#### **4.7. Prospecção Fitoquímica para Caracterização de terpenoides e esteroides**

No ensaio de Lieberman Buchard para caracterização de terpenos foi possível observar mudança de coloração para o verde permanente nas amostras EXTB, FHEX e FCL, indicando a presença de esteroides livres (MATOS, 2009). A presença de esteroides foi observada por Silva *et al.*, (2017) em estudo histoquímico das folhas, estames e pecíolos de *P. callosum*, corroborando com o resultado encontrado. Para *P. umbellatum* foi isolado o diterpenoide 4-nerolidilcatecol do extrato diclorometano das folhas e o mesmo apresentou atividade anti-inflamatória e anticâncer (IWAMOTO *et al.*, 2015). Enquanto que o triterpenoide ácido betulínico, quando avaliado *in vitro*, foi eficaz contra células cancerígenas e aquelas resistentes a quimioterapia, sendo ainda pouco tóxica para as células saudáveis (MALLAEUR *et al.*, 2010).

#### **4.8. Teste para Saponinas**

O teste para detecção de saponinas foi realizado com as amostras EXTB, FAC, FBU e FHID, contudo, apenas a fração butanólica (FBU), apresentou espuma persistente por mais de três minutos, sendo realizado o teste confirmatório. Durante o teste confirmatório (hidrolise ácida), a solução apresentou precipitado floculoso e não houve formação de espuma quando

agitado novamente, confirmando a presença de saponinas (MATOS, 2009). Na literatura há relatos para a presença de saponinas no extrato hidroalcolico das sementes de *Piper nigrum* (NARENDRA *et al.*, 2018). As saponinas possuem algumas atividades biológicas comprovadas. Por exemplo, as saponinas isoladas das raízes de *Chlorophytum borivillianum* possuem atividade anti-inflamatória e antiartrítica (LANDE *et al.*, 2015). As saponinas polifilina e dioscina isoladas do extrato metanólico de *Paris polyphylla*, apresentaram importante atividade anti-helmíntica (WANG *et al.*, 2010). Estas atividades biológicas podem estar relacionadas ao comportamento anfifílico das saponinas, característica que atribui a estas substâncias a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídios de membranas celulares, causando permeabilidade ou sua destruição (SIMÕES *et al.*, 2017).

Tabela 7- Fitoquímicos analisados do extrato bruto e frações de *P. callosum*.

Classes químicas	EXTB	FHEX	FCL	FAC	FBU	FHID
Saponinas	-	-	-	-	+	-
Esteroides Livres	+	+	+	-	-	-
Flavanonol	+	-	-	-	-	-
Taninos	+	-	-	+	+	+
Flobabênicos						
Flavonas	-	-	-	+	+	+
Flavonóis	-	-	-	+	+	+
Flavanonas	-	-	-	-	-	-
Xantonas	-	-	-	+	+	+
Catequinas	-	-	-	-	-	+
Taninos pirogálicos	-	-	-	-	-	-
Fenóis	-	-	-	-	-	-
Antocianidinas	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-	-
Chalconas	-	-	-	-	-	-
Auronas	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-

EXTB: extrato bruto; FHEX: fração hexano; FCL: fração clorofórmio; FAC: fração acetato; FBU: fração butanol; FHID: fração hidroalcolica.

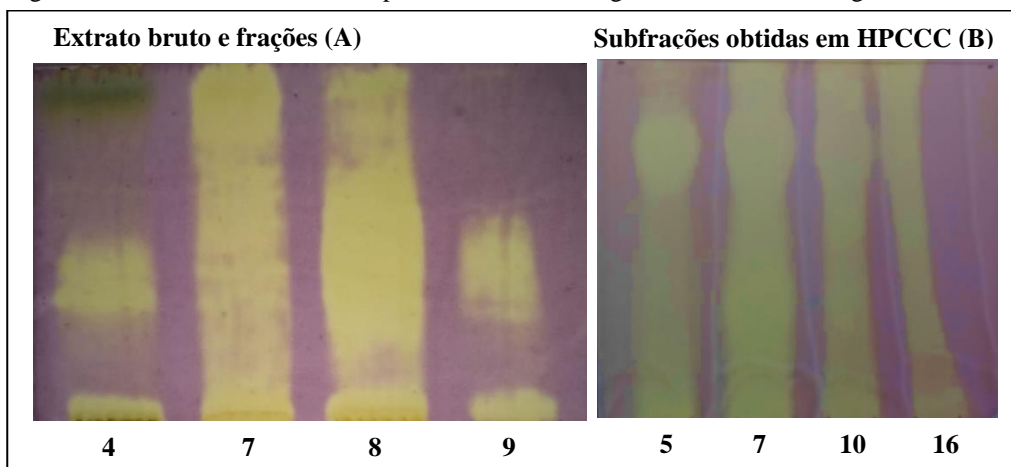
#### 4.9. Ensaio antioxidante qualitativo *in vitro* do extrato bruto e frações de *P. callosum*

Atualmente existe uma grande demanda científica e industrial para explorar ingredientes naturais e inovadores de espécies vegetais (DORNI *et al.*, 2017). Por isso, a importância da avaliação do potencial antioxidante frente ao radical DPPH do EXTB, frações (FAC, FBU e FHID) e subfrações (FBU-5, FBU-7, FBU-10 e FBU-16). Quando a placa cromatográfica foi

borrifada com o radical DPPH (FIGURA 15), observou mudança de coloração do lilás para o amarelo claro em todas as amostras avaliadas. A atividade antioxidante (AA) é positiva quando manchas amarelas são formadas a partir de branqueamento da cor púrpura do reagente DPPH (TEPE *et al.*, 2005).

Essas mesmas amostras apresentaram coloração indicativa para grupos fenólicos e flavonoides na placa revelada com NP/PEG (FIGURA 20), indicando, dessa forma, a presença de substâncias com propriedades antioxidantes (WAGNER, 1996; GUIMARÃES, 2005). Essas substâncias podem ser as principais responsáveis pela atividade antioxidante apresentada, devido principalmente, pela concentração de fenólicos e flavonoides, bem como, suas diferentes estruturas químicas (CHEN *et al.*, 2019). Essa propriedade antioxidante está descrita para diferentes espécies de *Piper*, como *Piper auritum* (CONDE-HERNÁNDEZ & GUERRERO-BELTRÁN, 2014), *Piper betle* (DASGUPTA & DE, 2004), *Piper kadsura* (LI *et al.*, 2013), *Piper nigrum* e *Piper umbellatum* que mostrou atividade antioxidante capaz de inibir o desenvolvimento de aterosclerose (AGBOR *et al.*, 2012).

Figura 15 - Atividade antioxidante por meio de Cromatografia em Camada Delgada



Fonte: Os autores (2020).

Legenda. Revelador: DPPH. (A) Eluente: BAW (4:1:5). (B) Eluente: AcOEt: CH<sub>3</sub>COOH: CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60:1:10) 4: Extrato bruto. 7: Fração acetato de etila. 8: Fração butanol. 9: Fração hidroalcolica. 5,7,10 e 16: subfrações reunidas obtidas em HPLC.

Baseado nos resultados obtidos no ensaio antioxidante qualitativo, foi realizado o ensaio quantitativo pelo método de inibição do radical DPPH (MENSOR *et al.*, 2001). Os resultados de inibição de radical DPPH e o valor de CI<sub>50</sub> estão descritos na tabela 8. Realizou-se também

o ensaio quantitativo para fenóis totais e os resultados mostraram a presença de grupos fenólicos, mas em baixas concentrações (Tabela 8). Apenas as amostras FBU e FHID mostraram atividade antioxidante superior a 50%, obtendo valores de  $CI_{50}$  de 89 e 91  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Tabela 8- Atividade antioxidante,  $CI_{50}$  e fenóis totais do extrato bruto, frações e subfrações de *P. callosum*.

Amostra	% AA	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fenóis Totais ( $\mu\text{g}$ Ácido Gálico/ml)
EXTB	22 $\pm$ 11,00	-	2 $\pm$ 0,22
FBU	63 $\pm$ 40,00	89 $\pm$ 4,57	6 $\pm$ 0,49
FHID	57 $\pm$ 40,00	91 $\pm$ 6,23	2 $\pm$ 0,19
<sup>1</sup> FBU-5	10 $\pm$ 40,00	-	3 $\pm$ 0,03
<sup>1</sup> FBU-7	18 $\pm$ 30,00	-	9 $\pm$ 1,12
<sup>1</sup> FBU-10	17 $\pm$ 30,00	-	9 $\pm$ 0,32
<sup>1</sup> FBU-16	17 $\pm$ 30,00	-	8 $\pm$ 0,94

n=3. <sup>1</sup>Subfrações, reunidas, obtidas da fração butanólica (FBU) em HPLCC. AA: atividade antioxidante

#### 4.10. Ação fumigante de óleos essenciais sobre *Suidasia pontifica*.

##### 4.10.1. Mortalidade (%) do óleo essencial de *P. callosum*

O ensaio de ação fumigante foi realizado com as amostras OE1, OE2 e OE3 coletadas em outubro/2018 sobre o ácaro *S. pontifica*. Na tabela 9 estão descritos os resultados de percentual de mortalidade em diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações.

O percentual de mortalidade de *S. pontifica* aumentou com o tempo de exposição e com o aumento nas concentrações para os três óleos avaliados. Na amostra OE1 (óleo essencial mais denso que a água), com 24 h de exposição dos ácaros, houve uma mortalidade superior e proporcionou uma mortalidade de 50% na concentração de 2  $\mu\text{L/L}$  de ar (Tabela 9) e na concentração de 6  $\mu\text{L/L}$  de ar a mortalidade foi de 100% em todos os tempos avaliados. Para o OE2 (óleo essencial menos denso que a água) a mortalidade dos ácaros foi de 95,52% na concentração de 2  $\mu\text{L/L}$  de ar e de 100% na concentração de 4  $\mu\text{L/L}$  de ar, em 72 h de exposição ao óleo essencial. A amostra OE3 (óleo essencial transparente menos denso que a água) proporcionou uma mortalidade de 72,94% na primeira concentração em 48h de exposição e na concentração de 8  $\mu\text{L/L}$  de ar, a mortalidade foi de 100% em todos os tempos avaliados.

Tabela 9- Mortalidade corrigida (média  $\pm$  desvio padrão) de *S. pontifica* em diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações de três óleos essenciais de *P. callosum* aplicados por fumigação.

Amostras	Concentração $\mu\text{L/L}$	Tempo			Média Geral $\pm$ DP <sup>1</sup>
		24 h	48 h	72 h	
OE1	00	0,0 $\pm$ 0,56	0,00 $\pm$ 2,47	0,00 $\pm$ 1,37	0,00 $\pm$ 0,83 <b>d</b>
	02	52,81 $\pm$ 4,24	58,90 $\pm$ 3,56	79,37 $\pm$ 5,56	63,69 $\pm$ 4,61 <b>c</b>
	04	93,26 $\pm$ 0,00	94,52 $\pm$ 0,68	96,83 $\pm$ 0,79	94,87 $\pm$ 0,60 <b>b</b>
	06	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
	08	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
	10	96,63 $\pm$ 1,69	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	98,88 $\pm$ 0,74 <b>ab</b>
Média Geral $\pm$ DP		73,78 $\pm$ 8,97 <b>B</b>	75,57 $\pm$ 8,95 <b>B</b>	79,37 $\pm$ 8,83 <b>A</b>	76,24 $\pm$ 5,06
OE2	00	0,00 $\pm$ 4,26	0,00 $\pm$ 3,18	0,00 $\pm$ 7,12	0,00 $\pm$ 2,56 <b>d</b>
	02	-2,60 $\pm$ 2,83	6,94 $\pm$ 3,03	95,52 $\pm$ 2,24	33,29 $\pm$ 15,68 <b>c</b>
	04	75,32 $\pm$ 2,34	76,39 $\pm$ 1,39	100,00 $\pm$ 0,00	83,90 $\pm$ 4,10 <b>b</b>
	06	70,13 $\pm$ 0,65	77,78 $\pm$ 3,67	100,00 $\pm$ 0,00	82,64 $\pm$ 4,61 <b>b</b>
	08	94,81 $\pm$ 1,30	91,67 $\pm$ 1,20	100,00 $\pm$ 0,00	95,49 $\pm$ 1,32 <b>a</b>
	10	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
Média Geral $\pm$ DP		56,28 $\pm$ 10,22 <b>B</b>	58,80 $\pm$ 9,73 <b>B</b>	82,59 $\pm$ 9,03 <b>A</b>	65,89 $\pm$ 5,72
OE3	00	0,00 $\pm$ 2,95	0,00 $\pm$ 1,56	0,00 $\pm$ 6,30	0,00 $\pm$ 2,06 <b>d</b>
	02	36,49 $\pm$ 5,77	72,94 $\pm$ 2,94	62,90 $\pm$ 4,49	57,44 $\pm$ 5,89 <b>c</b>
	04	90,54 $\pm$ 2,44	96,47 $\pm$ 1,76	90,32 $\pm$ 0,00	92,44 $\pm$ 1,33 <b>b</b>
	06	98,65 $\pm$ 0,62	95,29 $\pm$ 1,56	98,39 $\pm$ 0,81	97,44 $\pm$ 0,76 <b>ab</b>
	08	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
	10	100,00 $\pm$ 0,00	98,82 $\pm$ 0,59	100,00 $\pm$ 0,00	99,61 $\pm$ 0,26 <b>a</b>
Média Geral $\pm$ DP		70,95 $\pm$ 9,48 <b>B</b>	77,26 $\pm$ 8,69 <b>A</b>	75,27 $\pm$ 8,81 <b>A</b>	74,49 $\pm$ 5,11

<sup>1</sup>Média seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de sobreposição no intervalo de confiança a 95%. OE1: óleo transparente mais denso que a água. OE2: óleo amarelo claro menos que a água. OE3: óleo transparente menos denso que a água.

O potencial acaricida dos óleos essenciais, de várias espécies vegetais, vem sendo investigada para o controle de diferentes espécies de ácaros (ROSADO-AGUILAR, *et al.*, 2017). Neste sentido, a atividade fumigante do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum*, coletada em Pernambuco, e utilizado na concentração de 50  $\mu\text{L/L}$  de ar, apresentou mortalidade de 50% sobre *Suidasia pontifica* (ASSIS *et al.*, 2011). Em contrapartida, os óleos essenciais das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Eugenia uvalha* Cambess, *Melaleuca leucadendra* (L.) L. e *Eugenia uniflora* L. causaram 98, 87, 80, 41 e 27%, respectivamente, de mortalidade sobre *T. putrescentiae* (Schrank, 1781) na concentração de 50  $\mu\text{L/L}$  de ar (ASSIS *et al.*, 2011). Enquanto que, *S. terebinthifolius*, *C. zeylanicum* e *E. uvalha*

causaram 100 e 60% mortalidade sob *S. pontifica* na concentração de 50 µL/L de ar (ASSIS *et al.*, 2011). Para este mesmo ácaro, *E. uniflora* e *M. leucadendra* promoveram 50% de mortalidade na mesma concentração avaliada (ASSIS *et al.*, 2011). Outros óleos essenciais de diferentes espécies medicinais, como *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Ocimum basil* L., *Pimenta dioica* (L.) (KIM *et al.*, 2003), *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* e *Pinus pinaster* (MACCHIONE *et al.*, 2002), foram ativos contra *Tyrophagus putrescentiae*. Além destas, *Lavandula angustifolia* Mill., *Mentha piperita* L., *Lavandula stoechas* L. e *Eucalyptus globulus* Labill., também foram estudadas contra *Tyrophagus longior* (Gervais, 1844) (PERRUCCI, 1995).

A atividade fumigante apresentada neste estudo pode estar relacionada a presença do safrol na composição química dos óleos essenciais, uma vez que, o safrol apresentou toxicidade fumigante contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* na pesquisa realizada por Huang *et al.*, 1999.

#### 4.10.2. Concentração Letal do óleo essencial de *P. callosum* frente *S. pontifica*

As concentrações respostas (CL<sub>25%</sub> e CL<sub>50%</sub>) dos óleos essenciais para *S. pontifica* estão descritas na Tabela 10. Com exceção da amostra OE2 a 72 h, todas as inclinações das linhas de respostas foram significativas ( $p \leq 1,39.10^{-4}$ ). Com base nos intervalos de confiança, não houve diferença para a CL<sub>25%</sub> e a CL<sub>50%</sub> entre os tempos de exposição para a amostra OE1 e OE2. Para OE3 houve maior toxicidade após 24 h de exposição.

O óleo essencial de *C. zeylanicum* apresentou CL<sub>50%</sub> para *S. pontifica* de 1,75 µL/L de ar (ASSIS *et al.*, 2011), sendo desta forma semelhante em toxicidade aos óleos de *P. callosum* avaliados no presente estudo, que apresentaram CL<sub>50%</sub> variando de 1,24 a 3,31 µL/L de ar. Já os óleos essenciais de *S. terebinthifolius* e *E. uvalha* apresentaram CL<sub>50%</sub> de 4,87 e 11,09 µL/L de ar, respectivamente (ASSIS *et al.*, 2011), sugerindo que os óleos de *P. callosum* tem maior potencial de ação fumigante para *S. pontifica*.

Os compostos que compõem os metabólitos secundários podem agir de forma isolada ou, mais comumente, de forma sinérgica (BAKKALI *et al.*, 2008). Para os ácaros *T. putrescentiae* e *T. longior*, compostos isolados de metabolitos secundários de plantas, como os monoterpenos pulegona, mentona, linalool, fenchona, linalil acetato, mentol e limoneno e o fenilpropanoide 1,8-cineol apresentaram possibilidade de uso para o controle das duas espécies de ácaros (PERUCI, 1995; SÁNCHEZ-RAMOS & CASTAÑERA 2001; MACCHIONE *et al.*,



2002). O safrol e isosafrol, também, apresentaram toxicidade fumigante contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* (HUANG et al., 1999).

A atividade acaricida apresentada, dos óleos essenciais, possivelmente está relacionada a ação neurotóxica, agindo com rapidez no controle de pragas (ISMAN, 2006). Há relatos sobre o bloqueio no neuromodulador octopamina, encontrados em todos os invertebrados e canais de cálcio modulados pelo GABA (ISMAN, 2006). A octopamina age como neurohormônio, neuromodulador e neurotransmissor, regulando os batimentos cardíacos, os movimentos, o comportamento e o metabolismo dos insetos (ROEDER, 1999). Por serem potentes agentes no controle aos ácaros de produtos armazenados, são também seletivos de baixa toxicidade a organismos não alvos e ao meio ambiente e podem ser aplicados aos produtos armazenados da mesma forma como os acaricidas convencionais (ISMAN, 2006).

Tabela 10- Inclinações das linhas de respostas ( $\pm$  desvio padrão), concentração letal média (CL), Intervalo de confiança inferior (Mín.) e superior (Máx.) para testes com 24, 48 e 72 h de exposição de uma população de *S. pontifica* a óleos essenciais de *P. callosum* aplicados por fumigação.

Tem.	Amostras	G.L.	n <sup>1</sup>	Inclinação	Z	p	CL <sub>25%</sub>	Mín.	Máx.	CL <sub>50%</sub>	Mín.	Máx.
24 h		5	18	3,2443 $\pm$ 0,4119	7,876	3,37.10 <sup>-15</sup>	1,34 <b>a</b>	1,10	1,63	1,88 <b>a</b>	1,65	2,15
48 h	OE1 25.10.18	5	18	4,0665 $\pm$ 0,6971	5,833	5,44.10 <sup>-9</sup>	1,30 <b>a</b>	1,05	1,60	1,70 <b>a</b>	1,48	1,95
72 h		5	18	3,6376 $\pm$ 0,9547	3,810	1,39.10 <sup>-4</sup>	0,91 <b>a</b>	0,57	1,48	1,24 <b>a</b>	0,88	1,73
24 h		5	18	3,3021 $\pm$ 0,2968	11,126	2.10 <sup>-16</sup>	2,37 <b>a</b>	2,09	2,69	3,31 <b>a</b>	3,02	3,63
48 h	OE2 25.10.18	5	18	2,8099 $\pm$ 0,2685	10,466	2.10 <sup>-16</sup>	1,90 <b>a</b>	1,62	2,23	2,81 <b>a</b>	2,52	3,14
72 h		5	18	28,09 $\pm$ 8407,03	0,003	0,997 <sup>ns</sup>	--	--	--	--	--	--
24 h		5	18	4,0599 $\pm$ 0,5056	8,030	9,76.10 <sup>-16</sup>	1,57 <b>a</b>	1,37	1,80	2,06 <b>a</b>	1,87	2,27
48 h	OE3 25.10.18	5	18	2,4363 $\pm$ 0,4204	5,795	6,84.10 <sup>-09</sup>	0,81 <b>b</b>	0,52	1,26	1,27 <b>b</b>	0,93	1,72
72 h		5	18	2,9791 $\pm$ 0,5089	5,855	4,78.10 <sup>-09</sup>	0,99 <b>ab</b>	0,70	1,38	1,42 <b>b</b>	1,13	1,79

<sup>1</sup>n = número de repetições; G.L.: graus de liberdade (n-1). Valores para um mesmo óleo seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de sobreposição do intervalo de confiança a 95%. OE1: óleo transparente mais denso que a água; OE2: óleo amarelo claro menos denso que a água; OE3: óleo transparente menos denso que a água. <sup>ns</sup>Não significativo.

#### 4.11. Efeito residual do extrato bruto e frações de *P. callosum* sobre *R. indica*

##### 4.11.1. Mortalidade (%) do extrato bruto e frações de *P. callosum*

O extrato bruto e as frações obtidas das folhas de *P. callosum* foram avaliadas quanto a toxicidade sobre *R. indica*. Os resultados estão descritos na tabela 11. Nos períodos de 48 e 72 h de exposição das frações FHEX e FHID na concentração de 0,5 mg/mL, assim como o controle negativo acetona (FCL), apresentaram mortalidade corrigida inferior ao tratamento controle (água) (Tabela 11), aparentando um efeito de hormoligose, onde uma dose subletal pode proporcionar uma mortalidade inferior ao controle (LUCKEY, 1968). Para os demais extratos na concentração de 0,5 mg/mL e todos as frações a partir da concentração de 1,0 mg/mL a mortalidade corrigida foi maior que a observada no controle. De forma geral, entre as diferentes concentrações de EXTB, a mortalidade corrigida superior ao controle variou de 13,28 a 99,58%, com este último valor, obtido na concentração de 10,0 mg/mL, não diferindo da mortalidade corrigida proporcionada pela abamectina. Para os períodos de exposição, de forma geral, a maior mortalidade corrigida foi observada após 72 h de exposição, para os dois períodos anteriores a este não houve diferença na mortalidade corrigida.

Para a fração FHEX, de forma geral, entre as diferentes concentrações, a mortalidade corrigida superior ao controle variou de 6,55 a 24,32%. Entre os períodos de exposição, de forma geral, a maior mortalidade corrigida também foi observada após 72 h de exposição, com os dois períodos anteriores a este não diferindo entre si. Para a fração FCL, de forma geral, entre as diferentes concentrações, a mortalidade corrigida superior ao controle variou de 33,40 a 77,69%. Entre os períodos de exposição, de forma geral, a maior mortalidade corrigida foi observada após 72 h de exposição, com os dois períodos anteriores diferindo entre si.

No resultado obtido da fração FBU, de forma geral, entre as diferentes concentrações, a mortalidade corrigida superior ao controle variou de 1,95 a 99,54%. No entanto, entre os períodos de exposição, de forma geral, a maior mortalidade corrigida observada foi após 48 h de exposição, mas diminuiu no período de 72 h. Já para a fração FHID, de forma geral, entre as diferentes concentrações, a mortalidade corrigida superior ao controle variou de 13,50 a 100,00%, sendo que esta última não diferiu da concentração de 5 mg/mL e do controle positivo. Entre os períodos de avaliação, de forma geral, a maior mortalidade corrigida foi observada após 24 h exposição. No entanto, no período de 48 e 72 h a mortalidade diminuiu.

Geralmente as substâncias químicas naturais apresentam baixa estabilidade, tanto fotoquímica como térmica (SIMÕES *et al.*, 2007). Essa explicação é pertinente quando avaliamos a mortalidade da fração FBU em 48 h e da fração FHID em 24 h de exposição, quando apresentaram mortalidade maior que nos outros períodos de avaliação. Provavelmente, a substância química responsável pela bioatividade é altamente degradável. Outra explicação para este fato pode ser atribuída aos erros casuais, inevitáveis em qualquer experimento.

Estudos realizados para avaliar a bioatividade de extratos de plantas frente ao ácaro *R. indica* ainda são escassos, sendo relatada a atividade acaricida do extrato hidro-álcooglicólico das sementes de *Myrciaria dubia*, que apresentou atividade acaricida superior a 82% nos intervalos de 48 e 72 horas nas concentrações de 4 e 8% contra *R. indica* (SOUZA *et al.*, 2018). Enquanto que o extrato de *Plectranthus amboinicus* não foi eficiente no controle de *R. indica* nas concentrações avaliadas (CASTILLO-SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

Vários extratos de plantas têm sido avaliados contra diferentes espécies de ácaros fitófagos. Como, por exemplo, a mortalidade ocasionada pelo extrato cetônico de *Artemisia annua* L. que variou de 74 a 100% em 48 h de exposição sobre *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (ZHANG *et al.*, 2008). Já o extrato aquoso de *Ziziphus joazeiro* foi eficiente no controle do ácaro-vermelho, *Tetranychus ludeni* (FERRAZ *et al.*, 2017). Enquanto que, o extrato cetônico obtido da semente de *Ammi visnaga* (PAVELA, 2015) e os extratos hexânico, clorofórmio, éter, acetato de etila, etanólico e aquoso de *Syzygium cumini* foram capazes de promover a mortalidade das fêmeas adultas de *Tetranychus urticae* (AFIFY *et al.*, 2011).

Tabela 11- Mortalidade corrigida (média  $\pm$  desvio padrão) de *R. indica* em diferentes tempos de exposição e diferentes concentrações do extrato bruto e frações de *P. callosum* avaliando o efeito residual.

Amostra	Concentração	Tempo			Média Geral $\pm$ DP
		24 h	48 h	72 h	
EXTB	0,5 mg/mL	6,33 $\pm$ 0,53	11,48 $\pm$ 0,99	22,03 $\pm$ 1,14	13,28 $\pm$ 2,52 <b>d</b>
	1,0 mg/mL	44,30 $\pm$ 1,13	50,82 $\pm$ 1,53	62,71 $\pm$ 1,14	52,61 $\pm$ 3,01 <b>c</b>
	5,0 mg/mL	81,01 $\pm$ 0,88	75,41 $\pm$ 1,14	77,97 $\pm$ 1,09	78,13 $\pm$ 1,30 <b>b</b>
	10 mg/mL	98,73 $\pm$ 0,18	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	99,58 $\pm$ 0,24 <b>a</b>
	0,0 mg/mL	0,00 $\pm$ 0,18	0,00 $\pm$ 1,37	0,00 $\pm$ 1,32	0,00 $\pm$ 1,05 <b>e</b>
	Abamectina	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
Média Geral $\pm$ DP		55,06 $\pm$ 6,00 <b>B</b>	56,28 $\pm$ 5,39 <b>B</b>	60,45 $\pm$ 5,53 <b>A</b>	57,27 $\pm$ 3,31
FHEX	0,5 mg/mL	2,26 $\pm$ 0,29	-9,79 $\pm$ 0,40	-26,44 $\pm$ 0,56	-11,32 $\pm$ 2,46 <b>e</b>
	1,0 mg/mL	2,82 $\pm$ 0,56	12,50 $\pm$ 0,75	4,32 $\pm$ 1,19	6,55 $\pm$ 1,01 <b>c</b>
	5,0 mg/mL	15,14 $\pm$ 0,65	14,24 $\pm$ 0,75	36,44 $\pm$ 1,73	21,94 $\pm$ 2,22 <b>b</b>
	10 mg/mL	16,61 $\pm$ 0,59	14,00 $\pm$ 0,79	42,33 $\pm$ 1,67	24,32 $\pm$ 1,21 <b>b</b>
	0,0 mg/mL	0,00 $\pm$ 0,83	0,00 $\pm$ 1,02	0,00 $\pm$ 2,01	0,00 $\pm$ 0,77 <b>d</b>
	Acetona	-0,52 $\pm$ 0,72	7,22 $\pm$ 1,06	-0,08 $\pm$ 1,59	2,21 $\pm$ 0,98 <b>d</b>
	Abamectina	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
Média Geral $\pm$ DP		19,47 $\pm$ 4,52 <b>B</b>	29,54 $\pm$ 4,00 <b>B</b>	45,08 $\pm$ 3,68 <b>A</b>	31,37 $\pm$ 2,48
FCL	0,5 mg/mL	13,56 $\pm$ 0,47	40,07 $\pm$ 1,01	46,58 $\pm$ 1,17	33,40 $\pm$ 3,02 <b>e</b>
	1,0 mg/mL	55,86 $\pm$ 1,13	61,55 $\pm$ 0,97	71,68 $\pm$ 0,87	63,03 $\pm$ 1,43 <b>d</b>
	5,0 mg/mL	57,17 $\pm$ 1,00	60,96 $\pm$ 0,97	71,68 $\pm$ 0,55	68,55 $\pm$ 2,86 <b>c</b>
	10 mg/mL	61,41 $\pm$ 0,94	80,48 $\pm$ 1,31	91,17 $\pm$ 0,66	77,69 $\pm$ 1,73 <b>b</b>
	0,0 mg/mL	0,00 $\pm$ 0,66	0,00 $\pm$ 1,23	0,00 $\pm$ 1,18	0,00 $\pm$ 0,58 <b>f</b>
	Acetona	2,09 $\pm$ 0,71	-6,80 $\pm$ 0,90	-6,80 $\pm$ 0,93	-5,02 $\pm$ 11,19 <b>g</b>
	Abamectina	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
Média Geral $\pm$ DP		41,44 $\pm$ 4,66 <b>C</b>	58,29 $\pm$ 3,99 <b>B</b>	65,22 $\pm$ 4,35 <b>A</b>	54,98 $\pm$ 2,61
FBU	0,5 mg/mL	1,37 $\pm$ 0,42	2,94 $\pm$ 0,83	1,54 $\pm$ 1,10	1,95 $\pm$ 0,82 <b>d</b>
	1,0 mg/mL	20,55 $\pm$ 0,71	26,47 $\pm$ 0,53	23,08 $\pm$ 0,55	23,37 $\pm$ 1,05 <b>c</b>
	5,0 mg/mL	98,63 $\pm$ 0,20	98,53 $\pm$ 0,21	98,46 $\pm$ 0,22	98,54 $\pm$ 0,20 <b>b</b>
	10 mg/mL	98,63 $\pm$ 0,20	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	99,54 $\pm$ 0,26 <b>ab</b>
	0,0 mg/mL	0,00 $\pm$ 0,46	0,00 $\pm$ 0,55	0,00 $\pm$ 0,77	0,00 $\pm$ 0,58 <b>e</b>
	Abamectina	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
Média Geral $\pm$ DP		53,20 $\pm$ 6,77 <b>B</b>	54,66 $\pm$ 6,66 <b>A</b>	53,85 $\pm$ 0,75 <b>B</b>	53,90 $\pm$ 3,86
FHID	0,5 mg/mL	2,94 $\pm$ 0,62	-28,02 $\pm$ 0,78	-31,94 $\pm$ 1,28	-19,01 $\pm$ 5,71 <b>d</b>
	1,0 mg/mL	26,47 $\pm$ 0,62	65,2 $\pm$ 0,65	75,0 $\pm$ 1,20	13,50 $\pm$ 3,42 <b>b</b>
	5,0 mg/mL	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
	10 mg/mL	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
	0,0 mg/mL	0,00 $\pm$ 1,05	0,00 $\pm$ 1,61	0,00 $\pm$ 1,43	0,00 $\pm$ 1,32 <b>c</b>
	Abamectina	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00 <b>a</b>
Média Geral $\pm$ DP		54,90 $\pm$ 6,69 <b>A</b>	46,42 $\pm$ 7,97 <b>B</b>	45,93 $\pm$ 8,09 <b>B</b>	49,08 $\pm$ 4,38

Média seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de sobreposição do intervalo de confiança a 95%. Temperatura média: 28,02 °C; Umidade média: 87,93%. EXTB: extrato bruto. FHEX: Fração hexano. FCL: Fração clorofórmio. FBU: Fração butanol. FHID: Fração hidroalcoólica.

#### 4.11.2. Concentração letal (CL) do extrato bruto e frações de *P. callosum*

Para todas as amostras e tempos avaliados as inclinações das linhas de respostas (CL<sub>25%</sub> e CL<sub>50%</sub>) foram significativas com  $p \leq 8,14 \cdot 10^{-04}$  (Tabela 12). A partir destas inclinações e das concentrações letais, observa-se que todos os extratos proporcionaram letalidade na população de *R. indica*. Com 24 h de exposição, a melhor CL<sub>25%</sub> e CL<sub>50%</sub> foram obtidas nas frações OE6 e OE9, respectivamente. Após 48 h de exposição as melhores CL<sub>25%</sub> foram observadas no EXTB e FCL, já as melhores CL<sub>50%</sub> foram as destes mesmos extrato e fração mais a fração OE9. Por fim, com 72 h de exposição, o EXTB e FCL continuaram apresentando as melhores CL<sub>25%</sub> e também a melhor CL<sub>50%</sub>. Assim, para todos os períodos de exposição, tanto para a CL<sub>25%</sub> quanto para a CL<sub>50%</sub>, a FCL estava entre os melhores resultados.

Resultados semelhantes foram encontrados testando o extrato etanólico de *Spilanthes acmella* frente *R. indica*, obtendo CL<sub>25</sub> de 0,1948 mg/mL e CL<sub>50</sub> de 0,4598 mg/mL (COELHO *et al.*, 2019). Para o extrato hidro-álcooglicólico de *Myrciaria dubia* os resultados de CL<sub>50</sub> foi 35,89 mg/mL e 38,01 mg/mL em 24 e 48 h de exposição a *R. indica* (SOUZA *et al.*, 2018), maior que o resultado encontrado neste estudo.

O efeito de diferentes extratos vegetais sobre a mortalidade de ácaros fitófagos, em condições de laboratório, vem sendo relatados. Os extratos etanólico, hexânico, éter e acetato de etila de *Syzigium cumini* foram eficientes no controle de *Tetranychus urticae* (ROCH, 1836) (AFIFY *et al.*, 2011). O extrato das sementes de *Ammi visnaga* apresentou toxicidade aguda e diminuição da oviposição de *T. urticae* (PAVELA, 2015). Já o extrato aquoso das folhas de juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) foi tóxico, eficiente e repelente ao ácaro *Tetranychus ludeni* (FERRAZ *et al.*, 2017). Enquanto que o extrato cetônico das folhas de *Artemisia annua* foi tóxico para *Tetranychus cinnabarinus*. (ZHANG *et al.*, 2008).

Os resultados supracitados são semelhantes aos obtidos neste trabalho, o qual promoveu mortalidade e diminuição na oviposição. Esses efeitos podem ser ocasionados pelos metabólitos secundários presentes nas folhas, como os esteroides livres, flavanonol, taninos flobabênicos, flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas e saponinas. Como é relatado pelo trabalho de Pavela (2015), em que tanto as cromonas visnagina e kelina, isoladas da semente de *Ammi visnaga*, exibiram atividade ovicida, e somente a substância visnagina foi responsável pela atividade acaricida, promovendo toxicidade aguda e crônica ao ácaro *T. urticae*. Piperovatine isolada de *Piper corcovandensis* mostrou potencial larvicida contra o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (FERNANDES *et al.*, 2018). Ghosh *et al.*, (2013) identificaram a

presença de quercetina, ácido gálico, kaempferol, flavona nos extratos e relacionaram a esses compostos a atividade inseticida e o efeito sinérgico contra *R. (Boophilus) microplus*. Os compostos esqualeno, cadaleno, dilapiol e a mistura de compostos fenólicos (proantocianidinas e flavonoides glicosilados) foram identificados nas frações ativas de *Ocotea aciphylla*, sendo eficientes na mortalidade e diminuição da reprodução das larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CONCEIÇÃO *et al.*, 2017). A azadiractina, um composto isolado da espécie *Azadirachta indica* A Juss., considerado o mais recente inseticida de origem vegetal, interfere no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento da ecdise e também atividade fago-inibidora (SIMÕES *et al.*, 2007). Portanto, os extratos formulados a partir das folhas de *P. callosum* podem ser usados como agrotóxicos naturais acessíveis a pequenos agricultores da região no controle de *R. indica*.

Tabela 12- Coeficientes de inclinação da linha de resposta (Incl.),  $\pm$  desvio padrão, concentração letal média (CL), inferior (Mín.) e superior (Máx.) para testes com 24, 48 e 72 h após avaliar o efeito residual do extrato bruto e frações de *P. callosum* sobre uma população de *R. indica*.

Tem.	Amostras	G.L.	n <sup>1</sup>	Incl.	Z	p	CL <sub>25%</sub>	Mín.	Máx.	CL <sub>50%</sub>	Mín.	Máx.
24 h	EXTB	7	40	1,6547 $\pm$ 0,1623	10,20	2,00.10 <sup>-16</sup>	0,76 <b>ab</b>	0,61	0,96	1,48 <b>ab</b>	1,23	1,79
24 h	FHEX	7	40	0,52191 $\pm$ 0,09712	5,374	7,71.10 <sup>-08</sup>	0,29 <b>b</b>	0,12	0,69	2,36 <b>a</b>	1,53	3,63
24 h	FBU	7	40	2,5625 $\pm$ 0,2920	8,776	2,00.10 <sup>-16</sup>	0,88 <b>a</b>	0,75	1,03	1,35 <b>ab</b>	1,15	1,58
24 h	FHID	7	40	2,5730 $\pm$ 0,3331	7,726	1,11.10 <sup>-14</sup>	0,70 <b>ab</b>	0,60	0,82	1,08 <b>b</b>	0,93	1,25
48 h	EXTB	7	40	1,1897 $\pm$ 0,1466	8,117	4,79.10 <sup>-16</sup>	0,33 <b>b</b>	0,22	0,48	0,82 <b>b</b>	0,64	1,05
48 h	FHEX	7	40	0,3380 $\pm$ 0,1009	3,348	8,14.10 <sup>-04</sup>	0,002 <b>b</b>	0,0003	0,22	0,21 <b>b</b>	0,05	0,93
48 h	FBU	7	40	2,4129 $\pm$ 0,2963	8,144	3,83.10 <sup>-16</sup>	0,70 <b>a</b>	0,59	0,82	1,11 <b>a</b>	0,95	1,29
48 h	FHID	7	40	2,2708 $\pm$ 0,2970	7,647	2,06.10 <sup>-14</sup>	0,56 <b>a</b>	0,47	0,68	0,91 <b>b</b>	0,79	1,06
72 h	EXTB	7	40	1,0912 $\pm$ 0,1534	7,112	1,15.10 <sup>-12</sup>	0,21 <b>b</b>	0,12	0,35	0,57 <b>bc</b>	0,41	0,78
72 h	FHEX	7	40	0,6469 $\pm$ 0,1293	5,005	5,59.10 <sup>-07</sup>	0,04 <b>b</b>	0,01	0,17	0,22 <b>c</b>	0,09	0,51
72 h	FBU	7	40	2,3093 $\pm$ 0,2797	8,257	2,00.10 <sup>-16</sup>	0,67 <b>a</b>	0,57	0,79	1,08 <b>a</b>	0,93	1,26
72 h	FHID	7	40	2,1041 $\pm$ 0,2874	7,322	2,44.10 <sup>-13</sup>	0,47 <b>a</b>	0,38	0,58	0,79 <b>b</b>	0,67	0,92

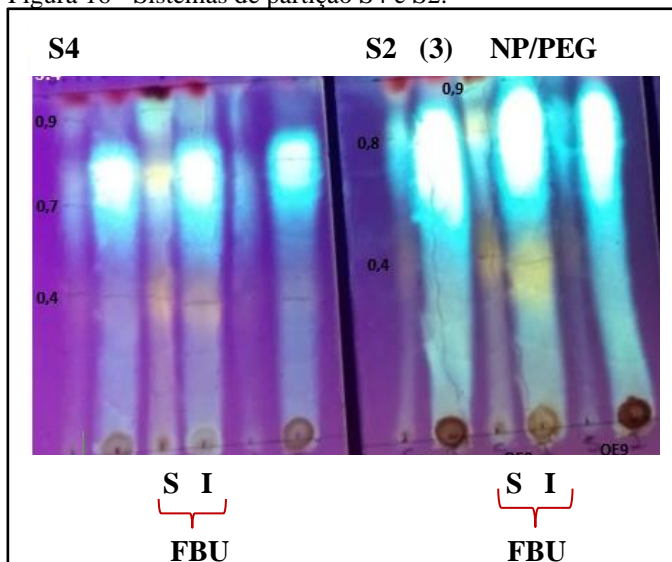
<sup>1</sup>n= número de repetições. G.L.: graus de liberdade (n-1). Valores para um mesmo extrato seguidos da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de sobreposição do intervalo de confiança a 95%. Temperatura média: 28,02 °C; Umidade média: 87,93%. EXTB: extrato bruto. FHEX: Fração hexano. FCL: Fração clorofórmio. FBU: Fração butanol. FHID: Fração hidroalcoólica.



#### 4.12. Fracionamento em HPLCC

Baseado no rendimento, atividade acaricida e antioxidante, escolheu-se a fração FBU para ser fracionada e purificada em HPLCC. Os sistemas de gradiente escolhidos foram 1, 3, 4 e 6 (Figura 16 e 17), pois apresentaram uma excelente partição entre as fases superior (S) e inferior (I) (COSTA & LEITÃO, 2010; SILVA & VILEGAS, 2012). Depois da escolha dos sistemas de gradiente, foram realizadas duas corridas no HPLCC modo analítico, a primeira de fase normal e a segunda de fase reversa.

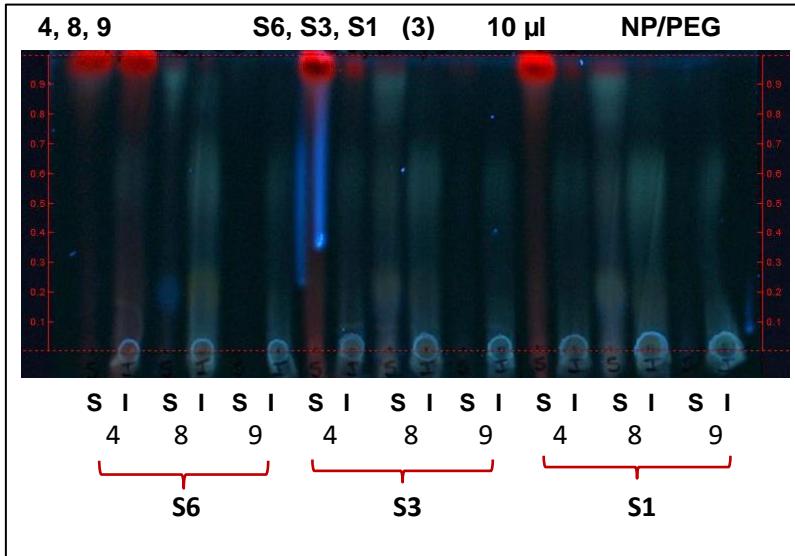
Figura 16 - Sistemas de partição S4 e S2.



Fonte: Os autores (2020).

Legenda. FBU: fração butalólica. S4: AcOEt:ButOH:H<sub>2</sub>O (3:2:5). S2: AcOEt:ButOH:H<sub>2</sub>O (1:4:5). Eluente 3: AcOEt: CH<sub>3</sub>COOH:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60:1:10). Revelador: NP/PEG.

Figura 17 - Sistemas de partição S6, S3, S1.

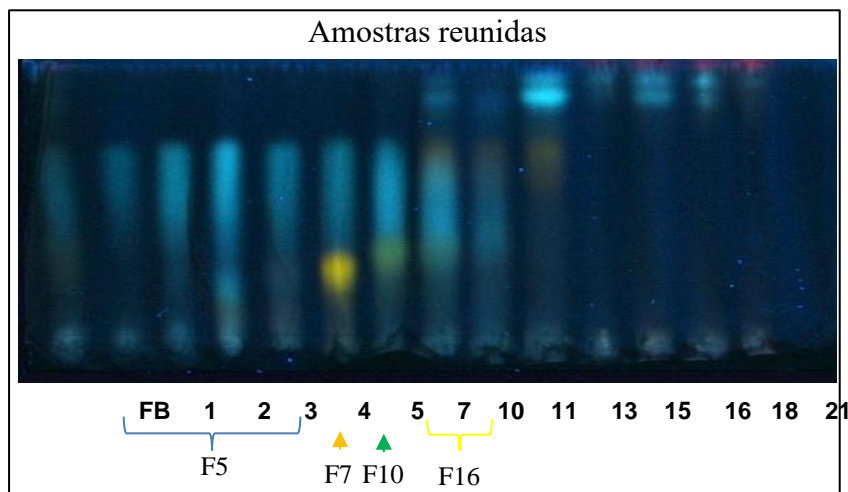


Fonte: Os autores (2020).

Legenda. 4: extrato bruto (EXTB); 8: fração butalólica (FBU); 9: fração hidroalcolólica (FHID). S6. EtOAc:H<sub>2</sub>O 1:1; S3. EtOAc:ButOH:H<sub>2</sub>O 2:3:5; S1. ButOH: H<sub>2</sub>O 5:5. Eluente 3: EtOAc: CH<sub>3</sub>COOH:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60:1:10. Revelador: NP/PEG.

Na análise em fase normal foram coletadas 30 subfrações e na fase reversa 35 subfrações. Os resultados das análises foram avaliados por CCD para avaliar o melhor método de separação. Os perfis das substâncias presentes nas amostras foram analisados com auxílio da CCD, conforme Figura 18.

Figura 18 - Perfil das subfrações obtidas da fração FBU em HPLCC



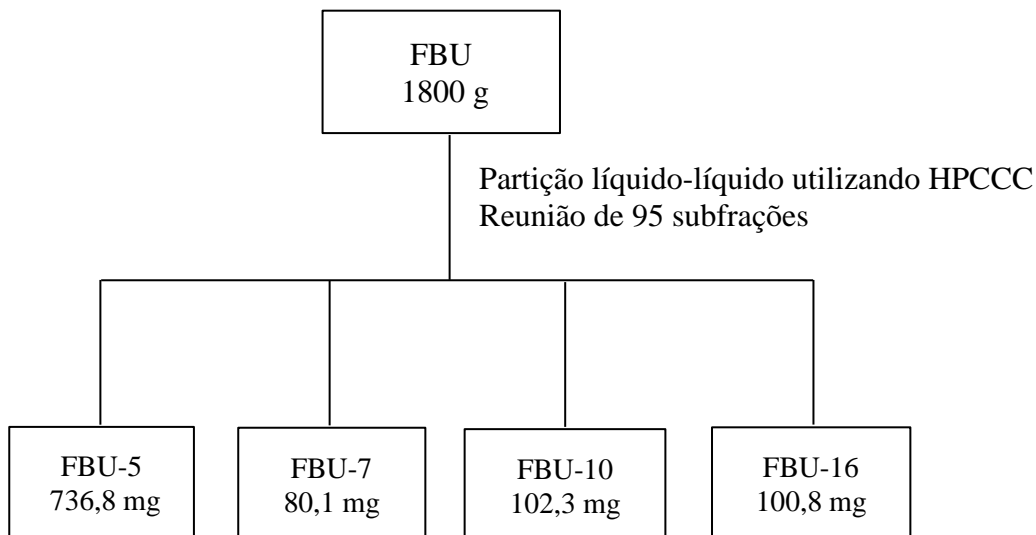
Fonte: Os sutores (2020).

Eluente: EtOAc: CH<sub>3</sub>COOH:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60:1:10. Revelador: NP/PEG.

Legenda. F5: FBU.5; F7: FBU.7; F10: FBU.10; F16: FBU.16

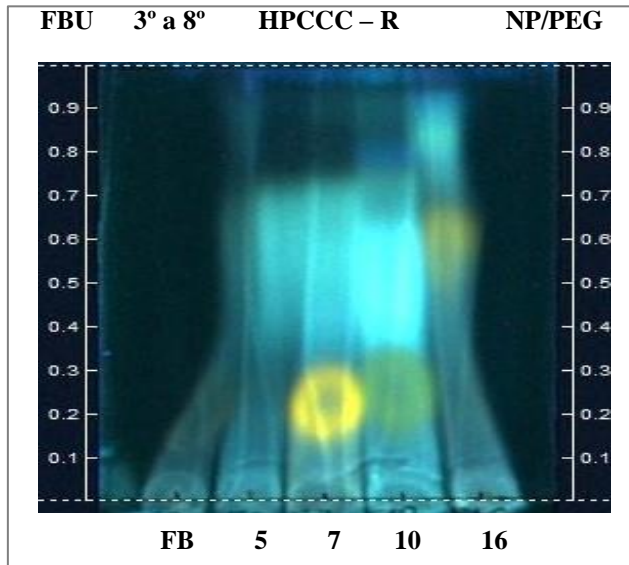
Após as injeções foram obtidas 95 subfrações. Após a análise por CCD foram selecionadas 4 subfrações que apresentaram maior diversidade de substâncias fenólicas e maiores rendimentos obtendo as subfrações FBU-5, FBU-7, FBU-10 e FBU-16. O somatório das massas corresponderam a 56,63% do total injetado (1800 g) (FIGURA 19). As frações obtidas foram reunidas com o auxílio de CCD, observando os grupos com os mesmos Rfs e coloração. A figura 20 mostra a cromatoplaça das subfrações FBU-5, FBU-7, FBU-10 e FBU-16. As demais subfrações foram armazenadas para posterior análise.

Figura 19 - Fluxograma de rendimentos das subfrações reunidas, obtidas por HPCCC.



Fonte: Os autores (2020).

Figura 20 - Subfrações reunidas das 6 corridas em HPCCC.



Fonte: Os autores (2020).

Legenda: FB: fração bruta. 5: FBU-5. 7: FBU-7. 10: FBU-10. 16: FBU-16

#### 4.13. Isolamento e Identificação

A Figura 21 apresenta a ordem de saída de 3 picos, referentes as substâncias isoladas por CLAE-UV, no comprimento de onda de 354 e 328 nm da amostra FBU-5. Os 3 sinais obtidos por CLAE-UV apresentam tempos de retenção de 45,22 min para a FBUT-5.1 (substância 1); 85,23 min para a FBU-5.2 (substância 2) e 97,50 para a FBU-5.3 (substância 3), indicando a presença de 3 substâncias fenólicas diferentes. As substâncias coletadas de acordo com tempos de retenção, apresentaram rendimentos de 3,4 mg para substância 1; 2,0 mg para a substância 2 e 2,5 mg para a substância 3. Essas substâncias, foram avaliadas em CCD (FIGURA 22) e apresentaram diferentes RFs de, aproximadamente, 0,65; 0,6 e 0,7; respectivamente.

Figura 21 - Cromatograma da Fração FBU-5 por CLAE-UV.

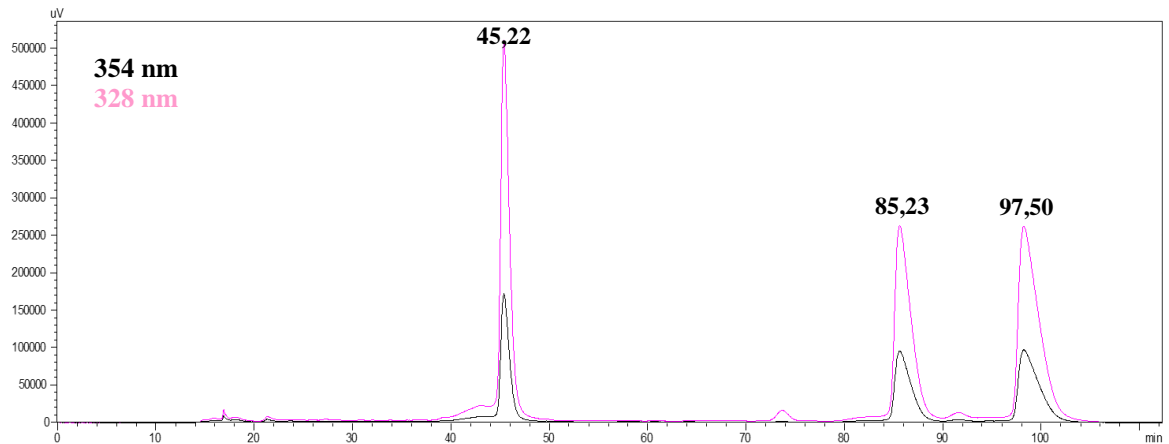
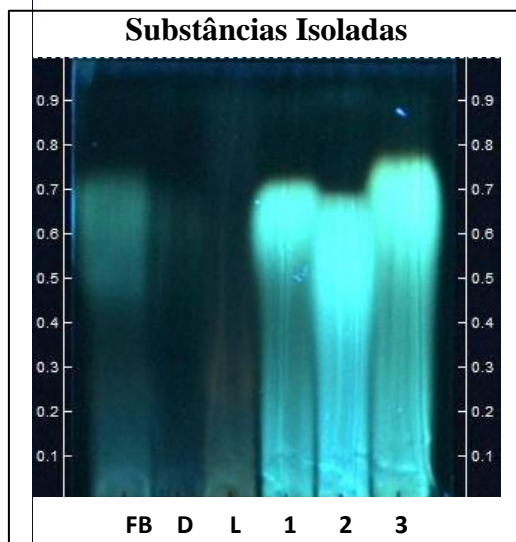


Figura 22 - Substâncias isoladas da FBU-5.



Fonte: Os autores (2020).

Legenda. FB: fração bruta. D: descarte da coluna.

L: lavagem da coluna. Eluente: AcOEt:

CH<sub>3</sub>COOH: CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60:1:10). Revelador: NP/PEG

Analisando os espectros das substâncias 1, 2 e 3, foram observados os picos comuns com m/z 353, 191, 179, 173 e 135. Todos apresentaram íon molecular m/z 353 com fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>. Além disso, o íon molecular produziu quatro íons m/z 191, 179, 173 e 135. Comparando com os dados da literatura, aqueles picos foram compatíveis para isômeros

derivados do ácido cafeoilquínico (FANG *et al*, 2002). A discussão das estruturas dos isômeros será descrita isoladamente a seguir.

#### 4.13.1. Substância 1

A substância 1 precipitou como óleo de coloração verde. A análise da substância 1 por espectrometria de massas ( $[M - H]^-$ ) apresentou o íon molecular em  $m/z$  353 (modo negativo em APCI) (FIGURA 23). Além, da presença intensa do pico base em  $m/z$  191 (100%), e outros fragmentos em  $m/z$  179 (55,10%), 173 (27,56%) e 135 (44,33%). A clivagem do ácido clorogênico produz o pico base de  $m/z$  191, referente ao ácido quínico (FIGURA 24), e fragmentos com intensidades relativamente altas relacionados na estrutura cafeoil. Esses fragmentos apresentaram intensidades semelhantes em relação aos encontrados na literatura para o isômero ácido neoclorogênico 179 (34%), 135 (13%) e 173 (4%) (FANG, 2002). Essas informações indicaram para a estrutura do ácido neoclorogênico, que difere do ácido clorogênico (FIGURA 28), pela esterificação no carbono 3 do ácido quínico.

Figura 23 - Espectro de massas da substância 1

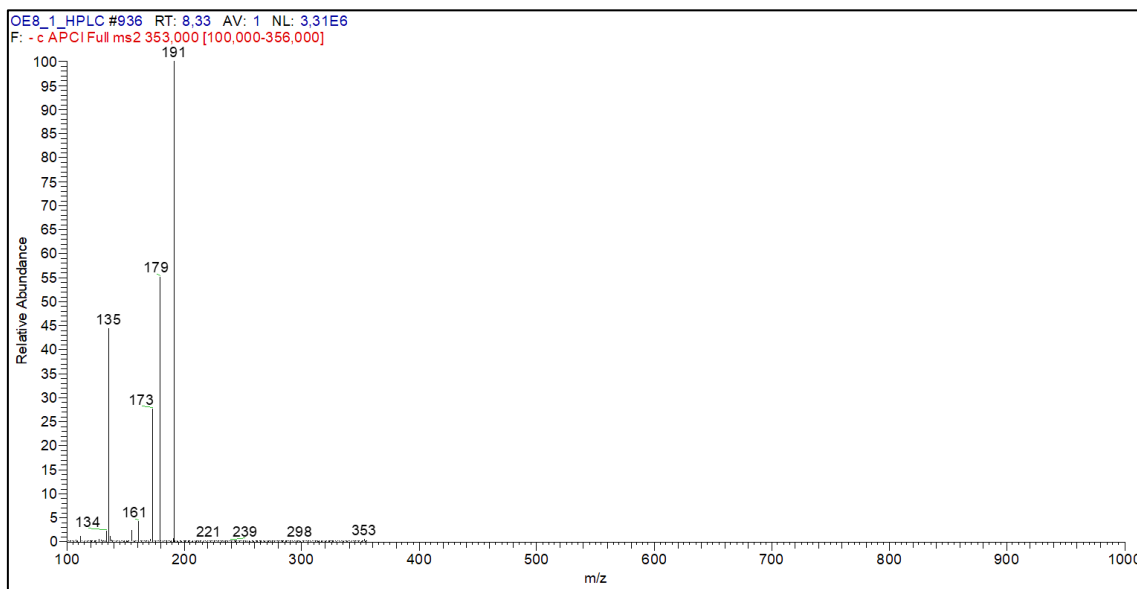
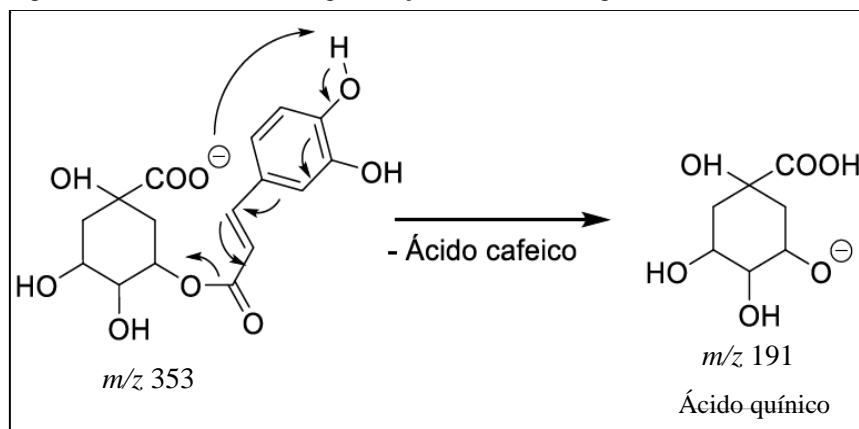


Figura 24 - Mecanismo de fragmentação do ácido clorogênico

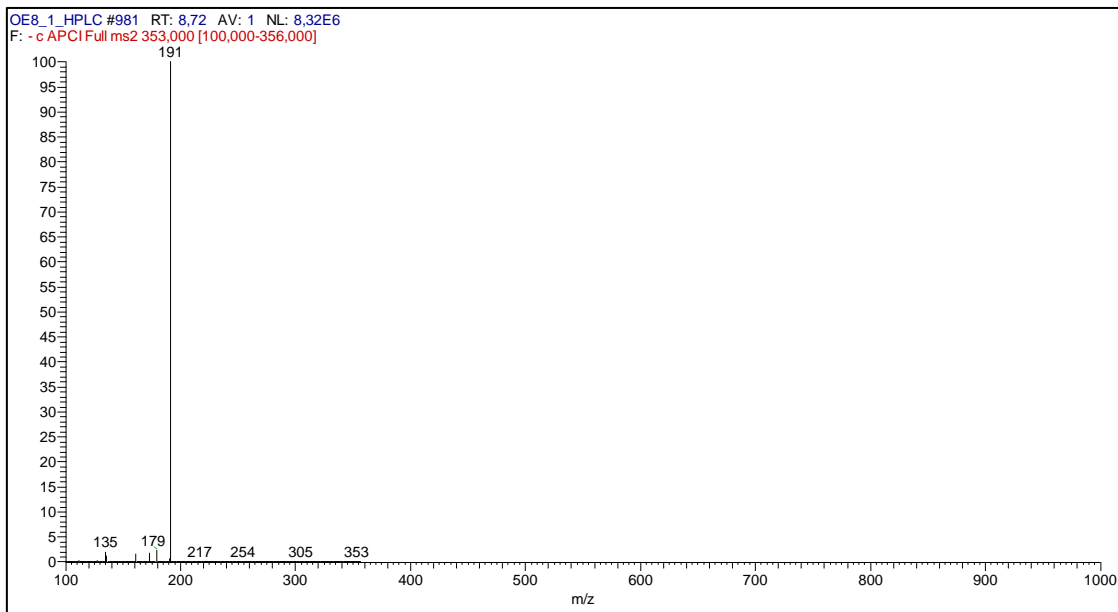


Fonte: Demarque et al., (2016)

#### 4.13.2. Substância 2

A substância 2 também se apresentou como precipitado oleoso de coloração verde. A análise por espectrometria de massas ( $[M - H]^-$ ) apresentou o íon molecular em m/z 353 (modo negativo em APCI), referente a m/z 354 com fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_9$ . Além, da presença intensa do pico base em m/z 191 (100%), e outros fragmentos em m/z 179 (2,21%), 173 (1,75%) e 135 (1,24%) (FIGURA 25). A presença do íon molecular, os quatro fragmentos presentes no espectro de massas, com intensidades baixas sugeriu se tratar do ácido clorogênico, uma forma esterificada do ácido cafeico e ácido quínico, na posição 5 (FANG, 2002). Isto é confirmado, quando observamos a literatura que mostra o comportamento característico da clivagem do ácido clorogênico ao produzir o pico base com maior intensidade (m/z 191) e a contribuição do cafeoil para produzir íons com intensidades muito baixas, 179 (6%), 135 (1%) e 173 (0,5%), em comparação com outros derivados do ácido cafeoilquínico (FANG, 2002). Esses dados indicaram fortemente para a estrutura do ácido clorogênico (FIGURA 28).

Figura 25 - Espectro de massas da substância 2.



#### 4.13.3. Substância 3

A substância 3 apresentou coloração verde e aspecto oleosa. A análise por espectrometria de massas ( $[M - H]^-$ ) mostrou o íon molecular em  $m/z$  353 (modo negativo em APCI), referente a  $m/z$  354 com a fórmula molecular  $C_{16}H_{18}O_9$ . Além, da presença intensa do pico base em  $m/z$  191 (100%), e outros fragmentos em  $m/z$  179 (52,66%), 173 (45,88%) e 135 (36,33%) (FIGURA 26). A amostra apresentou o mesmo perfil de fragmentação semelhante ao da substância 1. As intensidades dos picos referentes aos fragmentos produzidos pelo grupo cafeoil foram maiores que aqueles produzidos pela fragmentação do ácido clorogênico. Esses fragmentos apresentaram intensidade alta em relação aos encontrados na literatura,  $m/z$  179 (35%), 135 (15%) e 173 (2%) (FANG, 2002). Esses dados sugerem que a substância 3 se trata de um derivado estereoisômero do ácido neoclorogênico.

Segundo Fang 2002, os isômeros do ácido cafeoilquínico apresentam esterificação do ácido cafeico nos carbonos 3, 4 e 5 do ácido quínico. Esses são conhecidos pelos nomes ácidos neoclorogênico, criptogênico e clorogênico, respectivamente. Além disso, podem ocorrer isômeros geométricos cis, referentes a dupla ligação dos  $C7'$  e  $C8'$  do ácido cafeico. Outras



possibilidades isoméricas estão relacionadas aos estereoisômeros referentes às posições das hidroxilas do ácido quínico, no espaço (FIGURA 28).

O diagnóstico do padrão de fragmentação (EM) dos isômeros do ácido clorogênico, envolve a quebra do cafeoil e do ácido quínico. Dois caminhos de fragmentação ocorrem produzindo os íons  $m/z$  191, 173, 179 e 135 (FIGURA 27). As intensidades relativas de cada espectro são significativamente diferentes. O ácido criptogênico produz o íon  $m/z$  173 como pico base. Em contraste, o ácido clorogênico produz, como pico base, o íon  $m/z$  191 e o íon  $m/z$  173 com intensidade baixa (0,5 %). Este fato pode ser explicado por uma competição nos caminhos da fragmentação dos isômeros. Observando os espectros de massas das três substâncias isoladas pôde-se excluir sem dúvida a presença do ácido criptogênico nas frações isoladas. Já os perfis dos espectros das substâncias 1 e 3 são semelhantes, o que sugere que as amostras são o ácido neoclorogênico e/ou seu derivado estereoisomérico (FIGURA 28) (FANG *et al* 2002).

Figura 26 - Espectro de massa da substância 3

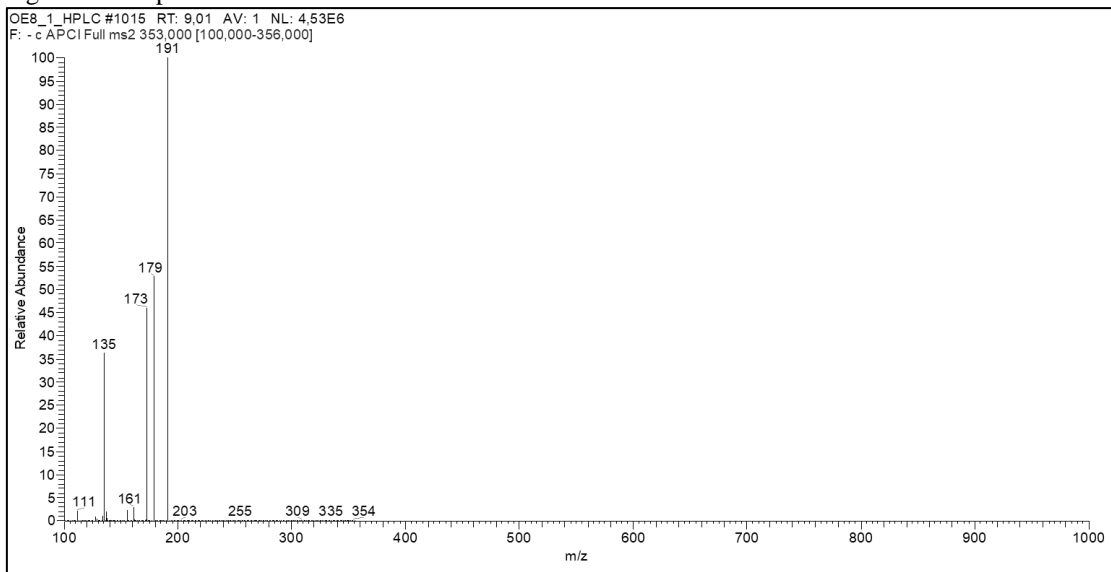
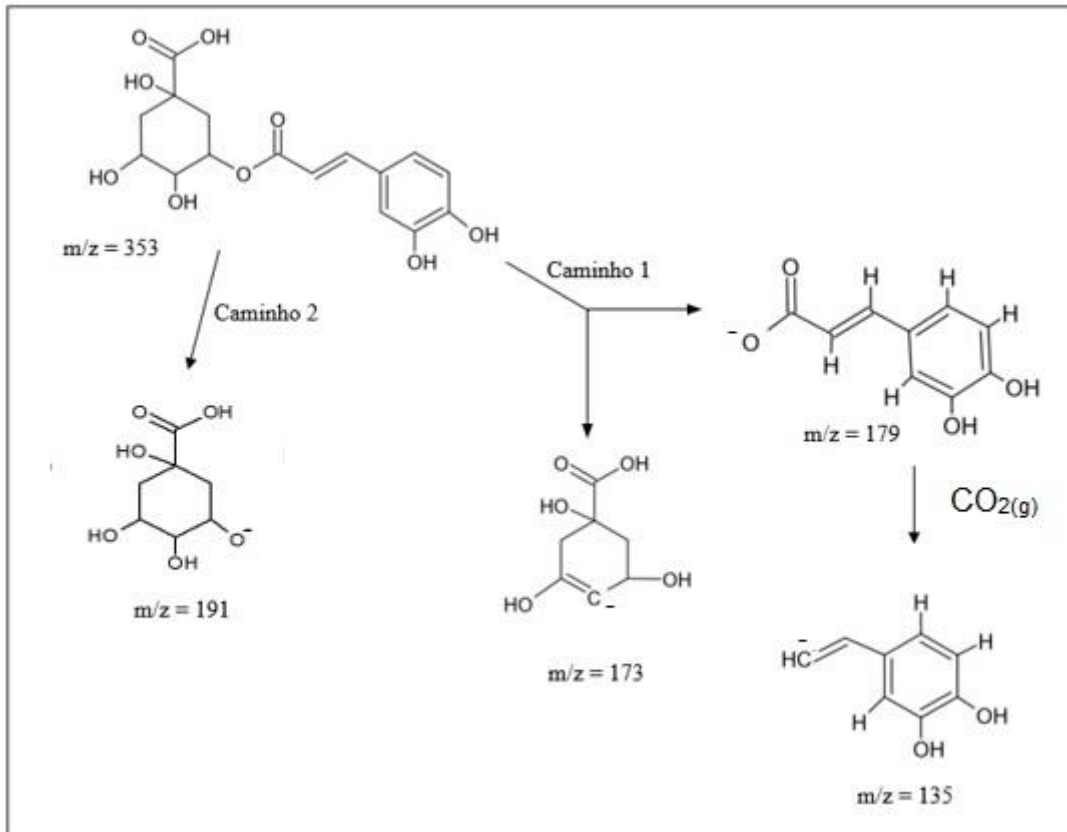
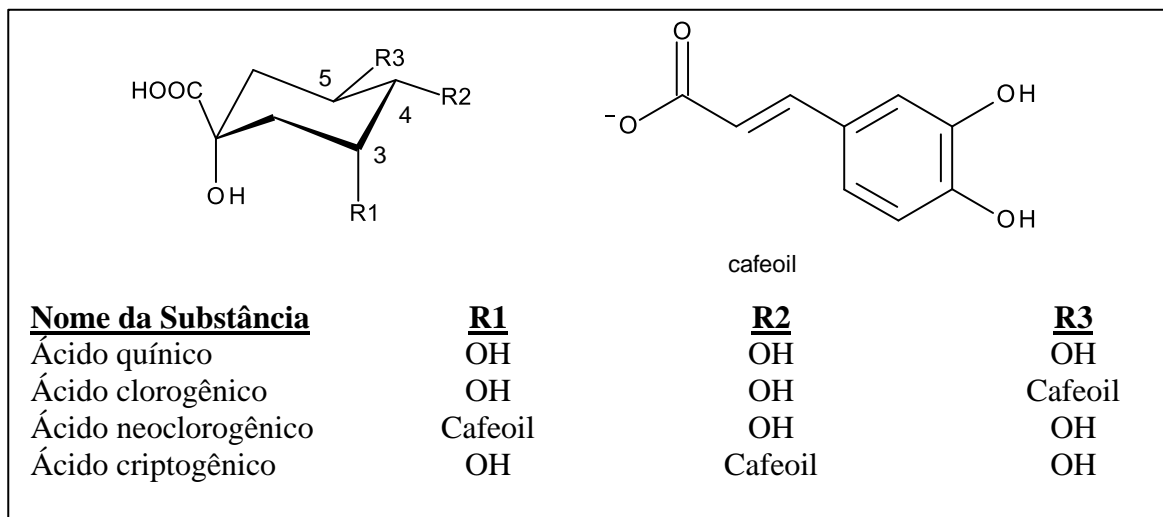


Figura 27 - Etapas de fragmentação proposto para os isômeros do ácido clorogênico



Fonte: Fang et al., 2002.

Figura 28 - Estruturas dos compostos fenólicos utilizados neste estudo.



Fonte: Fang et al., (2002).

O ácido clorogênico pertence à família dos ácidos fenólicos, formado pela esterificação do ácido cafêico com o ácido quínico (1L-1(OH),3,4,5-tetra-hidroxi-ciclohexanóico), sendo denominado pela nomenclatura IUPAC como ácido 5-*O*-cafeoilquínico (DE MARIA & MOREIRA, 2004; CLIFFORD, 1999, 2000). É um dos ácidos mais disponíveis entre os compostos de ácido fenólico, que podem ser encontrados naturalmente nos extratos de café verde, no chá, sidras, além de outros alimentos de origem vegetal (NAVEED *et al.*, 2018; CLIFFORD, 1999, 2000). Além de exercer vários benefícios para moderar o risco de muitas doenças infecciosas e degenerativa (NAVEED *et al.*, 2018; UPADHYAY & RAO, 2013).

O ácido clorogênico ainda não foi reportado para a espécie *P. callosum*. Há apenas o relato do ácido clorogênico isolado de *Piper betel*, o qual foi avaliado frente as cepas marinha do gênero *Vibrio*, mostrando excelente atividade bactericida com MIC<sub>90</sub> na faixa de 5 a 16 mg/mL (ACOSTA-SMITH *et al.*, 2019). Foi relatado também, o efeito antinutritivo e tóxico ocasionado pela oxidação do ácido clorogênico, quando adicionado as proteínas da dieta das larvas de *Spodopra exigua*, causando redução do valor nutricional e o não desenvolvimento das formas adultas (FELTON *et al.*, 1992). Além disso, o ácido clorogênico possui atividade antioxidante contra a oxidação lipídica, propriedades protetoras contra a degradação de outras substâncias bioativas presentes nos alimentos, e também, atividade prebiótica (NAVEED *et al.*, 2018; SANTANA-GÁLVES *et al.*, 2017).

A literatura relata a atividade bactericida e bacteriostático do ácido clorogênico frente a bactéria *Escherichia coli* (KABIR *et al.*, 2014). Além de inibir o crescimento de grupos de bactérias gram-positiva e gram-negativa, com valores de IC<sub>50</sub> variando entre 20 a 80 µg/mL (LOU *et al.*, 2011). Estas atividades são observadas quando o ácido clorogênico ao se ligar a membrana externa da célula, causa rompimento da parede celular e consequente morte das bactérias (LOU *et al.*, 2011). No entanto, para o isômero (1S,3R,4S,5R)5-*O*-cafeoilquínico, isolado dos frutos de *Sorbus domestica*, o mesmo apresentou maior redução da absorção de glicose e colesterol pela linhagem celular HepG2 (Carcinoma Hepatocelular), quando comparado com o ácido clorogênico (FORINO, 2015). A combinação dessas propriedades faz do ácido clorogênico um excelente candidato para a formulação de suplementos alimentares, medicamentos e até mesmo na formulação de inseticidas de origem natural.

Considerando os relatos sobre as propriedades do ácido clorogênico e seus derivados pode-se supor que ele potencialize os efeitos acaricida encontrado neste estudo, se associado aos óleos essenciais de *P. callosum*. Baseado nos resultados apresentados de atividade acaricida o ácido clorogênico pode ter relação com atividade apresentada neste trabalho (Tabela 12). A

fração FBU apresentou atividade antioxidante, o que pode ser explicado pela presença do ácido clorogênico e seus isômeros. Mais estudos são necessários para avaliar as contribuições do ácido clorogênico e os demais fenólicos para a atividade antioxidante de FBU. Em relação ao neoclorogênico e seus estereoisômero não foram encontrados artigos relatando o isolamento no gênero *Piper*. Este trabalho deve ser continuado para a identificação estrutural do ácido clorogênico e seus estereoisômeros por RMN.

## 5. CONCLUSÃO

Foram obtidos 3 óleos essenciais com densidades e colorações diferentes em relação a água. Embora o maior rendimento do óleo essencial das partes aéreas de *P. callosum* tenha sido observado em outubro/2018, o mesmo não sofreu influência da sazonalidade. No entanto, o maior teor de óleo essencial e número de substâncias químicas foram observados no período de mais alta temperatura e nenhuma precipitação. Portanto, o rendimento elevado do óleo essencial de *P. callosum* não sofreu influência da época de coleta, mas sim, do período de maior temperatura observado. Em relação aos constituintes químicos, podemos observar que a maior quantidade das substâncias presentes nos óleos essenciais, foram obtidas no período de seca. O safrol foi a substância majoritária presente em todos os óleos obtidos, seguidos de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno.

O extrato bruto, frações e subfrações de *P. callosum* apresentaram atividade antioxidante, exceto as frações FHEX e FCL, na avaliação em CCD. No entanto, somente as amostras FBU e FHID inibiram 63 e 57% do radical DPPH, obtendo  $CI_{50}$  de 89 e 81  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Os 3 óleos essenciais de *P. callosum* apresentaram ação fumigante frente ao ácaro *S. pontifica*. O percentual de mortalidade aumentou com o tempo de exposição e concentrações, apresentando concentrações respostas ( $CL_{25\%}$  e  $CL_{50\%}$ ) significativas ( $p \leq 1,39.10^{-4}$ ).

O efeito residual de contato do extrato bruto e frações sobre *R. indica*, apresentaram mortalidade corrigida maior que 50% em 24 h de exposição na concentração de 5 mg/mL. Para, praticamente, todas as amostras e tempos avaliados as inclinações das linhas de respostas ( $CL_{25\%}$  e  $CL_{50\%}$ ) foram significativas com  $p \leq 8,14.10^{-04}$ , indicando letalidade na população de *R. indica*.

Os resultados obtidos por CLAE/EM permitiram identificar 3 substâncias químicas, denominadas como ácido clorogênico, neoclorogênico e/ou seu derivado estereoisomérico. Essas substâncias estão sendo descritas pela primeira vez para a espécie *P. callosum*. Enquanto que, o ácido neoclorogênico e/ou seu derivado estereoisomérico estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Piper*.

Portanto, a espécie *P. callosum*, endêmica da região amazônica, é uma fonte promissora de metabólitos secundários de interesse para a indústria de alimentos, cosméticos, perfumarias, agroquímicos e entre outros. Esta espécie poderá contribuir como subsídios para formulação de acaricidas para o controle de ácaros fitofágos que atacam plantas de interesse econômico para

a região local. Também, seus óleos essenciais, podem ser explorados como acaricidas fumigante no controle de ácaros de grão armazenados. Além de suas substâncias fixas serem utilizadas em formulações de alimentos e medicamentos para o controle dos radicais livres. Contudo, torna-se necessário mais estudos para a identificação das substâncias responsáveis por tais atividades biológicas.

## REFERENCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-267, 1925.

ACOSTA-SMITH, E., LEON-SICAIROS, N., TIWARI, S., FLORES-VILLASEÑOR, H., CANIZALEZ-ROMAN, A., KUMAVATH, R. et al. *Piper betel* compounds piperidine, eugenyl acetate, and chlorogenic acid are broad-spectrum anti-vibrio compounds that are also effective on mdr strains of the pathogen. **Pathogens**, v. 8, n. 64, p. 1-8, 2019.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, 4<sup>o</sup> Ed. Allured Publ Corp Carol Stream IL, 802 p., 2007.

ADORJAN, B; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour e Fragrance Journal**. 25, 407–426, 2010.

AFIFY, A-M. M. R.; EL-BELTAGI, H. S.; FAYED, S. A.; SHALABY, E. A. Acaricidal activity of different extracts from *Syzygium cumini* L. Skeels (Pomposia) against *Tetranychus urticae* Koch. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 359-364, 2011.

AGBOR, G. A.; VINSON, J. A.; SORTINO, J.; JOHNSON, R. Antioxidant and anti-atherogenic activities of three *Piper* species on atherogenic diet fed hamsters. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 4, 387–391, 2012.

AHMAD, A.; HUSAIN, A.; MUJEEB, M., KHAN, S. A., ALHADRAMI, H. A. A.; BHANDARI, A. Quantification of total phenol, flavonoid content and pharmacognostical evaluation including HPTLC fingerprinting for the standardization of *Piper nigrum* Linn fruits. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 2, p. 101–107, 2015.

AHMAD, S.; REZAEI, M.; KHATONY, A. Comparing effects of aromatherapy with lavender essential oil and orange essential oil on fatigue of hemodialysis patients: A randomized trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 36, p. 64–68, 2019.

ALMEIDA, C. A.; AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, I. A.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. *Piper* Essential Oils Inhibit *Rhizopus oryzae* Growth, Biofilm Formation, and Rhizopuspepsin Activity. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, p. 1-7, 2018.

ALVES, D. S.; MOREJÓN, R. C.; MACHADO, A. R. T.; CARVALHO, G. A.; PINAS, O.; OLIVEIRA, D. F. Acaricidal activity of Annonaceae fractions against *Tetranychus tumidus* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and the metabolite profile of *Duguetia lanceolata* (Annonaceae) using GC-MS. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 36, p. 4119-4132, 2015.

ALVES, H. S.; OLIVEIRA, G. E. de.; ZOGHBI, M. das G.; CHAVES, M. C. de O. Flavonóides de *Piper carniconnectivum* C.DC.1. Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 160–164, 2010.

ANDRADE, E. H. A.; Guimarães, E. F.; Maia, J. G. S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia**. Belém: FEQ/UFPa, p. 448, 2009.

ASLAN, I., H. ÖZBEK, Ö. ÇALMASUR & F. ŞAHİN. 2004. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. **Ind. Crop Prod.** 19: 167-173.

ASSIS, C. P.O.; GONDIM JR, M. G. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; CAMARA, C. A. G. Toxicity of essential oils from plants towards *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) and *Suidasia pontifica* Oudemans (Acari: Astigmata). **Journal of Stored Products Research**.v. 47, 311-315, 2011.

BAGGIO, D.; FIGUEIREDO, S. M. FLECHTMANN, C. H. H.; ZAMBON, G. Q.; MIRANDA, S. H. G. Avaliação da presença de ácaros em cereais armazenados na grande São Paulo. **Anais da E. S. A.** v 44, p. 617-626, 1987.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. and IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. **Food Chem Toxicol.** 46: 446-475.

BALSA, D.; VÁSQUEZ, C.; VALERA, R. Aspectos biológicos de *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) sobre cultivares de *Musa spp.*: posible rol de la anatomía y química de la hoja. **Entomotropica**, v. 30, p. 181-192, 2015.

BARRA, A. Factors Affecting Chemical Variability of Essential Oils: a Review of Recent Developments. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 8, p. 1147-1154, 2009.

BERTHOD, A.; HASSOUN, M.; RUIZ-ANGEL, M.J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography **Anal. Bioanal. Chem.** v.383, p. 327, 2005.  
Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. **Agriculture**, v. 5, p. 48-102, 2015.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology.** v. 94, p. 223-253, 2004.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 107-120, 2018.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L. E.; RUZ-FEBLES, N. M.; ALVARADO-CANCHÉ, A. R.; CANUL-SOLÍS, J. R.; LÓPEZ-COBÁ, E.; CAMPOS-NAVARRETE, M. J. Ethanolic extracts of *Brosimum alicastrum* and *Plectranthus amboinicus* for the control of *Raoiella indica*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, n. 5, 625-628, 2018.

CAZELLA, L. N.; GLAMOCLINJA, J.; SOCOVIC, M.; GONÇALVES, J. E.; LINDE, G. A.; COLAUTO, M. B.; GAZIM, Z. C. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Aerial Parts at Flowering Period. **Front. Plant Sci.** v. 10, n. 27, p. 1-9, 2019.

RAJESHWARI; HIREMATHAD, A.; SINGH, M.; SANTOS, M. A.; RANGAPPA, S. K. A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic derivatives. **Pharmacological Reports**, v. 69, p. 281–295, 2017.

CHEN, Y. P., & CHUNG, H. Y. Antioxidant and Flavor in Spices Used in the Preparation of Chinese Dishes. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v. 2, p. 1-9, 2019.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. **J Sci Food Agric.**, v. 79, p. 362.372, 1999.

CLIFFORD, M. N. Review Chlorogenic acids and other cinnamates –nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolismo. **J Sci Food Agric.**, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

COELHO, C. R.; SANTOS, M. C.; VITERI-JUMBO, L.; SENA FILHO, J. G.; CASTRO, K. N. C.; CANUTO, K. M.; BRITO, E. S.; SOUZA, A. S. Q.; TEODORO, A. V. Bioactividad de *Spilanthes*



*acmella* (Asteraceae) a *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) y selectividad al depredador *Amblyseius largoensis* (Acari: Phytoseiidae). **Revista de Protección Vegetal**, Vol. 34, No. 1, 224-4697, 2019.

CONCEIÇÃO, R. S.; CARNEIRO, M. M. A. A.; REIS, I. M. A.; BRANCO, A.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; BOTURA, M. B. In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 275–282, 2017.

CONDE-HERNÁNDEZ LA; GUERRERO-BELTRÁN JÁ. Total phenolics and antioxidant activity of *Piper auritum* and *Porophyllum ruderale*. **Food Chem**, v. 1, p. 455-60, 2014.

CORPES, R.; MONTEIRO, L.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G.; MENEZES, I.; SETZER, W. N.; RAMOS, A. R.; DA SILVA, J. R. Comparison of Volatile Profile and Antioxidant Activity of *Piper divaricatum* G. Meyer (Piperaceae) Using Cuttings and Cell Tissue. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, n. 11, p. 2291-2298, 2019.

COSTA, F. N.; G. G. LEITÃO, G. G. Strategies of solvent system selection for the isolation of flavonoids by countercurrent chromatography. **J. Sep. Sci.** v. 33, p. 336–347, 2010.

DA SILVA, J. L.N. **Estudo sintético de derivados do óleo de sassafrás**. Santa Catarina: UFSC, 1987, 53 p.

DASGUPTA, N., & DE, B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, 219–224, 2004.

DAYAN, F. E.; OWENS, D. K.; WATSON, S. B.; ASOLKAR, R. N.; BODDY, L. G. Sarmentine, a natural herbicide from *Piper* species with multiple herbicide mechanisms of action. **Front. Plant Sci.** v. 6; p. 1-11, 2015.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para Análise de Ácido Clorogênico. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DEL QUIQUI, E. M.; DESCHAMPS, C.; AMARAL, W.; SIPRIANO, R. R.; MACHADO, M. P. Yield and Chemical Composition of Essential oil of Piperaceae in one Segment of the Semi deciduous Forest of Paraná State, Brazil, in Seasonal Samplings. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**. v. 6, n. 3, p. 335-367, 2019.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; colaboradores Souza-Brito, A. R. M.; MARIOT, A.; SANTOS, C. M. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata Atlântica**. 2. ed. rev. e ampl. – São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DIXON, R. Natural products and plant disease resistance. **Nature**. v. 14, p. 843-7, 2001.

DORNI, C. A. I., AMALRAJ, A., GOPI, S., VARMA, K., & ANJANA, S. N. Novel cosmeceuticals from plants—An industry guided review. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 7, 1–26, 2017.

DOS SANTOS, A. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A.; CHORILLI, M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L.R.; ISAAC, V. L. B. **Fitocosméticos**. In: ALVES, D. L.; SILVA, C.R. 2002. Fitohormônios: abordagem natural de terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002, 19-62 p.

DURANT-ARCHIBOLD, A. A.; SANTANA, A. I.; GUPTA, M. P. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 63–82, 2018.

Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 1-19, 2016.

EMRIZAL; AHMAD, F.; SIRAT, H. M.; JAMALUDIN, F.; MUSTAPHA, N. M.; ALI, R. M.; ARBAIN, D. Anti-inflammatory Activity of *Piper magnibaccum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**; v. 3, n. 10, p. 1719-1721, 2008.

FANG, N.; YU, S.; PRIOR, R. L. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3579-3585, 2002.

FELTON, G. W., DONATO, K. K., BROADWAY, R. M., & DUFFEY, S. S. Impact of oxidized plant phenolics on the nutritional quality of dipteran protein to a noctuid herbivore, *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v. 38, n. 4, p. 277-285, 1992.

FERAZ, J. C. B.; MATOS, C. H. C.; OLIVEIRA, C. R. F.; SÁ, M. G. R.; CONCEIÇÃO, A. G. C. Extrato de folhas de juazeiro com atividade acaricida sobre o ácaro-vermelho em algodoeiro. **Pesq. agropec. bras.**, v.52, n.7, p.493-499, 2017.

FERNANDEZ, C. M. M.; LORENZETTI, F. B.; BERNUCI, K. Z.; IWANAGA, C. C.; BORTULUCI, W. C.; ROMAGNOLO, M. B.; SIMÕES, M. G.; CORTEZ, D. A. G.; SCODRO, R. B. L.; GAZIM, Z. C.; DIAS FILHO, B. P. Larvicidal potential of piperovatine in the control of cattle tick. **Veterinary Parasitology**, v. 263, p. 5-9, 2018.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 31 p., 1971.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros em Produtos Armazenados e na Poeira Domiciliar**. Editora: FEALQ, 1986.

FLECHTMANN, C. H. W.; CASTELO, F. P. On some insects mites associated with dried and salted fish in Brazil. **Acta Amazônica**, v. 12, p 489-490, 1982.

FORINO, M.; TENORE, G. C.; TARTAGLIOLE, L.; CARMELA, D.; NOVELLINO, E.; CIMINIELLO, P. (1S,3R,4S,5R)5-O-Caffeoylquinic acid: Isolation, stereo-structure characterization and biological activity. **Food Chemistry**, v. 178, p. 306-310, 2015.

FREIRE, R.A.P.; MORAES, G.J.; SILVA, E.S.; VAZ, A.C.; CASTILHO, R.C. Biological control of *Bradysia matogrossensis* (Diptera: Sciaridae) in mushroom cultivation with predatory mites. **Experimental and Applied Acarology**, v.42, p. 87-93, 2007.

GAMBOA, F.; MUÑOZ, C-C.; NUMPAQUE, G.; SEQUEDA-CASTAÑEDA, L. G.; GUTIRREZ, S. J.; TELLEZ, N. Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. **International Journal of Microbiology**, p. 1-9, 2018.

GASPARETTO, A.; CRUZ, A. B.; WAGNER, T. M.; BONOMINI, T. J.; CORREA, R.; MALHEIROS, A. 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, 2016.

GELLER, M.; HAHNSTADT, L.; REGO, R. M.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E. Anafilaxia induzida por farinha de trigo contaminada por ácaros. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** v. 32, p. 199-201, 2009.

GHOSH, S.; TIWARI, S. S.; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; RAY, D. D.; RAWAT, A. K. S. Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate

and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 259–267, 2013.

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

GÓMEZ-MOYA, C. A.; LIMA, T. P. S.; MORAIS, E. G. F.; GONDIM JUNIOR, M. G. C.; MORAES, G. J. Hosts of *Raoiella indica* Hirst (Acari: Tenuipalpidae) Native to the Brazilian Amazon. **Journal of Agricultural Science**; v. 9, p. 87–94, 2017.

GUIMARÃES, A.C. **Estudo químico e biológico de *Cladocolea micranta* (Loranthaceae), uma planta medicinal da região Amazônica**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005, p. 305.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; HOYO-VADILLO, C. Alkaloids from *Piper*: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.13, p. 163–193, 2013.

GUZLEK, H.; WOOD, P. L.; JANAWAY, L. Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments. **Journal of Chromatography**, v. 1216, n. 19, p. 4181–4186, 2009.

HARKAT-MAUDORI, L.; ASMA, B.; MADANI, K.; SAID, Z. B-O. S.; RIGOU, P.; GRENIER, D.; ALLALOU, H.; REMINE, H.; ADJAOUD, A.; Boulekbache-Makhlouf, L. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. **Industrial Crops and Products**, n. 78, 148–153, 2015.

HO, C-C.; WU, C-S. *Suidasia* Mite Found from the Human Ear. **Formosan Entomol**, v. 22, p. 291–296, 2002.

HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J-L., TERREAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. **Pharm. Biol.** v. 39, p. 18–32, 2001.

HRITCU, L.; NOUMEDEM, J. A.; CIOANCA, O.; HANCIANU, P. H.; POSTU, P.; MIHASAN, M. Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of *Piper nigrum* fruits in beta-amyloid (1–42) rat model of Alzheimer's disease. **Behavioral and Brain Functions**, v. 11, n. 13, 2015.

HUANG, X.-Y.; PEI, D., LIU, J.-F.; DI, D.-L. A review on chiral separation by counter-current chromatography: Development, applications and future outlook. **Journal of Chromatography A**, v. 1531, p. 1–12, 2018.

HUANG, Y.; Ho, S. H.; KINI, R. M. Bioactivities of Safrole and Isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 3, p. 676–683, 1999.

HUBERT, J.; STEJSKAL, V.; MUNZBERGOVÁ, Z.; KUBÁTOVÁ, A.; VÁNOVÁ, M.; ZDÁRKOVÁ, E. Mites and fungi in heavily infested stores in the Czech Republic. **J Econ Entomol**, v. 97, n 6, p. 2144–2153, 2004.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v.51, n.1, p.45–66, 2006.

ISO. Aromatic Natural raw materials – Vocabulary. Comitê Europeu de Normalização - ISO 9235:2013.

IWAMOTO, L. H.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; MONTEIRO, P. A.; RUIZ, A. L. T. G.; SOUSA, I. M. de O.; FOGLIO, M. A.; RODRIGUES, R. A. F. Anticancer and Anti-Inflammatory Activities of a Standardized Dichloromethane Extract from *Piper umbellatum* L. Leaves. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, p. 1–8, 2015.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURY, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, [2017].

KABIR, F.; KATAYAMA, S.; TANJI, N.; NAKAMURA, S. Antimicrobial Effects of Chlorogenic Acid and Related Compounds. J Korean Soc Appl Biol Chem., p. 1-7, 2014.

KHAN, M.; ELHUSSEIN, S. A. A.; KHAN, M. M.; KHAN, N. Anti-Acetylcholinesterase Activity of Piper sarmentosum by a Continuous Immobilized-enzyme Assay. **APCBEE Procedia**, n. 2, p. 199 – 204, 2012.

KIM, E. H.; KIM, H. K.; AHN, Y. J. Acaricidal Activity of Plant Essential Oils against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). Journal of Asia-Pacific Entomology, n. 6, v. 1, p. 77–82, 2003.

KUMAR, S.; PANDEY A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 1, p.11-55, 2013.

LABORDA, R. et al. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**. v. 48, p. 106–110, 2013.

LABORDA, R.; MANZANO, I.; GAMON, M.; GRAVIDIA, I.; PERZ-BERMUDEZ, P.; BOLUDA, R. Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Industrial Crops and Products**, v. 48, p. 106–110, 2013.

LAMBANDEIRA, C. C.; DILCHER, D. L.; DAVIS, D. R.; WAGNER, D. L. Ninety-seven million years of angiosperm-insect association: Paleobiological insights into the meaning of coevolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 91, p. 12278-12282, 1994.

LANDE, A. A.; AMBAVADE, S. D.; SWAMI, U. S.; ADKAR, P. P.; AMBAVADE, P. D.; WAGHAMARE, A. B. Saponins isolated from roots of *Chlorophytum borivillianum* reduce acute and chronic inflammation and histone deacetylase. **Journal of Integrative Medicine**, v. 13, n. 1, 25–33, 2015.

LEAL, L. de F. **Estudo químico e avaliação da atividade farmacológica e microbiológica de *Piper mikanianum* Kunth Steudel**. Florianópolis: UFSC, 2000.

LEITÃO, G.G. Uso da Cromatografia Contracorrente na obtenção de padrões de origem Vegetal. **Revista Fitos**. v.1 n. 2, 2005.

LI, S., LI, S.-K., GAN, R.-Y., SONG, F.-L., KUANG, L., & LI, H.-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 51, 289–298, 2013.

LIMA, L. M. Safrole and the Versatility of a Natural Biophore. **Revista Virtual de Química**. v. 7, n. 2, p. 495-538, 2015.

- LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; MA, C.; WANG, Z. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 398-403, 2011.
- LUCKEY, T. D. Insecticide hormoligosis. **J. Econ. Entomol.** v. 61, 7-12, 1968.
- MACCHIONE, F.; CIONE, P. L.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; PERRUCCI, S.; FRANCESCHI, A.; MACCHIONE, G.; CECCARINE, L. Acaricidal Activity of Pine Essential Oils and Their Main Components against *Tyrophagus putrescentiae*, a Stored Food Mite. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 4586-4588, 2002.
- MACEDO, A. L.; da SILVA, D. P. D.; MOREIRA, D. L.; de QUEIROZ, L. N.; VASCONCELOS, T. R. A.; ARAUJO, G. F.; ... ROBBS, B. K. Cytotoxicity and selectiveness of Brazilian Piper species towards oral carcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 110, 342–352, 2019.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
- MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de Piper da Amazônia Rica em Safrol. **Química Nova**, v. 10, p. 200-204, 1987.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Developments in the application of counter-current  
MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. J.; TICONA, J. C.; JIMÉNEZ, I. A.; FLORES, N.; FERNÁNDEZ, J. J.; BAZZOCCHI, I. L. Flavonoids from *Piper delineatum* modulate quorum-sensing-regulated phenotypes in *Vibrio harveyi*. **Phytochemistry**, v. 117, p. 98–106, 2015.
- MARTINS, R. C. C.; LAGO, J. H. G.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, 64, p. 667-670, 2003.
- MATOS, F.T. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, 150p, 2009.
- MCDONALD, S.; PRENZLER, D. P.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, K. Phenolic content and antioxidante of olive extracts. **Food Chem.** v. 73, p. 73-84, 2001.
- MENDONÇA, R. S.; NAVIA, D.; FLECHTMANN, C. H. W. **Raoiella indica Hirst (Prostigmata: Tenuipalpidae), o ácaro vermelho das palmeiras - uma ameaça para as Américas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
- MENSOR, L.L.; MENENZES, F. S.; LEITAO G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITAO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v.15, p.127-130, 2001.
- MOGHADDAM, M.; MEHDIZADEH, L. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. **Soft Chemistry and Food Fermentation**, v. 3, 379–419, 2017.
- MOHARRAM, H. A.; YOUSSEF, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. **Alex. J. Fd. Sci. & Technol**, v. 11, p. 31-42, 2014.
- MORAES, G.J.; FLECHTMANN, C.H.W. **Manual de Acarologia. Acarologia Básica e Ácaros de Plantas Cultivadas no Brasil**. Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 308, 2008.

- MORAIS, E. G. F.; NAVIA, D.; GONDIN JUNIOR, M. G. C. **Dez Perguntas e Respostas sobre o Ácaro-Vermelho-das-Palmeiras Raiouella indica Hirst (Tenuipalpidae): Uma Ameaça para Palmeiras e Bananeiras no Brasil**. Boa Vista: Embrapa Roiraima, 2011, p. 17.
- MULLAEUR, F. B.; KESSLER, J. H.; MEDEMA, J. P. Betulinic acid, a natural compound with potent anticancer effects. **Anti-Cancer Drugs**, v. 21, n. 3, p. 215–227, 2010.
- NALINA, T.; RAHIM, Z. H. A. The Crude Aqueous Extract of *Piper betle* L. and its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus mutans*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 3, n. 1, 10–15, 2007.
- NARENDRA B. K.; HEMALATHA, R.; SATYANARAYANA, U.; SHUJAUDDIN, M.; HIMAJA, N.; BHASKARACHARY, K.; DINESH K, B. Phytochemicals, polyphenols, prebiotic effect of *Ocimum sanctum*, *Zingiber officinale*, *Piper nigrum* extracts. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, p. 42-51, 2018.
- NASCIMENTO, J. C.; PAULA, V. F. Occurrence, Biological Activities and <sup>13</sup>C NMR Data of Amides from *Piper* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 2288-2311, 2012.
- NAVEED, M.; HEJAZI, V.; ABBAS, M.; KAMBOH, A. A. et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further Research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67–74, 2018.
- NILE, S. H.; NILE, A. S.; KEUM, Y. S.; BASKAR, V.; RAMALINGAM, S. In vitro and in planta nematocidal activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) leaf extracts. **Crop Protection**, v. 100, p. 1-7, 2017.
- NIYAZI, M. M.; KHAN, Z. H.; KHAN, N. D.; MULAR, S. M. Identification, purification and characterization of bioactive compounds present in *Bridelia ferrugínea* and *Piper umbellatum*. **International Journal of Applied Research**, v. 3, n. 1, p. 557-559, 2017.
- NJERI, L. K.; NJAGI, E. N. M. Anti-diabetic Activity in Mice of *Piper capence* Used Traditionally in the Management of Diabetes Mellitus in Kenya. **Diabetes Metab**, v8, n. 4, p. 2-6, 2017.
- OLIVEIRA, D. C.; PRADO, E. P.; MORAES, G. J.; MORAES, E. G. F.; CHAGAS, E. A.; JUNIOR GODIM, M. G. C.; SOUCER, D. N. First Report of *Raiouella indica* (Acari: Tenuipalpidae) in Southeastern Brazil. **Florida Entomologist**, v. 99, p. 123-125, 2016.
- OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 228 p.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISTH, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the Genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 591-673, 1997.
- PAVELA, R. Acaricidal properties of extracts and major furanochromenes from the seeds of *Ammi visnaga* Linn. against *Tetranychus urticae* Koch. **Industrial Crops and Products**, n. 67, p. 108–113, 2015.
- PERRUCCI, S. Acaricidal Activity of Some Essential Oils and Their Constituents against *Tyrophagus longior*, a Mite of Stored Food. **Journal of Food Protection**, n. 58, n. 5, p. 560–563, 1995.
- PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochem & Anal Biochem**, p. 1-10, 2011.

- PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S. O.; CÂMERA, C. A. G.; GODIM JUNIOR, M., G. C.; OLIVEIRA, J., V.; SCHWARTZ, M. O. E. Atividade Acaricida dos Óleos Essenciais de Folhas e Frutos de *Xylopia sericea* Sobre o Ácaro Rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Quim. Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, 2007.
- PRASHANT, A.; RANGASWAMY, C.; YADAV, A. K.; REDDY, V.; SOWMYA, M. N.; MADHUNAPANTULA, S. In vitro anticancer activity of ethanolic extracts of *Piper nigrum* against colorectal carcinoma cell lines. **Int J App Basic Med Res**, v. 7, p. 67-72, 2017.
- PRING, B.G. Isolation and Identification of Amides from *Piper callosum*. Synthesis of Pipercallosine and Pipercallosidine. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, p.1493-8, 1982.
- RAMOS-LIMA, M.; MORENO-RODRÍGUES, D.; VARGAS-SANDOVAL, M. Nuevas palmas hospedantes de *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) en Cuba. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 43, p. 113-120, 2017.
- RANILLA, L. G.; KWON, Y-I.; APOSTOLIDIS, E., SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v 101, p. 4676–4689, 2010.
- RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, v. 29, p. 913-920, 2010.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 830, 2011.
- REZVANIAN, M.; OOI, Z. T.; JAMAL, J. A.; HUSAIN, K.; JALIL, J.; Z. YAACOB, Z.; MOHAMAD, H. F.; GHANI, A. A. Pharmacognostical and Chromatographic Analysis of Malaysian *Piper nigrum* Linn. Fruits. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 3, p. 334-343, 2016.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 372 p. 1997.
- RODRIGUES, J. C. V.; ANTONY, L. M. K. First Report of *Raoiella indica* (Acari: Tenuipalpidae) in Amazonas State, Brazil. **Florida Entomological Society**, v. 94, p.1073-1074, 2011.
- ROEDER, T. “Octopamine in invertebrates”. **Progress in Neurobiology**, v.59, n.5, p.533-561, 1999.
- ROSADO-AGUILAR, J.A.; ARJONA-CAMBRANES, K.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; ORTEGA-PACHECO, A.; ALZINA-LÓPEZ, A.; GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J.; GUTIÉRREZ-BLANCO, E.; AGUILAR- CABALLERO, A.J. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 30, n. 238, p. 66-76, 2017.
- SADGROV, N.; JONES, G. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, SAHA, SARMISTHA; VERMA, RAMTEJ J. In vitro and in silico study of *Piper nigrum* on cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and antioxidant enzymes. **Journal of Herbal Medicine**, v. 5, p. 86–98, 2015.
- SAMAIN, M-S.; VRIJDAGHS, A.; HESSE, M.; GOETGHEBEUR, P.; RODRÍGUEZ, F. J.; STOLL, A.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. Verhuellia is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany**, p. 1-12, 2010.

- SÁNCHEZ-RAMOS, I., & CASTAÑERA, P. Acaricidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), a mite of stored food. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n. 1, p. 93–101, 2001.
- SANTANA-GÁLVEZ, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. **Molecules**, v. 22, n. 358, p. 1-21, 2017.
- SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 136–138, 2011.
- SILVA, D.M.M.H. & BASTOS, C.N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatol. Bras**, v. 32, p. 143-145, 2007.
- SILVA, J. K. R.; PINTO, L. C.; BURBANO, R. M. R.; MONTENEGRO, R. C.; GUIMARAES, E. F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55–60, 2014.
- SILVA, M. A.; VILEGAS, W. **Cromatografia em Contracorrente**. In: SOUZA, G. H. B.; MELO, J. C. P.; LOPES, N. P. Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamentos e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais. Editora: UFOP, 2012.
- SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; FAIAL, K.; DO, C. F.; MENDONÇA, M.S. Morphoanatomical and physicochemical profile of *Piper callosum*: valuable assessment for its quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, 20-33, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2017.
- SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants e A review. **Journal of Pharmacy Research**, v 7, p. 828-835, 2013.
- SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; MAIA, J. G. S. Estudos preliminares da atividade inseticida de óleos essenciais de espécies de *Piper linneus* (Piperaceae) em operárias de *Solenopsis saevissima* f Smith (Hymenoptera: formicidae), em laboratório. **Biota Amazônia**, v. 1, p. 42-48, 2011.
- SOUZA, J. M.; GONDIM JR, M. G. C.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. Ácaros em Produtos Armazenados Comercializados em Supermercados e Feiras Livres da Cidade de Recife. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 303-309, 2005.
- SOUZA, R. C. P.; MORAIS, E. G. F.; PEREIRA, R. S.; CHAGAS, E. A.; SCHURT, D. A. Atividade Acaricida de Extrato a base de Sementes dos Frutos de Caçari. **GEINTEC**, v. 8, n.3, p.4495-4507, 2018.



- SOUZA, T. M.; SEVERI, J.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodedron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosidae). **Revista de Ciências Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 221-226. 2007.
- STONE, R. A biopesticidal tree begins to blossom. **Science**, v. 255, n. 5048, p. 1070–1071, 1992.
- SUEKANE, R.; DEGRANDE, P. E.; MELO, E. P.; BERTONCELLO, T. F.; LIMA JUNIOR, I. S.; KODAMAS, C. Damage level of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) in soybeans. **Rev. Ceres, Viçosa**, v. 59, p. 77-81, 2012.
- SUTHERLAND, I. A.; DEREK, F.; Role of counter-current chromatography in the modernisation of Chinese herbal medicines. **J. Chromatogr. A**. v. 1216, p. 740–753, 2009.
- TAKEARA, R. et al. **Biological Properties of Essential Oils from the Piper Species of Brazil: A Review**. In: EL-SHEMY, H. A. Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature. Publish: In Tech, 2017. p. 82-93, 2017.
- TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, n. 193, p. 51–88, 2019.
- TASLEEM, F.; AZHAR, I.; ALI, S. N.; PERVEEN, S.; MAHMOOD, Z. A. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pac J Trop Med**, v. 7, p. S461-S468, 2014.
- TEODORO, A.; RODRIGUES, J. V.; SILVA, J. F da.; NAVIA, D.; SILVA, S. S. **Acaro-vermelho-das-palmeiras *Raiolla Indica*: nova praga de coqueiro no Brasil**. Aracaju: Embrapa Tabuleiro costeiro, 2016, 19 p.
- TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chem.** v. 90, p. 333–340, 2005.
- THAKUR, M.; BHATTACHARYA, S.; KHOSLA, P. K.; PURI, L. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, n. 12, p. 1–12, 2019.
- TORQUILHO, H. S.; PINTO, A. C.; GODOY, R. L. O.; GUIMARÃES, E. F. Essential Oil of *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 4, p. 429-430, 1999.
- UPADHYAY, R.; RAO, L. J. M. An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 968-984, 2013.
- VAN GENDEREN, M. H.P.; LECLERCQ, P. A.; DELGADO, H. S.; KANJILAL, P. B.; SINGH, R. S. Compositional analysis of the leaf oils of *Piper callosum* Ruiz & Pav. from Peru and *Michelia montana* Blume from India. **Spectroscopy**, v. 14, p. 51–59, 1999.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, v 4, p. 105-113, 2015.

VIEIRA, Si. C. H.; PAULO, L. F.; SVIDZINSKI, T. I. E.; DIAS FILHO, B. P., et al. Antifungal Activity of *Piper diospyrifolium* Kunth (PIPERACEAE) Essential Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1001-1006, 2011.

VILLAMIZAR, L. H.; CARDOSO, M. G.; ANDRADE, J.; TEXEIRA, M. L. T.; SOARES, M. J. Linalool, a *Piper aduncum* essential oil component, has selective activity against *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms at 4°C. **Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 2, 131-139, 2017.

VILEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis*. 2° ed. Editora: Springer, p. 384, 1996.

WANG, G.-X., HAN, J., ZHAO, L.-W., JIANG, D.-X., LIU, Y.-T.; LIU, X.-L. Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. **Phytomedicine**, v. 17, n. 14, p. 1102–1105, 2010.

WELCH, B. L. The Significance of The Difference Between Two Means when the Population Variances are Unequal. **Biometrika**, v. 29, n.3-4, p. 350–362, 1938.

YAO, S.; et al. Developments of instruments and methods related with high-speed countercurrent chromatography and their applications in research of natural medicines. **Central European Journal of Chemistry**, v.10, p. 417–432, 2012.

ZHANG, Q.; DING, L.; LI, M.; CUI, W.; DING, W.; LUO, J.; ZHANG, Y. Action modes of *Aloe vera* L. extracts against *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval (Acarina: Tetranychidae). **Agricultural Sciences**, v.4, p. 117-122, 2013.

ZHANG, Y. Q.; DING, W.; ZHAO, Z-M.; WU, J.; FAN, Y-H. Studies on Acaricidal Bioactivities of *Artemisia annua* L. Extracts Against *Tetranychus cinnabarinus* Bois. (Acari: Tetranychidae). **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 5, p. 577-584, 2008.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.18, p. 925–938, 2014.