

**AVALIAÇÃO FUNGITÓXICA E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS E EXTRATOS OBTIDOS APÓS
DIFERENTES PROCESSOS DE EXTRAÇÃO
DE CIPÓ VICK (*Tanaecium nocturnum*) E
JOÃO-BRANDIM (*Piper piscatorum*)**

FLÁVIO ARAÚJO PIMENTEL

2007

FLÁVIO ARAÚJO PIMENTEL

**AVALIAÇÃO FUNGITÓXICA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS OBTIDOS APÓS DIFERENTES
PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE CIPÓ VICK (*Tanaecium nocturnum*) E
JOÃO-BRANDIM (*Piper piscatorum*).**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa
de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos,
área de concentração em Ciência dos Alimentos,
para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora
Prof^ª. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pimentel, Flávio Araújo

Avaliação fungitóxica e caracterização química dos óleos essenciais e extratos obtidos após diferentes processos de extração de cipó vick (*Tanaecium nocturnum*) e João-brandim (*Piper piscatorum*) / Flávio Araújo Pimentel. -- Lavras : UFLA, 2007.

178 p. : il.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Óleo essencial. 2. Extratos. 3. Processos de extração. 4. Cipó vick. 5. João-brandim. 6. Toxicidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-661.806

FLÁVIO ARAÚJO PIMENTEL

**AVALIAÇÃO FUNGITÓXICA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS OBTIDOS APÓS DIFERENTES
PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE CIPÓ VICK (*Tanaecium nocturnum*) E
JOÃO-BRANDIM (*Piper piscatorum*).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2007.

Profa. Márcia Ortiz Mayo Marques.....IAC

Prof. David Lee Nelson.....UFMG

Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli.....UFLA

Prof. Ruy Carvalho.....UFLA

Profa. Zuy Maria Magriotis.....UFLA

Profa. Maria das Graças Cardoso
UFLA
(Orientadora)
LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus,

por ter me concedido esta graça!

Aos meus pais, Luiz e Maria;

Aos meus irmãos, Arnaldo, Lúcio, Roberto e Melânia,

OFEREÇO

À minha esposa, Sônia;

E aos meus filhos, Fabíola, Samantha e Franklin;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças durante toda a caminhada para a obtenção deste título em Ciência dos Alimentos tão sonhado!

À Prof^ª. Dra. Maria das Graças Cardoso (DQI-UFLA), por ter aceitado a orientação e viabilizado a execução de um projeto de custos tão elevados, pela presteza e conhecimentos repassados, pelo apoio, humildade e compreensão nos momentos difíceis da pós-graduação.

À Prof^ª. Dra. Fabiana Queiroz (DCA-UFLA), pela sua co-orientação e ensinamentos repassados em relação à extração com CO₂ supercrítico.

Ao Prof^º. Dr. Luís Roberto Batista (DCA-UFLA), pela sua co-orientação e ensinamentos repassados em relação aos ensaios antiaflatogênicos.

Ao Prof^º. Dr. Augusto Ramalho, pela orientação nas análises estatísticas.

Aos professores e funcionários dos **Departamentos de Ciência dos Alimentos e de Química (UFLA)**, pela convivência e amizade;

Ao Prof^º. Dr. Luiz Cláudio (DEQ-UFV), pelos ensinamentos e por ter colocado o Laboratório de Identificação de Compostos Orgânicos à disposição.

Ao Prof^º. Dr. David Lee Nelson (UFMG), pela sua presteza e colaboração com a elaboração do documento de tese e em diversos artigos científicos encaminhados para publicação;

Ao Prof^º. Dr. Ruy Carvalho (Chefe do DQI-UFLA), pela presteza e viabilização estrutural, necessária para a execução do projeto de tese;

Ao Prof^º Dr. Mário Cesar Guerreiro, pela colaboração na execução do experimento com CO₂ supercrítico, pelos ensinamentos e pela grande amizade;

Aos membros da banca examinadora, Profa. Márcia Ortiz Mayo Marques, Prof. David Lee Nelson, Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, Prof. Ruy Carvalho e Profa. Zuy Maria Magriotis, pelas valiosas sugestões e pela participação.

Aos colegas da Embrapa Acre, Francisco de Assis Correa Silva, Evandro Orfanó Figueiredo e Francisco José Elias Abmorad, pelo importantíssimo empenho para o fornecimento das matérias-primas deste projeto de tese (cipó vick e João-brandim);

Ao colega Murilo Fazolin, pela presteza e colaboração quando esteve como conselheiro Acadêmico da Embrapa;

Ao ex-chefe Dr. Marcus Vinicio Neves d'Oliveira, pela autorização do custeio das despesas com colheita e transporte das matérias-primas utilizadas neste projeto de tese;

Aos meus chefes, Dr. Lucas Antonio de Sousa Leite, Dr. Ricardo Elesbão Alves e Dr. Caetano Silva Filho, pela compreensão e atendimento todas as vezes em que algum problema foi apresentado;

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Química Orgânica (UFLA) que colaboraram com a execução do experimento de tese, Lidyane, Milene, Fabiana, Juliana, Luis Gustavo, Ana Paula e Rafaela; sem a ajuda e colaboração de vocês, eu não conseguiria, muito obrigado!

Aos amigos do Laboratório de Química de Orgânica (UFLA), Fernando, Jean, Stefânia, Luciene, Priscila, Masson, Ana Eliza e Cleuza;

Às secretárias, Rafaela (DCA-UFLA), Miriam e Lílian (DQI-UFLA), pela presteza no atendimento, pela amizade e pela boa vontade constante.

À EMBRAPA, pela oportunidade concedida;

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

BIOGRAFIA

Flávio Araújo Pimentel, filho de Luiz dos Santos Pimentel e Maria Bezerra de Araújo Pimentel, nasceu na cidade de Açu – RN, em 26 de setembro de 1959.

Diplomou-se em Agronomia em fevereiro de 1985, pela Escola Superior de Agricultura de Mossoró - ESAM, Mossoró-RN.

Em novembro de 1989, ingressou no Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre – Embrapa Acre, por concurso público, onde ocupou o cargo de Pesquisador II, realizando pesquisas na área de alimentos, óleos essenciais, corantes naturais, processamento de frutos e desenvolvimento de equipamentos.

Em fevereiro de 1993, ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, concentrando seu estudo na área de Corantes Naturais, concluindo-o em setembro de 1995.

Em fevereiro de 2003, iniciou o curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, concentrando seus estudos na área de Fitoquímica.

Em novembro de 2005, foi transferido para a Embrapa Agroindústria Tropical, localizada em Fortaleza – CE, onde irá atuar principalmente em pesquisas com plantas medicinais.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1 Problema da pesquisa a ser investigada.....	4
2 Caracterização botânica das espécies.....	9
2.1 Piper piscatorum	9
2.1.1 Sinonímia: João-brandim, raiz-de-muela, raiz-de-mato.	9
2.2 Tanaecium nocturnum	9
2.2.1 Sinonímia: Cipó vick, cipó-carimbo	9
2.3 Bertholletia excelsa.....	10
2.3.1 Sinonímia: castanha-verdadeira, castanha-do-pará, castanheira, castanha-do-brasil.	10
3 Caracterização do habitat natural.....	11
3.1 Piper piscatorum e Tanaecium nocturnum	11
3.1.1 Condições Edafoclimaticas.....	11
3.2 Castanha-do-brasil	13
3.2.1 Condições Edafoclimaticas.....	13
4 Metabólitos secundários e biossíntese	14
5 Atividades biológicas de metabólitos secundários.....	20
6 Características da microbiota encontrada na castanha-do-Brasil.....	21
7 Técnicas de extração.....	22
7.1 Extração por fluido supercrítico.....	22
7.2 Arraste por vapor d' água	23

7.3 Extração por solventes orgânicos.....	24
7.3.1 A frio.....	24
7.3.2 Sob refluxo.....	25
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPITULO II.....	31
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE RENDIMENTOS DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE RAÍZES DE <i>Piper piscatorum</i> (TREL. YUNC.) OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT	33
1 INTRODUÇÃO.....	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4 CONCLUSÕES	51
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO	56
CAPÍTULO III.....	71
OBTENÇÃO DE EXTRATO DE <i>Piper piscatorum</i> (TREL. YUNC.) COM A UTILIZAÇÃO DE CO ₂ SUPERCRÍTICO E ÁLCOOIS ETÍLICO E METÍLICO COMO CO-SOLVENTES.....	71
RESUMO.....	72
ABSTRACT.....	73
1INTRODUÇÃO.....	74
2 MATERIAL E MÉTODOS	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4 CONCLUSÕES	95
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	96
ANEXO	101

CAPÍTULO IV	113
INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SECAGEM SOBRE O RENDIMENTO E A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Tanaecium nocturnum</i> (Barb. Rodr.) BUR. & K. SHUM.	113
RESUMO.....	114
ABSTRACT	115
1 INTRODUÇÃO.....	116
2 MATERIAL E MÉTODOS	118
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
4 CONCLUSÕES	127
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128
ANEXO	133
CAPÍTULO V.....	141
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AÇÃO FUNGITÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Tanaecium nocturnum</i> (BARB. RODR.) BUR. & K. SHUM SOBRE O <i>Aspergillus flavus</i> ISOLADO DA CASTANHA-DO-BRASIL (<i>Bertholletia excelsa</i>).....	141
RESUMO.....	142
ABSTRACT	143
1 INTRODUÇÃO.....	144
2 MATERIAL E MÉTODOS	146
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	151
4 CONCLUSÕES	156
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
ANEXO	162
CONSIDERAÇÕES FINAIS	167
ANEXOS GERAIS.....	168

RESUMO

Pimentel, Flávio Araújo. **Avaliação fungitóxica e caracterização química dos óleos essenciais e extratos obtidos após diferentes processos de extração de cipó vick (*Tanaecium nocturnum*) e João-Brandim (*Piper piscatorum*).** 2007. p. 178. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

Este trabalho foi desenvolvido em quatro experimentos, visando à caracterização química por IV, CG-EM e CG-DIC de óleos essenciais e extratos obtidos por diferentes processos de extração das espécies *Piper piscatorum* e *Tanaecium nocturnum*, nativas do estado do Acre, e à avaliação da toxicidade sobre o *Aspergillus flavus*. No primeiro, avaliou-se a eficiência de extração de raízes frescas e secas de *Piper piscatorum*, empregando as técnicas de hidrodestilação, técnicas de extração por refluxo e a frio com solventes de crescentes polaridades; no segundo, trabalhando com a mesma espécie, avaliou-se a eficiência de extração com folhas frescas e secas, utilizando CO₂ supercrítico e co-solventes (10 % etanol e 10 % metanol) à 40°C e 70°C e pressão de 400 bar; no terceiro caracterizaram-se quimicamente os óleos essenciais obtidos por hidrodestilações de folhas, caules e raízes frescos e secos (30 °C e 40°C) de *Tanaecium nocturnum*; e no quarto, avaliou-se a toxicidade do óleo essencial de folhas frescas de *Tanaecium nocturnum* sobre o *Aspergillus flavus*, isolado da castanha-do-Brasil. Pelos resultados do primeiro experimento, verificou-se que os principais componentes identificados no óleo essencial de *Piper piscatorum* foram o selin-11-en-4- α -ol (57,63%) e benzoato de benzila (16,32%), e no extrato, o selin-11-en-4- α -ol (40,69%), tetradecanol (26,31%), piperovatina (22,46%) e hidrocarbonetos (36,43%). Os maiores rendimentos de extratos ocorreram com solventes polares sob refluxo. Os teores de piperovatina, pipercallosidina e pipercallosina, com potencial anestésico, foram mais elevados em extratos de raiz fresca, utilizando-se acetato de etila para as técnicas de extração por refluxo e a frio. Já no segundo, os maiores rendimentos (% p/p) do extrato, piperovatina e pipercallosidina, foram obtidos de folhas frescas de *Piper piscatorum* extraídas com CO₂ + etanol a 40°C. A secagem analisada nos dois primeiros experimentos reduziu os rendimentos de óleo essencial e do extrato, exceto, para os ensaios com CO₂, utilizando o etanol como co-solvente. Os principais componentes identificados nesses extratos foram a piperovatina, seguido de ácido palmítico, pentadecano e pipercallosidina. Devido à matéria-

¹ Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora); Fabiana Queiroz - UFLA; Luiz Roberto Batista – UFLA (Co-orientadores)

prima, esse tratamento promoveu modificações nas suas composições químicas, principalmente nas reduções dos teores de amidas presentes. Os compostos majoritários encontrados nos óleos essenciais da espécie *Tanaecium nocturnum* foram benzaldeído, álcool benzílico e mandelonitrila. Para essas matérias-primas, ocorreram perdas do óleo essencial com modificações de suas composições químicas, com ênfase para a eliminação (folhas) ou redução (caules e raízes) do teor de mandelonitrila, proporcionado pela secagem. Pelos resultados da avaliação de fungitoxidade desse óleo essencial sobre o *Aspergillus flavus*, realizado até 10 dias de incubação, constatou-se que a inibição total do seu crescimento micelial ocorreu quando se utilizou o óleo essencial nas concentrações de 0,5 µL/mL na técnica de contato e de 1,0 µL/mL na técnica de fumigação. Em ambas as técnicas, essa essência inibiu a esporulação a partir da concentração de 0,5 µL/mL.

ABSTRACT

Pimentel, Flávio Araújo. **Evaluation of fungitoxic activity and chemical characterization of the essential oils obtained after different processes of extraction of cipó vick (*Tanaecium nocturnum*) and João-brandim (*Piper piscatorium*)**. 2007. p. 178. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The chemical characterization by IR, GC-MS and GC-FID of essential oils and extracts obtained from *Piper piscatorium* and *Tanaecium nocturnum*, plant species native to the state of Acre, by different extraction processes and the evaluation of the toxicity to *Aspergillus flavus* were performed. The study involved four experiments. In the first, the efficiency of the extraction of the fresh and dried roots of *Piper piscatorium* was evaluated employing steam distillation and extraction with hot and cold solvents of increasing polarity. The second experiment involved the evaluation of the efficiency of supercritical extraction of the fresh and dried leaves of the same species with CO₂ and co-solvents (10 % ethanol and 10 % methanol) at 40 °C and 70 °C and a pressure of 400 bar. The essential oils obtained by steam distillation of the fresh and dried (30 °C and 40°C) leaves, stems and roots of *Tanaecium nocturnum* were characterized chemically in the third experiment. In the fourth experiment, the toxicity of the essential oil from the fresh leaves of *Tanaecium nocturnum* to *Aspergillus flavus* isolated from Brazil nuts was evaluated. The principal components identified in the essential oil of *Piper piscatorium* were selin-11-en-4- α -ol (40.69%), tetradecanol (26.31%), piperovatine (22.46%) and hydrocarbons (36.43%). The highest yields of extracts were obtained with refluxing polar solvents. The highest concentrations of piperovatine, pipercallosidine and pipercallosine, which are potential anesthetics, were encountered in extracts of fresh roots obtained by hot and cold extractions with ethyl acetate. In the second experiment, the highest yields (% w/w) of extract, piperovatine and pipercallosidine were obtained from fresh leaves of *Piper piscatorium* extracted with CO₂ + ethanol at 40 °C. Drying of the material lead to a reduction in the yields of the essential oil and the extracts, except for the assays with CO₂, using ethanol as the co-solvent. The principal component identified in these extracts was piperovatine, followed by palmitic acid, pentadecane and pipercallosidine. The treatment caused modifications in the

¹ Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Major Professor); Fabiana Queiroz – UFLA and Luiz Roberto Batista – UFLA

chemical composition of the raw material, especially in the concentrations of the amides. The main compounds encountered in the essential oil of *Tanaecium nocturnum* were benzaldehyde, benzyl alcohol and mandelonitrile. Drying of the plant material caused loss of the essential oil with modifications in the chemical composition, with emphasis on the elimination (leaves) or reduction (stems and roots) in the mandelonitrile content. Total inhibition of the micellar growth of *Aspergillus flavus* during 10 days of incubation was observed at an essential oil concentration of 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in the contact test and 1.0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ in the fumigation test. This oil inhibited sporulation in both techniques using a concentration of 0.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as atenções globais estão voltadas para a Amazônia, que apresenta como detentora de um dos maiores estoques da biodiversidade do planeta. Entre os recursos naturais existentes, destaca-se a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) como uma das mais importantes espécies de exploração extrativa da região. O Brasil abastece 75% do mercado mundial e produz, anualmente, cerca de 26.000 toneladas de castanha-do-brasil, sendo predominante a exportação do produto “in natura”. Com participação significativa na geração de divisas para a região, com as exportações de seus produtos para os mercados interno e externo, a castanha tem ocupado importantes espaços na indústria de cosméticos, e de forma mais acentuada, na área de alimentos (Müller et al., 1995). No entanto, o baixo nível tecnológico característico da cadeia produtiva, associado às condições climáticas (umidade e precipitação pluviométricas elevadas) no período de colheita (novembro a março), tem favorecido a contaminação das amêndoas em casca, principalmente por fungos produtores de aflatoxinas e, mais especificamente, pelo *Aspegillus flavus*. Esses problemas dificultam a comercialização do produto, principalmente no mercado externo, em decorrência do rigoroso controle de países europeus e Estados Unidos em relação aos níveis de toxinas presentes nos alimentos. Assim, os habitantes, juntamente com as instituições governamentais e não-governamentais, vêm buscando alternativas que reduzam os riscos de contaminações, sem que haja descaracterização da cadeia produtiva, enfatizando, nesse sentido, a possibilidade de utilização de substâncias naturais encontradas nas localidades de produção.

Outros recursos naturais existentes nessa região tornam-se conhecidos gradativamente, à medida que a pesquisa científica é intensificada e os

resultados apresentam-se disponíveis para a sociedade. Pelo que foi identificado até o presente, tem-se um amplo diagnóstico das possibilidades da Região Amazônica, como uma reserva de recursos genéticos, capaz de interferir na balança comercial do país e, sobretudo, na economia mundial. Nesse caso, citam-se o óleo essencial do pau-rosa (*Aniba duckei* e *A. rosaeodora*); o óleo-resina de copaiba (*Copaifera duckei*, *C. reticulata* e *C. multijuga*) e recentemente a pimenta-longa (*Piper hispidinervum*). Esta vem despertando grandes interesses nacionais e internacionais, com perspectivas de tornar o Brasil produtor mundial de safrol (Maia et al., 1993).

Existem centenas de espécies utilizadas artesanalmente para diferentes aplicabilidades na medicina popular, culinária e conhecidas popularmente com os mais variados nomes. Na Amazônia, essas plantas têm sido consumidas em sua maioria sem nenhum conhecimento fitoquímico e com pouco ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. A falta dessas informações tem dificultado as pesquisas fitogenéticas, além de proporcionar pouco ou nenhum retorno econômico para a população local. A utilização de plantas nativas com atividades precursoras e/ou inseticida, fungicida, bactericida, e medicinal insere-se nesse contexto. Como exemplos, têm-se o “cipó vick (*Tanaecium nocturnum*)” com ações bactericida, inseticida e sendo utilizado externamente pela população como analgésico, e o “joão-brandim (*Piper piscatorium*)”, usado principalmente como anestésico nas formas de emplastro, infusão ou pelo uso direto no combate a dores em geral, com destaque para os problemas odontológicos (Ming, 1995).

Com base nesses aspectos, objetivou-se neste trabalho: a) caracterizar quimicamente os constituintes fixos e voláteis de *Tanaecium nocturnum* e *Piper piscatorium*; b) analisar diversos processos de extração para essas espécies e c) avaliar *in vitro* a toxicidade do óleo essencial do *Tanaecium nocturnum* sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-brasil .

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

1 Problema da pesquisa a ser investigada

A diversidade da flora brasileira apresenta imenso potencial para a produção de compostos primários e secundários. Esses têm sido, nessa última década, demandados continuamente pela indústria devido ao incremento da utilização de produtos naturais na agropecuária (Pletsch et al., 1995).

Estima-se em 250.000 o número de espécies vegetais usadas na medicina popular em todo o mundo. Menos de 10% delas têm sua atividade farmacológica e bioquímica estudada. Compostos ativos descobertos em produtos naturais podem ser otimizados por meio da química. Foi o caso da artemisinina (ginghaosu), potente antimalárico obtido da planta *Artemisia annua*, de uso milenar na China. A artemisinina alterada quimicamente resultou em moléculas de baixa toxicidade, eficazes no tratamento da malária grave pelo *Piper falciparum* resistente aos antimaláricos, inclusive na forma cerebral (Krettli, 2007).

Até o início da década de 80, foi estimado que menos de 1% das espécies da flora brasileira eram conhecidas quanto aos seus constituintes químicos (Gottlieb & Mors, 1980). Apesar de terem ocorrido incrementos significativos a partir desse percentual nas últimas duas décadas, há, evidentemente, uma grande lacuna de conhecimento da flora brasileira a ser preenchida (Shapiro, 1991).

Na América Latina, o Brasil é grande produtor e exportador de óleos essenciais e de alguns de seus componentes puros. As essências mais produzidas no país são os óleos cítricos, os de menta, eucalipto, geranim, citronela, vetiver, palma rosa e cravo. As substâncias puras mais importantes obtidas desses óleos são citral, citronelal, mentol, eucaliptol, geraniol e eugenol (Keifer, 1986).

Até 1989, a pauta comercial de produtos amazônicos, no que diz respeito a óleos essenciais e extratos, restringia-se à produção de óleo essencial de pau-rosa, extrato de copaíba e da extração de sementes de cumaru. A forma de exploração desses produtos caracterizava-se como extrativismo grosseiro, levando o pau-rosa, como exemplo, à quase extinção (Maia et al., 1993).

Na Amazônia, a maioria dos óleos essenciais é pouco comercializada, e são extraídos de plantas aromáticas silvestres de maneira rudimentar. A população nativa da Região Amazônica também extrai de maneira rudimentar diversos óleos essenciais e extratos, os quais são utilizados popularmente sem atender a qualquer padrão de qualidade para aproveitamento em outros mercados. A utilização dos óleos essenciais atende às mais diferentes áreas, tais como indústria química de perfumaria, farmacologia, inseticidas, alimentos, bebidas, fumos, anti-sépticos, estimulantes, etc. Por essa razão, vem crescendo, mesmo de forma lenta, o número de estudos sobre a constituição e propriedades biológicas dessas essências, bem como os fatores taxonômicos, ambientais e de cultivo que levam à variação tanto na quantidade como na qualidade desses compostos (Maia & Milchard, 1987; Simões et. al., 2004).

Entre as 119 drogas desenvolvidas de plantas, 74% devem-se a estudos científicos idealizados para avaliar os usos de plantas bem conhecidas na medicina popular. O que falta em recursos materiais e humanos para fazer pesquisas sobre plantas medicinais na Amazônia, sobra em riqueza da flora medicinal e sabedoria popular sobre sua utilização. Contudo, um limitado número de ervas já apresenta comprovação científica de suas propriedades, habilitando-as à agroindustrialização ou ao uso “in natura” (Cerri, citado por Silva Junior et al., 1994).

Segundo Martins et al. (1994), em pelo menos metade das espécies vegetais existentes no Brasil pode ser encontrada alguma propriedade terapêutica útil à população; entretanto, menos de 1% dessas espécies foi motivo

de estudos adequados. A pesquisa avançada com plantas medicinais pode conduzir às drogas revolucionárias e à comprovação de eficiência de chás de custo irrisório à população carente.

Em pesquisas etnofarmacológicas realizadas no Estado do Acre, verificou-se que 52% das plantas medicinais ou utilizadas para outros fins são de ocorrência espontânea, e encontradas em florestas primária e secundária (Ming & Ferreira, 1992). Nessas pesquisas, constatou-se que centenas de espécies são utilizadas pelas comunidades de colonos, seringueiros e indígenas, sem nenhum conhecimento das suas composições químicas ou da manipulação adequada da matéria-prima. Entre essas manipuladas, destacam-se o João-brandim (*Piper piscatorum*) pertencente à família Piperaceae, predominante na região, e o cipó vick (*Tanaecium nocturnum*), pertencente a família Bignoniaceae. As raízes e folhas do João-brandim vêm sendo utilizadas principalmente como anestésico nas formas de emplastro, infusão ou pelo uso direto, no combate a dores em geral, com destaque para os problemas odontológicos (Ming, 1995). Entre outras aplicações, a população utiliza a planta no combate à cefaléia e como antitérmico. As folhas do cipó vick são utilizadas externamente pela população como analgésico. Os índios da aldeia de Gotira, localizada às margens do rio Fresco, afluente do rio Xingu, usam esse cipó para combater abelhas e formigas (saúva) e como descongestionante nasal.

Outro recurso natural da Amazônia de importância econômica é a castanha-do-brasil. Produzida de forma extrativista, tem participação significativa na geração de divisas para a região, com as exportações de suas sementes para os mercados interno e externo (Müller et al., 1995).

Na agroindústria, a castanha em casca é armazenada a granel ou em sacos de polipropileno ou aniagem em galpões de alvenaria, por período superior a seis meses, quando é submetido ao processo de beneficiamento (Souza, 2004).

O Brasil abastece 75% do mercado mundial e produz, anualmente, cerca de 26.000 toneladas de castanha-do-brasil, sendo predominante a exportação do produto “in natura”. Durante o período de 1996 a 2001, os estados do Acre, Amazonas e Pará exportaram 54.000 toneladas de castanha “in natura” (com casca) e 15.000 toneladas de castanha beneficiada. Da produção nacional, apenas de 10% a 20% foram consumidos pelo mercado interno (Cavalcante, 1996).

Segundo Pereira (2004), o Brasil produz quase 30 mil toneladas de castanha-do-brasil por ano, sendo parte exportada para os Estados Unidos e Europa, sobretudo Itália e Alemanha. Os negócios geram R\$ 30,3 milhões na economia da região norte, beneficiando especialmente as comunidades extrativistas formadas por seringueiros, povos indígenas e ribeirinhos. Só no Acre, mais de 15 mil famílias têm na castanha um dos componentes na formação da renda familiar.

Produtos à base da castanha-do-brasil têm ocupado importantes espaços na indústria de cosméticos, peças e equipamentos de informática e, de forma acentuada, na indústria de alimentos. Entre os produtos alimentícios de maior uso, estão as amêndoas descascadas, utilizadas em snacks, coberturas de sorvetes, produção de biscoitos e bombons, e farinhas de elevado teor protéico. Essas últimas são largamente empregadas em alimentos destinados a mercados institucionais, como a merenda escolar ou como complemento/suplemento alimentar, além de óleos para uso na culinária (Cavalcante, 1996).

O baixo nível tecnológico característico da cadeia produtiva, bem como as condições inadequadas de manejo e manuseio da castanha-do-brasil, têm favorecido a constituição de pontos de contaminação, com conseqüente risco à saúde do consumidor e perdas econômicas comuns em todas as etapas. Entre os principais problemas identificados na produção da castanha-do-brasil, está a elevada contaminação por bactérias do grupo coliforme, devido à sua

prolongada exposição a fatores ambientais e às condições de manipulação na indústria, além da contaminação por fungos produtores de aflatoxinas, sendo a contaminação por *Aspergillus flavus* a mais acentuada. Essa é encontrada em mais 90% dos isolados obtidos de lotes importados. Esses problemas têm constituído em forte entrave para a comercialização do produto, principalmente no mercado externo, dado o rigoroso controle de países europeus e dos Estados Unidos em relação aos níveis presentes nos alimentos (Souza, 2004).

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. A resolução (34/76) do Ministério da Saúde, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, publicada no Diário Oficial em janeiro de 1977, estabelece o limite máximo de 30 µg/Kg de aflatoxinas B1 e G1. Já a Portaria n° 183, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicada no Diário Oficial da União em março de 1996, fixou o limite máximo das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em 20 µg/Kg. Esse limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (OMS/FAO) (Batista, 2000; Caldas et al., 2002).

No Brasil, a Instrução Normativa N° 12, de 27 de maio de 2004, do MAPA, estabelece que a exportação de castanha-do-brasil com casca e descascada fica sujeita à certificação sanitária específica referente ao controle de contaminantes, quando exigida pelos países importadores, expedida com base em regulamentos técnicos, critérios e procedimentos utilizados pelos órgãos técnicos competentes do MAPA. O certificado sanitário será documento indispensável ao licenciamento de exportação, bem como à autorização de embarque do lote (Brasil, 2004).

De acordo com Batista (2000), no Mercosul, uma legislação comum a todos os integrantes destina um limite de 20 ppb de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) para milho, farelo de milho, amendoim e para grãos em geral. Na

União Européia, para todos os membros, a legislação estimula o valor de 5 ppb de aflatoxinas totais para cereais, amendoim, nozes e produtos processados para consumo humano direto.

Diante dessas demandas, faz-se necessária a realização de pesquisas com métodos extrativos, visando à caracterização química e testes biológicos para o controle do *Aspergillus flavus*, principalmente com espécies amazônicas pouco domesticadas, entre essas o cipó vick e o João-brandim.

2 Caracterização botânica das espécies

2.1 *Piper piscatorum*

2.1.1 Sinonímia: João-brandim, raiz-de-muela, raiz-de-mato.

Classificada como *Piper piscatorum* e pertencente à família Piperaceae, o João-brandim é um subarbusto fortemente nodoso. Suas folhas são do tipo subcoreáceas, verde opacas e ovadas e acuminadas no ápice. Apresenta espiguetas erectas de cor verde, brácteas florais circulares, com fruto globoso, ovóide tetrágono. Na floresta, as plantas são encontradas em bosques úmidos (Rangel, 2002).

2.2 *Tanaecium nocturnum*

2.2.1 Sinonímia: Cipó vick, cipó-carimbo

Identificada botanicamente como *Tanaecium nocturnum*, essa planta pertence à família Bignoniaceae. Trata-se de uma espécie trepadeira alta, de ramos flexuosos, estriados longitudinalmente, folhas opostas, pecioladas, biofoliadas, folíolos peciolulados e elípticos. Apresenta flores brancas, muito

grandes, aromáticas, de cálice espontâneo irregularmente bifendido, corola de 16 cm, igualmente glanduloso-punctuada na parte interna, dispostas em racimos no ápice dos ramos, geralmente sobre as folhas das árvores em que a póia (Correa, 1931; Gottlieb & Mors, 1980).

2.3 *Bertholletia excelsa*

2.3.1 Sinonímia: castanha-verdadeira, castanha-do-pará, castanheira, castanha-do-brasil.

Pertencente à família Lecythidaceae, a castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) é uma espécie de grande porte, podendo atingir até 50 m de altura. Entre as plantas adultas, podem ser encontrados indivíduos com idade estimada entre 800 a 1200 anos. O fruto, conhecido como ouriço, é uma cápsula indeiscente (que não se abre espontaneamente), com casca lenhosa muito dura e de formato esférico ou levemente achatado. Contém, em seu interior, cerca de dezoito sementes, cujas amêndoas são altamente nutritivas. As sementes têm formato triangular-anguloso, comprimento entre 4 e 7 cm e casca bastante dura e rugosa. O peso do fruto varia de 200 gramas até 1,5 quilograma, com peso médio de aproximadamente 750 gramas. As sementes representam cerca de 25% do peso dos frutos e as amêndoas (sementes sem casca), 13%. O peso médio de uma semente gira em torno de 8,2 gramas (Frank & Betancourt, 1981; Müller et al., 1995).

3 Caracterização do habitat natural

3.1 *Piper piscatorum* e *Tanaecium nocturnum*

3.1.1 Condições Edafoclimáticas

O tipo de clima dominante nas áreas de populações nativas das espécies é AW, caracterizado pela ocorrência de temperatura média do mês mais frio superior a 18 °C e uma estação seca de pequena duração. O regime térmico é caracterizado por temperatura média anual em torno de 24,3°C. Os meses mais quentes são setembro, novembro e dezembro, com temperaturas médias em torno de 25°C. O período mais frio está compreendido pelos meses de junho e julho, com temperaturas médias de 22,9°C e 22°C, respectivamente. É frequente a queda brusca de temperatura, pela ocorrência de ondas de frio, que pode atingir até 4°C, com duração de 3 a 8 dias. O regime pluviométrico da região caracteriza-se por um período chuvoso de 7 meses, de outubro a abril, sendo os meses de dezembro a março os mais chuvosos. A precipitação média anual na região situa-se em torno de 1.950 mm, correspondendo o período chuvoso ao período mais quente do ano. O trimestre mais chuvoso, janeiro, fevereiro e março, é responsável por cerca de 40% da precipitação total anual. O período seco prolonga-se por 5 meses, de maio a setembro, com precipitação média que varia de 11 mm a 83 mm ao mês. O solo foi classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico. A classe de textura é de média/argilosa (Embrapa, 2001).

Nas Figuras 1 e 2, verifica-se a localização do habitat natural das espécies *Piper piscatorum* e *Tanaecium nocturnum*.

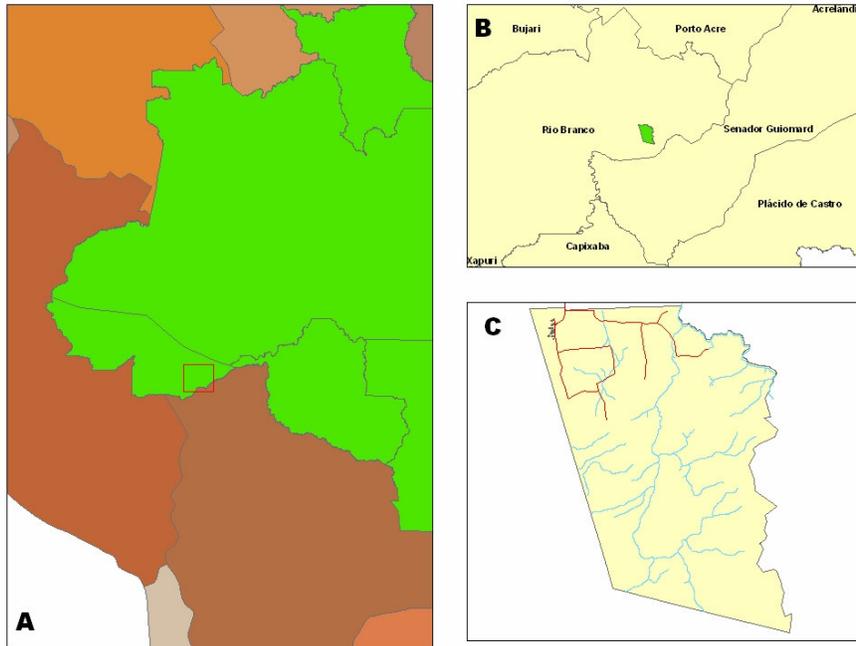


FIGURA 1. Mapa de localização do habitat natural de *Piper piscatorum* e *Tanaecium nocturnum* (A. Estado do Acre na América do Sul, B. Campo Experimental da Embrapa Acre, C. Reserva Florestal da Embrapa Acre) (Embrapa, 2001).



FIGURA 2. Fotografia aérea vertical do habitat natural de *Piper piscatorum* e *Tanaecium nocturnum* (Embrapa, 2001).

3.2 Castanha-do-brasil

3.2.1 Condições Edafoclimáticas

A castanha-do-brasil é encontrada em estado nativo na Amazônia, localizando-se as maiores concentrações na porção brasileira, principalmente no planalto que separa a bacia formada pelos afluentes do baixo Amazonas, alto Tocantins e alto Moju, e em terras altas ao norte do rio Jarí, no estado do Pará e nos estados do Amazonas e Acre, Peru, até o alto Beni na Bolívia. Desenvolve-se bem em terra firme, em solos argilosos ou argilo-arenosos, com temperatura média anual que varia entre 24,3 e 27,2 °C, com máximas de 30,6 a 32,6 °C e mínimas de 19,2 a 23,4 °C. Nas regiões de produção, a umidade relativa varia

entre 79% a 86 % e a precipitação total anual oscila de 1400mm e 2800 mm (Müller et al., 1995; Souza, 2004).

4 Metabólitos secundários e biossíntese

Os organismos vegetais são um universo rico e complexo de compostos orgânicos, com inúmeros centros estereogênicos que participam ativamente no seu crescimento e desenvolvimento. Tais compostos, definidos como metabólitos secundários, são originados por vias biossintéticas alternativas e podem ser caracterizados como elementos de diferenciação e especialização celular, atuando, por exemplo, na defesa contra herbívoros e microorganismos, na proteção contra os raios UV, em atração de polinizadores ou de animais dispersores de sementes, além de sua participação em alelopatias (Harbone, 1993; Wink, 1990).

Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, isso tem ocorrido somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em razão do grau de diferenciação e desenvolvimento deles. Em alguns casos, a produção pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ecológicas ou ambientes. Os tipos de metabólitos secundários são específicos de algumas espécies e/ou famílias (Wink, 1990).

Em várias espécies, o local da biossíntese está restrito a um órgão, ao passo que os produtos são acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes, devido a um sistema de transporte intercelular. Nas células, certos mecanismos bioquímicos garantem a condução dos compostos aos compartimentos de estocagem apropriados: os hidrofílicos tendem a ser armazenados nos vacúolos, e os lipofílicos acumulam-se em ductos de células mortas ou ligam-se aos

componentes celulares lipofílicos, como membranas, ceras cuticulares e lignina (Wink, 1990).

São bem conhecidos, alguns casos em que a compartimentalização é de fundamental importância para a sobrevivência do vegetal. Por exemplo, os glicosídeos cianogênicos são estocados nos vacúolos das células epidérmicas; portanto, encontram-se isolados de hidrolases, localizadas nos tecidos do mesofilo adjacente. Somente nas situações em que os tecidos são danificados (por exemplo, durante a mastigação) é que os glicosídeos cianogênicos e as hidrolases interagem, havendo liberação de HCN. Assim, a própria planta produtora fica protegida e utiliza essa estratégia em caso de ataque de herbívoros (Simões, 2004).

De acordo com Simões et al. (2004), a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 3). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. O acetato fornece as unidades acetila, que compõem o intermediário reativo, acetil-tio-coenzima A (acetil-ScoA ou acetil-CoA), o verdadeiro precursor de vários grupos de substâncias, tais como os aminoácidos alifáticos (e os alcalóides deles derivados), terpenóides, esteróis, ácidos graxos e triglicerídeos. Os aminoácidos alifáticos originam-se no ciclo do ácido cítrico, ao passo que os demais metabólitos derivam do mevalonato ou da condensação de unidades de acetato.

No ciclo do ácido cítrico, são originados o aspartato e a glutamina, além de seus derivados (em vegetais superiores) lisina e ornitina, respectivamente (Figura 3). Esses derivados vão dar origem a uma série de alcalóides (pirrolidínicos, tropânicos, etc.). Além dos alcalóides, outros compostos nitrogenados com função protetora são encontrados nos vegetais.

O mevalonato é formado da condensação de uma unidade da acetoacetyl-CoA com uma molécula da acetil-CoA (Figuras 3 e 4). Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise, originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA, que é reduzida a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é, então, convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP), ou isopreno ativo, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula de isopentenil-pirofosfato e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) formam o *trans*-geranyl-pirofosfato (GPP), a partir do qual formam os demais terpenos. Novas ligações cabeça-cauda entre *trans*-geranyl-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato resultarão em sesquiterpenos (C₁₅) e diterpenos (C₂₀). A ligação cabeça-cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (FPP) dará origem ao esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides. Mono e sesquiterpenos são as principais substâncias que compõem as misturas chamadas de óleos essenciais.

De acordo com Deschamps (2005), uma rota via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS), de ocorrência nos plastídios, vem sendo discutida. Nessa rota, o piruvato e o D-gliceraldeído-3-fosfato, produzidos no metabolismo primário, formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, que após sucessivas reações, formam tanto o IPP como o DAPP (Figura 5). A partir da formação desses isoprenóides, segue o mesmo processo de biossíntese de terpenóides discutido para via do mevalonato.

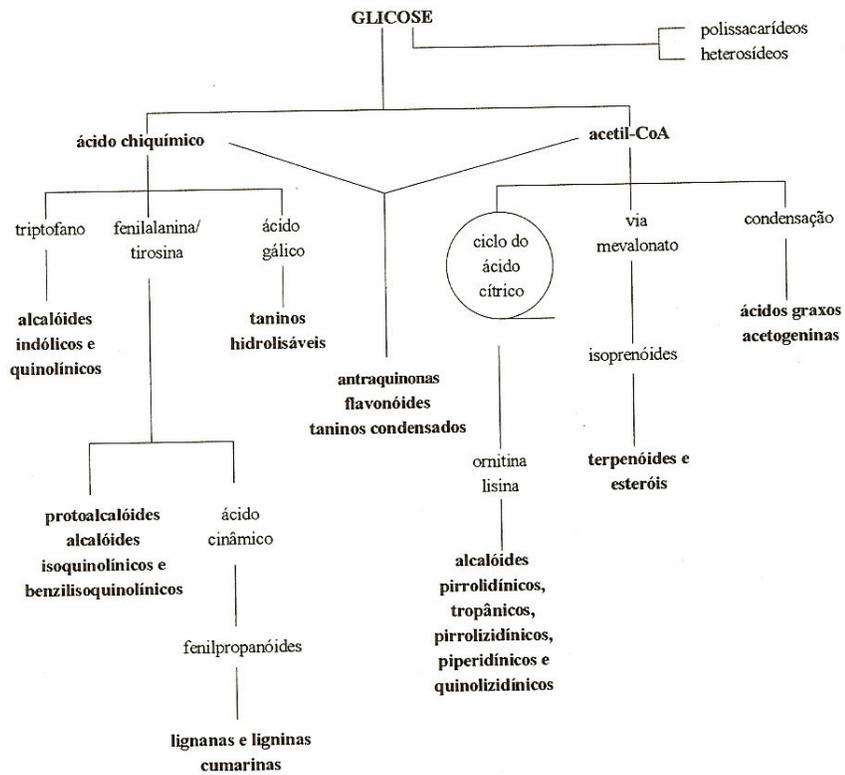


FIGURA 3. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Simões et al., 2004).

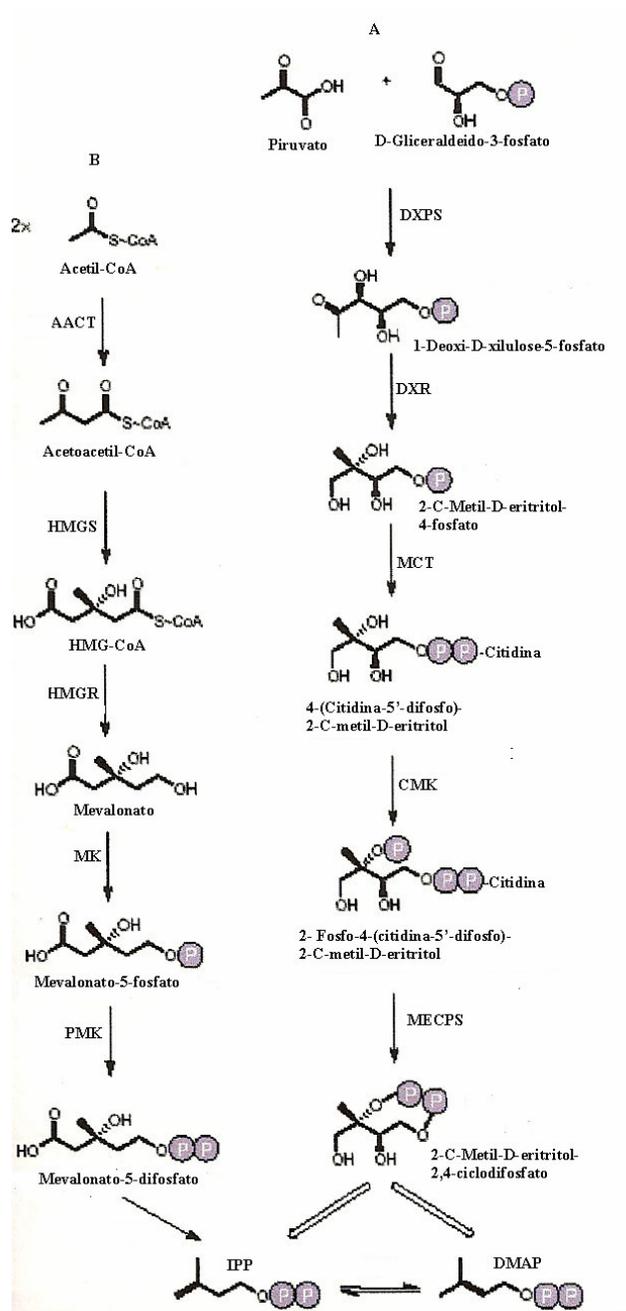


FIGURA 4. Ciclo biossintético de terpenóides, pela via do mevalonato (A) e independente do mevalonato ou via DXPS (B) (Deschamps, 2005)

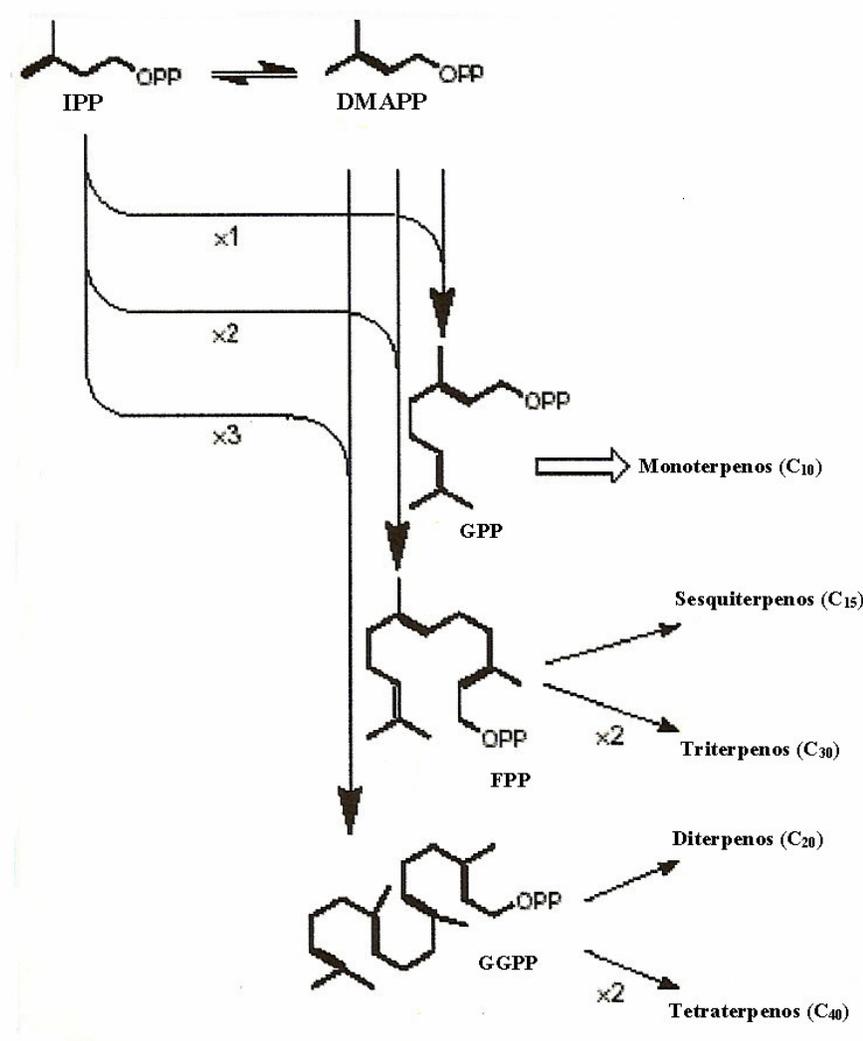


FIGURA 5. Biossíntese de terpenóides por meio da condensação de IPP e DMAPP (Deschamps, 2005).

5 Atividades biológicas de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários de maior atividade biológica são os ácidos orgânicos, alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, óleos essenciais, saponinas, mucilagens, glicosídeos e amidas, e recebem a denominação de princípios ativos quando induzem respostas fisiológicas em outros organismos. A existência e a distribuição desses compostos são bastante variáveis nas espécies vegetais, dependendo de fatores hereditários, ontogênicos (etapas de desenvolvimento) e ambientais (solo, clima, microorganismos, etc) (Robbers et al., 1997).

Segundo Putman (1983), a comunicação química entre os seres vivos representa um campo de atividade desafiante, de grande valor científico e de enorme aplicação. Substâncias alelopáticas, tais como cânfora, psoraleno e florizina, que participam da guerra química entre os organismos vivos, podem ser isolados de plantas, microorganismos e solos. Para Almeida, citado por Braz-Filho (1994), todos os seres vivos sintetizam substâncias alelopáticas, porém, as plantas são responsáveis pela maior quantidade e diversidade desses compostos.

Certos óleos essenciais, comumente usados como fragrâncias e aromatizantes na indústria de perfumes e alimentos, têm sido relatados como repelentes a insetos (Isman, 2000). Em recentes investigações em vários países, constatou-se que alguns óleos essenciais de plantas não agem apenas como repelentes a insetos, mas possuem ação inseticida fumigante (Lee et al., 2001), ação fungicida contra alguns importantes patógenos de plantas (Müller-Riebau et al., 1995) e contra ervas daninhas (Kohli et al., 1998). Pode ser verificado em vários trabalhos que os óleos essenciais de eucalipto, gengibre, tomilho, erva-doce, alecrim e laranja-amarga reduziram a produção de aflatoxina B1 desenvolvida por *Aspergillus* (Rao et al., 1983). Da mesma forma, o óleo

essencial de *Azadirachta indica* tem reduzido significativamente a síntese de aflatoxina em grãos de milho armazenados (Bankola, 1997).

Em várias pesquisas publicadas sobre Piperaceae, ralata-se o potencial anestésico de amidas encontradas em espécies utilizadas na medicina popular. Entre esses constituintes identificados, estão a pipericallosina (*Piper darinensis*), piperovatina (*Ottonia corcovadensis*, *Piper piscatorum*, *Ottonia martiana* e *Ottonia frutescens*), pipericallosidina (*Piper piscatorum*) e cefaradiona (*Piper auritum*) (Cunico et al., 2003; Makapugay, 1983; Mcferren & Rodríguez, 1998).

6 Características da microbiota encontrada na castanha-do-Brasil

Entre as espécies fúngicas encontradas em castanha-do-brasil, destacam-se *Aspergillus flavus*, *A. ninger*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *Penicillium verrucosum*, *P. viridicatum*, *P. citrinum*, *Fusarium sacchari*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *Alternaria alternata*, todas reconhecidamente capazes de produzir micotoxinas, entre elas as aflatoxinas, ocratoxina A, citrinina, ácido ciclopiazônico, desoxinivalenol, fumonisina, zearalenona, toxina T-2, altenueno (ALT), alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altertoxina I e ácido tenuazônico (Freire et al., 2000).

As aflatoxinas (B1, B2), micotoxinas mais comuns na castanha-do-brasil, são metabólitos altamente tóxicos, conhecidos por seu efeito carcinogênico, teratogênico e mutagênico, produzidos por varias estirpes de *Aspergillus*, em diversos produtos. Essas além de comprometerem órgãos vitais, atacam o sistema imunológico e causam disfunção do sistema nervoso. A aflatoxina B1 é considerada uma das mais potentes substâncias carcinogênicas conhecidas, havendo evidências de que causa câncer hepático em seres humanos (Freire et al., 2000). Quimicamente pertencem à classe dos compostos denominados furanocumarinas, possuindo um núcleo associado ao furano e à

lactona, havendo quatro tipos mais importantes, designados pela cor da fluorescência sob a luz ultravioleta (B1 e B2, luz azul) e (G1 e G2, luz verde). A aflatoxina é tóxica para a maioria dos animais, com valor de $LD_{50} = 0,5 \text{ mg/Kg}$. A forma de lesão mais comum é o excessivo crescimento de células do fígado. Essa é a forma de câncer iniciada pela aflatoxina, reconhecida como o carcinogênico mais potente, e seus principais receptores são as proteínas e os ácidos nucleicos. A aflatoxina é facilmente absorvida pelo trato intestinal.

Os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos em grãos estocados são a umidade, incluindo a atividade de água (a_w), temperatura, tempo de estocagem, grau de contaminação do grão antes de ser estocado, quantidade de material estranho e atividade de insetos e ácaros (Christensen & Kaufmann, 1969). Segundo Moreau (1979), a temperatura tem papel dominante no crescimento do micélio, bem como na formação e germinação dos esporos. A temperatura ótima para o crescimento do fungo e produção de aflatoxinas em *Aspergillus flavus* varia entre 24°C e 30°C, sendo a temperaturas mínima 12°C e máxima 42°C para a produção de micotoxinas. Em relação ao pH, as aflatoxinas têm crescimento ótimo na faixa de 5 a 7 (Samson et al., 1995).

7 Técnicas de extração

7.1 Extração por fluido supercrítico

Fluidos supercríticos (FSC) apresentam meios bastante atrativos para o processamento de produtos de ocorrência natural devido a várias características distintas, tais como, facilidade de recuperação do soluto e reciclagem do solvente, com a simples manipulação de temperatura e/ou pressão; a possibilidade de direcionar a separação pela escolha a priori das condições termodinâmicas de temperatura e/ou pressão e, com isso, a sintonia do poder de

solvência do fluido usado na extração para uma determinada extração e/ou separação e o controle da seletividade do processo pela escolha apropriada do solvente e da combinação solvente/co-solvente utilizados (Mohamed, 1997).

Atualmente o CO₂ supercrítico é um dos métodos de opção para extração industrial de óleos essenciais, pois permite recuperar os aromas de vários tipos, não somente de óleo essencial, de modo mais eficiente. Esse método também tem sido empregado nas extrações de plantas medicinais, devido à instabilidade térmica dos princípios ativos e também ao elevado grau de pureza com que esses são obtidos. Para a referida extração, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão a 31°C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é analoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como à de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação. Uma desvantagem do uso de CO₂ supercrítico é a sua baixa polaridade, fazendo a extração de compostos polares mais difíceis. Contudo, com o uso de co-solventes adequados, pode-se elevar a seletividade e solubilidade do CO₂ supercrítico em solutos polares, como por exemplo, a adição de etanol, metanol ou água em baixas temperaturas (Fajardo, 1997; Kopcak, 2003; LI & Hartland, 2002).

7.2 Arraste por vapor d' água

Segundo Martins (1994), o processo mais utilizado para realizar as extrações é o arraste com vapor d'água, que além de apresentar bom rendimento, apresenta a facilidade de execução e baixo custo.

Para a obtenção de óleos essenciais, há três tipos de extrações distintas de arraste por vapor d' água, amplamente utilizadas pelas indústrias dessa essência. A distinção entre os tipos é feita pela forma na qual se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor. O primeiro é

chamado de hidrodestilação, em que a amostra fica imersa na água contida numa caldeira. No segundo, chamado de destilação pela água e vapor, a amostra permanece contida em um recipiente logo acima da água da caldeira, ficando, assim, separada da água. No terceiro, chamado propriamente de destilação pelo vapor de água, a amostra é mantida em um recipiente separado e o vapor de água que flui provém de um gerador próprio independente (Chaar, 2000).

7.3 Extração por solventes orgânicos

7.3.1 A frio

É uma técnica de baixo custo e consiste em pôr a amostra em contato com a quantidade de solvente preestabelecida, à temperatura ambiente, em recipiente fechado, durante 2 a 14 dias. É um processo seletivo que resulta num equilíbrio de concentração entre a amostra e o solvente, e é influenciado por fatores que dependem da amostra (sua natureza, tamanho de partícula, grau de umidade e quantidade em peso) e do solvente (sua seletividade e quantidade em volume). A velocidade com que se obtém o equilíbrio é função do tamanho da partícula e do grau de inchamento das células, bem como da viscosidade e da polaridade do solvente. Esse método tem sido escolhido quando os princípios ativos podem sofrer alteração pelo calor ou pelo ar e são solúveis à temperatura ambiente, em um solvente que não deve ser tão volátil. Entre as desvantagens do processo, estão a lentidão, a impossibilidade de extrair totalmente os princípios ativos da amostra e a possibilidade de contaminações, quando se empregam solventes com grande quantidade de água. Esse processo é bastante utilizado para a extração em pequena escala, tanto por químicos quanto por farmacêuticos (Farmacopéia Brasileira, 1996).

7.3.2 Sob refluxo

É considerado um método contínuo (lixiviação) e de baixo custo. É um método muito utilizado na extração de compostos orgânicos. Apresenta restrições ligadas ao elevado tempo de extração, que pode variar de 1 a 72 horas (Chaar, 2000). Nesse processo, o solvente extrai o material orgânico retido na amostra, na sua temperatura de ebulição. Dependendo da temperatura, podem ocorrer transformações químicas nos componentes extraídos. Na maioria dos casos, o processo de extração não é seletivo e, basicamente, a temperatura de extração e a natureza do solvente determinam o poder de dissolução (Synder et al., 1979; Vale, 1997).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKOLE, S. A. Effect of essential oils from two Nigerian medicinal plants (***Azadirachta indica*** and ***Morinda lucida***) on growth and aflatoxin B1 production in maize by a toxigenic ***Aspergillus flavus***. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 190-192, Mar. 1997.
- BATISTA, L. R. **Identificação, potencial toxigênico e produção de micotoxinas de fungos associados a grãos de café (*Coffea arábica* L.)**. 2000. 188p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 12, de 27 de maio de 2004**. Estabelecer que a exportação de castanha-do-brasil com casca, NCM 08012100, e descascada, NCM 0801. 22. 00, fica sujeita à certificação sanitária específica referente ao controle de contaminantes. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?>>. Acesso em: 15 nov. 2004.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 405-420, set./out. 1994.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e ricos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, jun. 2002.
- CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6 ed. Belém: CNPq; Museu Paraense Emílio Göeldi, 1996. p. 82-84. (Coleção Adolpho Ducke).
- CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. 2000. 124p. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- CHRISTENSEN, C. M.; KAUFMANN, H. H. **Grain storage** – The role of fungi in quality loss. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1969. 153 p.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil e das espécies exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. 707 p.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ, C.; AUER, C. G.; JÚNIOR, G. . Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 77-82, dez. 2003.

DESCHAMPS, C. Biossíntese de óleos essenciais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 3, 2005, Campinas. **Palestras...** Disponível em: <<http://iac.sp.gov.Br/sboe2005/palestra.htm>>. Acesso em: 26 fev. 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA.
Caracterização e classificação dos solos do campo experimental da Embrapa Acre, Rio Branco, Estado do Acre. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 40 p. (Embrapa Amazônia Oriental). Documentos, 122.

FAJARDO, G. Comparative study of the oil na supercritical CO₂ extract of Mexican pimento (Pimenta dioica Merrill). **Journal Essential Oil Research**, Lawrence, v. 9, n. 2, p. 181-185, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Parte I – Métodos Gerais. 4 ed. São Paulo: Atheneu Editora, São Paulo, 1996. 300p.

FRANK, H. K.; BETANCOURT, L. A castanha-do-Pará: I - Origem, produção e características físicas e químicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 351-365, 1981.

FREIRE, F. das C. O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERNSON, R. M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, White pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 149, n. 1, p. 13-19, Jan. 2000.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Potential utilization of Brazilian wood extractives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 28, n. 2, p. 96-215, Out. 1980.

HARBORNE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1993. 318 p.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, Oxford, v. 19, n. 8/10, p. 603-608, Jan./Dec. 2000.

KEIFER, H. Exploração de plantas aromáticas e óleos essenciais. In: SIMPÓSIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 1., 1985, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 15-20.

KOHLI, R. K.; BATISH, D.; SINGH, H. P. Allelopathy and its implications in agroecosystems. **Journal of Crop Production**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 169-202, 1998.

KOPCAK, U. **Extração de cafeína das sementes da planta do guaraná (Paullinia cupona) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes.** 2003. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas.

KRETTLI, A. U. Disponível em:
<<http://canalciencia.ibict.br/pesquisas/pesquisa.php?ref.pesquisa=205>>. Acesso em: fev. 2007.

LEE, B. H.; CHOI, W. S.; LEE, S. E.; PARK, B. S. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, **Sitophilus oryzae** (L.). **Crop Protection**, Washington, v. 20, n. 4, p. 317-320, May 2001.

LI, S.; HARTLAND, S. Supercritical fluid extraction of alkylamides from *Echinacea angustifolia*. **Journal of Supercritical Fluids**, Ottawa, v. 50, n. 14, p. 3947-3953, 2002.

MAIA, J. G. S.; GREEN, C. L.; MILCHARD, M. J. New sources of natural safrole. **Perfumer & flavorist**, London, v. 18, n. 102, p. 1-15, March, 1993.

MAIA, J. G. S.; MILCHARD, M. J. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 200-204, maio/jun. 1987.

MAKAPUGAY, H. C.; DOJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; BORDAS, E. Piperovatina, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutencens*. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 7, n. 2, p. 235-238, 1983.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1994. 220 p.

McFERRIN, M. A.; RODRÍGUEZ, E. Piscidal properties of piperovatina from **Piper piscatorum** (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Ithaca, v. 60, n. 2, p. 183-187, Mar. 1998.

MING, L. C. **Levantamento de plantas medicinais na reserva extrativista Chico Mendes – Acre**. 1995. 192p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Julho de Mesquita Filho, Botucatu, SP.

MING, L. C.; FERREIRA, L. A. **Plantas medicinais utilizadas pelos seringueiros na reserva extrativista “Chico Mendes”, Acre (Notas preliminares)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992. 12 p. Mimeografado.

MOHAMED, R. S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluidos supercríticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 344-345, dez. 1997.

MOREAU, C. **Moulds, toxins and food**. London: John Willey & Sons, 1979. 477 p.

MÜLLER, C. H.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U. de; STEIN, R. L. B.; SILVA, A. de B. **A cultura da castanha-do-brasil**. Embrapa: Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental; Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 65 p. (Coleção Plantar, 23).

MÜLLER-RIEBAU, F.; BERGER, B.; YEGEN, O. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural of the Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2262-2266, 1995.

PEREIRA, S. Pesquisas com castanha-do-brasil terão apoio do Ministério de Agricultura. p. 20, 28 nov. 2004. Disponível em: <<http://www2.uol.com.br/pagina20/28072004/especial.htm>>. Acesso em: 21 set. 2004.

PLETSCH, M.; SANT’ANA, A. E. G. Secondary compound accumulation in plants – The application of plant biotechnology to plant improvement. **Chemistry of the Amazon ACS Symposium Series**, Washington, v. 588, p. 51-64, 1995.

PUTMAN, R. N. **Chemical & Engineer News**, Oxford, v. 61, p. 34-37, 1983.

RANGEL, J. A. R. Guia descriptiva de los barbasco de Venezuela. **Revista de la Facultad de Farmácia**, Caracas, v. 43, n. 1, p. 34-43, 2002.

RAO, M. V.; KRISHNAMURTHY, M. N.; NAGARAJA, K. V.; KAPUR, O. P. Inhibition of growtd and aflatoxin B1 production of (**Aspergillus parasiticus**) by spice oils. **Journal of Food Science and Tecnology**, Mysore, v. 20, n. 1, p. 131-132, 1983.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introdution to food-borne fungi**. 4. ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 1995. p. 322.

SHAPIRO, J. P. Phytochemicals at the plant-insect interface. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 17, n. 4, p. 191-200, 1991.

SILVA JUNIOR, A. A.; VIZZOTO, V. I.; GIORGI, E.; MACEDO, S. G.; MARQUES, L. F. **Plantas medicinais**: caracterização e cultivo. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 71 p. (Boletim Técnico, n. 68).

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004. 1102 p.

SOUZA, J. M. L. de. (Coord.). **Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília, DF: CampoPAS, 2004. 60 p. (Série: Qualidade e segurança dos alimentos).

SYNDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern luquid chromatography**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. p. 246.

VALE, M. G. R. **Extração de Hidrocarbonetos em Carvão Mineral Usando SFE, US e Soxhlet**. 1997. 152 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WINK, M. Physiology of secundar product formation in plants. In: CHARWOOD, B.; RHODES, M. J. C. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon Press, 1990. p. 23-42.

CAPITULO II

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE RENDIMENTOS DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE RAÍZES DE *Piper piscatorum* (TREL. YUNC.) OBTIDOS POR DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.

RESUMO

Pimentel, Flávio Araújo **Caracterização Química e Avaliação de Rendimentos do Óleo Essencial e Extratos de Raízes de *Piper Piscatorium* (Trel. Yunc.) Obtidos por Diferentes Métodos de Extração.** 2007. P. 178. Tese (Doutorado Em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal De Lavras, Lavras, MG*

Neste trabalho, foi avaliada a eficiência de extração de raízes frescas e secas de *Piper piscatorium*, empregando as técnicas de hidrodestilação, bem como as de refluxo e a frio com solventes de crescente polaridades. Os óleos foram caracterizados quimicamente, por IV, CG-EM e CG-DIC. Os principais componentes do óleo essencial foram o selin-11-en-4- α -ol e benzoato de benzila, e do extrato o selin-11-en-4- α -ol, seguido de tetradecanol, piperovatina e hidrocarbonetos. Os maiores rendimentos dos extratos ocorreram com solventes polares sob refluxo. Os teores de amidas foram mais elevados em extratos de raiz fresca, utilizando acetato de etila sob refluxo. A secagem da matéria-prima reduziu os rendimentos de óleo essencial e dos extratos, modificando as suas composições químicas.

Palavras chaves: *Piper piscatorium*; técnicas de extração; anestésico natural.

* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora); Fabiana Queiroz - UFLA; Luiz Roberto Batista – UFLA (Co-orientadores)

ABSTRACT

Pimentel, Flávio Araújo. **Chemical Characterization And Evaluation Of The Yields Of The Essential Oil And Extracts Of The Roots Of *Piper Piscatorium* (Trel. Yunc.) Obtained By Different Extraction Methods.** 2007. p. 178. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The efficiency of the extraction of fresh and dried roots of *Piper piscatorium* was evaluated employing steam distillation, as well as cold extraction and refluxing with solvents of increasing polarity. The oils were characterized by IR, GC-MS and GC-FID. The principal components of the essential oil were selin-11-en-4- α -ol and benzyl benzoate. The principal component of the extract was selin-11-en-4- α -ol, followed by tetradecanol, piperovatine e hydrocarbons. The highest yields of extract were obtained with refluxing polar solvents. The amide contents were highest in extracts of fresh roots obtained with refluxing ethyl acetate. Drying of the raw material reduced the yields of the essential oil and those of the extracts with changes in their chemical compositions.

Keywords: *Piper piscatorium*; extraction techniques, natural anesthetic

* Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Major Professor); Fabiana Queiroz – UFLA and Luiz Roberto Batista – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm-se constatado elevados aumentos nos países em desenvolvimento e desenvolvidos, para o consumo de produtos à base de fontes naturais. Entre essas, destaca-se o uso de plantas medicinais. Além de comercializadas em farmácias e lojas de produtos naturais, as plantas medicinais têm sido utilizadas como fontes para o desenvolvimento de grande parte dos medicamentos disponíveis no mercado mundial. Entretanto, no Brasil, essas plantas têm sido consumidas na sua maioria sem nenhum conhecimento fitoquímico e com pouco ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (Maciel, 2002; Veiga & Pinto, 2005; SBQ, 2007). Na Amazônia, onde se encontra a maior biodiversidade do planeta, a falta dessas informações também tem dificultado as pesquisas fitogenéticas e fitotécnica, além de não proporcionar retorno econômico para a população local (Ming, 1995).

Estudos etnobotânicos que abordem plantas medicinais da Amazônia, e mais especificamente no Estado do Acre, permitiram levantar centenas de espécies utilizadas pelas comunidades de colonos, seringueiros e indígenas com nenhum conhecimento das suas composições químicas ou da manipulação adequada da matéria-prima. Entre as plantas manipuladas, destaca-se o joão-brandim (*Piper piscatorum*) pertencente à família Piperaceae, predominante na região. As raízes dessa espécie vêm sendo utilizadas principalmente como anestésico nas formas de emplastro, infusão ou pelo uso direto, no combate a dores em geral, com destaque para os problemas odontológicos (Ming, 1995)

Apesar dessa propriedade medicinal ser popularmente conhecida na região, e trabalhos publicados sobre *Piper piscatorum* nativo da Amazônia Venezuelana (McFerren & Rodriguez, 1998) e de outras espécies da família

Piperaceae (*Piper darienesis*, *Ottonia corcovadensis*, *Ottonia martiana*, *Ottonia frutescens*, e *Piper auritum*) associarem o efeito anestésico com a presença das amidas (pipercallosina, piperovatina, pipercallosidina e cefaradiona) (Gupta, 2004; Facundo et al., 2004; Cunico et al. 2003; Makapugay et al. 1983 e Lans, 2001), estudos fitoquímicos que envolvem a caracterização química, processos extrativos e tratamentos da matéria-prima com a espécie *Piper piscatorum* nativa do Estado Acre são imprescindíveis para as futuras pesquisas farmacológicas e genéticas.

No entanto, avaliações de métodos extrativos que levam em consideração a eficiência e seletividade são fatores importantes para extração de produtos naturais, pois a composição química das plantas é extremamente complexa e freqüentemente ocorre a extração concomitante de vários tipos de substâncias, farmacologicamente ativas ou não, desejadas ou não. Da mesma forma, devem ser avaliadas em que condições a matéria-prima deve ser consumida ou processada, já que muitas das plantas medicinais são sensíveis ao processo de secagem, podendo ocorrer variações nas concentrações de seus princípios ativos Melo et al., 2004; Simões et al., 2004).

Assim, como presente trabalho, objetivou-se efetuar a caracterização química e avaliar a eficiência de extração de raízes frescas e secas de *Piper piscatorum*, empregando as técnicas de hidrodestilação e de refluxo e a frio com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol. Nos processos extrativos, foram avaliados o rendimento do extrato (base seca) e a sua composição química. A utilização dos referidos solventes com crescentes polaridades teve como propósito avaliar a seletividade para as amidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

O material genético foi coletado de população nativa de *Piper piscatorum* (Trel. Yunc.), situada na Reserva Florestal da Embrapa Acre, localizada no município de Rio Branco, AC. A colheita foi realizada no mês de janeiro/2005, entre 8-10 horas da manhã, erradicando as plantas do solo. A temperatura local encontrava-se em torno de 25°C. Após essa etapa, as plantas foram submetidas às operações de separação e seleção das raízes, descartando-se os materiais atacados por praga ou doenças. Em seguida, o material vegetal foi acondicionado em sacos plásticos e colocados em caixas de isopor, sob refrigeração (gelo), sendo transportado via aérea para o Laboratório de Química Orgânica, da Universidade Federal de Lavras, MG. O material foi armazenado em geladeira a 2°C, até a utilização nos experimentos. Para a confirmação da autenticidade da espécie coletada, uma exsicata de número 10.473 foi submetida à identificação, cujo exemplar encontra-se arquivado no Herbário da Universidade Federal do Acre (UFAC).

Condições Edafoclimáticas

O tipo de clima dominante nessa área é AW, caracterizado pela ocorrência de temperatura média do mês mais frio superior a 18°C e uma estação seca de pequena duração (EMBRAPA, 2001).

O regime térmico é caracterizado por temperatura média anual em torno de 24,3°C. Os meses mais quentes são setembro, novembro e dezembro, com temperaturas médias em torno de 25°C. O período mais frio está compreendido pelos meses de junho e julho, com temperaturas médias de 22,9°C e 22°C,

respectivamente. É freqüente uma queda brusca de temperatura, pela ocorrência de ondas de frio, que pode atingir até 4°C, com duração de 3 a 8 dias (EMBRAPA, 2001).

O regime pluviométrico da região caracteriza-se por um período chuvoso de 7 meses, de outubro a abril, sendo os meses de dezembro a março os mais chuvosos. A precipitação média anual na região situa-se em torno de 1.950 mm, correspondendo o período chuvoso ao período mais quente do ano. O trimestre mais chuvoso, janeiro, fevereiro e março, é responsável por cerca de 40% da precipitação total anual. O período seco prolonga-se por 5 meses, de maio a setembro, com uma precipitação média que varia de 11 mm a 83 mm ao mês (EMBRAPA, 2001).

O solo foi classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico. A classe de textura é de média/argilosa (EMBRAPA, 2001).

Secagem

As raízes frescas de *Piper piscatorum* foram submetidas à desidratação em secador de bandejas com circulação de ar, à temperaturas de 30°C e 40°C, por um período de 6 dias (Barbosa & Barbosa, 2006).

Umidade

Para a determinação da umidade, utilizaram-se separadamente 5 gramas de raízes frescas e secas picadas, emergidas em 50 mL de ciclohexano (C₆H₁₂), colocadas em balão volumétrico com capacidade para 250 mL, acoplado a um condensador, com coletor volumetricamente graduado. O aquecimento foi realizado por meio de manta aquecedora, controlando-se a temperatura para 100±5°C. Após o processo de destilação, realizado em 3 horas, quantificou-se o volume de água presente nas raízes. A umidade foi calculada levando-se o teor de água contido em 100 gramas da amostra (AAOCS, 1994; Pimentel et al., 2006).

Extrações

Óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação, utilizando um aparelho Clevenger modificado, acoplado a um balão de 1 L. Nesse balão, foram colocadas separadamente 50 gramas de matérias-primas frescas e secas (30°C e 40°C) picadas, juntamente com 500 mL de água destilada. O tempo de extração, determinado por meio de testes preliminares, foi de 4 horas, contado a partir do momento de ebulição. O óleo essencial foi separado da fase aquosa utilizando-se diclorometano (3 x 30 mL). Reuniram-se as frações orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e removeu o solvente sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 35°C. A massa do óleo obtido foi determinada por pesagem em balança analítica com precisão de 0,1 miligrama. O óleo obtido foi transferido para frascos de vidro com tampa rosqueável (septo de silicone) e armazenado em geladeira a 2°C, até o momento das análises (Barbosa & Barbosa, 2006; Craveirao et al., 1981).

Extratos

As extrações foram realizadas por meio das técnicas de refluxo e a frio, utilizando-se 30 gramas de matérias-primas frescas e secas (30°C), emergidas, separadamente, em 250 mL de hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol. Para o refluxo, as amostras foram colocadas em balão volumétrico com capacidade para 500 mL, acoplado a um condensador, e aquecido por meio de manta aquecedora, controlando-se a temperatura para o ponto de ebulição do solvente. Deixou-se por 24 horas, filtrou-se e concentrou-se sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 55°C. A massa do extrato foi transferida para frascos de vidro e submetida à secagem em estufa a 40°C até a completa evaporação do solvente. Em seguida, determinou-se a massa do extrato por pesagem em balança analítica com precisão de 0,1 mg. Essa foi transferida para

vidros com tampa rosqueável e armazenada em geladeira a 2°C. Para a extração a frio, as amostras foram acondicionadas com os respectivos solventes, em vidros âmbar com tampa rosqueável. Esse processo extrativo foi realizado à temperatura ambiente, por um período de oito dias, seguindo os demais procedimentos metodológicos, descritos para a extração sob refluxo (Matos, 1988).

Análises qualitativa e quantitativa

Análises no infravermelho(IV)

Os extratos de *Piper piscatorum* proveniente de cada tratamento foram submetidos à análise por espectrofotometria no infravermelho, utilizando um espectrofotômetro Digilab Excalibur, série FTS 3000, equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR), com cristal de seleneto de zinco de reflexão única a 45°. Os espectros foram registrados na região de 4000 e 600 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹.

Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa (CG-EM) e gasosa (CG-DIC).

As análises qualitativas dos óleos essenciais e extratos das raízes frescas e secas de *Piper piscatorum* foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, MG, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM), utilizando-se um equipamento da marca Shimadzu, modelo GCEM-QP 5050A. Para a identificação dos constituintes químicos, foi empregada uma coluna DB-5, da marca J & W Scientific, com 30 m de comprimento, d.i. de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm, e hélio como gás carreador. As condições de operação do cromatógrafo a gás foram: pressões interna da coluna de 100 kPa (óleo essencial) e 121,2 kPa (extrato), fluxo de gás na coluna de 1,8 mL min⁻¹, temperatura no injetor de

220°C, temperaturas no detector ou na interface (GC-EM) de 240°C (óleo essencial) e 300°C (óleos resina). As temperaturas iniciais da coluna foram de 40°C (óleo essencial) e 80°C (extrato) por 2 min, seguido de um incremento de 3°C min⁻¹, até atingirem 240°C (óleo essencial) e 300°C (extrato), sendo mantidas constante por 25 min. A razão de split foi de 1:10. O espectrômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 600 Da, em intervalos de 0,5 s, com energia de ionização de 70 eV. Foi injetado 1 µL da amostra, nas concentrações de 0,5% (extrato) e 1% (óleo essencial), dissolvida em diclorometano, exceto, para os extratos extraídos com etanol e metanol, que foram inicialmente submetidos à siliilação. A derivatização consistiu de 2 mg do extrato acondicionado em vidro cônico, acrescido de 60 µL de piridina e 100 µL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 4% de trimetilclorosilano (TMCS). A reação ocorreu sob agitação (agitador mecânico) seguida de aquecimento em banho de glicerina a 70°C por 30 min. Da solução obtida, apenas 1 µL foi injetada em duplicata no CG-EM (Sjöström & Alén, 1998). A identificação dos componentes foi feita pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroteca Willey, 7ª edição, com dados da literatura e também pelos índices de Kovats (Adams, 1995). Para o dos índices de Kovats, foi injetada no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 a C26) (Thomazini & Franco, 2000).

A quantificação dos componentes foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, MG, utilizando-se um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (GC-DIC) de marca Shimadzu, modelo GC-17A. As análises foram realizadas nas mesmas condições descritas para a identificação dos constituintes. As análises de óleos essenciais foram conduzidas em triplicata e as de extratos, em duplicata.

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos com extrato e óleo essencial foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, respectivamente, com 3 e 5 repetições. Para os extratos, os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial de 5 x 2 x 2, constituído dos fatores: solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol), matérias-primas (folhas frescas e secas) e técnicas de extração (a frio e em refluxo). Para o óleo essencial, utilizaram-se como tratamentos as matérias-primas fresca e secas a 30°C e 40°C. Em ambos os experimentos, as variáveis analisadas foram rendimentos de extrato e de óleo essencial (gramas/100 gramas da matéria-prima em base seca). Os dados obtidos foram submetidos às análises de variâncias e aos testes de comparações múltiplas de médias (Tukey), utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000). Nas análises da composição química, foram determinados para cada constituinte a média e o desvio-padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As raízes frescas de *Piper piscatorum* apresentaram teor de umidade de $40\pm 1\%$. Após seis dias de secagem a 30°C e 40°C , sua umidade foi reduzida para $2\pm 0,5\%$.

São mostrados na Tabela 1 os rendimentos de óleos essenciais obtidos de raízes frescas e submetidos a diferentes temperaturas de secagem. Pelos dados, verificou-se a inviabilidade da secagem da matéria-prima para produção desse óleo essencial com perda de rendimento de $0,25\%$ para $0,02\%$ a partir de 30°C . Não foram disponibilizados na literatura dados referentes à influência do processo de secagem para a espécie *Piper piscatorum*. No entanto, em várias pesquisas publicadas relatam-se os efeitos da secagem na perda de óleos essenciais. Entre os fatores descritos como causadores da redução estão a temperatura ($\geq 40^{\circ}\text{C}$) e o tempo de secagem (acima de 48 horas) e características da estrutura celular em que possa estar armazenado o óleo essencial. Entre as espécies pesquisadas, tem sido encontradas reduções com a desidratação de *Lippia alba* (17%), *Piper hispidinervum* (25%), *Cymbopogon citratus* (44%), *Chamaemelum nobile* (53 %) e *Aiillanthus altíssima* (76%) (Barbosa & Barbosa; 2006; Braga, 2004; Costa et al., 2005; Lewinsohn et al., 1998; Mastelic & Jerkoic, 2002. Omidbaigiet al., 2004; Radüns, 2004).

Nas Tabelas 2a e 2b, são apresentados os resultados de rendimentos dos extratos das raízes frescas e secas de *Piper piscatorum* em que se utilizam as técnicas de extração a frio e em refluxo, com o empregando de solventes de crescente polaridade.

Na Tabela 2a, verifica-se, pelos dados, que a técnica de extração de raízes frescas sob refluxo foi significativamente mais eficiente que a realizada a frio, em todos solventes utilizados. Com raiz seca a 30°C , essa eficiência

significativa ocorreu apenas para as refluxadas com acetato de etila (2,52%) e etanol (6,20%). Com relação ao tipo de solvente, observa-se que o aumento da polaridade elevou progressivamente o rendimento de extrato, tanto em relação à matéria-prima quanto à técnica utilizada, exceto nas extrações com clorofórmio e acetato de etila de raízes secas a frio e de ambas as matérias-primas em refluxo, em que os seus rendimentos não se diferenciaram significativamente.

O aumento do rendimento com a utilização da técnica de refluxo tem sido relatado por Snyder & Kikland (1979), os quais relacionaram o aumento do poder de dissolução do solvente promovido pelo aumento da temperatura de extração. Os menores rendimentos encontrados na extração a frio podem ter sido ocasionados pela baixa velocidade de equilíbrio entre as substâncias e o solvente (Farmacopéia..., 1996). A elevação do rendimento em função do gradiente de polaridade do solvente encontrado com as raízes de *Piper piscatorum* pode ser atribuída, segundo Miranda & Cuellar (2001), à maior seletividade desses para os constituintes predominantes da amostra.

Resultados semelhantes que mostram a superioridade da técnica de refluxo em relação à técnica a frio, foram relatados com a obtenção dos extratos de flores *Hibiscus tiliaceus* (refluxo: hexano: 10,26%; acetato de etila: 17,54% e metanol: 5,67%; a frio: hexano: 3,67%, acetato de etila; 1,20% e metanol: 3,67%) (Melecchi, 2005).

Pelos dados da Tabela 2b, observou-se que a secagem da matéria-prima reduziu o rendimento do extrato para a maioria dos solventes e técnicas de extração utilizadas. As reduções significativas de rendimento de extrato ocorreram nas extrações “a frio” com todos os solventes, sendo 2,22% para 1,77% em acetato de etila; 5,33% para 3,85% em etanol e 8,00% para 7,28% em metanol. Na “técnica de refluxo”, observaram-se reduções de 8,00% para 6,20% em etanol e de 9,15% para 7,43% em metanol. Constatou-se que ocorreram reduções de rendimentos não expressivos para os demais solventes em refluxo.

Os únicos aumentos de rendimentos ocorreram nas extrações “a frio” em hexano (0,53% para 0,83%) e, de forma significativa, para o clorofórmio (1,42% para 2,23%). Entre os tratamentos avaliados, verificou-se que o maior rendimento de extrato foi obtido de folhas frescas extraídas com metanol (9,15%), seguido de etanol (8,00%) com a utilização da “técnica de refluxo”. De acordo com Simões et al.¹¹, essas reduções podem estar relacionadas com a perda de compostos voláteis, mostrada anteriormente, e com o aumento da compactação da estrutura histológica da raiz, ocorrida durante a secagem, dificultando a penetração do solvente.

Pesquisadores trabalhando com espécie *Piper piscatorum*, mostraram que na extração de raízes secas a frio com metanol, houve um rendimento de extrato em torno de 3,75% (Mcferren & Rodriguez, 1998). Esse valor é inferior ao encontrado neste trabalho para a referida técnica utilizada (7,28%).

Os componentes identificados dos óleos essenciais obtidos de raízes frescas e submetidas a diferentes temperaturas de secagem (Tabela 1), incluindo as porcentagens e os índices de Kovats, encontram-se descritos na Tabela 3. No óleo essencial de raízes frescas, foram identificados treze componentes, entre monoterpenos, sesquiterpenos e ésteres, representando 87,65% da constituição volátil. Os principais constituintes detectados foram selin-11-en-4- α -ol (57,63%) e benzoato de benzila (15,40%). Os tratamentos de secagem (30°C e 40°C) contribuíram para variações quantitativas da composição química, com pequenas oscilações nos teores dos componentes majoritários selin-11-en-4- α -ol (raiz fresca = 57,63%; raiz seca a 30°C = 53,95% e raiz seca a 40°C = 56,20%) e benzoato de benzila (raiz fresca = 15,40%; raiz seca a 30°C = 16,32% e raiz seca a 40°C = 15,04%). Maiores perdas foram detectadas nos constituintes minoritários, mais apolares com a secagem da matéria-prima a 40°C (timol e *trans*-cariofileno). Apesar de não terem sido encontrados na literatura trabalhos com a composição química de óleo essencial de *Piper piscatorum*, a maioria dos

constituintes aqui identificados foi também encontrada, em outras espécies da família Piperaceae (*Ottonia corcovadensis*, *Piper arboreum*, *Piper dilatatum*) (Cysne, 2005; Facundo et al. 2004; Machado et al., 1994).

Em vários trabalhos têm sido relatadas as oscilações da composição química ocorrida com a secagem de *Piper piscatorum*, mediante a desidratação de plantas aromáticas (Barbosa & Barbosa, 2006; Radünz, 2004; Arabhosseini et al, 2006; Martins et al, 2002). Com variações significativas, tem-se reportado o aumento dos teores de citral de *Lipia alba* e *Cymbopogon citratus* (10 a 15 %) e reduções para o α -muroleno (100 %) e linalol (74 %) em *Ailanthus altissima* (Costa et al., 2005; Mastelic & Jerkoic, 2002; Nagao et al., 2005).

As investigações químicas dos extratos produzidos por meio das diferentes técnicas de extração (2a e 2b) iniciaram-se com as análises espectrofotométricas no infravermelho. Nas avaliações preliminares, verificou-se elevada similaridade dos perfis dos extratos obtidos por ambos os tratamentos de extrações avaliados. Os resultados do infravermelho dos extratos extraídos de raízes frescas, com todos os solventes testados em refluxo, estão apresentados nas Figuras 1a, 1b, 1c, 1d e 1e. Em todos os espectros, observaram-se sinais característicos grupo carbonílico (amidas e ésteres), hidrocarbonetos, álcoois, fenóis. A presença de amidas secundárias é confirmada por uma banda larga entre 3315 e 3400 cm^{-1} , característica de vibrações de deformação axial de N-H livre de amidas secundárias, por um sinal forte em 1640 cm^{-1} , correspondente a vibrações de deformação axial de C = O, denominada de banda de amida I, por outro sinal entre 1615 e 1515 cm^{-1} , que pode ser atribuída a vibrações de deformação angular de N-H, denominada de banda de amida II. Outros sinais são observados; em 1463 cm^{-1} , o sinal pode ser atribuído à deformação axial de C-N; em 1250 cm^{-1} , banda resultante da interação entre deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N; em 1255 cm^{-1} , 1046 cm^{-1} e 928 cm^{-1} , a presença do grupo metilenodioxí; em 997 cm^{-1} , infere-se que seja do sistema

dieno com configuração trans-trans conjugado com o grupo carboxila da amida; e 722 cm^{-1} , correspondente à deformação angular simétrica fora do plano de N-H. Em razão da presença de bandas muito intensas em 2954 , 2920 e 2849 cm^{-1} (estiramento de ligação C-H) e de menor intensidade em 1709 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} (estiramento de ligação C = O) infere-se a presença de compostos alifáticos, principalmente de hidrocarbonetos e ésteres. O sinal em 1463 cm^{-1} indica a presença de hidrocarbonetos aromáticos (deformação axial de C=C do anel aromático); em 1155 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , podem estar relacionados com a presença de álcoois e fenóis (vibrações de deformação axial de C-O); e em 1155 cm^{-1} , esse pode ser atribuído à presença de ésteres aromáticos (Pring, 1982; Silverstein & Webster, 2000).

Pelas análises realizadas em CG/EM e CG/DIC, pôde-se identificar e quantificar 34 compostos, entre monoterpenos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos, ésteres, ácidos, álcoois e amidas, conforme listado nas Tabelas 4a, 4b, 5a e 5b. Nos extratos de raiz fresca obtidos em cada solvente a frio, foi possível identificar 21 compostos em (hexano), 28 (clorofórmio), 23 (acetato de etila), 24 (etanol) e 29 (metanol), totalizando, respectivamente, 85,85%; 91,36%, 97,73%, 63,22% e 73,74% da composição do extrato (Tabela 4a). Os componentes majoritários detectados nesses extratos foram selin-11-en-4- α -ol, piperovatina, tetradecanol e heptadecano. Os teores de amidas variaram com o tipo de solvente utilizado na extração a frio de raízes frescas. Analisando-se os dados da composição química de extratos extraídos de raízes secas com solventes a frio apresentados na Tabela 4b, verificou-se que a secagem contribuiu para alterações quantitativas dos constituintes químicos, com ênfase para redução de compostos amidas em todos os solventes utilizados. As reduções ocorreram com piperovatina, com a pipercollosidina e para a pipercollosina.

Na investigação química dos extratos de raízes frescas, obtidos em cada solvente refluxado (Tabela 5a), identificaram-se 23 compostos em (hexano), 30

(clorofórmio), 24 (acetato de etila), 23 (etanol) e 25 (metanol), totalizando, respectivamente, 88,12%; 83,22%; 89,88%; 76,14% e 73,61% da composição química total. Com a utilização da técnica de refluxo, os componentes majoritários extraídos da matéria-prima fresca (Tabela 5a) para os diferentes solventes foram selin-11-en-4- α -ol, piperovatina, e tetradecanol. Com a técnica de refluxo, os teores de amidas também variaram com o tipo de solvente utilizado na extração de raiz. Comparando-se os dados das composições químicas dos extratos apresentados nas Tabelas 5a e 5b (extração em refluxo), verifica-se que, com a secagem da matéria-prima, os resultados de oscilações quantitativas dos constituintes foram semelhantes às encontradas na extração a frio.

Os perfis cromatográficos dos extratos obtidos em refluxo são qualitativamente equivalentes aos dos produzidos na extração a frio (Tabelas 4a, 4b, 5a 5b). No aspecto quantitativo, observaram-se alterações na porcentagem relativa entre os valores dos constituintes dos extratos, elevando-se principalmente os teores da maioria dos compostos majoritários, quando a técnica de refluxo foi utilizada. Essas elevações de teores foram de raiz seca (Tabela 5b) para o selin-11-en-4- α -ol extraído em hexano (40,69%) e tetradecanol em metanol (26,31%). Para a piperovatina, o aumento do teor foi obtido de raiz fresca (Tabela 5a) em acetato de etila (22,46%).

Para as amidas não majoritárias, os maiores teores (Tabela 4a) foram obtidos de raízes frescas extraídas com acetato de etila a frio (pipericallosidina: 4,68% e pipericallosina: 10,37%).

Nas análises da composição parcial do extrato, verifica-se a presença da maioria dos constituintes encontrados no óleo essencial, com ênfase para os compostos majoritários selin-11-en-4- α -ol e benzoato de benzila. As variações das constituições químicas dos extratos, ocorridas tanto com o tipo de solvente como pela influência da secagem, foram proporcionadas pelos mesmos fatores

discutidos nos rendimentos do óleo essencial (perda de voláteis) e extrato (aumento de dissolução e seletividade do solvente bem como pela compactação da estrutura histológica da raiz). As reduções dos teores de amidas constatadas durante o processo de secagem podem ter sido ocasionadas pela à autoxidação alfa à ligação dupla, formando hidroperóxidos, aldeídos, cetonas, etc, conforme reações sugeridas para piperovatina na Figura 6. Os produtos da autoxidação não foram identificados neste trabalho.

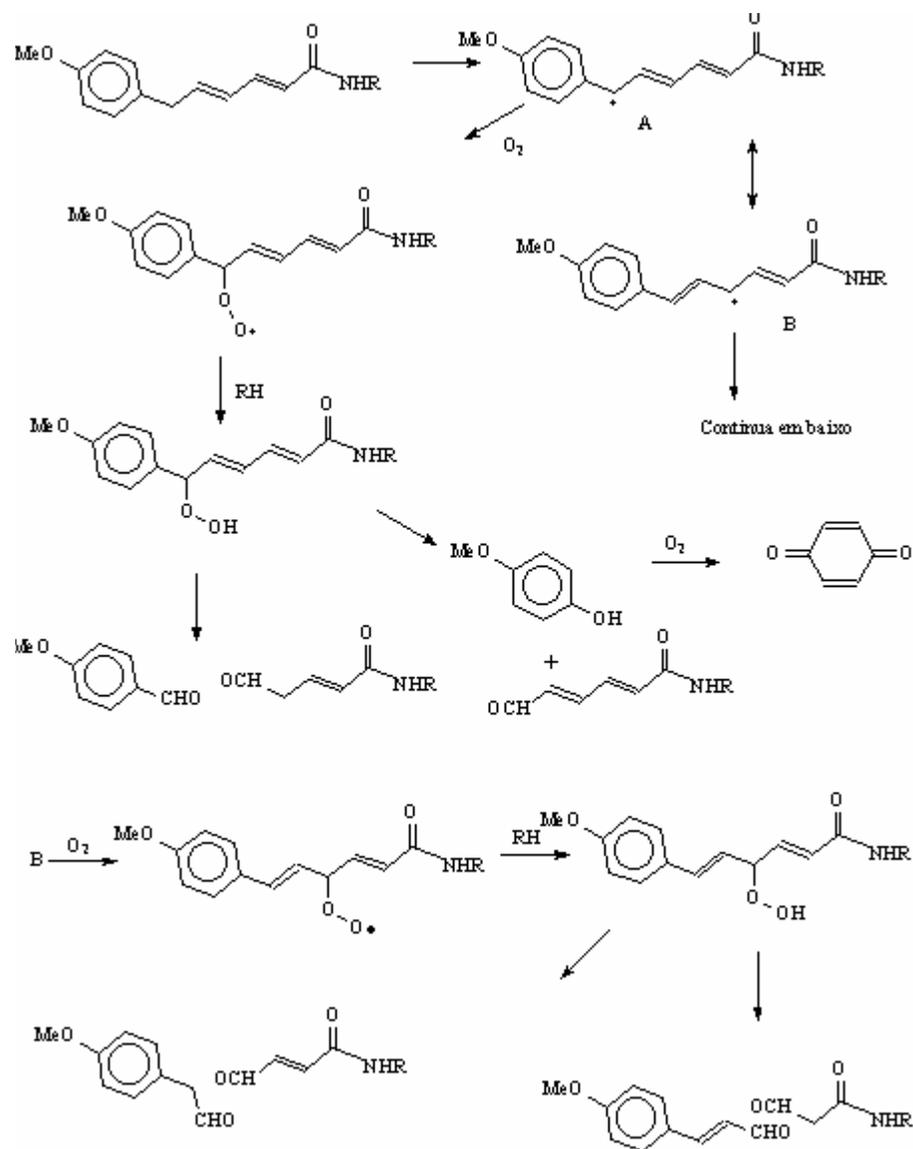
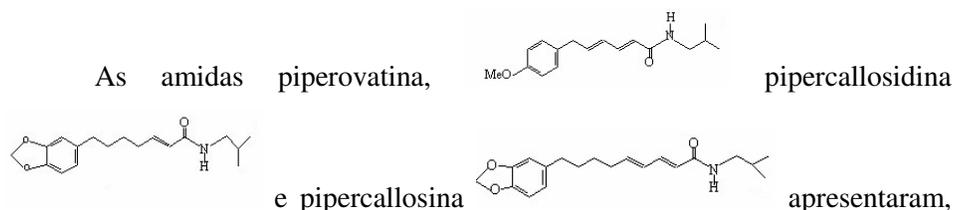


FIGURA 6. Mecanismo de auto oxidação das amidas.

Dados complementares sobre a caracterização química das amidas identificadas e relatadas como princípios ativos anestésicos de *Piper piscatorum* serão mostrados a seguir.



respectivamente, tempo de retenção (Tr) de 54,623; 57,773 e 65,650 min no cromatograma (CG-EM). A piperovatina, pipercollosidina e pipercollosina, de fórmulas moleculares correspondentes a $C_{17}H_{23}NO_2$, $C_{18}H_{25}NO_3$ e $C_{20}H_{27}NO_3$, revelaram íons moleculares em m/z 273 (18%), m/z 303 (15%) e m/z 329 (20%), com picos bases em m/z 173 (100%), m/z 135 (100%) e m/z 135 (100%), respectivamente, no CG-EM. O pico-base da piperovatina resultaria do fragmento (M- 72) decorrente da perda de $^*NH-CH_2-CH(CH_3)_2$ do íon molecular, seguido da perda de CO. Os picos bases da pipercollosidina e da pipercollosina ocorreriam mediante quebra na ligação β em relação ao anel do íon molecular, seguido de rearranjo, formando o íon tropílio (McLafferty & Turecek, 1993). Esses dados espectrais, juntamente com os demais fragmentos mostrados nas Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7, estão de acordo com aqueles descritos na literatura para as referidas amidas (Cunico et al., 2003; Facundo et al., 2004; McFerren & Rodriguez, 1998; Pring, 1982).

A presença de piperovatina e pipercollosidina em *Piper piscatorum* foi relatada por McFerren & Rodríguez (1998) em pesquisas com a referida espécie nativa da Amazônia Venezuelana. A presença de pipercollosina não foi mencionada neste trabalho, porém, tem sido encontrada em extratos obtidos da espécie *Piper callosum*, pertencente à mesma família Piperaceae (Pring, 1982). Em ambas, a caracterização química foi realizada por meio de CG-EM e RMN¹H/¹³C.

4 CONCLUSÕES

Com a caracterização química do óleo essencial de *Piper piscatorum*, verificou-se a presença de treze constituintes, tendo como constituinte majoritário o selin-11-en-4- α -ol, seguido de benzoato de benzila. Nos extratos, foram identificados trinta e quatro constituintes, com o componente selin-11-en-4- α -ol, seguido de tetradecanol, piperovatina e dos hidrocarbonetos pentadecano e heptadecano.

Além da piperovatina, foram identificadas outras amidas com potencial anestésico, como a pipercallosidina e pipercallosina, com maiores concentrações nos extratos de raízes fresca, extraídos com acetato de etila sob refluxo e a frio.

A extração sob refluxo de raízes frescas foi mais eficiente do que a frio. Com raízes secas, esse efeito foi expressivo apenas quando se utilizou acetato de etila e etanol. Para ambas as técnicas, os maiores rendimentos dos extratos foram encontrados em solventes com polaridade mais elevada.

A secagem da matéria-prima reduziu significamente os rendimentos de óleo essencial e dos extratos, modificando as suas composições químicas.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa - Acre, ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio Pesquisa e Extensão de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro e bolsas concedidas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<http://www.sbg.org.br/PN-NET/plantas_medicinais.pdf>. Acesso em: jan. 2007.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.

AOCS Official Method Da2b-42. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 4. ed. Champaign: American Oil Chemists Society, 1994.

ARABHOSSEINI, A.; PADHYE, S.; BEEK, T. A.; BOXTEL, A. J. B.; HUISMAN, W.; POSTHUMUS, M. A.; MÜLLER J. Loss of essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*, L.) due to dryin. **Journal of the Science Food and Agriculture**, Washington, v. 86, n. 15, p. 2543-2550, Dec. 2006.

BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C. A. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, nov./dez. 2006.

BRAGA, N. P.; CREMASCO, M. A.; VALLE, R. C. C. R. Effects of fixed bed drying on the yield and composition of essential oil from long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC.) leaves. INTERNATIONAL DRYING SYMPOSIUM, 14., 2004, São Paulo, Brazil. **Proceedings...** São Paulo, 2004.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de campim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 965-959, dez. 2005.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. DE A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ, C.; AUER, C. G.; JÚNIOR, G. Estudo da atividade antifúngica de *ottonia martiniana*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 77-82, dez. 2003.

CYSNE, J. B.; CANUTO, K. M.; PESSOA, O. D. L.; NUNES, E. P.; SILVEIRA, E. R. Leaf essential oil of four piper species from the State of Ceara – Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1378-1381, Nov./Dec. 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Amazônia Oriental. **Caracterização e classificação dos solos do Campo Experimental da Embrapa Acre, Rio Branco, Estado do Acre, Zoneamento Agroecológico**. Belém, 2001.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Ottona Corcovadensis* Miq. da Floresta Amazônica. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 79-83, jan./fev. 2004.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000.

GUPTA, M. P. Investigaciones farmacognósticas sobre la flora Panaména. **Annales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 70, p. 839-842, 2004.

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 10-26, 2001.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, D. M. Histochemical localization of citral accumulation in cerngrass leaves (*Cymbopogon Citratus* (DC) Stapf; *Poaceae*). **Annals of Botany**, London, v. 81, n. 1, p. 35-39, Jan. 1998.

MACHADO, S. M. F.; MILITÃO, J. S. L. T.; FACUNDO, V. A.; RIBEIRO, A.; MORAIS, S. M.; MACHADO, M. I. L. The leaf oil of two Brazilians species: *Piper arboreum* Aublet var. *latifolium* (C. DC.) yunker and *Piper hispidum* Sw. **Journal Essential Oil Research**, v. 6, p. 643-644, 1994.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VIEGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 429, 2002.

MAKAPUGAY, H. C.; DOJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; BORDAS, E. Piperovatina the tongue-numbing principle of *Ottonia Frutencens*. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 7, n. 2, p. 235-238, 1983.

MARTINS, P. M.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; SANTOS, R. H. S.; MACHADO, M. C. Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 569, n. 569, p. 155, 2002.

MASTELIC, J.; JERKOIC, I. Volatile constituent from the leaves of young and old *Ailanthus altissima* (Mill.) swingle tree. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 75, n. 1, p. 189-197, Feb. 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 1988.

MCFERREN, M. A.; RODRÍGUEZ, E. Piscidal properties of piperovatina from ***Piper piscatorum*** (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Ithaca, v. 60, n. 2, p. 183, 1998.

MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. **Interpretation of mass spectra**. 4. ed. California: University Science Books, 1993

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização Química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 192 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

MELO, E. C.; RADÜNZ, L. L.; MELO, R. C. A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais - revisão. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 12, n. 4, p. 307-315, out./dez. 2004.

MING, L. C. **Levantamento de plantas medicinais na reserva extrativista Chico Mendes – Acre**. 1995. 192 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Julho de Mesquita Filho, Botucatu, SP.

MIRANDA, M.; CULLAR, A. **Farmacognosia y productos naturales**. La Habana: Félix Varela, 2001.

NAGAO, E. O.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; MARCO, C. A. Influência do período de secagem nas estações seca e chuvosa no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. nas condições do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 1, p. 53-59, jan./abr. 2005.

OMIDBAIGI, R.; SELFDKON, F.; KAZEMI, F. Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman Chamomile. **Flavour and Frangance Journal**, Sussex, v. 19, n. 3, p. 196-198, May/June 2004.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, maio/abr. 2006.

PRING, B. G. Isolation and Identification of Amides from Piper-Callosum Synthesis of piper-callosine and piper-callosidine. **Journal of Chemical Society – Perkin Transactions**, Cambridge, v. 1, n. 7, p. 1493-1498, 1982.

RADÜNZ, L. L. Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds). 2004. 100 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SILVERSTEIN, R. M.; WESBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004.

SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking**, Berlin: Springer Verlag, 1998.

SYNDER, L. R.; KIKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1979.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 52-59, jan./jun. 2000.

VIEGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 519, 2005.

ANEXO

TABELA 1. Valores médios de rendimento do óleo essencial extraído de raízes de *Piper piscatorum* submetidas a diferentes temperaturas do ar de secagem.

Tratamentos	Rendimento
	(% b.s.)
Fresco (testemunha)	0,25 ^a
30 °C	0,02b
40 °C	0,02b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) = 27,43; Média Geral = 0,10

TABELA 2a. Valores médios de rendimento dos extratos (% b.s.) obtidos de raízes de *Piper piscatorum*, em função do tipo de solvente e da matéria-prima, para extrações a frio e em refluxo.

Solventes	Matérias-primas			
	Raiz fresca		Raiz seca	
	À frio	Refluxo	À frio	Refluxo
Hexano	0,53aA	0,99aB	0,83aA	0,90aA
Clorofórmio	1,42bA	2,72bB	2,23bA	2,49bA
Acetato de etila	2,22cA	2,85bB	1,77bA	2,52bB
Etanol	5,33dA	8,00cB	3,85cA	6,20cB
Metanol	8,00fA	9,15dB	7,28dA	7,43dA

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma matéria-prima na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) = 5,65 Média Geral = 3,84.

TABELA 2b. Valores médios dos rendimentos dos extratos (% b.s.) obtidos de raízes de *Piper piscatorum*, em função do tipo de solvente e da matéria-prima, para extrações a frio e em refluxo.

Solventes	Técnicas de extração			
	Á frio	Refluxo		
	Raiz fresca	Raiz seca	Raiz fresca	Raiz seca
Hexano	0,53aA	0,83aA	0,99aA	0,90aA
Clorofórmio	1,42bA	2,23bB	2,72bA	2,49bA
Acetato de etila	2,22cB	1,77bA	2,85bA	2,52bA
Etanol	5,33dB	3,85cA	8,00cB	6,20cA
Metanol	8,00fB	7,28dA	9,15dB	7,43dA

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma técnica de extração na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) = 5,65 Média Geral = 3,84.

TABELA 3. Composição química do óleo essencial de raízes de *Piper piscatorum* submetidas a diferentes temperaturas do ar de secagem (valores expressos em percentual proporcional da área)¹

Componentes do óleo	IK ²	Tratamentos de secagem		
		Raízes frescas	30 °C	40 °C
Timol	1292	1,55±0,21	0,16±0,02	t ³
<i>trans</i> -cariofileno	1414	0,92±0,15	1,06±0,17	t
δ -guaiano	1501	3,04±0,20	2,16±0,25	t
β -bisaboleno	1506	0,39±0,08	0,21±0,05	0,36±0,02
(<i>Z,E</i>)- α -farneseno	1509	1,06±0,09	1,10±0,11	1,08±0,14
γ -cadineno	1516	1,44±0,24	1,77±0,10	1,17±0,15
Espatuleno	1573	1,61±0,07	2,36±0,05	2,58±0,20
<i>epi</i> -1-cubenol	1622	1,09±0,12	1,37±0,12	1,72±0,14
Gonossorol	1639	0,47±0,04	0,09±0,03	0,12±0,02
<i>epi</i> - α -muurolo	1642	0,38±0,03	0,28±0,04	0,67±0,04
<i>epi</i> - α -cadinol	1644	2,67±0,28	3,15±0,09	3,25±0,15
Selin-11-en-4- α -ol	1652	57,63±3,07	53,95±1,56	56,20±0,43
Benzoato de benzila	1760	15,40±0,36	16,32±0,85	15,04±0,24
Total identificado		87,65±3,73	83,98±1,78	82,19±0,13

¹Médias de três repetições seguidas dos desvios-padrão.

²Índices de Kovats calculados.

³t –Quantidades traços (< 0,1 %)

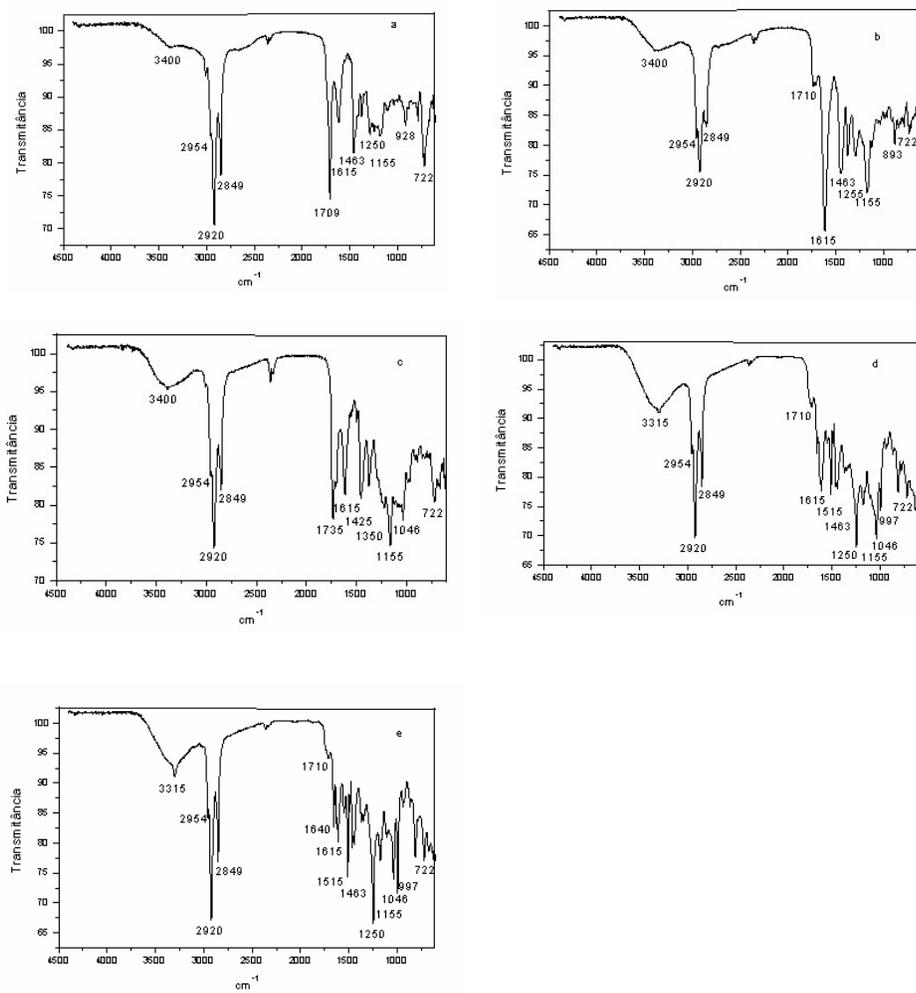


FIGURA 1. Espectros no infravermelho dos extratos obtidos em refluxo com hexano (a), clorofórmio (b), acetato de etila (c), etanol (d) e metanol (e).

TABELA 4a. Composição química (% Área)* dos extratos de raízes frescas de *Piper piscatorum* extraídos a frio, em hexano (HEX), clorofórmio (CL), acetato de etila (ACET), etanol, (ET) e metanol (MET).

Compostos	HEX	CL	ACET	ET**	MET**
<i>α</i> -terpineol	-	-	-	-	0,22±0,07
acetato					
Ciclosativeno	-	0,04±0,01	-	-	0,06±0,01
<i>α</i> -copaeno	-	3,20±0,07	0,87±0,04	1,06±0,35	1,03±0,25
<i>β</i> -elemeno	-	-	0,13±0,01	-	0,04±0,01
Tetradecano	-	0,02±0,01	-	2,53±0,56	4,25±0,25
<i>trans</i> -cariofileno	2,41±0,18	0,78±0,03	1,22±0,02	-	0,07±0,02
Calareno	-	0,25±0,07	0,20±0,09	-	0,04±0,009
<i>trans-α</i> - bergamonteno	1,08±0,02	0,44±0,09	0,11±0,03	-	-
<i>α</i> -humuleno	-	0,49±0,03	0,06±0,01	0,06±0,01	0,03±0,01
<i>trans-β</i> -farneseno	2,40±0,14	0,13±0,04	0,21±0,07	-	-
<i>γ</i> muuroleno	-	8,15±0,14	0,12±0,03	0,37±0,09	0,34±0,04
<i>β</i> -selineno	-	0,68±0,01	0,16±0,01	0,04±0,01	0,31±0,07
<i>cis-β</i> -guaieino	1,70±0,04	2,97±0,08	0,16±0,02	0,99±0,05	0,23±0,08
<i>α</i> -muuroleno	-	1,45±0,08	-	0,42±0,03	0,20±0,06
Pentadecano	1,50±0,02	9,11±0,16	16,45±2,23	0,22±0,05	1,48±0,09
<i>β</i> -bisaboleno	0,11±0,01	1,18±0,04	4,58±0,91	0,43±0,02	0,04±0,01
<i>γ</i> cadineno	0,76±0,05	3,49±0,08	0,45±0,06	0,42±0,09	0,20±0,7
<i>trans-γ</i> bisaboleno	-	0,55±0,04	0,17±0,04	0,14±0,02	0,19±0,04
Espatuleno	0,86±0,07	0,44±0,04	-	-	-

...continua...

TABELA 4a, Cont.

1- <i>epi</i> -cubenol	2,40±0,13	-	-	-	-
<i>epi</i> - α -muurolol	0,22±0,05	0,92±0,02	-	0,24±0,01	0,14±0,01
<i>epi</i> - α -cadinol	2,15±0,16	-	-	-	-
Selin-11-en-4- α -ol	32,12±2,18	20,15±1,06	10,74±1,45	6,40±0,65	6,12±0,57
Tetradecanol	6,15±0,34	4,15±0,35	4,72±0,67	15,13±1,78	19,05±2,16
Heptadecano	13,12±0,23	11,40±0,73	5,76±0,92	10,20±0,99	22,05±3,12
Benzoato de benzila	9,15±0,67	5,10±0,35	-	3,33±0,76	2,12±0,54
Hexadecanoato de metila	1,10±0,07	1,09±0,06	4,13±0,24	0,77±0,06	0,75±0,09
Hexadecanoato de etila	1,48±0,13	0,54±0,09	11,43±1,16	1,06±0,08	0,43±0,04
Ácido octadecanóico	-	-	-	2,00±0,15	1,04±0,21
Octadecadienoato de metila	2,10±0,24	0,34±0,07	0,37±0,34	1,04±0,08	2,09±0,36
Tetracosano	-	-	-	8,31±1,06	7,04±,98
Piperovatina	4,46±0,15	9,57±0,45	20,64±2,01	4,54±0,78	2,51±0,67
Pipercallosidina	0,26±0,02	0,30±0,06	4,68±0,76	1,07±0,08	0,88±0,08
Pipercallosina	0,32±0,05	4,43±0,18	10,37±1,02	2,45±0,07	0,79±0,05
Total identificado	85,85±0,48	91,36±0,45	97,73±0,53	63,22±0,53	73,74±0,56

*Médias obtidas de três repetições; **Composição química do extrato derivatizado.

TABELA 4b. Composição química (% Área)* dos extratos de raízes secas de *Piper piscatorum* extraídos a frio, em hexano (HEX), clorofórmio (CL), acetato de etila (ACET), etanol, (ET) e metanol (MET).

Compostos	HEX	CL	ACET	ET**	MET**
<i>α</i> -terpineol	-	-	-	-	0,16±0,05
acetato					
Ciclosativeno	-	0,03±0,01	-	-	0,07±0,02
<i>α</i> -copaeno	-	2,66±0,45	1,04±0,22	0,15±0,03	0,09±0,02
<i>β</i> -elemeno	-	-	0,18±0,08	-	0,03±0,01
Tetradecano	-	0,16±0,08	-	3,67±0,67	7,32±0,77
<i>trans</i> -cariofileno	2,68±0,34	0,99±0,10	1,55±0,49	-	0,17±0,09
Calareno	-	0,26±0,03	0,15±0,03	-	0,07±0,02
<i>trans-α</i> -bergamonteno	1,50±0,8	0,97±0,12	0,21±0,06	-	-
<i>α</i> -humuleno	-	0,66±0,19	0,15±0,03	0,22±0,06	0,09±0,02
<i>trans-β</i> -farneseno	2,52±0,25	0,16±0,07	0,19±0,05	-	-
<i>γ</i> -muuroleno	-	6,34±1,02	0,26±0,02	0,67±0,12	0,48±0,07
<i>β</i> -selineno	-	0,74±0,15	0,17±0,01	0,06±0,01	0,36±0,08
<i>cis-β</i> -guaieino	0,99±0,12	2,10±0,87	0,13±0,02	0,51±0,09	0,28±0,09
<i>α</i> -muuroleno	-	1,64±0,66	-	0,37±0,07	0,31±0,07
Pentadecano	1,66±0,14	15,20±2,34	17,50±3,12	0,43±0,13	6,66±1,05
<i>β</i> -bisaboleno	0,05±0,01	0,42±0,06	3,10±0,55	0,22±0,07	0,54±0,14
<i>γ</i> -cadineno	1,31±0,15	4,12±0,54	0,56±0,14	0,62±0,12	0,31±0,09
<i>trans-γ</i> -bisaboleno	-	0,66±0,13	0,29±0,04	0,27±0,08	0,27±0,12
Espatuleno	0,98±0,07	0,66±0,18	-	-	-

...continua...

TABELA 4b, Cont.

1- <i>epi</i> -cubenol	2,60±0,54	-	-	-	-
<i>epi</i> - α -muurolol	0,42±0,09	0,87±0,18	-	0,21±0,04	0,18±0,07
<i>epi</i> - α -cadinol	2,48±0,34	-	-	-	-
Selin-11-en-4- α -ol	33,40±3,45	18,84±3,10	6,84±0,67	5,66±0,67	4,13±1,02
Tetradecanol	8,15±1,76	5,13±1,09	5,10±1,02	16,18±3,12	21,76±3,65
Heptadecano	22,13±2,78	13,15±2,54	15,10±2,76	21,44±2,98	36,43±4,21
Benzoato de benzila	9,38±1,04	5,40±0,98	-	3,76±0,54	1,97±0,45
Hexadecanoato de metila	0,11±0,03	0,86±0,17	2,02±0,78	0,96±0,13	0,66±0,14
Hexadecanoato de etila	1,00±0,24	0,38±0,09	6,40±1,06	0,54±0,07	0,19±0,12
Ácido octadecanóico	-	-	-	1,43±0,47	0,78±0,21
Octadecadienoato de metila	1,78±0,32	0,11±0,04	0,32±0,02	2,30±0,54	0,03±0,01
Tetracosano	-	-	-	6,28±1,06	9,10±1,15
Piperovatina	3,52±0,47	5,38±1,03	11,48±1,06	3,81±0,79	0,75±0,12
Pipercallosidina	0,09±0,02	0,15±0,08	2,49±0,65	0,54±0,13	0,34±0,09
Pipercallosina	0,23±0,05	0,32±0,05	7,40±1,05	0,28±0,08	0,33±0,13
Total identificado	96,98±0,62	88,36±0,58	82,63±0,82	70,58±68	93,86±0,98

*Médias obtidas de três repetições; **Composição química do extrato derivatizado

TABELA 5a. Composição química (% Área)* dos extratos de raízes frescas de *Piper piscatorum* extraídos sob refluxo, em hexano (HEX), clorofórmio (CL), acetato de etila (ACET), etanol, (ET) e metanol (MET).

Compostos	HEX	CL	ACET	ET**	MET**
α -terpineol	0,04±0,01	0,06±0,01	-	-	0,06±0,01
acetato					
Ciclosativeno	0,13±0,02	0,19±0,06	-	0,05±0,01	0,08±0,01
α -copaeno	0,34±0,08	1,40±0,34	0,69±0,12	0,43±0,06	0,08±0,02
β -elemeno	-	-	0,18±0,07	0,06±0,02	0,10±0,03
Tetradecano	-	0,06±0,01	-	0,11±0,01	0,19±0,05
<i>trans</i> -cariofileno	1,42±0,34	0,40±0,07	0,80±0,13	0,22±0,04	0,21±0,02
Calareno	-	0,32±0,08	0,10±0,06	-	-
<i>trans</i> - α -bergamonteno	0,38±0,09	0,87±0,12	0,08±0,01	0,12±0,02	-
α -humuleno	-	1,02±0,29	0,04±0,01	-	-
<i>trans</i> - β -farneseno	0,44±0,11	0,67±0,13	0,14±0,05	-	0,10±0,01
γ -muuroleno	-	5,12±0,28	0,38±0,09	1,79±0,12	1,55±0,14
β -selineno	-	0,39±0,06	0,66±0,11	0,08±0,02	-
<i>cis</i> - β -guaieeno	2,44±0,98	1,32±0,07	0,15±0,02	-	-
α -muuroleno	-	1,05±0,23	-	-	-
Pentadecano	-	10,42±0,99	16,38±1,04	18,47±1,07	17,24±1,47
β -bisaboleno	0,16±0,04	6,20±0,65	1,60±0,06	0,23±0,04	1,22±0,05
γ -cadineno	0,49±0,11	2,40±0,14	0,30±0,05	0,09±0,02	0,08±0,01
<i>trans</i> - γ -bisaboleno	-	0,32±0,05	0,06±0,01	0,37±0,08	0,31±0,08
Espatuleno	1,32±0,16	0,22±0,06	-	-	-

...continua...

TABELA 5a, Cont.

1- <i>epi</i> -cubenol	3,98±0,25	0,40±0,01	-	-	0,05±0,02
<i>epi</i> - α -muurolol	0,66±0,13	0,40±0,08	-	0,31±0,04	0,04±0,01
<i>epi</i> - α -cadinol	5,10±1,13	-	-	-	-
Selin-11-en-4- α - ol	38,66±3,45	26,15±3,12	10,44±0,45	7,75±0,66	5,38±0,34
Tetradecanol	7,12±0,96	1,67±0,08	8,50±0,66	20,61±2,07	19,42±2,89
Heptadecano	8,15±0,98	10,42±0,58	12,40±0,34	11,15±1,08	15,69±1,45
Benzoato de benzila	7,10±0,45	1,02±0,06	-	-	-
Hexadecanoato de metila	2,97±0,55	2,42±0,12	1,60±0,45	1,07±0,09	0,72±0,13
Hexadecanoato de etila	0,67±0,16	0,98±0,11	1,10±0,12	0,75±0,15	0,66±0,09
Ácido octadecanóico	-	-	-	0,60±0,17	0,93±0,10
Octadecadienoato de metila	1,38±0,32	0,07±0,01	0,28±0,07	1,13±0,09	1,05±0,25
Tetracosano	-	-	0,12±0,02	-	0,05±0,01
Piperovatina	4,48±0,49	6,35±0,54	22,46±1,01	8,77±0,78	6,37±1,04
Pipercallosidina	0,25±0,02	0,32±0,09	2,72±0,36	0,70±0,09	0,44±0,04
Pipercallosina	0,44±0,06	0,59±0,11	8,70±0,56	1,28±0,08	1,58±0,13
Total identificado	88,12±0,67	83,22±0,48	89,88±0,74	76,14±0,77	73,61±0,54

*Médias obtidas de três repetições; **Composição química do extrato derivatizado.

TABELA 5b. Composição química (% Área)* dos extratos de raízes secas de *Piper piscatorum* extraídos sob refluxo, em hexano (HEX), clorofórmio (CL), acetato de etila (ACET), etanol, (ET) e metanol (MET).

Compostos	HEX	CL	ACET	ET**	MET**
α -terpineol	0,03±0,01	0,02±0,01	-	-	0,03±0,01
acetato					
Ciclosativeno	0,18±0,02	0,12±0,04	-	0,03±0,01	0,15±0,02
α -copaeno	0,19±0,02	1,15±0,16	0,52±0,07	0,40±0,09	0,21±0,08
β -elemeno	-	-	0,24±0,08	0,13±0,02	0,07±0,02
Tetradecano	-	0,18±0,08	-	0,24±0,01	1,22±0,12
<i>trans</i> -cariofileno	1,66±0,23	0,65±0,12	0,82±0,09	0,38±0,08	0,66±0,21
Calareno	-	0,26±0,08	0,08±0,03	-	-
<i>trans</i> - α -bergamonteno	0,22±0,05	1,45±0,19	0,12±0,04	0,27±0,06	-
α -humuleno	-	1,96±0,45	0,09±0,02	-	-
<i>trans</i> - β -farneseno	0,56±0,15	0,54±0,14	0,10±0,01	-	0,12±0,04
γ -muuroleno	-	1,38±0,34	0,20±0,06	1,58±0,12	1,40±0,28
β -selineno	-	0,52±0,19	0,81±0,08	0,13±0,04	-
<i>cis</i> - β -guaieno	2,01±0,45	0,89±0,20	0,06±0,03	-	-
α -muuroleno	-	1,68±0,17	-	-	-
Pentadecano	-	12,12±1,06	18,40±1,67	11,97±3,34	18,56±2,67
β -bisaboleno	0,10±0,01	2,70±0,77	0,82±0,13	0,20±0,08	1,10±0,43
γ -cadineno	0,62±0,09	3,20±0,98	0,35±0,09	0,21±0,17	0,04±0,01
<i>trans</i> - γ -bisaboleno	-	0,40±0,09	0,08±0,01	0,42±0,07	0,58±0,13
Espatuleno	1,52±0,10	0,34±0,07	-	-	-

...continua...

TABELA 5b, Cont.

1- <i>epi</i> -cubenol	1,66±0,19	0,53±0,12	-	-	0,13±0,05
<i>epi</i> - α -muurolol	1,13±0,24	0,62±0,13	-	0,39±0,06	0,05±0,02
<i>epi</i> - α -cadinol	3,94±0,48	-	-	-	-
Selin-11-en-4- α - ol	40,69±3,22	24,39±3,78	8,96±0,99	6,84±0,56	4,30±0,51
Tetradecanol	6,15±0,66	1,56±0,34	8,12±1,04	23,31±2,45	26,31±3,45
Heptadecano	14,40±0,78	15,30±1,66	20,16±2,78	19,78±1,99	12,53±0,55
Benzoato de benzila	5,00±0,65	1,74±0,45	-	-	-
Hexadecanoato de metila	1,78±0,12	1,05±0,21	1,30±0,45	0,87±0,17	0,57±0,12
Hexadecanoato de etila	0,55±0,10	0,76±0,16	0,48±0,10	0,43±0,08	0,45±0,10
Ácido octadecanóico	-	-	-	0,50±0,10	0,54±0,16
Octadecadienoato de metila	0,42±0,07	0,02±0,01	0,17±0,01	1,00±0,19	0,65±0,19
Tetracosano	-	-	0,29±0,08	-	1,32±0,45
Piperovatina	3,53±0,21	5,39±0,89	16,60±0,78	6,77±0,67	5,39±0,78
Pipercallosidina	0,22±0,08	0,23±0,07	1,97±0,36	0,64±0,12	0,35±0,07
Pipercallosina	0,27±0,08	0,40±0,09	7,15±0,58	1,46±0,16	1,24±0,34
Total identificado	86,83±0,65	81,55±0,75	87,89±0,60	77,95±0,56	77,97±0,70

*Médias obtidas de três repetições; **Composição química do extrato derivatizado.

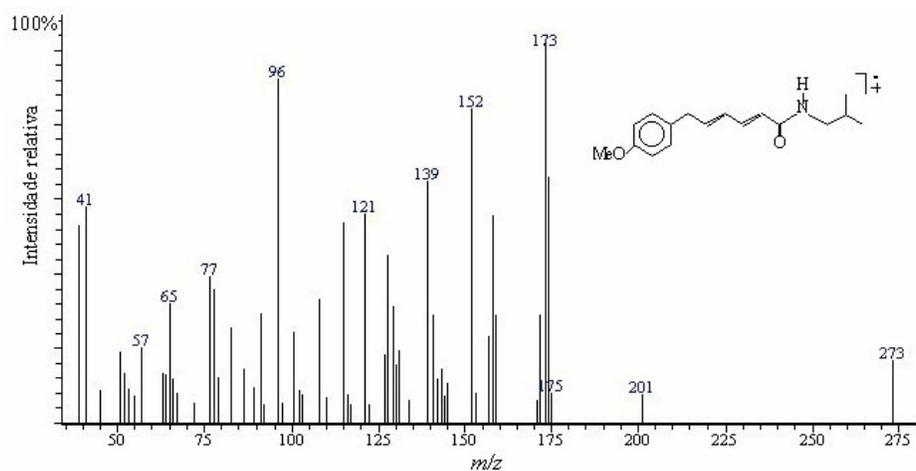


FIGURA 2. Espectro de massa de piperovatina.

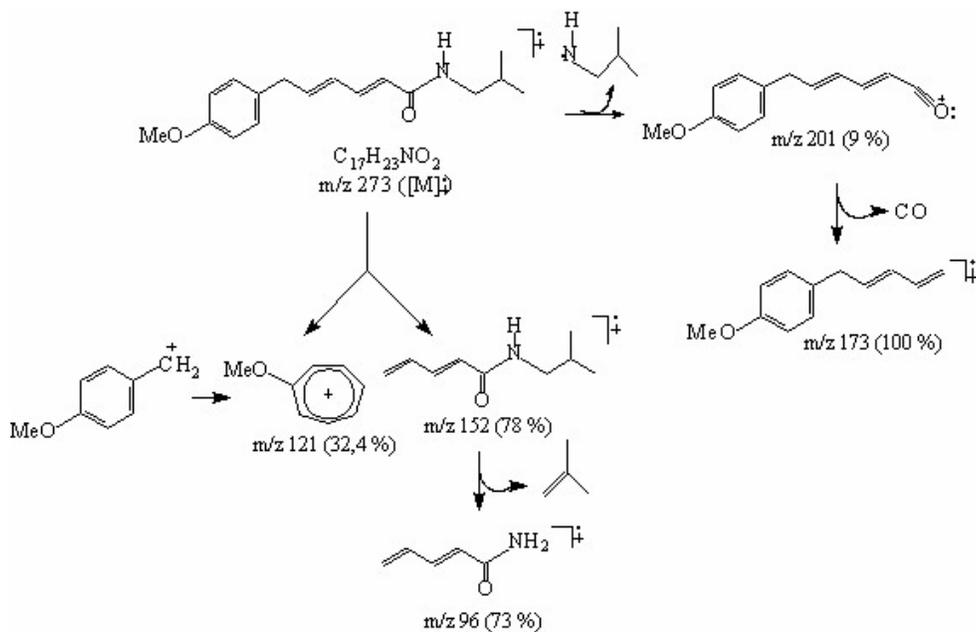


FIGURA 3. Fragmentos atribuídos aos picos principais observados no espectro de massa de piperovatina.

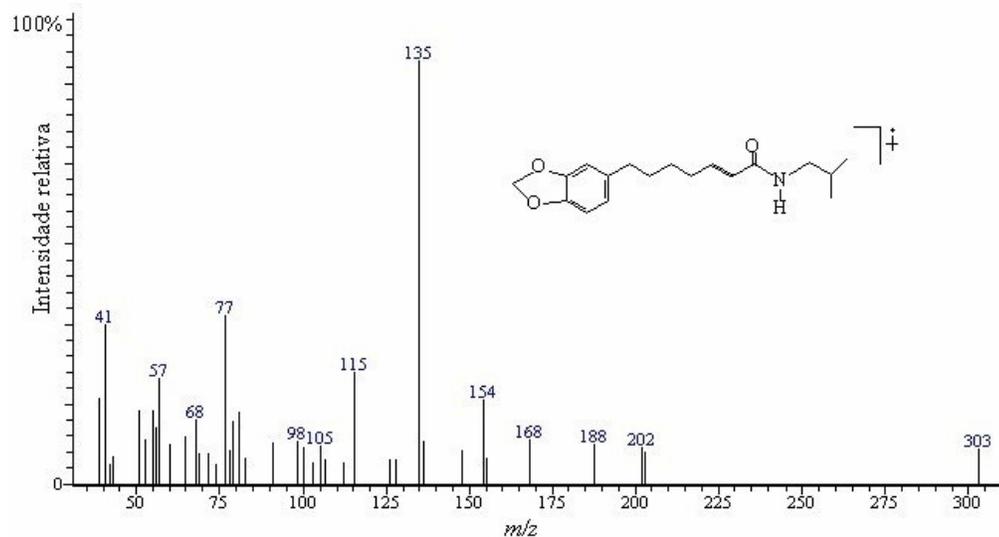


FIGURA 4. Espectro de massa de pipercollosidina.

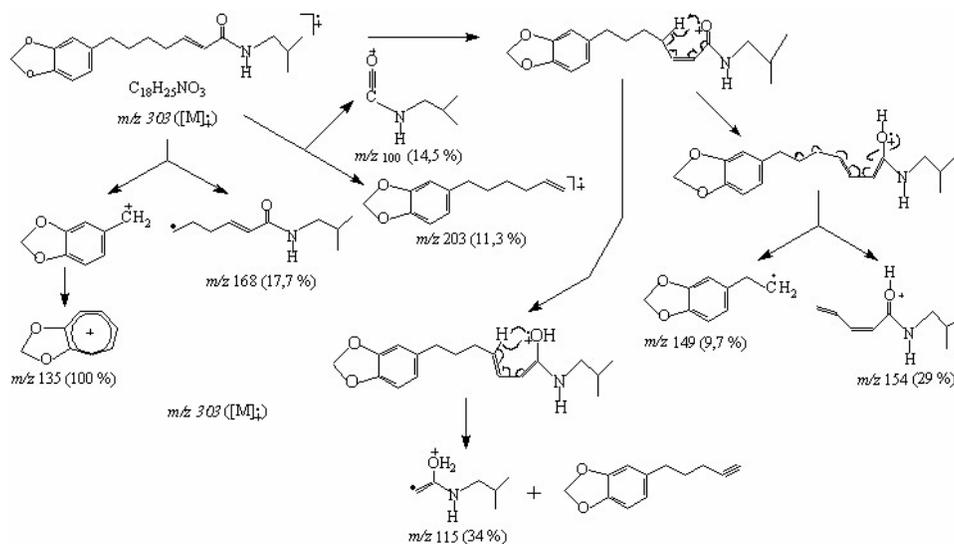


FIGURA 5. Fragmentos atribuídos aos picos principais observados no espectro de massa de pipercollosidina.

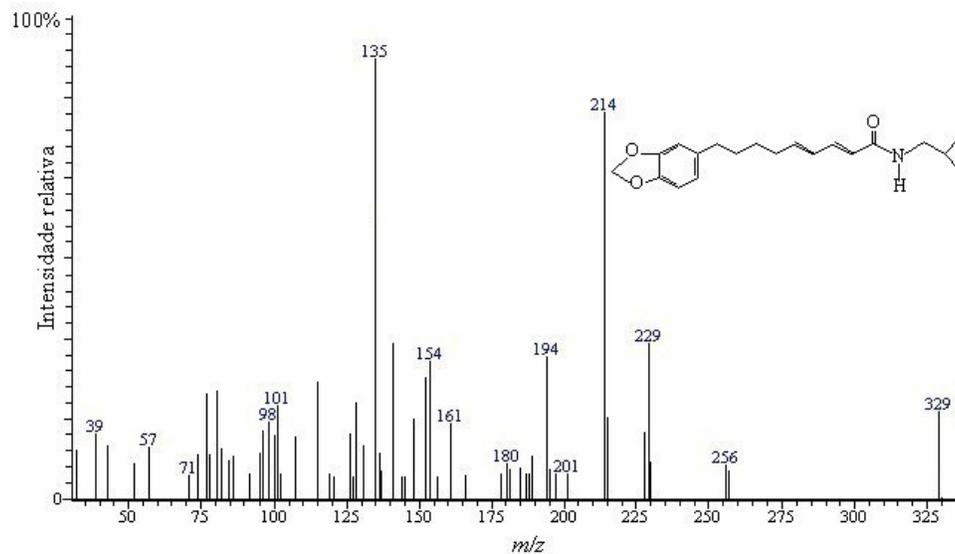


FIGURA 6. Espectro de massa de pipercollosina.

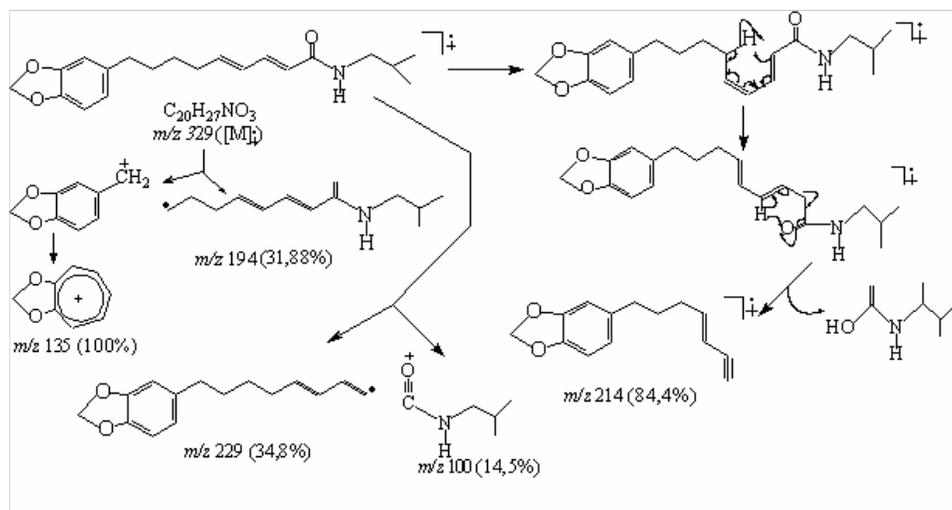


FIGURA 7. Fragmentos atribuídos aos picos principais observados no espectro de massa de pipercollosina.

CAPÍTULO III

OBTENÇÃO DE EXTRATO DE *Piper piscatorum* (TREL. YUNC.) COM A UTILIZAÇÃO DE CO₂ SUPERCRÍTICO E ÁLCOOIS ETÍLICO E METÍLICO COMO CO-SOLVENTES

RESUMO

Pimentel, Flávio Araújo. **Obtenção de Extrato de *Piper Piscatorum* (Trel. Yunc.) Com A Utilização de CO₂ Supercrítico e Álcoois Etilico e Metílico como co-Solventes.** 2007. p. 178. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Neste trabalho, foi avaliada a eficiência da extração de folhas frescas e secas de *Piper piscatorum*, empregando CO₂ supercrítico e co-solventes (10% etanol e 10% metanol) a 40°C e 70°C e pressão de 400 bar. Os extratos foram caracterizados quimicamente, utilizando-se as técnicas de IV, CG-EM e CG-DIC. Os principais componentes dos extratos foram a piperovatina, seguido de ácido palmítico, pentadecano e pipercallosidina. A secagem das folhas provocou modificações de sua composição química, reduzindo principalmente os teores de amidas com potencial anestésico. Os maiores rendimentos (% p/p) dos extratos (piperovatina e pipercallosidina) foram obtidos de folhas frescas extraídas com CO₂ e etanol a 40°C.

Palavras-chave: *Piper piscatorum*; extração supercrítica; anestésico natural.

* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora); Fabiana Queiroz - UFLA; Luiz Roberto Batista – UFLA (Co-orientadores)

ABSTRACT

Pimentel, Flávio Araújo. **Supercritical Extraction of *Piper Piscatorium* (Trel. Yunc.) With CO₂, Employing Ethanol And Methanol As Co-Solvents.** 2007. p. 178. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil*

The efficiency of the extraction of fresh and dried leaves of *Piper piscatorium* was evaluated employing supercritical CO₂ and co-solvents (10% ethanol e 10% methanol) at 40 °C e 70 °C and a pressure of 400 bar. The extracts were characterized chemically by IIR, GC-MS and GC-FID. The principal components of the extracts were piperovatine, followed by palmitic acid, pentadecane and pipercallosidine. Drying of the leaves caused modifications in their composition, mainly reducing the concentration of the amides, which have a potential as anesthetics. The highest yields (% w/w) of the extracts (piperovatine and pipercallosidine) were obtained from the fresh leaves extracted with CO₂ and ethanol at 40 °C.

Keywords: *Piper piscatorium*; supercritical extraction; natural anesthetic.

* Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Major Professor); Fabiana Queiroz – UFLA and Luiz Roberto Batista – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira apresenta inúmeras espécies com variadas atividades biológicas, algumas com propriedade medicinal útil à população. No entanto, estima-se que menos de 1% dessas espécies tem sido motivo de um estudo adequado. A pesquisa avançada com plantas medicinais pode levar à descoberta de drogas revolucionárias, com custo irrisório para população carente (Martins et al., 1994). Das 119 drogas desenvolvidas de plantas, 74% devem-se a estudos científicos realizados para avaliar o uso das plantas bem conhecidas na medicina popular (Ming, 1995). Contudo, um limitado número de ervas apresenta comprovação científica de suas propriedades, habilitando-as à agroindustrialização ou ao uso “in natura” (Silva Junior, 1994).

Entre as Regiões brasileiras, a Amazônia apresenta-se como detentora de um dos maiores estoques da biodiversidade do planeta. Os recursos naturais existentes tornam-se conhecidos gradativamente à medida que a pesquisa científica intensifica-se e os resultados apresentam-se disponíveis para a sociedade. O que foi possível identificar até o presente permite um amplo diagnóstico das possibilidades dessa região, como uma reserva de recursos genéticos capaz de interferir na balança comercial do país e, sobremaneira, na economia mundial (Pletsch & Sant’Ana, 1995).

No estado do Acre, verificou-se, por meio de pesquisas etnofarmacológicas, que 52% das plantas medicinais utilizadas por índios e seringueiros são de ocorrência espontânea, sendo encontradas em florestas primárias e secundárias (Ming & Ferreira, 1992). Entre a infinidade de recursos genéticos não-domesticados, encontra-se o João-Brandim (*Piper piscatorum*), uma Piperaceae utilizada pelos índios como anestésico. Entre outras aplicações, a população utiliza suas folhas no combate à cefaléia, dores em geral e como

antitérmico, sem nenhum conhecimento da sua composição química. Levando-se em consideração a experiência adquirida por esses indivíduos, certamente essa planta poderá surgir como uma nova fonte natural de anestésico para a indústria farmacêutica (Ming, 1995 e Schultes, 1975). A atividade anestésica tem sido relacionada à presença de amidas encontradas em diferentes espécies da família Piperaceae. Entre esses compostos, estão a pipericallosina (*Piper darienensis*), piperovatina (*Ottonia corcovadensis*, *Piper piscatorum*, *Ottonia martiana* e *Ottonia frutescens*), pipericallosidina (*Piper piscatorum*) e cefaradiona (*Piper auritum*) (Cunico et al., 2003; Gupta, 2004; Facundo et al., 2004; Lansert et al., 2001; Makapugay et al., 1983; McFerren & Rodrigues, 1998).

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, levando-se em consideração a presença e quantidades de substâncias extraídas. A composição química das plantas é extremamente complexa e frequentemente ocorre a extração concomitante de vários tipos de substâncias, farmacologicamente ativas ou não, desejadas ou não. Por isso, deve-se inicialmente avaliar a eficiência de métodos extrativos (Simões et al., 2003). Outro ponto a ser considerado está relacionado com a qualidade da matéria-prima. Após a colheita, deve-se estabelecer em que condições a planta pode ser consumida ou processada. Nesse sentido, a secagem de plantas medicinais tem sido realizada visando a inibir a atividade enzimática e o desenvolvimento de microorganismos. Entretanto, esse procedimento pode afetar a composição de princípios ativos da matéria-prima ou produto extraído (extratos, óleos essenciais, etc), devido a uma série de fatores, como a volatilização e oxidação de compostos ou por dificultar o processo de extração (Barbosa & Barbosa, 2006; Simões et al., 2003). Nas pesquisas realizadas com as Piperaceae, anteriormente citadas, os extratos brutos foram obtidos de matérias-primas secas sob mesmas condições de temperatura (ambiente) utilizando-se etanol ou metanol, para fins de caracterização química e estudos biológicos.

A extração com CO₂ supercrítico (CO₂ SC), utilizando ou não co-solventes, apresenta-se bastante atrativa para o processamento de produtos de ocorrência natural devido a várias características distintas, tais como a facilidade de recuperação do soluto e reciclagem do solvente, com a simples manipulação de temperatura e/ou pressão. A flexibilidade de se operacionalizar com temperaturas críticas baixas, sem riscos de deixar resíduos indesejáveis e/ou degradar termicamente os produtos obtidos, é a principal vantagem dessa técnica (Mancini, 1984, Martins, 1996; Mohamed, 1997). Uma desvantagem do uso de CO₂ SC é a sua baixa polaridade, tornando a extração mais difícil de compostos polares. Contudo, com o uso de co-solventes adequados, pode-se elevar a seletividade e solubilidade do CO₂ SC em solutos polares. Como exemplo, a adição de etanol, metanol ou água em baixas concentrações (Kopcak, 2003; Li & Hartland, 1992; Oliveira, 2005).

Neste trabalho objetivou-se efetuar a caracterização química e avaliar a eficiência de extração das folhas frescas e secas de *Piper piscatorum* empregando CO₂ supercrítico com co-solventes (etanol e metanol) nas temperaturas de 40°C e 70°C e pressão de 400 bar. Foram avaliados os efeitos das variáveis estudadas no rendimento dos extratos (base seca) e na composição química desses, no teor de piperovatina e de pipercollosidina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

O material genético foi coletado de população nativa de *Piper piscatorum* (Trel. Yunc.), situada na Reserva Florestal da Embrapa Acre, localizada no município de Rio Branco, AC. A colheita foi realizada no mês de janeiro/2005, entre 8 e 10 horas da manhã, erradicando as plantas do solo. A temperatura local encontrava-se em torno de 25°C. Em seguida, as plantas foram submetidas às operações de desfolha e seleção, descartando-se os materiais atacados por praga ou doenças. Posteriormente, o material vegetal foi acondicionado em sacos plásticos e colocado em caixas de isopor, sob refrigeração (gelo), sendo transportado via aérea para o Laboratório de Química Orgânica, da Universidade Federal de Lavras, MG, onde foi armazenado em geladeira à 2°C, até a utilização nos experimentos. Para a confirmação da autenticidade da espécie coletada, uma exsicata de número 10.473 foi submetida à identificação, cujo exemplar encontra-se arquivado no Herbário da Universidade Federal do Acre (UFAC).

Condições Edafoclimáticas

O tipo de clima dominante nessa área é AW, caracterizado pela ocorrência de temperatura média do mês mais frio superior a 18°C e uma estação seca de pequena duração (EMBRAPA, 2001).

O regime térmico é caracterizado por temperatura média anual em torno de 24,3°C. Os meses mais quentes são setembro, novembro e dezembro, com temperaturas médias em torno de 25°C. O período mais frio é compreendido pelos meses de junho e julho, com temperaturas médias de 22,9°C e 22°C,

respectivamente. É freqüente uma queda brusca de temperatura, pela ocorrência de ondas de frio, que pode atingir até 4°C, com duração de 3 a 8 dias (EMBRAPA, 2001).

O regime pluviométrico da região caracteriza-se por um período chuvoso de 7 meses, de outubro a abril, sendo os meses de dezembro a março os mais chuvosos. A precipitação média anual na região situa-se em torno de 1.950 mm, correspondendo o período chuvoso ao período mais quente do ano. O trimestre mais chuvoso, janeiro, fevereiro e março, é responsável por cerca de 40 % da precipitação total anual. O período seco prolonga-se por 5 meses, de maio a setembro, com uma precipitação média que varia de 11 mm a 83 mm ao mês (EMBRAPA, 2001).

O solo foi classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico. A classe de textura é de média/argilosa (EMBRAPA, 2001).

Secagem

As folhas frescas de *Piper piscatorum* foram submetidas à desidratação em secador de bandejas com circulação de ar, à temperatura de 30°C, por um período de 6 dias (Barbosa & Barbosa, 2006).

Umidade

Para a determinação da umidade, utilizaram-se separadamente 5 gramas de folhas frescas e secas picadas, emergidas em 50 mL de ciclohexano (C₆H₁₂), colocadas em balão volumétrico com capacidade para 250 mL, acoplado a um condensador, com coletor volumetricamente graduado. O aquecimento foi realizado por meio de manta aquecedora, controlando-se a temperatura para 100±5°C. Após o processo de destilação, realizado em 3 horas, quantificou-se o volume de água presente nas folhas. A umidade foi calculada levando-se o teor de água contido em 100 gramas da amostra (AOCS, 1994; Pimentel, 2006).

Densidade relativa

Para a determinação da densidade do material vegetal (folhas frescas e secas picadas) e material inerte (esferas de vidro), empregou-se o método de picnometria (picnômetros Hubbard Cormick de 30 mL). Foram empregados como fluidos picnométricos água (esferas de vidro) e tolueno (material vegetal). Utilizou-se uma balança analítica com precisão de 0,1 mg, sendo realizadas três repetições (Schoch & Leach, 1964; Mohsenin, 1970).

Extração supercrítica

Os experimentos foram realizados utilizando-se o equipamento SFT – 150 SFE System, da empresa Supercritical Fluid Technologies, Inc. O equipamento é constituído de uma autoclave (100 mL), painel eletrônico para controles de temperatura da coluna extratora (de ambiente até 200 °C) e pressão (até 680 bar), e de válvula de restrição com temperatura controlada para 80 °C. O sistema é constituído de duas linhas com bombas micrométricas, sendo uma para o CO₂ e outra para co-solventes, que se juntam internamente numa só tubulação. A de co-solventes permite operacionalizar entre um fluxo de 0,1 a 10 mL min⁻¹. Para geração de CO₂ supercrítico, a bomba micrométrica multiplicadora de pressão é suplementada com ar comprimido (5,5 bar) e refrigerada com fluxo líquido (água e etileno glicol) à temperatura de 5 °C. Um esquema do equipamento de fluido supercrítico é mostrado na Figura 1.

Antes de proceder ao empacotamento da coluna para a obtenção dos extratos, as folhas frescas ou secas picadas de *Piper piscatorium* (15 gramas) foram misturadas com esferas de vidro de diâmetro médio de 2 mm. Esse material (folhas + esferas de vidro) foi empacotado no extrator manualmente com o auxílio de um bastão de vidro, dentro de sacolas de tecido (composição: 90% nylon + 10% elastano). Utilizaram-se esferas de vidro com o objetivo de completar o volume do extrator, fixando a massa de matéria-prima empregada

na extração (15 gramas de folha) e evitar a compactação do leito e formação de canais de preferências. Os pesos das esferas de vidro foram padronizados para folhas frescas (113 gramas de esferas de vidro) e secas (90 gramas de esferas de vidro).

Após o empacotamento da coluna, foi feita uma pressurização do sistema apenas com CO₂ para retirada do ar da coluna de extração. Fechou-se a válvula após a coluna e procedeu-se à introdução do solvente supercrítico (CO₂ SC ou CO₂ SC + co-solvente) na coluna, nas condições de operação (pressão e temperatura). Utilizou-se um período estático de 3 horas para permitir um equilíbrio prático entre o solvente supercrítico e a matriz sólida (folhas) e o equilíbrio térmico na temperatura de operação (40°C e 70°C). O tempo necessário para atingir o equilíbrio prático entre o CO₂ SC (ou a mistura de CO₂ SC + co-solvente) foi determinado por testes preliminares.

Nos experimentos realizados com misturas de CO₂ SC e co-solventes a 10% (fração molar do co-solvente), a massa de co-solvente injetada na coluna durante o período estático foi calculada considerando a fração molar da mistura de operação (10% de co-solvente), o volume ocupado pela mistura de CO₂ SC + co-solvente (volume da tubulação após mistura de CO₂ SC e co-solvente até entrada da coluna, adicionado ao volume vazio da coluna empacotada) e a densidade molar da mistura de CO₂ SC + co-solvente (equação de Peng-Robison, (Sandler (1987))). Bombeou-se a massa do co-solvente depois da pressurização inicial da coluna com CO₂ e fechou-se a válvula após a coluna, controlando-se pela vazão da bomba do co-solvente e tempo de funcionamento. Em seguida, injetou-se a massa de co-solvente no sistema, sendo a coluna de extração pressurizada a 400 bar, ligando-se a bomba de CO₂. Atingido o período estático (3 horas), abriu-se a válvula situada após a coluna e iniciou-se o período de extração dinâmico, em que as bombas de CO₂ e do co-solvente foram ligadas e as vazões programadas de modo a manter a fração molar da mistura. Com a

taxa de massa do CO₂ de aproximadamente 6×10^{-5} kg/s, empregada durante o período dinâmico de extração, padronizou-se um tempo de 30 minutos de extração. Neste, a mistura de CO₂ + co-solvente em equilíbrio com a matriz durante o período estático foi extraída. A mistura do fluido SC e do material extraível, ao passar pela válvula de restrição (válvula tipo agulha), foi despressurizada até a pressão próxima à atmosférica, permitindo a separação do extrato do CO₂, recolhendo-o num frasco de vidro (separador) com tampa e uma tubulação para saída do CO₂. A taxa de CO₂ na saída do separador foi monitorada utilizando-se a técnica de deslocamento de coluna de água. Para isso, utilizaram-se uma bureta (1000 mL), cronômetro e acessórios. Os extratos obtidos com co-solventes foram levados para estufa a 40°C para evaporação do etanol (5 horas) e metanol (2 horas) remanescentes.

Após o término do período de extração dinâmica (folha fresca ou folha seca), a massa do extrato foi determinada por pesagem em balança analítica com precisão de 0,1 mg. Armazenou-se a amostra contida em frasco de vidro com tampa rosqueável em geladeira a 2°C.

Objetivando-se recuperar o extrato depositado da tubulação, lavou-se a linha de tubulação com uma mistura de etanol (vazão: 5 mL/s) e CO₂ (pressão: 200 bar). O solvente (etanol) foi separado do extrato sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 55°C. A massa do extrato contendo pequena quantidade do solvente foi transferida para frascos de vidro e submetida à secagem em estufa a 40°C por aproximadamente 6 horas, para a completa evaporação do etanol. Após esse procedimento, pesou-se conforme mencionado anteriormente. O extrato total foi determinado pela soma do óleo obtido durante o período de extração (30 minutos) e aquele obtido durante a limpeza (40 minutos). Caracterizou-se quimicamente o extrato obtido durante o período de extração dinâmico.

Análises qualitativa e quantitativa

Análises no infravermelho(IV)

Os extratos de *Piper piscatorum* proveniente de cada tratamento foram submetidos à análise por espectrofotometria no infravermelho, utilizando um espectrofotômetro Digilab Excalibur, série FTS 3000, equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR), com cristal de seleneto de zinco de reflexão única a 45°. Os espectros foram registrados na região de 4000 e 600 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹.

Análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-EM) e gasosa (GC-DIC).

As análises qualitativa dos extratos das folhas frescas e secas de *Piper piscatorum* foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, MG, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM), utilizando-se um equipamento da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP 5050A. Para a identificação dos constituintes químicos, foi empregada uma coluna DB-5, da marca J & W Scientific, com 30 m de comprimento, d.i. de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm, e hélio como gás carreador. As condições de operação do cromatógrafo a gás foram: pressão interna da coluna de 121,2 kPa, fluxo de gás na coluna de 1,8 mL min⁻¹, temperatura no injetor de 220°C, temperatura no detector ou na interface (GC-EM) de 300°C. A temperatura inicial da coluna foi de 80°C por 2 min, seguido de um incremento de 3°C min⁻¹, até atingir 300°C, sendo mantida constante por 25 min. A razão de split foi de 1:10. O espectrômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 600 Da, em intervalos de 0,5 s, com energia de ionização de 70 eV. Foi injetado 1 µL da amostra, na concentração de 0,5%, dissolvida em diclorometano. A identificação dos componentes foi feita pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de

dados da espectroteca Willey, 7ª edição, com dados da literatura e também pelos índices de Kovats (Adams, 1995). Para o índices de Kovats, foi injetada no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 a C26) (Thomazini & Franco, 2000).

A quantificação dos componentes foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, MG, utilizando-se um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (GC-DIC) de marca Shimadzu, modelo GC-17A. As análises foram realizadas em triplicata e nas mesmas condições descritas para a identificação dos constituintes.

Delineamento experimental e análise estatística

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, e os tratamentos, dispostos em esquema fatorial. Utilizou-se o esquema fatorial 3 x 2 x 2, constituído dos fatores: solventes (CO₂ supercrítico, CO₂ supercrítico e etanol e CO₂ supercrítico e metanol), matérias-primas (folhas frescas e secas) e temperaturas de extração (40°C e 70°C). As variáveis analisadas foram o rendimento do extrato (gramas de extrato/100 gramas da matéria-prima em base seca) e teores de piperovatina e pipericallosidina no extrato e as massas extraídas desses componentes em 100 gramas de matéria-prima (base seca). Os dados referentes aos efeitos dos tratamentos foram submetidos às análises de variâncias e a testes de comparações múltiplas de médias (Tukey), utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas frescas de *Piper piscatorum* apresentaram teor de umidade de $69\pm 2\%$. Após seis dias de secagem a 30°C , sua umidade foi reduzida para $10\pm 2\%$. Esse material genético fresco e seco, bem como o inerte (esferas de vidro), possuem, respectivamente, densidades médias de $1,1151\text{ g/cm}^3$; $0,8542\text{ g/cm}^3$ e $2,5025\text{ g/cm}^3$.

Os dados das Tabelas 1a e 1b apresentam os resultados de rendimentos do extrato das folhas frescas e secas de *Piper piscatorum*, obtidos durante o tempo dinâmico (30 minutos) nos diferentes tratamentos empregados.

Na Tabela 1a, pode ser observado que, com a folha seca, a elevação da temperatura de 40°C para 70°C resultou num aumento significativo do rendimentos dos extratos para todos os solventes estudados ($\text{CO}_2\text{ SC}$, $\text{CO}_2\text{ SC} + \text{etanol}$, $\text{CO}_2\text{ SC} + \text{metanol}$). Esse aumento com a elevação da temperatura operando em altas pressões é relatada por diversos pesquisadores e deve-se ao efeito predominante da temperatura na pressão de vapor dos componentes do extrato (Casas, 2005; Casas et al., 2005; Mohamed, 1997; Valle et al., 2000; Yongyue et al., 2006). Esses consistiram de $1,02\%$ para $1,78\%$ (CO_2); $2,10\%$ para $2,54\%$ ($\text{CO}_2\text{ SC} + \text{etanol}$) e $1,60\%$ para $2,36\%$ ($\text{CO}_2\text{ SC} + \text{metanol}$). Efeitos semelhantes da temperatura foram encontrados na obtenção dos extratos de raízes de *Angélica sinensis* ($\text{CO}_2\text{ SC}$: rendimento de $0,87\%$ p/ $2,06\%$ elevando-se de 45°C p/ 65°C , sob 500 bar) (Yongyue et al., 2006); de folhas secas de *Helianthus annuus* ($\text{CO}_2\text{ SC}$: rendimento de $0,6\%$ p/ $1,0\%$ e $\text{CO}_2\text{ SC} + \text{metanol}$: rendimento de $0,75\%$ p/ $1,25\%$ elevando-se de 35°C para 50°C , sob 500 bar) (Casas, 2005) e de sementes de *Rosa aff. Rubiginosa* ($\text{CO}_2\text{ SC}$: rendimento $6,56\%$ p/ $7,09\%$ elevando-se de 40°C p/ 60°C sob 400 bar)³³.

Pelos dados obtidos, nota-se que, utilizando folha fresca, o efeito da elevação da temperatura variou com o tipo de solvente empregado. Com CO₂ SC + metanol e CO₂ SC + etanol, ocorreram respectivamente aumento (0,96 % para 1,64 %) e redução (3,07% para 2,84 %) do rendimento do extrato. Essa diminuição do rendimento está relacionada com o fenômeno de retrogradação de compostos em solventes pressurizados. Nas extrações com CO₂ SC, o aumento do rendimento (0,68% p/ 0,86%) não foi significativo.

Para as temperaturas de operação (40°C e 70°C), observa-se uma elevação significativa dos rendimentos dos extratos obtidos de folha seca em relação à folha fresca, exceto, para o CO₂ SC + etanol (Tabela 1b). Os aumentos foram de 0,68% p/ 1,02% e 0,86% p/ 1,78% (CO₂ SC) e de 0,96% p/ 1,60% e 1,64% p/ 2,36 % (CO₂ SC + metanol), respectivamente, para as temperaturas de 40°C e 70°C. Utilizando o CO₂ SC + etanol, as reduções foram de 3,07% para 210% a 40°C e de 2,84 % para 2,54% a 70°C. Casas et al. (2006), estudando o efeito da secagem de folhas de *Helianthus annuus* (folhas secas a 25°C) sob o rendimento de extração com o emprego de diferentes condições operacionais (temperaturas: 35°C e 55°C; Pressões: 100 e 500 bar; solventes: CO₂ SC, CO₂ SC + metanol, CO₂ SC + água, CO₂ SC + DMSO), constataram que, para todas as condições operacionais, os maiores rendimentos foram obtidos de amostras secas. Segundo esses, a umidade da amostra contribuiu para a diminuição do rendimento de extração, com a água da matéria-prima agindo como um solvente e competindo com o CO₂ SC. Isso pode ter ocorrido devido à partição de solutos polares para fase aquosa, favorecida pelo excesso de água no recipiente de extração, reduzindo conseqüentemente a presença desses no fluido supercrítico recuperado. Resultados semelhantes foram relatados com a extração do extrato de frutos de *Capsicum annuum* peletizados (amostras frescas e secas) a temperaturas de 35° e 65°C e pressões de 220 e 500 bar (Valle et al., 2003).

A utilização de co-solventes aumentou a extração de extratos. Os maiores rendimentos foram obtidos com CO₂ SC + etanol, exceto com a folha seca a 70°C, em que a quantidade do extrato com CO₂ SC + etanol não foi significativamente diferente da obtida com CO₂ SC + metanol. Os teores dos extratos extraídos com CO₂ SC + etanol da folha fresca foram de 3,07% a 40°C e 2,84% a 70°C, e da folha seca de 2,10% a 40°C e 2,54% a 70°C (Tabela 1a). Esses resultados também foram encontrados por vários pesquisadores com a utilização de diferentes espécies vegetais. Pesquisadores que trabalharam com extrações de folhas de *Helianthus annuus* e *Tabernaemontana catharinensis* e de raízes *Angélica sinensis* (Casas et al., 2006; Pereira et al., 2005; Yongyue et al., 2006) relataram que os resultados das extrações de folhas secas e frescas (congelada) de *Helianthus annuus* utilizando-se CO₂ SC e com os co-solventes metanol, dimetil sulfóxido e água, sob temperaturas de 35°C e 50 °C e pressão de 500 bar, mostraram maiores rendimentos obtidos com aplicações de co-solventes para ambas as condições operacionais testadas. Entre esses, a extração de folhas secas com CO₂ SC + água (5 % em massa) foi a mais elevada. Nas extrações de *Angélica sinensis* (solventes: CO₂ SC, CO₂ + etanol, temperaturas: 45°C e 65 °C pressões de 30 e 500 bar), o maior rendimento foi obtido a 65°C e 500 bar, com o co-solvente etanol (4,06 %) na proporção de 1:6 em relação à matéria-prima, e para a espécie *Tabernaemontana catharinensis* (CO₂ SC e com solventes: etanol, metanol, álcool isopropílico, água e mistura dessa com álcoois, os maiores rendimentos foram encontrados nas extrações com água e na mistura dessa com álcoois (15±1 %). Concluiu-se que esses aumentos estão relacionados com a extração de solutos mais polares da matéria-prima.

Pelos dados da Tabela 2, verificaram-se os resultados de rendimentos dos extratos das folhas frescas e secas de *Piper piscatorum*, obtidos no tempo dinâmico e durante a lavagem sob diferentes condições operacionais de extração. Observa-se que para os rendimentos totais relativos a cada tratamento,

os maiores valores estão relacionados com as extrações dos extratos com CO₂ SC + etanol (2,81 % a 4,10 %), seguido de CO₂ SC + metanol (1,59 % a 2,99 %) e CO₂ SC (0,78 % a 1,98 %). Considerando-se o rendimento total dos extratos (rendimento do extrato obtida no tempo dinâmico + rendimento do extrato obtido na lavagem da tubulação), verifica-se que para todos os tipos de matéria-prima e solvente ocorre uma tendência de aumento do rendimento de extrato com a elevação da temperatura. Nas extrações realizadas com as folhas frescas e CO₂ SC + etanol, constatou-se uma maior retenção do extrato na tubulação. Esse fato pode explicar o efeito da temperatura sobre o rendimento do extrato quando extraído com CO₂ SC + etanol, verificado pelos dados da Tabela 1A, na qual se observa que os teores dos extratos retidos na tubulação oscilaram em função do obtido no tempo dinâmico, sendo de 0,10% a 0,20% para CO₂ SC; 0,71% a 1,26% para CO₂ SC + etanol e de 0,63% a 0,73% para CO₂ SC + metanol. Essas variações podem estar relacionadas com o aumento da viscosidade e densidade dos extratos, bem como da composição dos produtos, promovida pela elevação da polaridade do fluido extrator.

Os espectros no infravermelho dos extratos de folhas frescas de *Piper piscatorum*, extraídos com CO₂ supercrítico e com co-solventes (Figuras 2a, 2b e 2c), apresentam similaridades, com bandas características de amidas, hidrocarbonetos, álcoois, fenóis e ésteres. A presença de amidas secundárias é sugerida pelas representações dos sinais de absorções em 3400 cm⁻¹ (banda larga característica de vibrações de deformação axial de N-H livre de amidas secundárias), 1640 cm⁻¹ (correspondente a vibrações de deformação axial de C = O, denominada de banda de amida I), 1615 cm⁻¹ e 1515 cm⁻¹ (atribuídas a vibrações de deformação angular de N-H, chamada de banda de amida II), 1250 cm⁻¹ (banda resultante da interação entre deformação angular de N-H e a deformação axial de C-N) e 722 cm⁻¹ (correspondente à deformação angular simétrica fora do plano de N-H). A presença de bandas muito intensas em 2954,

2920 e 2849 (estiramento de ligação C-H) e de menor intensidade em 1709 cm^{-1} , 1710 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} (estiramento de ligação C = O) sugerem a presença de compostos alifáticos, principalmente de hidrocarbonetos e ésteres. Os sinais de absorções em 1150 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} podem estar relacionados com a presença de álcoois e fenóis (vibrações de deformação axial de C-O) (Silvestein & Webster, 2000).

Pelas análises realizadas no CG/EM e CG/DIC, pôde-se identificar e quantificar 24 compostos, conforme listado na Tabela 3. Nos extratos obtidos de folhas frescas e secas com CO_2 SC à temperatura de 40°C, foi possível identificar 12 substâncias, correspondendo entre 71,63% e 72,76% do total dos componentes presentes nas amostras. Dos obtidos com o mesmo solvente à temperatura de 70°C, foram identificadas 24 substâncias, totalizando entre 70,37% e 78,59%. Nos extratos obtidos de folhas frescas e secas com co-solventes à 40°C, foram identificados 23 constituintes, sendo 9 em etanol e 14 em metanol, correspondendo de 63,96% e 70,66% dos compostos presentes. Dessas mesmas matérias-primas utilizando co-solventes a 70°C, identificaram-se 44 substâncias, sendo 20 em metanol e 24 em etanol, totalizando de 60,93% a 66,42%, em relação à composição do extrato. Com base na caracterização parcial, os constituintes pertencem às classes das amidas, ácidos graxos, hidrocarbonetos e álcoois. Várias pesquisas relacionadas à caracterização fitoquímica com os constituintes identificados foram publicadas para as espécies *Piper gaudichaudianum*, *P. callosum*, *P. arboreum*, *P. dilatatum*, *P. tuberculatum*, *Ottonia martiana* e *Ottonia corcovadensis*, pertencentes à família Piperaceae (Cunico et al., 2006; Cysne et al., 2005; Facundo et al., 2004; Maia & Milchard, 1987; Peres et al., 2005). Desses, apenas as amidas piperovatina e pipercallosidina, respectivamente, com tempo de retenção de 54,923 e 57,973 minutos no cromatograma (CG-EM), foram referenciadas com efeito anestésico.

A piperovatina e pipercollosidina, de fórmulas moleculares correspondentes a $C_{17}H_{23}NO_2$ e $C_{18}H_{25}NO_3$, apresentaram íons moleculares em m/z 273 (18 %) e m/z 303 (15 %), com picos bases em m/z 173 (100 %) e m/z 135 (100 %), respectivamente, no CG-EM. O pico-base da piperovatina resultou do fragmento (M- 72) decorrente da perda de $\cdot NH-CH_2-CH(CH_3)_2$ do íon molecular, seguido da perda de CO. O pico-base da pipercollosidina ocorreu mediante quebra na ligação β em relação ao anel do íon molecular, seguido de rearranjo, formando o íon tropílio (McLafferty & Turecek, 1993). Esses dados espectrais, juntamente com os demais fragmentos mostrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6, foram consistentes com aqueles descritos na literatura para as referidas amidas (Cunico et al., 2006; Facundo et al., 2004; McFerren & Rodriguez, 1998; Pring, 1982).

As presenças de piperovatina e pipercollosidina em *Piper piscatorum* foram relatadas por McFerren & Rodríguez (1998) em pesquisas com a referida espécie nativa da Amazônia Venezuelana. Neste trabalho, a caracterização química foi realizada por meio de CG-EM e RMN¹H/¹³C.

Comparando-se os perfis cromatográficos, constataram-se modificações da composição química entre os solventes utilizados e com a elevação da temperatura de 40°C para 70°C. De acordo com dados literários, essas variações podem ser atribuídas a vários fatores, como aumentos da polaridade e solubilidade do solvente e volatilidade de analitos. A mudança de perfis cromatográficos foi também encontrada em pesquisas com obtenção dos extratos de *Artemisia sieberi* utilizando CO₂ SC sob diferentes condições operacionais (Pressões: 101 a 304 bar e temperaturas: 35 a 55°C). Neste, o aumento de temperatura a uma pressão constante de extração alterou a composição do extrato por aumentar a volatilidade de analitos (Ghasemi et al., 2007). Na obtenção do extrato de *Cróton zehntneri* utilizando CO₂ SC sob 66,7 bar, essas mudanças ocorreram com a elevação de temperatura de 25°C para 28°C,

reduzindo o componente majoritário *trans*-anetol (87,2% para 82,5%) (Souza et al., 2005). Nas extrações de cafeína de semente de guaraná (*Paullinia cupona*), as mudanças foram presenciadas com adição de co-solventes (5% e 10 % de etanol e 5% de álcool isopropílico) às temperaturas de 50,2°C , 60,2°C e 70,2°C e pressões de 179; 234 e 300 bar, reduzindo os teores de alcalóides e aumentando os de fenóis (Kopcak, 2003).

Pelos dados apresentados na Tabela 3 verifica-se mostram que os extratos de folhas frescas de *Piper piscatorum* extraídos com CO₂ supercrítico sob temperaturas de 40 e 70°C apresentam como componente majoritário a piperovatina (34,52% a 37,77%), seguido de ácido palmítico (27,57% a 29,10%), pipercallosidina (0,60% a 3,49%), *epi*- α -muurolol (0,44% a 1,73%) e heptadecano (1,20% a 1,41%). Nos extratos obtidos com co-solventes a 40°C e 70°C, os teores de piperovatina (13,45% a 30,46%) são seguidos de ácido palmítico (10,11% a 17,53%), pentadecano (3,66% a 13,25%), pipercallosidina (2,87% a 8,71%), β -bisaboleno (0,22% a 7,97%), heptadecano (0,59% a 6,43%), selin-en-4- α -ol (2,83% a 5,81%), δ -cadineno (1,62% a 2,99%) α -copaeno (0,14% a 1,93%), *trans*-cariofileno (0,23 % a 1,80 %), *trans*- α -bergamonteno (0,05 % a 1,55 %) e *trans*- β -farneseno (1%). Os demais constituintes consistem de pequenas quantidades (\angle 1%) de mono e sesquiterpenos e álcoois. Em relação aos extratos extraídos de folhas secas, observou-se que para mesma temperatura e solvente ocorreram oscilações quantitativas dos constituintes, quando comparadas com as de folhas frescas. Essas variações podem ser atribuídas à estabilidade e instabilidade de alguns componentes durante o processo de secagem. Para os compostos majoritários, constatou-se que, com a secagem, houve um aumento no teor de hidrocarbonetos e diminuição do conteúdo de amidas e ácidos graxos. Essas reduções podem ter ocorrido devido à volatilização e/ou autoxidação de compostos insaturados. Baritoux et al. (1992) compararam a constituição química do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum*

basilicum) submetido à secagem com ar aquecido a 45°C com o da planta fresca (testemunha). A composição química do óleo essencial de manjeriço seco apresentou um padrão cromatográfico muito diferente do obtido na testemunha. Os teores de metilchavicol e eugenol decresceram com a secagem, enquanto os teores de *trans*-bergamoteno, linalol e 1,8-cineol aumentaram significativamente. Em pesquisas realizadas com *Lippia alba* constatou-se que a secagem (temperaturas: 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C com respectivos tempos de 205, 110, 70, 45 e 35 min) contribuiu para a redução do rendimento de óleo essencial e para alteração de sua composição química. Observou-se também que entre os constituintes majoritários ocorreu uma conversão oxidativa de geraniol e nerol em geraniol e neral (Barbosa & Barbosa (2006)).

Verifica-se pelos dados da Tabela 4a que, para mesma matéria-prima, a elevação da temperatura de 40°C para 70°C reduziu significativamente a quantidade de piperovatina em ambos os solventes utilizados, exceto para folhas frescas e secas extraídas com CO₂ SC, em que a massa desse composto aumentou em relação à matéria seca. Esses aumentos foram de 0,26% para 0,30% (folhas frescas) e de 0,10% para 0,15% (folhas secas).

Com relação ao tipo de matéria-prima, nota-se que, numa mesma temperatura, houve redução significativa na quantidade de piperovatina extraída de folhas secas, quando comparada com folhas frescas, independentemente do solvente utilizado. Essas reduções ocorreram no teor de piperovatina do extrato e da sua massa em relação à matéria seca (Tabela 4b).

Para o tipo de solvente, verificou-se que o maior teor deste constituinte no extrato foi obtido de folhas frescas extraídas com CO₂ SC a 40 °C (37,77 %), seguido, nessas mesmas condições, de CO₂ SC + etanol (30,46 %) e CO₂ SC + metanol (28,44 %). Não houve diferença significativa do teor de piperovatina entre os co-solventes. Em relação à massa da amida extraída de 100 gramas matéria-prima (b.s.), a maior massa dessa substância foi encontrada na extração

de folhas frescas extraídas com CO₂ SC + etanol a 40°C (0,93 %). Em relação aos demais tratamentos, as quantidades de piperovatina foram significativamente superiores com a utilização desse solvente. Comparando-se os maiores teores de piperovatina encontrados no extrato (CO₂ SC: 37,77 % e CO₂ SC + etanol: 30,46 %) e as suas massas em relação à matéria fresca (CO₂ SC: 0,26 % e CO₂ SC + etanol: 0,93 %), verifica-se que para uma diferença de teor de 7,31 % tem-se uma proporção de massas de 1:3,6 da referida amida. Com base nesses dados, a extração de piperovatina com CO₂ SC + etanol é mais significativa.

Os dados relativos à pipericallosidina, apresentados na Tabela 5a, mostram uma significativa redução dessa amida com a elevação da temperatura (40°C p/ 70°C) quando extraída de mesma matéria-prima e com co-solventes. O aumento significativo desse composto somente foi observado quando extraído de folhas frescas com CO₂ SC (extrato de 0,60% p/ 3,49% e em relação à matéria-prima de 0,0004% p/ 0,031%).

Os efeitos da secagem da matéria-prima sobre os rendimentos de pipericallosidina (Tabela 5b) foram semelhantes aos encontrados com piperovatina, exceto para as extrações de folhas frescas e secas com CO₂ SC a 40°C, em que as massas dessa amida em relação à matéria-prima não apresentaram diferença significativa (folha fresca: 0,004 % e folha seca: 0,002 %). Entre os tipos de solventes utilizados, também foram observadas diferenças significativas da quantidade de pipericallosidina, exceto para extração de folhas secas a 70°C, em que o teor desse composto no extrato e a sua massa em relação à matéria seca não foram significativos. A extração realizada a 40°C de folhas frescas com CO₂ SC + metanol foi a que apresentou o maior teor desse composto (8,71%), seguido de CO₂ SC + etanol (7,82%) e CO₂ (0,60%). Considerando-se a matéria-prima (b.s.), a maior massa foi obtida na extração a 40°C de folhas frescas com CO₂ SC + etanol (0,24 %), seguido de CO₂ SC + metanol (0,085 %) e CO₂ SC (0,004 %). A diferença entre os maiores teores de

pipercallosidina encontrados no extrato de 0,89 % e a razão de suas massas em relação à matéria seca de 1:2,8 mostram uma superioridade do CO₂ SC + etanol na extração dessa amida.

Com base na análise complementar, a redução do teor de piperovatina com a elevação da temperatura pode estar relacionada com o aumento da solubilidade do solvente e volatilidade de analitos, favorecendo a presença de novas substâncias no extrato, conforme dados de identificação de constituintes apresentados na Tabela 3. O maior rendimento ocorrido na presença de co-solventes deve-se à elevação da seletividade do solvente para amida, o que não foi possível apenas com o aumento da densidade do CO₂ SC. A diminuição presenciada na matéria-prima provavelmente ocorreu devido à autoxidação alfa à ligação dupla, formando hidroperóxidos, aldeídos, cetonas. Os produtos do processo oxidativo não foram identificados.

Para a pipercallosidina, verificaram-se efeitos semelhantes aos encontrados com a piperovatina, exceto quando se utilizou CO₂ SC em folhas frescas. Neste, o aumento da temperatura de extração elevou o teor da amida e, a 40°C, para o tipo de matéria-prima não houve diferença significativa. Essas exceções podem ser atribuídas ao maior poder de solvatação do CO₂ SC nessas condições, com conseqüente aumento da quantidade de pipercallosidina extraída.

Não foram encontradas na literatura informações sobre a obtenção dos extratos e/ou de frações contendo as amidas pesquisadas, com CO₂ supercrítico sob diferentes condições de operação e preparação da matéria-prima. As informações literárias disponíveis reportam apenas para a obtenção padronizada dos extratos a frio com solventes polares (etanol, metanol, etc), seguido de fracionamento e isolamento, utilizando-se diferentes técnicas cromatográficas (HPLC, CCD e CC) para fins de caracterização química (Cunico et al., 2006; Facundo et al., 2004; Mcferren & Rodriguez, 1998; Pring, 1982). Em relação a

essa classe de compostos, têm-se encontrado pesquisas com extrações, de alcaloides de raízes frescas e secas de *Echinacea angustifolia*, utilizando CO₂ SC nas temperaturas de 45°C e 60°C sob pressões de 340 e 550 bar. Pelos resultados, verificou-se que o maior rendimento dessa substância foi obtido de raízes secas na temperatura e pressão mais elevada (Sun et al., 2002). Resultados semelhantes, em que o uso de co-solventes aumentou a seletividade do CO₂ SC para substâncias ativas, foram encontrados na literatura para as extrações de cafeína (10% de etanol, a 70,2°C e pressão de 179 bar), flavanóides (50% de etanol em relação à matéria-prima a 50°C e pressão de 250 bar) e coronadina/voacangina (4,6% etanol a 35°C e pressão de 250 bar), respectivamente, obtidas das espécies *Paullinia cupona* (Kopcak, 2003), *Humulus lupulus* (Guo-qing et al., 2005) e *Tabernaemontana catharinensis* (Pereira et al., 2005).

4 CONCLUSÕES

Pelas análises cromatográficas dos extratos das folhas frescas de *Piper piscatorum*, pôde-se identificar 24 compostos, tendo como componente majoritário a piperovatina, seguido de ácido palmítico, pentadecano e pipercallosidina.

A secagem das folhas realizada no período de seis dias a 30°C promoveu um aumento do rendimento de extrato, exceto com a utilização de CO₂ + etanol.

A composição química do extrato foi significativamente modificada com a secagem, reduzindo principalmente os teores de amidas com potencial anestésico.

Os maiores rendimentos (% p/p) dos extratos, de piperovatina e pipercallosidina foram obtidos de folhas frescas extraídas com CO₂ + etanol a 40°C, sob pressão de 400 bar.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA - Acre, ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio Pesquisa e Extensão de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro e bolsas concedidas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<<http://www.supercriticalfluids.com/prod150.htm>>. Acesso em: dez. 2006.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.

AOCS Official Method Da2b-42. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. 4. ed. Champaign: American Oil Chemists Society, 1994.

BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C. A. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, nov./dez. 2006.

BARITAU, O.; RICHARD, H.; TOUCHE, J.; DERBESY, M. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. Part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 7, p. 267-271, 1992.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; GORDILLO, M. D.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; OSSA, E. M. Effect of the pré-treatment of the samples on the natural substances extraction from *Helianthus annuus* L. using supercritical carbon dioxide. **Talanta**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 175-181, July 2005.

CASAS, L.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; GORDILLO, M. D.; TORRES, A.; MACÍAS, F. A.; OSSA, E. M. Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 1, p. 1-7, 2006.

CUNICO, M. M.; DIAS, J. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana*. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 746-749, jul./ago. 2006.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; PEITZ, C.; AUER, C. G.; JÚNIOR, G. Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia Martiana*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 77-82, dez. 2003.

CYSNE, J. B.; CANUTO, K. M.; PESSOA, O. D. L.; NUNES, E. P.; SILVEIRA, E. R. Leaf essential oils of four piper species from the states of Ceará – northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1378-1381, Nov./Dec. 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Amazônia Oriental. **Caracterização e classificação dos solos do Campo Experimental da Embrapa Acre, Rio Branco, Estado do Acre**. Zoneamento Agroecológico. Belém, 2001.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R.; Constituintes químicos de *Ottona Corcovadensis* Miq. da Floresta Amazônica. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 79-83, jan./fev. 2004.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**, Lavras: UFLA, 2000.

GHASEMI, E.; YAMINI, Y.; BAHRAMIFAR, N.; SEFIDKON, F. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia sieberi*. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 306-311, Mar. 2007.

GUO-QUING, H.; HAO-PING, X.; QI-HE, C.; HUI, R.; ZHAO-YUE, W. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal ZHEJIANG Univ SCI**. v. 10, p. 999-1004, 2005.

GUPTA, M. P. Investigaciones farmacognósticas sobre la flora Panaména. **Annales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 70, p. 839-842, 2004.

KOPCAK, U. **Extração de cafeína das sementes da planta do guaraná (*Paullinia cupana*) com dióxido de carbono supercrítico e co-solventes**. 2003. 178 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 10-26, 2001.

LI, S.; HARTLAND, S. Supercritical fluid extraction of aikylamides from *Echinacea angustifolia*. **Journal of Supercritical Fluids**, Ottawa, v. 5, n. 14, p. 3947-3953, 2002.

MAIA, J. G. S.; MILCHARD, M. J. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, p. 200-204, 1987.

MAKAPUGAY, H. C.; DOJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; BORDAS, E. Piperovatina, the tongue-numbing principle of *Ottonia Frutesces*. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 7, n. 2, p. 235-236, 1983.

MANCINI, B. Influência de tempo de destilação na composição qualitativa e quantitativa de óleos essenciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 6, p. 1-7, 1984.

MARTINS, E. R. **Morfologia interna e externa, caracterização isozimática e óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth.** 1996. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1994.

MCFERREN, M. A.; RODRÍGUEZ, E. Priscidal properties of piperovatina from piper piscatorum (*Piperaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, Ithaca, v. 60, n. 2, p. 183- 187, Mar. 1998.

MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. **Interpretation of mass spectra.** 4. ed. California: University Science Books, 1993.

MING, L. C. **Levantamento de plantas medicinais na reserva extrativista Chico Mendes – Acre.** 1995. 192 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Julho de Mesquita Filho, Botucatu, SP.

MING, L. C.; FERREIRA, L. A. **Plantas medicinais utilizadas pelos seringueiros na Reserva Extrativista Chico Mendes, Acre.** Paraná: Universidade Federal do Paraná, 1992.

MOHAMED, R. S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluídos supercríticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 344-353, dez. 1997.

MOHAMED, R. S. Extração e fracionamento de produtos de ocorrência natural com fluidos supercríticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, p. 344-345, 1997.

MOHSENIN, N. N. **Physical properties of plant and animal materials**. 14. ed. New York: Gordon and Breach, 1970.

OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma cacao*)**. 2005. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

PEREIRA, C. G.; LEAL, P. F.; SATO, D. S.; MEIRELES, M. A. A. Antioxidant and catharinensis extracts obtained by supercritical CO₂ + cosolvent. **Journal of Medicinal Foods**, New Rochelle, v. 8, n. 4, p. 533-538, 2005.

PERES, V. F.; SAFFI, J.; MELECCHI, M. I.; ABAD, F. C.; MARTINEZ, M. M.; OLIVEIRA, E. C.; JACQUES, R. A.; CARAMAO, E. B. Optimization of pressurized liquid extraction of piper gandichandianum kunt leaves. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1105, n. 1/2, p. 148-153, Feb. 2006.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, May/Apr. 2006.

PLETSCH, M.; SANT'ANA, A. E. G. Secondary compound accumulation in plants – the applications of plant biotechnology to plant improvement. **Chemistry of Amazon ACS Symposium Series**, Washington, v. 588, p. 51-64, 1995.

PRING, B. G. Isolation and identification of amides from piper-callosum syntesis of piper-callosine and piper-callosidine. **Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions**, Cambridge, v. 1, n. 7, p. 1493-1498, 1982.

SANDLER, S. I. **Peng-Robinson equation of state program for a pure fluid for use**. 2. ed. Newark: Wiley and Sons, 1987.

SCHOCH, T. J.; LEACH, W. H. Determination of Absolute Density Liquid Displacement. In: WHESTLES, R. L.; WOLFROM, M. L. (ED.). **Methods in Carbohydrates Chemistry**. New York: Academic Press, 1964. v. 4, p. 101-103.

SCHULTES R. E. **New England Botanical Club**, v. 77, p. 165, 1975.

SILVA-JUNIOR, A. A.; VIZZOTO, V. I.; GIORGI, E.; MACEDO, S. G.; MARQUES, L. F. **Plantas medicinais: caracterização e cultivo**. Santa Catarina: EPAGRI, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; WESBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2003.

SOUSA, E. M. B. D.; MARTINEZ, J.; CHIAVONE-FILHO, O.; ROSA, P. T. V.; DOMINGOS, T.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of volatine oil from croton zehntneri pax et hoff wiht pressurized CO₂: solubility, composition and kinetics. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 325-333, Aug. 2005.

SUN, L.; KARAMATOLAH, A. R.; FERAL, T.; BUNCHA, O. Supercritical fluid extraction of alkylamides from Echinacea angustifolia. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 14, p. 3947-3953, 2002.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos contituíntes voláteis do sabor. **Boletim da Socidde Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 52-59, jan./jun. 2000.

VALLE, J. M.; BELLO, S.; THIEL, J.; ALLEN, A.; CHORDIA, L. Comparision of conventional and supercritical CO₂-extracted rosehip oil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n. 3, p. 335-348, 2000.

VALLE, J. M.; JIMÉNEZ, M.; NAPOLITANO, P.; ZETZL, C.; BRUNNER, G.; Supercritical carbon dioxide extraction of palletized jalapeno peppers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n. 6, p. 550-556, May 2003.

YONGYUE, S.; SHUFEN, L.; HUITING, S.; SONGJIANG, T. Extraction of ferulic acid from *Angelica sinensis* with supercritical CO₂. **Natural Product Research**, v. 20, p. 835-841, 2006.

ANEXO

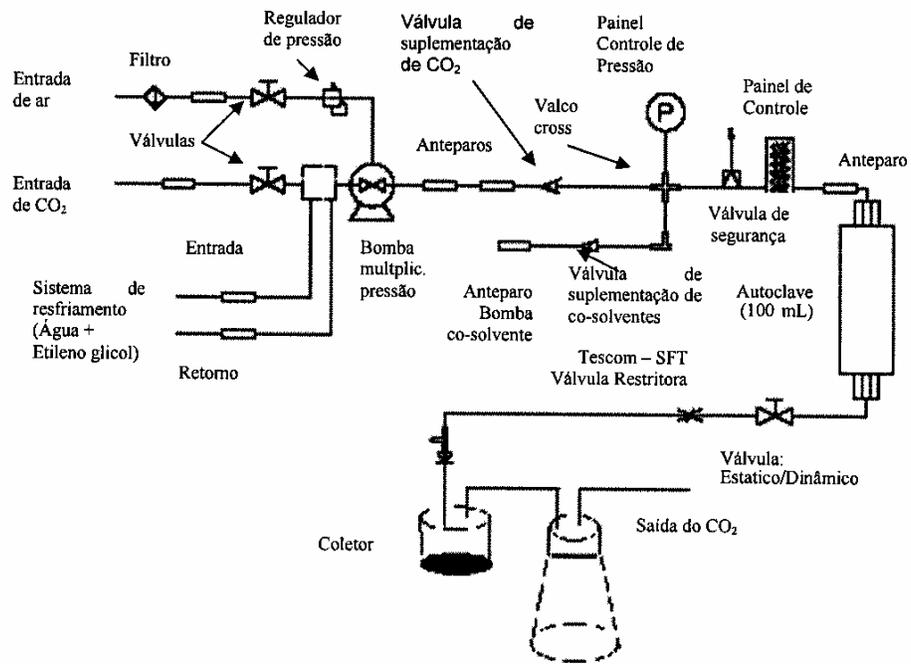


FIGURA 1. Esquema do equipamento de fluido supercrítico em escala de laboratório ([http:// www.supercriticalfluids.com/prod 150.htm](http://www.supercriticalfluids.com/prod150.htm)).

TABELA 1a. Valores médios dos rendimentos dos extratos (% b.s.) de *Piper piscatorum*, obtido durante o tempo dinâmico, em função do tipo de solvente e da temperatura de extração para folhas frescas e secas.

Solventes	Matérias-primas			
	Folhas frescas		Folhas secas	
	40°C	70°C	40°C	70°C
CO ₂ SC	0,68aA	0,86aA	1,02aA	1,78aB
CO ₂ + Etanol	3,07cB	2,84cA	2,10cA	2,54bB
CO ₂ + Metanol	0,96bA	1,64bB	1,60bA	2,36bB

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma matéria-prima na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) = 6,75 Média Geral = 1,79

TABELA 1b. Valores médios dos rendimentos dos extratos (% b.s.) de *Piper piscatorum*, obtido durante o tempo dinâmico, em função do tipo de solvente e da matéria-prima para as temperaturas de 40 °C e 70 °C.

Solventes	Temperaturas de extração			
	40 °C		70 °C	
	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas
CO ₂ SC	0,68aA	1,02aB	0,86aA	1,78aB
CO ₂ + Etanol	3,07cB	2,10cA	2,84cB	2,54bA
CO ₂ + Metanol	0,96bA	1,60bB	1,64bA	2,36bB

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma temperatura na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV(%) = 6,75 Média Geral = 1,79

TABELA 2. Valores médios de rendimentos dos extratos (% b.s.) das folhas frescas e secas de *Piper piscatorium*, extraídos com CO₂ supercrítico e com co-solventes durante o período dinâmico e após limpeza da tubulação.

Solventes	Temperaturas de extração						
	40°C			70°C			
	Folhas frescas		Total	Folhas frescas		Total	
	Rend. 1	Rend. 2		Rend. 1	Rend. 2		
	CO ₂ SC	0,68	0,10	0,78	0,86	0,18	1,06
CO ₂ + Etanol	3,07	1,01	4,08	2,84	1,26	4,10	
CO ₂ + Metanol	0,96	0,63	1,59	1,64	0,73	2,37	
Solventes	Folhas secas		Folhas secas				
	Rend. 1	Rend.2	Rend. 1	Rend. 2			
	CO ₂ SC	1,02	0,16	1,19	1,78	0,20	1,98
	CO ₂ + Etanol	2,10	0,71	2,81	2,54	0,76	3,31
	CO ₂ + Metanol	1,60	0,66	2,26	2,36	0,63	2,99

Rend 1= Rendimento de extrato obtido no tempo dinâmico

Rend 2 = Rendimento de extrato obtido na lavagem da tubulação

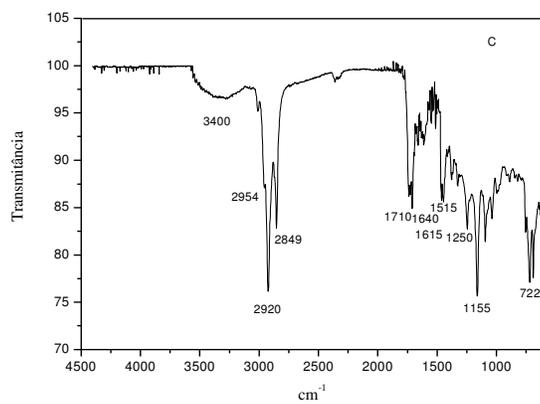
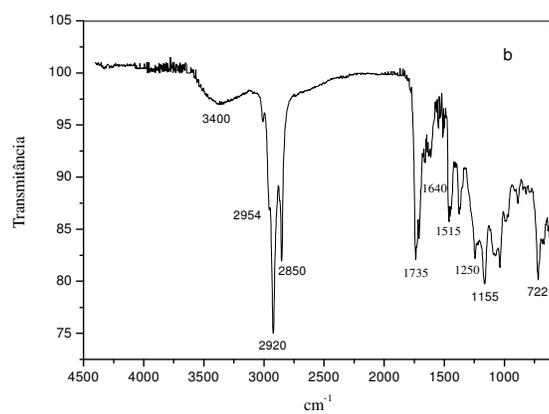
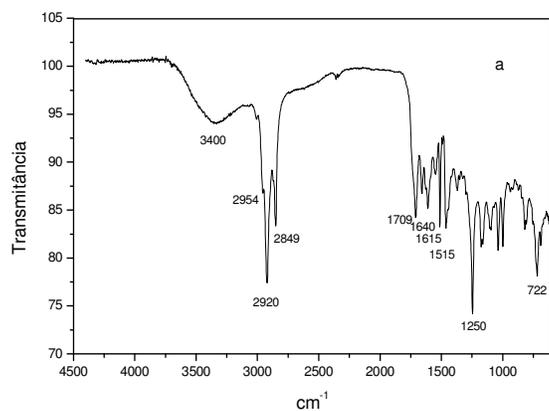


FIGURA 2. Espectros no infravermelho dos extratos com CO₂ supercrítico (a), CO₂ supercrítico + etanol (b) e CO₂ supercrítico + metanol (c)

TABELA 3. Composição química (% Área)* de extratos obtido de *Piper piscatorum*

Constituintes	IK**	Folha fresca (40 °C)			Folha seca (40 °C)		
		T1	T2	T3	T1	T2	T3
Cânfora	1147	0,14	-	-	0,24	-	-
α -copaeno	1374	-	-	0,14	-	-	0,78
<i>trans</i> -cariofileno	1416	-	0,37	0,23	-	6,78	5,70
<i>trans</i> - α -bergamonteno	1435	-	-	0,05	-	-	0,22
Germocrema D	1478	0,31	-	-	0,23	-	1,41
Pentadecano	1501	0,04	3,66	7,71	11,53	7,64	12,28
β -bisaboleno	1508	-	0,22	-	-	0,29	-
δ -cadineno	1522	0,20	-	-	3,64	-	1,00
<i>trans</i> -nerolidol	1564	0,15	-	0,06	1,56	-	0,06
Espatuleno	1574	-	-	0,12	-	-	0,30
Globulol	1581	0,16	0,25	0,29	0,28	0,16	0,20
<i>epi</i> - α -muurolo	1641	1,73	-	-	1,20	-	-
Selin-11-en-4- α -ol	1653	0,23	3,06	4,43	3,30	2,42	2,65
Heptadecano	1699	1,20	0,59	5,31	18,91	15,54	18,49
Ácido palmítico	1986	29,10	17,53	14,51	21,45	8,05	11,36
Piperovatina	***	37,77	30,46	28,44	10,23	19,45	13,56
Pipericallosidina	***	0,60	7,82	8,71	0,19	1,30	2,65
Total identificado		71,63	63,96	70,00	72,76	61,63	70,66
		Folha fresca (70 °C)			Folha seca (70 °C)		
Terpinoleno	1090	0,07	-	-	0,19	0,06	-
Cânfora	1147	0,28	-	-	0,43	0,25	-
α -copaeno	1374	0,05	1,24	1,93	1,8	1,83	2,35

...continua

Tabela 3, Cont.

β -elemeno	1390	0,06	-	0,28	0,54	0,19	0,15
<i>trans</i> -cariofileno	1416	0,06	1,69	1,80	3,08	5,60	3,59
<i>trans</i> - α -bergamonteno	1435	0,16	0,97	1,55	2,50	0,68	3,54
α -humuleno	1451	0,05	-	0,31	0,35	0,27	0,58
<i>trans</i> - β -farneseno	1458	0,05	-	1,00	7,06	3,85	4,86
γ -muuroleno	1474	0,11	-	0,10	0,83	1,23	0,13
Germocrema D	1478	0,58	0,93	0,35	0,54	1,86	0,42
Pentadecano	1501	0,07	10,71	13,25	11,99	15,61	17,78
β -bisaboleno	1508	0,13	7,97	-	6,43	5,56	-
δ -cadineno	1522	0,19	1,62	2,99	3,35	2,29	2,66
α -cadineno	1535	0,13	0,29	0,25	0,70	0,14	1,47
<i>trans</i> -nerolidol	1564	0,16	0,56	0,30	0,49	0,40	0,19
Espatuleno	1574	0,05	0,33	0,29	0,65	0,44	0,56
Globulol	1581	0,08	0,27	0,31	0,17	0,20	0,19
epi- α -cadinol	1640	0,13	-	0,03	0,25	0,21	0,12
epi- α -muurolol	1641	0,44	-	-	-	0,16	-
Selin-11-em-4- α -ol	1653	0,53	2,83	5,81	2,30	2,65	2,31
Heptadecano	1699	1,41	2,88	6,43	8,15	5,38	8,14
Ácido palmítico	1986	27,57	10,11	12,68	17,85	8,36	8,48
Piperovatina	***	34,52	15,01	13,45	8,63	8,95	7,50
Pipercollosidina	***	3,49	3,52	2,87	0,25	0,25	0,20
Total identificado		70,37	60,93	65,98	78,59	66,42	65,22

*Médias obtidas de três repetições; **Índices de Kovats calculados; T1 = CO₂ SC; T2 = CO₂ SC + etanol; T3 = CO₂ SC + metanol; *** Não encontrado em literatura.

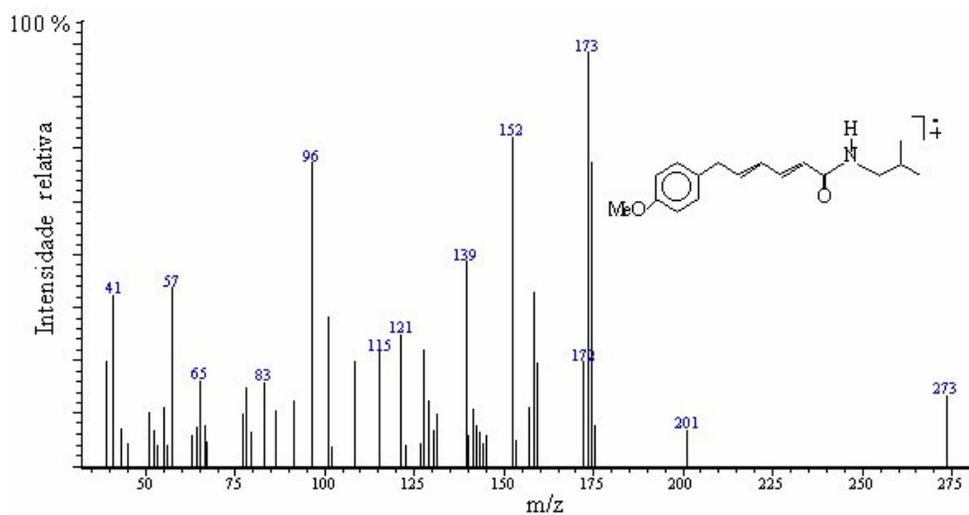


FIGURA 3. Espectro de massa de piperovatina.

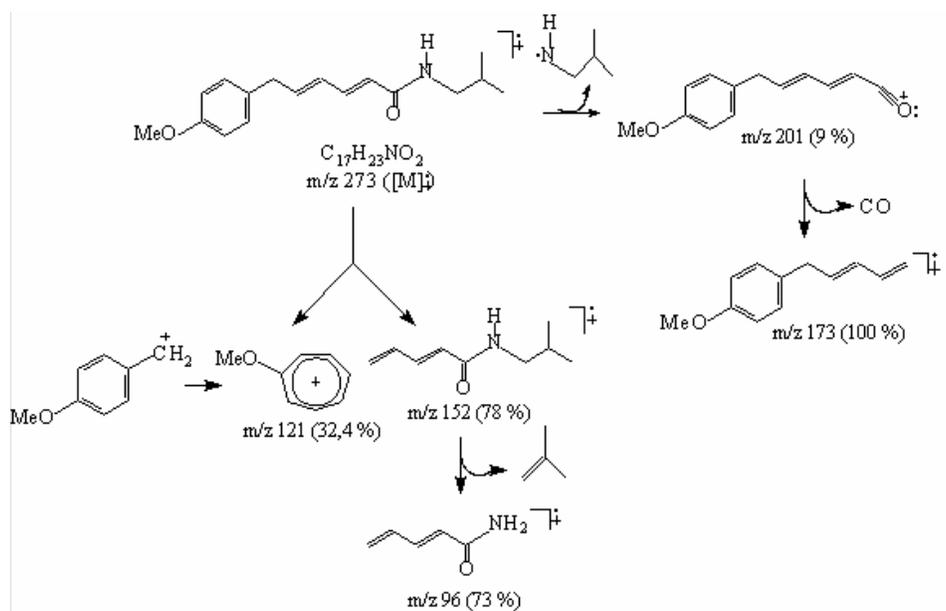


FIGURA 4. Fragmentos atribuídos aos picos principais observados no espectro de massa de piperovatina.

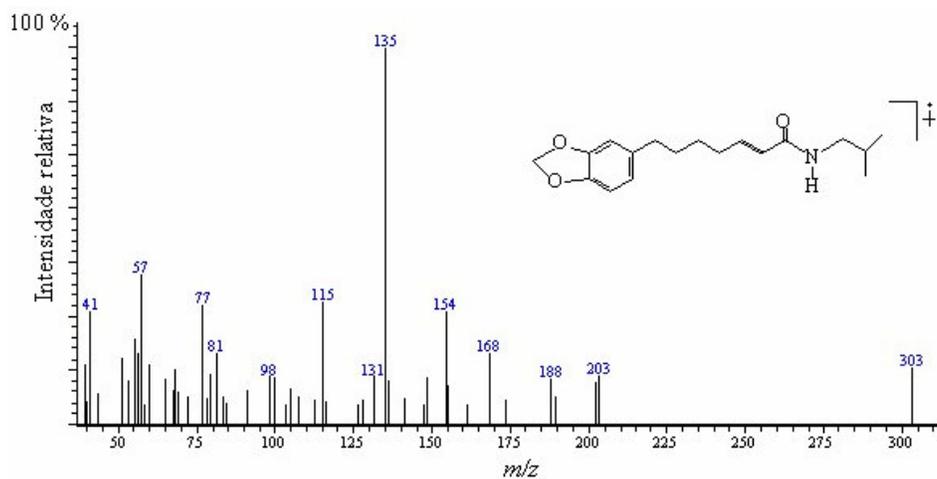


FIGURA 5. Espectro de massa de pipercolosidina

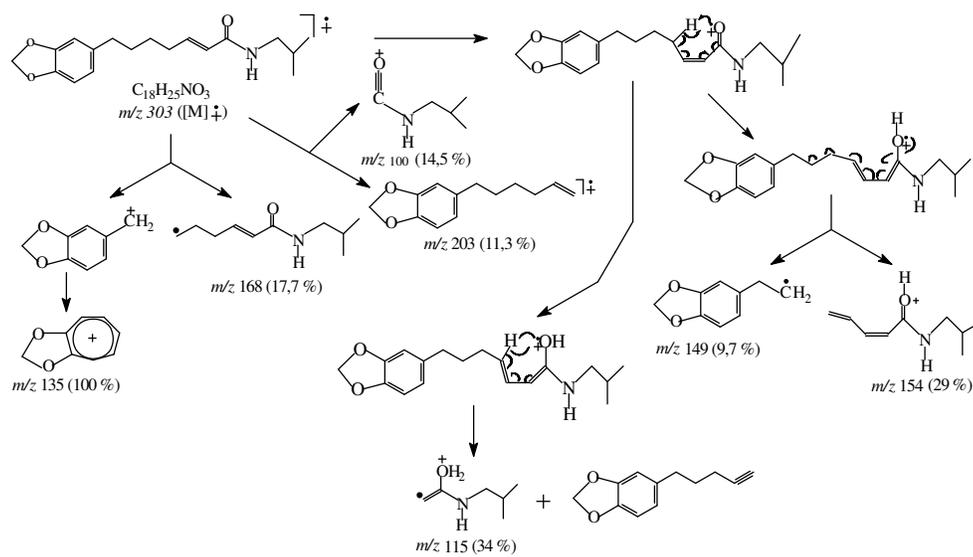


FIGURA 6. Fragmentos atribuídos aos picos principais observados no espectro de massa de pipercolosidina

TABELA 4a. Valores médios de piperovatina obtida de *Piper piscatorum* em função do tipo de solvente e temperatura de extração, em cada matéria-prima utilizada.

Solventes	Temperaturas de extração							
	Folhas frescas				Folhas secas			
	40°C	70°C	40°C	70°C	40°C	70°C	40°C	70°C
	(% Área)*		g/100 de M.S.**		(% Área)		g/100 de M.S.	
CO ₂ SC	37,77bB	34,52bA	0,26aA	0,30bB	10,23aB	8,63aA	0,10aA	0,15aB
CO ₂ SC+	30,46aB	15,01aA	0,93bB	0,43cA	19,45bB	8,95aA	0,41cB	0,23bA
Etanol								
CO ₂ SC+	28,44aB	13,45aA	0,27aB	0,22aA	13,56aB	7,50aA	0,22bB	0,18aA
Metanol								

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma matéria-prima na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**M.S. = Matéria seca

*CV(%) = 7,69 Média Geral = 19,27; ** CV(%) = 5,66 Média Geral = 0,31

TABELA 4b. Valores médios de piperovatina obtida de *Piper piscatorum*, em função do tipo de solvente e matéria-prima, em cada temperatura de extração.

Solventes	Temperaturas de extração							
	40°C				70°C			
	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas
	(% Área)*	g/100 de M.S.**	(% Área)	g/100 de M.S.				
CO ₂ SC	37,77bB	10,23aA	0,26aB	0,10aA	34,52bB	8,63aA	0,30bB	0,15aA
CO ₂ SC+	30,46aB	19,45bA	0,93bB	0,41cA	15,01aB	8,95aA	0,43cB	0,23bA
Etanol								
CO ₂ SC+	28,44aB	13,56aA	0,27aB	0,22bA	13,45aB	7,50aA	0,22aB	0,18aA
Metanol								

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma temperatura na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

M.S. = Matéria seca.

*CV(%) = 7,69 Média Geral = 19,27; ** CV(%) = 5,66 Média Geral = 0,31

TABELA 5a. Valores médios de pipericallosidina obtida de *Piper piscatorum* em função do tipo de solvente e temperatura de extração, em cada matéria-prima utilizada.

Solventes	Temperaturas de extração							
	Folhas frescas				Folhas secas			
	40°C	70°C	40°C	70°C	40°C	70°C	40°C	70°C
	(% Área)*	g/100 de M.S.**	(% Área)	g/100 de M.S.				
CO ₂ SC	0,60aA	3,49bB	0,004aA	0,031aB	0,19aA	0,25aA	0,002aA	0,005aA
CO ₂ SC+	7,82bB	3,52bA	0,240cB	0,100cA	1,30bB	0,25aA	0,030bB	0,006aA
Etanol								
CO ₂ SC+	8,71cB	2,87aA	0,085bB	0,047bA	2,65cB	0,20aA	0,042cB	0,005aA
Metanol								

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma matéria-prima na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

M.S. = Matéria seca

*CV(%) = 8,12 Média Geral = 2,65; ** CV(%) = 10,71 Média Geral = 0,05

TABELA 5b. Valores médios de pipercollosidina obtida de *Piper piscatorum*, em função do tipo de solvente e matéria-prima, em cada temperatura de extração.

Solventes	Temperaturas de extração							
	40°C				70°C			
	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas	Folhas frescas	Folhas secas
	(% Área)*		g/100 de M.S.**		(% Área)		g/100 de M.S.	
CO ₂ SC	0,60aB	0,19aA	0,004aA	0,002aA	3,49bB	0,25aA	0,031aB	0,005aA
CO ₂ SC+	7,82bB	1,30bA	0,240cB	0,030bA	3,52bB	0,25aA	0,100cB	0,006aA
Etanol								
CO ₂ SC+	8,71cB	2,65cA	0,085bB	0,042cA	2,87aB	0,20aA	0,047bB	0,005aA
Metanol								

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula para mesma temperatura na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

M.S. = Matéria seca

*CV(%) = 8,12 Média Geral = 2,65; ** CV(%) = 10,71 Média Geral = 0,05

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE SECAGEM SOBRE O RENDIMENTO E A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) BUR. & K. SHUM.

RESUMO

Pimentel, Flávio Araújo. **Influência da Temperatura de Secagem Sobre o Rendimento e a Composição Química do Óleo Essencial de *Tanaecium Nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum)**. 2007. p. 178. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Neste trabalho foi avaliada a influência da temperatura do ar de secagem (30 °C e 40°C) sobre o teor e composição química dos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação de folhas, caules e raízes de *Tanaecium nocturnum*. **Os óleos** foram identificados e quantificados por CG/EM e CG/DIC, apresentando como componente majoritário o benzaldeído, seguido de álcool benzílico e mandelonitrila. A secagem a partir de 30°C, de raízes, caules e folhas, proporcionou elevadas perdas do óleo essencial, com variações quantitativas da sua composição química, com ênfase para a eliminação ou redução do teor de mandelonitrila.

Palavras-chave: *Tanaecium nocturnum*, óleo essencial, caracterização química.

* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora); Fabiana Queiroz - UFLA; Luiz Roberto Batista – UFLA (Co-orientadores)

ABSTRACT

Pimentel, Flávio Araújo **The Influence Of Drying Temperature On The Yield And The Chemical Composition Of The Essential Oil From *Tanaecium Nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum.** 2007. p. 178. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The influence of the drying temperature (30 °C and 40 °C) on the yield and chemical composition of the essential oils extracted by steam distillation from the leaves, stems and roots of *Tanaecium nocturnum* was studied. The components of the oils were identified and quantified by GC/MS and GC/FID. The principal component was benzaldehyde, followed by benzyl alcohol and mandelonitrile. Drying of the roots, stems and leaves at a temperature higher than 30 °C resulted in large losses of the essential oil with quantitative variations in the chemical composition, especially in the elimination or reduction in the mandelonitrile content.

Keywords: *Tanaecium nocturnum*; essential oil; chemical characterization

* Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Major Professor); Fabiana Queiroz – UFLA and Luiz Roberto Batista – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor e exportador de óleos essenciais e de alguns de seus componentes puros. As essências mais produzidas no país são os óleos cítricos, menta, eucalipto, geranium, citronela, vetiver, palma rosa e cravo (Keifer, 1986).

Os óleos essenciais constituem um tipo de metabólito secundário de plantas que têm grande importância econômica, destacando-se o setor alimentício, farmacêutico e perfumaria. Por essa razão, vem crescendo, mesmo que de forma lenta, o número de estudos sobre a constituição e as propriedades biológicas dessas essências, bem como os fatores taxonômicos, ambientais e de cultivo que levam à variação tanto na quantidade como na qualidade desses óleos (Simões, 2003).

Na Amazônia, a maioria dos óleos essenciais é pouco comercializada, sendo extraídos de plantas aromáticas silvestres de maneira rudimentar. Dessa forma, a população nativa extrai diversos óleos essenciais e óleos-resinas, os quais são utilizados popularmente, sem atender a qualquer padrão de qualidade para aproveitamento em outros mercados. Os óleos essenciais são utilizados em diferentes áreas, sendo largamente empregados na indústria química de perfumaria, farmacologia, inseticidas, fungicidas, alimentos, bebidas, anti-sépticos, estimulantes, etc. (Maia & Milchard, 1987).

Espécies com variadas aplicações são utilizadas pelos habitantes amazônicos de forma *in natura* ou pré-processada, sem nenhum conhecimento da composição química e/ou do nível de toxicidade. Entre essas espécies, encontra-se o *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum, pertencente à família Bignoniaceae. Conhecida como cipó vick ou cipó-carimbó, é uma planta trepadeira, cujas partes apresentam cheiro forte, característico de

amêndoas amargas. Suas folhas são utilizadas externamente pela população como analgésico. Os índios da aldeia de Gotira, localizada às margens do rio São Fresco, afluente do rio Xingu, utilizam esse cipó para combater picadas de abelhas e formigas (saúvas) e como descongestionante nasal (Gottlieb, 1981; Ming, 1985).

A qualidade adequada das matérias-primas deve ser realizada de acordo com bases científicas e técnicas. Nos procedimentos rotineiros de análises de qualidade, geralmente é preconizado o emprego de metodologias químicas, físicas ou físico-químicas e biológicas, sendo necessária a correlação entre os parâmetros analisados e a finalidade a que se destinam (Simões, 2003). Parâmetros essenciais para qualidade da matéria-prima vegetal podem variar, dependendo da procedência do material. Sendo assim, a origem geográfica e as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, colheita, secagem e armazenamento devem ser conhecidas (Harbone, 1973; List & Schmidt, 1989; Simões, 2003).

A utilização de material vegetal fresco pode ser indispensável para a produção e detecção de alguns componentes específicos. Seu emprego traz a vantagem de evitar a presença de substâncias oriundas do metabolismo de fenecimento vegetal. Por outro lado, o material deve ser imediatamente processado ou conservado a baixas temperaturas. O material seco apresenta maior estabilidade química, devido à interrupção de processos metabólicos que ocorrem, mesmo após a coleta da planta. Nesse sentido, as condições da matéria-prima a ser processada irá depender de resultados de pesquisas fundamentadas no produto final que se quer obter (Silva & Casali, 2000; Simões, 2003).

Diante do exposto, objetivou-se identificar e quantificar os seus constituintes químicos voláteis e avaliar o efeito da temperatura de secagem da matéria-prima na produção de óleos essenciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Colheita

O material genético foi coletado de população nativa de *Tanaecium nocturnum*, situada na Reserva Florestal da Embrapa Acre, localizada no município de Rio Branco, AC. A colheita foi realizada no mês de janeiro/2005, no período das 8 às 10 horas, desprendendo o cipó das árvores e erradicando-o do solo. A temperatura local encontrava-se em torno de 25°C. Em seguida, as plantas foram submetidas às operações de seleção e lavagem, separando-se as partes da planta (raiz, caule e folha) e descartando os materiais atacados por praga ou doenças. Acondicionaram-se as matérias-primas separadamente em caixas de isopor, sob refrigeração (gelo) e transportando-as via aérea para o Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras, MG.

Condições Edafoclimáticas

O tipo de clima dominante nessa área é AW, caracterizado pela ocorrência de temperatura média do mês mais frio superior a 18°C e uma estação seca de pequena duração (EMBRAPA, 2001).

O regime térmico é caracterizado por temperatura média anual em torno de 24,3°C. Os meses mais quentes são setembro, novembro e dezembro, com temperaturas médias em torno de 25°C. O período mais frio está compreendido pelos meses de junho e julho, com temperaturas médias de 22,9°C e 22°C, respectivamente. É freqüente uma queda brusca de temperatura, pela ocorrência de ondas de frio, que pode atingir até 4°C, com duração de 3 a 8 dias (EMBRAPA, 2001).

O regime pluviométrico da região caracteriza-se por um período chuvoso de sete meses, de outubro a abril, sendo os meses de dezembro a março

os mais chuvosos. A precipitação média anual na região situa-se em torno de 1.950 mm, correspondendo o período chuvoso ao período mais quente do ano. O trimestre mais chuvoso, janeiro, fevereiro e março, é responsável por cerca de 40% da precipitação total anual. O período seco prolonga-se por cinco meses, de maio a setembro, com uma precipitação média que varia de 11 mm a 83 mm ao mês (EMBRAPA, 2001).

O solo foi classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico. A classe de textura é de média/argilosa (EMBRAPA, 2001).

Secagem

Para avaliar a influência da temperatura do ar de secagem sobre os teores e composições químicas dos óleos essenciais de raízes, caules e folhas de *Tanaecium nocturnum*, foram utilizados secadores de bandejas com circulação de ar, a temperaturas de 30°C e 40°C, por um período de 6 dias (Barbosa & Barbosa, 2006).

Determinação da umidade

Para a determinação da umidade, utilizaram-se 5 gramas de matérias-primas frescas e secas picadas, emergidas em 50 mL de ciclohexano (C₆H₁₂). Esse material foi emergido no respectivo solvente, colocado em balão volumétrico com capacidade para 250 mL, acoplado a um condensador, com coletor volumetricamente graduado. O aquecimento foi realizado por meio de manta aquecedora, controlando-se a temperatura para 100±5°C. Após o processo de destilação, realizado por 3 horas, quantificou-se o volume de água presente nas matérias-primas. A umidade foi calculada levando-se o teor de água contido em 100 gramas da amostra (AOCS, 1994; Pimentel et al., 2006).

Obtenção do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação, utilizando um aparelho Clevenger modificado, acoplado a um balão de 1 L. Nesse aparelho, foram colocados 50 g de matéria-prima picada, juntamente com 500 mL de água destilada. O tempo de extração, determinado por meio de testes preliminares, foi de 4 horas, contado a partir do momento de ebulição. O óleo essencial foi separado da fase aquosa utilizando-se diclorometano (3 x 30 mL). Reuniram-se as frações orgânicas, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e removeu-se o solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo a 35°C. A massa do óleo obtido foi determinada por pesagem em balança analítica com precisão de 0,1 mg. O óleo obtido foi transferido para frascos de vidro com tampa rosqueável (septo de silicone) e armazenado em geladeira a 10°C, até o momento das análises (Barbosa & Barbosa, 2006; Craveiro, 1981).

Análises qualitativa e quantitativa

As análises qualitativas dos óleos essenciais das matérias-primas frescas e secas (raízes, caules e folhas) de *Tanaecium nocturnum* foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, MG, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM), utilizando-se um equipamento da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP 5050A. Para a identificação dos constituintes químicos, foi empregada uma coluna DB-5, da marca J & W Scientific, com 30 m de comprimento, d.i. de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm, e hélio como gás carreador. As condições de operação do cromatógrafo a gás foram: pressão interna da coluna de 100 KPa, fluxo de gás na coluna de 1,8 mL min⁻¹, temperatura no injetor de 220°C, temperatura no detector ou na interface (GC-EM) de 240 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 40°C por 2 min, seguido de um incremento de 3°C min⁻¹ até atingir 240°C, sendo mantida constante por 30 min. A razão de split foi de 1:10. O

espectrômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 600 Da, em intervalos de 0,5 s, com energia de ionização de 70 eV. Foi injetado 1µL da amostra, na concentração de 1%, dissolvida em diclorometano. A identificação dos componentes foi feita pela comparação de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroteca Willey, 7ª edição, com dados da literatura e também pelos índices de Kovats (Adams, 1995). Para o cálculo dos índices de Kovats, foi injetado no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 a C26) (Thomazini & Franco, 2000).

A quantificação dos componentes foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (GC-DIC) de marca Shimadzu, modelo GC-17A. As análises foram realizadas nas mesmas condições descritas para a identificação dos constituintes e em triplicata.

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, os tratamentos (material fresco e secos a 30°C e 40°C) relativos a cada parte da planta foram conduzidos em relação às variáveis rendimento e composição química, respectivamente, com 5 e 3 repetições. Os dados referentes aos efeitos dos tratamentos foram submetidos às análises de variâncias, de desvios-padrão e testes de comparações múltiplas de médias (Tukey), utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas, caules e raízes frescas de *Tanaecium nocturnum* apresentaram teores de umidade, respectivamente, de 62%, 54% e 56%. Após seis dias de secagem, suas respectivas umidades foram reduzidas sob temperatura do ar de 30°C para 9,6%; 14,0% e 8,0%; e sob 40°C para 8,0%; 8,0% e 7,0%.

Os óleos essenciais das folhas, caules e raízes apresentaram concomitantemente densidades de 1,008 g/cm³; 1,006 g/cm³ e 1,018 g/cm³; suas colorações variaram de amarelo a transparente para os obtidos das folhas e caules, e de amarelo a avermelhado, o extraído das raízes.

Na Tabela 1 são apresentados os teores de óleos essenciais extraídos das diferentes partes da espécie *Tanaecium nocturnum*, quando submetidas a diferentes temperaturas de secagem. Pelos dados referentes às matérias-primas frescas, observou-se que as folhas apresentaram o maior teor de óleo essencial (1,55%), seguido do caule (1,02%) e raízes (0,63%). Em relação à secagem, constataram-se perdas significativas para todas as partes da planta. Essas reduções foram de até 91,6% (folhas); 69,6% (caules) e 11,0% (raiz). Entre as temperaturas de secagem, não foram observadas diferenças significativas entre os teores de óleo essencial.

Apesar de ainda não ter sido relatada a anatomia de *Tanaecium nocturnum*, pesquisadores que trabalharam a anatomia de diversas espécies da família Bignoniaceae (*Anemopaegma arvense*, *Amphilophium paniculatum*, *Mansoa hymenaea*, *Tabebuia rósea* Lundia *cordata*, *Zeyheria montana*, etc) revelam a existência de substâncias lipofílicas em células parênquimáticas e em tricomas glandulares (Coral, 2003; Díaz-Castelazo, 2005; Lopez et al., 2002; Machado et al., 2006). Com base nesse aspecto, a elevada diferença em perdas do óleo essencial durante a secagem de folhas, caules e raízes podem estar

associada em parte à anatomia celular, bem como à localização desse metabólito secundário em estruturas secretoras (Barbosa & Barbosa, 2006; Ogundipe & Wujek, 2004). Nesse sentido, as maiores perdas ocorridas nas folhas e caules possivelmente podem ter sido ocasionadas pelo nível de lignificação do tecido parenquimatoso ou pela presença do óleo essencial em tricomas glandulares, localizados mais externamente (Lewinsohn, 1998; Radünz, 2004).

Resultados relacionados a perdas de óleos essenciais em função do processo de desidratação e da temperatura operacional têm sido encontrados em diversos trabalhos. Perdas semelhantes as obtidas neste trabalho foram encontradas com secagem de espécies de *Cymbopogon citratus* (44%, 40°C), *Chamaemelum nobile* (53%, 40°C) e *Aillanthus altissima* (76 %, 30°C) (Costa, 2005; Mastelic & Jerkoic 2002; Omidbaigi, 2004).

Embora a desidratação de plantas aromáticas tenha o propósito de minimizar as perdas de metabólitos secundários e de retardar a sua deterioração em decorrência da redução da atividade enzimática, a técnica de secagem com circulação de ar quente mostrou-se inviável para a produção de óleos essenciais de *Tanaecium nocturnum*.

As análises dos óleos essenciais de folhas, caules e raízes por CG/EM e CG/DIC, pesquisas em espectroscopia, índices de Kovats (Adams, 1995) e dados literários possibilitaram a identificação e quantificação de quatorze constituintes químicos (Figura 1). Nas matérias-primas frescas de todas as partes da planta, observa-se como componente majoritário o benzaldeído (71,61 a 76,09%), seguido de mandelonitrila (3,96 a 13,21%) e álcool benzílico (1,64 a 10,25%). Os demais constituintes identificados (0,20 a 22,79%) consistem de uma mistura de benzoatos, aldeídos e álcoois. Constataram-se diferenças na composição química entre as partes da planta estudada. As presenças de 1-octen-3-ol (0,81%), o-cimeno (0,21%), feniletanal (0,60%) benzoato de etila (0,93%) foram encontrados somente nas folhas. O salicilato de etila foi encontrado apenas no

caule (1,39 %) e a mistura de neral e geranial nas raízes (4,67%) (Tabelas 2, 3 e 4). Não tem sido encontrada na literatura a composição do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*; porém, relata-se a presença de aldeído benzóico como constituinte majoritário, seguido de monoterpenos (Gottlieb, 1981). A presença desses constituintes tem sido relatada em outras espécies de plantas, como *Aniba canelilla* e *Cinnamomum zeylanicum* (canela-da-índia), originárias da Amazônia (Lima et al., 2004; Lima et al., 2005; Young-Cheol et al., 2005), bem como de *Cinnamomum osmophloeum*, *Prunus pérsica* e *Ailanthus altíssima*, respectivamente cultivadas em Taiwan, China e Croácia (Mastelic & Jerkoic, 2002); Sung et al., 2006; Wang et al., 2005). Na composição química dos seus óleos essenciais, citam-se como principais constituintes químicos o benzaldeído, benzoato de benzila, o-cimeno e eugenol. Espectros de massas com similaridade igual aos encontrados neste trabalho, referentes às moléculas de benzaldeído e mandelonitrila, têm sido relatados em literatura (Ômura et al., 2002). Tais compostos foram identificados simultaneamente em CG/EM e CLAE, utilizando amostras autênticas de cada componente. Esses dados espectrais, juntamente com o do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*, são apresentados na Tabela 5.

Pela composição química indicada do óleo essencial dessa Bignoniaceae estudada, verificaram-se indícios de uma biotransformação entre a maioria dos constituintes, tendo como precursores os aminoácidos tirosina e fenilalanina. Essa hipótese está fundamentada em propostas de biossínteses para a formação de vários metabólitos secundários em *Sorghum bicolor*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* e *Petúnia axillaris* (Back et al., 2000; Kondo et al., 2006; Petrounia et al., 1994; Poulton, 1990; Ribnicky et al., 1998).

Nas Tabelas 6, 7 e 8, são mostrados os teores dos principais constituintes químicos dos óleos essenciais encontrados nas folhas, caules e raízes de *Tanaecium nocturnum*, presentes em ambos tratamentos de secagem. Em cada

parte da planta, observa-se que, após a secagem, a maioria dos constituintes teve seus teores modificados.

No óleo essencial extraído da folha, observa-se que, a partir de 30°C, houve reduções significativas do benzaldeído (74,70% para 61,98%), álcool benzílico (7,89% para 5,93%) e 1-octen-3-ol (0,81% para 0,33%). Nos dois primeiros componentes, não houve perdas significativas entre as temperaturas de 30°C e 40°C. Para a concentração do benzoato de etila, um aumento significativo do seu teor ocorreu até a temperatura de 30°C (0,93 % para 1,82%), ao passo que o benzoato de benzila elevou-se simultaneamente com a temperatura (3,28% para 26,12%).

Entre os constituintes extraídos do caule, verifica-se que o benzaldeído (71,61% para 83,16%) e o benzoato de benzila (0,20% para 1,22%) foram os únicos que obtiveram suas concentrações elevadas com o aumento da temperatura. O álcool benzílico e o salicilato de etila não apresentaram alterações significativas com a secagem. O salicilato de metila obteve elevação da concentração até a temperatura de 30°C (0,82% para 1,73%). A mandelonitrila foi o único componente que obteve redução significativa com a secagem (13,21 para 2,11%).

Com relação aos obtidos da raiz, o benzaldeído e a mandelonitrila apresentaram resultados semelhantes aos do caule. O álcool benzílico elevou significativamente o seu teor até a temperatura de 30°C (1,64% para 5,60%), enquanto o salicilato de metila obteve um aumento do seu teor com a secagem da matéria-prima a 30°C (0,83% para 1,26%).

Durante o processo de secagem, as maiores variações ocorreram com benzaldeído, mandelonitrila e benzoato de benzila. Com exceção do óleo essencial obtido das folhas, observa-se uma correlação inversa entre os teores de benzaldeído e mandelonitrila. Esses dados estão condizentes com vários trabalhos publicados, nos quais se relata a conversão de mandelonitrila em

benzaldeído com liberação de HCN, promovido pelo efeito da temperatura e atividade enzimática (Darling et al., 2001; Matsura et al., 2005; Ômura et al., 2002). A enzima mandelonitrila liase, catalisadora da reação, apresenta atividade máxima entre 35 e 40°C (Petrounia et al., 1994; Swain & Pouton, 1994; Wajant et al.) Essa reação pode ter sido favorecida pela fragmentação da matéria-prima durante o período de secagem (6 dias). O elevado aumento do teor benzoato de benzila, ocorrido principalmente nas folhas, pode ter sido ocasionado pela sua maior estabilidade à temperatura, associada às perdas dos constituintes mais voláteis. Oscilações como essas foram encontradas em vários trabalhos com secagem de plantas aromáticas (Barbosa & Barbosa, 2006; Arabhosseini et al., 2006; Martins, et al., 2006; Radünz, 2004;). Entre estes, foram constatados aumentos dos teores de citral em *Lipia alba* e *Cymbopogan citratus* (10 a 15%) e reduções de α -muroleno (100%) e linalol (74%) em *Ailanthus altissima* (Costa, 2005; Mastelic & Jerkoic, 2002; Nagao, 2005).

Apesar das perdas do óleo essencial, pelos dados, verificou-se que a secagem apresentou efeito positivo em relação à qualidade desse metabólito secundário, eliminando ou reduzindo o teor de constituintes indesejáveis, como a mandelonitrila, presente em maiores quantidades no caule e raiz.

4 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais extraídos de folhas, caules e raízes de *Tanaecium nocturnum* apresentaram como componente majoritário o benzaldeído, seguido de álcool benzílico e mandelonitrila.

Pela presença de mandelonitrila com maior intensidade no caule e raiz, houve indícios de que a espécie seja produtora de glicosídeo cianogênico e que esse esteja sendo convertido em benzaldeído durante o processamento das matérias-primas.

A secagem a partir de 30°C de raízes, caules e folhas proporcionou elevadas perdas do óleo essencial, com variações quantitativas da sua composição química, com ênfase para a eliminação ou redução do teor de mandelonitrila.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA - Acre, ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio Pesquisa e Extensão de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro e bolsas concedidas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.

AOCS Official Method Da2b-42. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. 4. ed. Champaign: American Oil Chemists Society 1994.

ARABHOSSEINI, A.; PADHYE, S.; BEEK, T. A.; BOXTEL, A. J. B.; HUISMAN, W.; POSTHUMUS, M. A.; MÜLLER J. Loss of essential oil of tarragon (*Artemisia Dracunculus* Lo.) due drying. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 15, p. 2543-2550, Dec. 2006.

BAK, S.; OLSEN, C. E.; HALKIER, B. A.; MOLLER, B. L. Transgenic tobacco and arabidopsis plants expressing the two multifunctional sorghum cytochrome P450 enzymes, CYP79A1 and CYP7E1, are cyanogenic and accumulate metabolites derived from intermediates in dhurrin biosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 4, p. 1437-1448, Aug. 2000.

BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C. A. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N, E. Brown. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, nov./dez. 2006.

CORAL, D. J.; DALLAQUA, M. A. M Anatomia foliar de *Anemopaegma arvense* (Vell.). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54.; REUNIÃO AMAZÔNICA DE BOTÂNICA, 3., 2003, Belém, Brasil. **Resumos...** Belém, 2003.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de campim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 965-959, dez. 2005.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. DE A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981.

DARLING, C.; SCHOROEDER, F.; MEINWALD, J.; EISNER, M.; EISNER, T. Production of a cyanogenic secretion by a thyrnid caterpillar (*Calindoea trifascialis*, Thyrididae, Lepdoptera). **Naturwissenschaften**, New York, v. 88, p. 306-309, 2001.

DÍAZ-CASTELAZO, C.; RICO-GRAY, V.; ORTEGA, F.; ÁNGELES, G. Morphological and secretory characterization of extrafloral nectaries in plants of coastal Veracruz México. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 7, 1175-1189, Dec. 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - Amazônia Oriental. **Caracterização e classificação dos solos do Campo Experimental da Embrapa Acre, Rio Branco, Estado do Acre**, Zoneamento Agroecológico, Belém, 2001.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**, UFLA: Lavras, Minas Gerais, 2000.

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, A. I. R.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 11, n. 1, p. 143-148, mar. 1981.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. London: Chapman and Hall, 1973.

KEIFER, H. In: SIMPÓSIO SOBRE EXPLORAÇÃO DE PLANTAS AROMÁTICAS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA FUNDAÇÃO CARGILL, 1., 1986, Campinas, SP.

KONDO, M.; OYAMA-OKUBO, N.; ANDO, T.; MARCHESI, E.; NAKAYAMA, M. Floral scent diversity is differently expressed in emitted and endogenous components in *Petunia axillaries* lines. **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 6, p. 1253-1259, Dec. 2006.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, D. M. Histochemical localization of citral accumulation in lemon grass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Poaceae*). **Annals of Botany**, London, v. 81, n. 1, p. 35-39, Jan. 1998.

LIMA, M. P.; SILVA, T. M. D.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba Canelilla (Kunth) Mez* from Manaus, Brazil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 329-330, abr./jun. 2004.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum Zeylanicum Blume (Lauraceae)*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 3, p. 363-366, jul./set. 2005.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. London: CRC Press, 1989. p. 39-49.

LOPES, A. V.; VOGEL, STEFAN.; MACHADO, I. C. Secretory trichomes, a substitutive floral nectar source in *Lundia A. DC. (Bignoniaceae)*. A genus lacking a functional disc. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 2, p. 169-174, Aug. 2002.

MACHADO, S. R.; GREGORIO, E. A.; GUIMARAES, E. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana (Bignoniaceae)* developmental ultrastructure and secretion in relation to function. **Annals of Botany**, London, v. 97, n. 3, p. 357-369, Mar. 2006.

MAIA, J. G. S.; MILCHARD, M. J. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, p. 200-204, 1987.

MARTINS, P. M.; MELO, E. C.; BARBOSA, L. C. A.; SANTOS, R. H. S.; MACHADO, M. C. Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 569, n. 569, p. 155-189, 2002.

MASTELIC, J.; JERKOIC, I. Volatile constituent from the leaves of young and old *Ailanthus altissima (Mill.) Swingle tree*. **Croatica Chemica Acta**, Zagreb, v. 75, n. 1, p. 189-197, Feb. 2002.

MATSURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S.; MIRANDA, M. S.; MENEZES, H. C. Efeito da trituração e imersão em água na redução dos compostos cianogênicos do albedo de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, p. 63-69, 2005.

MING, L. C. **Levantamento de plantas medicinais na reserva extrativista Chico Mendes – Acre.** 1995. 192 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Julho de Mesquita Filho, Botucatu, SP.

NAGAO, E. O.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; MARCO, C. A. Influência do período de secagem nas estações seca e chuvosa no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. nas condições do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 1, p. 53-59, jan./abr. 2005.

OGUNDIPE, O. T.; WUJEK, D. E. Foliar anatomy on twelve genera of Bignoniaceae (Lamiales). **Acta Botânica Hungarica**, v. 46, p. 337-361, 2004.

OMIDBAIGI, R.; SELFDKON, F.; KAZEMI, F. Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman Chamomile. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 19, n. 3, p. 196-198, May/June 2004.

ÔMURA, H.; KUWAHARA, Y.; TANABE, T. Species-specific chemical compositions of defense secretions from *Parafontaria tonominea attems* and *Riukiaria semicircularis semicircularis* Takakuwa (*Polydesmida : Xystodesmidae*). **Applied Entomology Zoology**, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 73-78, Feb. 2002.

PETROUNIA, I. P.; GOLDBERG, J.; BRUSH, E. J. Transient inactivation of mandelonitrile lyase By 3-methyleneoxindole – A photooxidation product of the natural plant hormone indole – 3-acetic-acid. **Biochemistry**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2891-2899, Mar. 1994.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, maio/abr. 2006.

POULTON, J. E. Cyanogenesis in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, n. 2, p. 401-405, Oct. 1990.

RADÜNZ, L. L. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds).** 2004. 100 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

RIBNICKY, D. M.; SHULAEV, V.; RASKIN, L. Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 2, p. 565-572, Oct. 1998.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. Minas Gerais: Arte e Livros, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003.

SUNG, B. K.; LIM, J. H.; LEE, H. S. Food protective and color alteration effects of acaricidal aldehydes on *tyrophagus putrescentiae* (Schrank). **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, n. 7, p. 1728-1731, July 2006.

SWAIN, E.; POULTON, J. E. Immunocytochemical localization of prunasin hydroxylase and mandelonitrile lyase in stems and leaves of prunus-serotina. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, n. 4, p. 1285-1291, Dec. 1994.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 52-59, jan./jun. 2000.

WAJANT, H.; FÖSTER, S.; SELMAR, D.; EFFENBERGER, F.; PFIZENMAIER, K. Purification and characterization of a novel ® mandelonitrile lyase from the fern *Phlebodium aureum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1231-1238, Dec. 1995.

WANG, S. Y.; CHEN, P. F.; CHANG, S. T. Antifungal activities of essential oils and their constituents from *indigenus cinnamom* (*Cinnamomum osmoplaloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 813-818, May 2005.

YOUNG-CHEOL, Y.; HOI-SEON, L.; LEE, S. H.; CLARK, J. M.; YOUNG-JOON, A. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum Zeylannicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus Capitis* (*Anaplura : Pediculicidae*). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 14, p. 1595-1600, Dec. 2005.

ANEXO

TABELA 1. Valores médios dos teores de óleos essenciais extraídos de raízes, caules e folhas de *Tanaecium nocturnum* submetidos a diferentes temperaturas do ar de secagem.

Tratamentos	Teor de óleo essencial (%)		
	Partes da planta		
	Raiz	Caule	Folha
Fresco (testemunha)	0,63aA	1,02aB	1,55aC
30°C	0,55bA	0,34bB	0,15bC
40°C	0,56bA	0,31bB	0,13bC

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade
CV(%) = 6,73 Média Geral = 0,58

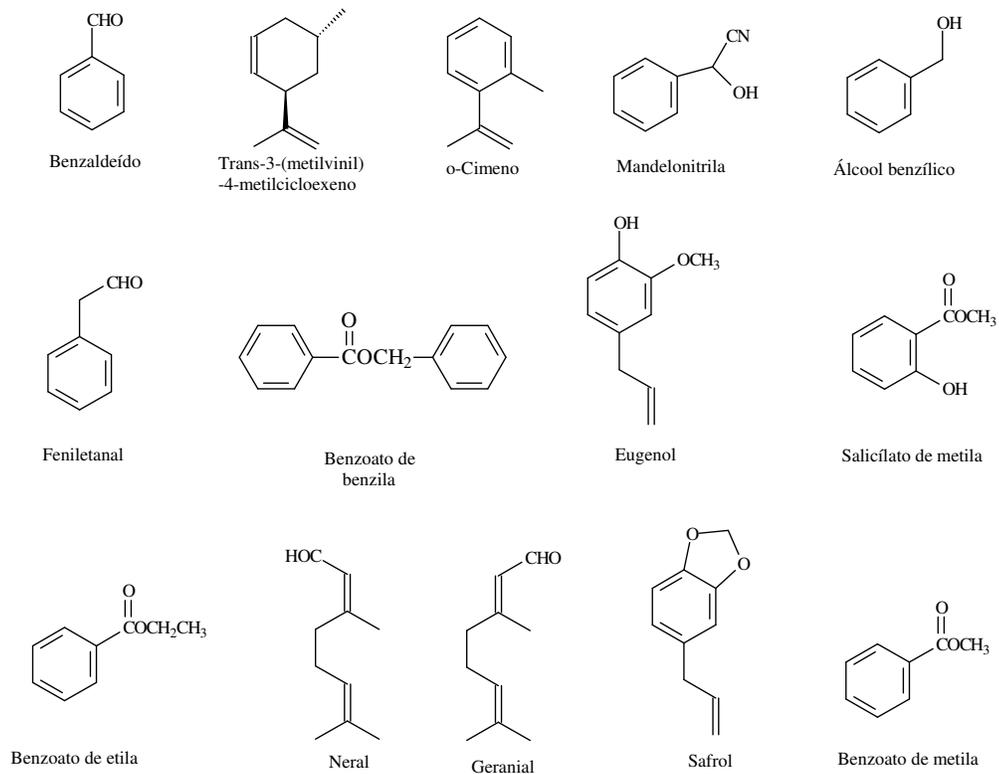


FIGURA 1. Fórmulas estruturais dos constituintes presentes nos óleos essenciais de *Tanaecium nocturnum*

TABELA 2. Composição química do óleo essencial de folhas de *Tanaecium nocturnum* submetidas a diferentes temperaturas do ar de secagem (valores expressos em percentual proporcional da área)¹

Componentes do óleo	IK ²	Tratamentos de secagem		
		Folhas frescas	30°C	40°C
Benzaldeído	962	74,70±0,44	61,98±0,79	61,44±0,44
1-Octen-3-ol	981	0,81±0,06	0,75±0,05	0,33±0,04
o-Cimeno	1022	0,21±0,03	t ³	t
Alcool benzílico	1035	7,89±0,04	5,93±0,52	5,26±0,11
Feniletanal	1041	0,60±0,04	t	t
Benzoato de metila	1090	0,65±0,05	0,44±0,02	t
Benzoato de etila	1168	0,93±0,05	1,82±0,07	1,24±0,13
Salicilato de metila	1188	0,26±0,03	0,44±0,03	0,37±0,04
Safrol	1283	0,87±0,04	0,80±0,04	t
Mandelonitrila	*	3,96±0,19	t	t
Eugenol	1354	0,21±0,03	3,36±0,08	t
Benzoato de benzila	1759	3,28±0,20	22,76±1,03	26,12±0,12
Total identificado		94,37±0,45	98,28±1,61	94,76±0,74

¹Médias de três repetições seguidas dos desvios-padrão.

²Índices de Kovats calculados. * Não encontrado em literatura.

³t –Quantidades traços (< 0,1 %)

TABELA 3. Composição química do óleo essencial de caules de *Tanaecium nocturnum* submetidas a diferentes temperaturas do ar de secagem (valores expressos em percentual proporcional da área)¹

Componentes do óleo	IK ²	Tratamentos de secagem		
		Caules frescos	30°C	40°C
Benzaldeído	962	71,61±0,88	80,74±0,64	83,16±0,12
Alcool benzílico	1035	10,25±0,49	11,23±0,48	10,39±0,32
Salicilato de metila	1188	0,82±0,06	1,73±0,20	0,91±0,07
Salicilato de etila	1266	1,39±0,28	1,58±0,16	1,10±0,24
Safrol	1283	0,59±0,04	t ³	t
Mandelonitrila	*	13,21±0,45	3,52±0,26	2,11±0,19
Benzoato de benzila	1759	0,20±0,02	0,45±0,04	1,22±0,15
Total identificado		98,07±1,54	99,25±0,49	98,89±0,73

¹Médias de três repetições seguidas dos desvios-padrão.

²Índices de Kovats calculados. * Não encontrado em literatura.

³t –Quantidades traços (< 0,1 %)

TABELA 4. Composição química do óleo essencial de raízes de *Tanaecium nocturnum* submetidas a diferentes temperaturas do ar de secagem (valores expressos em percentual proporcional da área)¹

Componentes do óleo	IK ²	Tratamentos de secagem		
		Raízes frescas	30°C	40°C
Benzaldeído	962	76,09±1,10	83,65±0,79	87,65±0,49
Alcool benzílico	1035	1,64±0,09	5,60±0,26	5,15±0,24
Benzoato de metila	1090	0,57±0,02	t ³	t
Salicilato de metila	1188	0,83±0,04	1,26±0,02	0,52±0,04
Neral	1239	1,27±0,05	t	t
Geranial	1269	3,40±0,17	t	t
Mandelonitrila	*	11,04±1,01	6,19±0,25	4,22±0,24
Total identificado		94,84±2,42	96,70±0,50	97,54±0,78

¹Médias de três repetições seguidas dos desvios padrão.

²Índices de Kovats calculados. * Não encontrado em literatura.

³t -Quantidades traços (< 0,1 %)

TABELA 5. Dados de massas espectral (GC/EM) de constituintes químicos identificados em secreções de *Parafontaria tonominea* (*) e *Riukiaria semicircularis semicircularis* (*) e no óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*.

Constituintes	m/z (int.rel.)
Benzaldeido	106 ([M] ⁺ , 100), 105 (98), 77 (79), 51(26)* 106 ([M] ⁺ , 66), 105 (71), 77 (100), 51 (64)
Mandelonitrila	133 ([M] ⁺ , 32), 115 (19), 106 (93), 105 (100), 77 (88), 51 (28)* 133 ([M] ⁺ , 52), 115 (31), 106 (45), 105 (82), 77 (100), 51 (35)

TABELA 6. Teor dos principais constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Tanaecium nocturnum* submetidas à secagem sob diferentes temperaturas do ar.

Tratamentos	Componentes do óleo (% Área)				
	Benzaldeido	1-Octen-3-ol	Álcool benzílico	Benzoato de etila	Benzoato de benzila
Fresca	74,70a	0,81a	7,89a	0,93a	3,28a
30°C	61,98b	0,75b	5,93b	1,82b	22,76b
40°C	61,44b	0,33c	5,26b	1,24a	26,12c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 7. Teor dos principais constituintes químicos do óleo essencial de caules de *Tanaecium nocturnum* submetidos à secagem sob diferentes temperaturas do ar.

Tratamentos	Componentes do óleo (% Área)					
	Benzaldeido	Álcool benzílico	Salicilato de metila	Salicilato de etila	Mandelo nitrila	Benzoato de benzila
Fresco	71,61a	10,25a	0,82a	1,39a	13,21a	0,20a
30°C	80,74b	11,23a	1,73b	1,58a	3,52b	0,45b
40°C	83,16c	10,39a	0,91a	1,10a	2,11b	1,22c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 8. Teor dos principais constituintes químicos do óleo essencial de raízes de *Tanaecium nocturnum* submetidas à secagem sob diferentes temperaturas do ar.

Tratamentos	Componentes do óleo (% Área)			
	Benzaldeido	Álcool benzílico	Salicilato de metila	Mandelonitrila
Fresca	76,09a	1,64a	0,83a	11,04a
30°C	83,65b	5,60b	1,26b	6,19b
40°C	87,65c	5,15b	0,52c	4,22c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CAPÍTULO V

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AÇÃO FUNGITÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Tanaecium nocturnum* (BARB. RODR.) BUR. & K. SHUM SOBRE O *Aspergillus flavus* ISOLADO DA CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*)

RESUMO

Pimentel, Flávio Araújo. **Caracterização Química e Ação Fungitóxica do Óleo Essencial de *Tanaecium Nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum Sobre o *Aspergillus Flavus* Isolado da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa*)** 2007. p. 178. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Neste trabalho, realizou-se a caracterização química e avaliou-se a capacidade fungitóxica do óleo essencial de folhas frescas de *Tanaecium nocturnum* sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-brasil, por meio das técnicas de contato e fumigação. O óleo essencial obtido por hidrodestilação foi submetido à identificação e quantificação dos seus componentes por CG/EM e CG/FID. Os principais constituintes foram benzaldeído (74,70%), álcool benzílico (7,89%), benzoato de benzila (3,28%) mandelonirila (3,96%), benzoato de etila (0,93%) e 1-octen-3-ol (0,81%). Pelos resultados dos bioensaios realizados até 10 dias de incubação, verificou-se que a inibição total do crescimento micelial ocorreu quando se utilizou o óleo essencial nas concentrações de 0,5 µL/mL (técnica de contato) e 1,0 µL/mL (técnica de fumigação). Em ambas as técnicas, o óleo essencial inibiu a esporulação a partir da concentração de 0,5 µL/mL.

Palavras-chave: óleo essencial, ação fungitóxica, *Tanaecium nocturnum*, *Aspergillus flavus*

* Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Orientadora); Fabiana Queiroz - UFLA; Luiz Roberto Batista – UFLA (Co-orientadores)

ABSTRACT

Pimentel, Flávio Araújo. **Chemical Characterization And Fungitoxic Action Of The Essential Oil Of *Tanaecium Nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum Against *Aspergillus Flavus* Isolated From The Brazil Nut (*Bertholletia Excelsa*).** 2007. p. 178. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The chemical characterization of the essential oil from fresh leaves of *Tanaecium nocturnum* was achieved, and the fungitoxic capacity of the oil against *Aspergillus flavus* isolated from the Brazil nut was evaluated by the contact and fumigation techniques. The components of the essential oil obtained by steam distillation were identified and quantified by GC/MS and GC/FID. The principal components were benzaldehyde (74.70%), benzyl alcohol (7.89%), benzyl benzoate (3.28%) mandelonirile (3.96%), ethyl benzoate (0.93%) and 1-octen-3-ol (0.81%). The results of the bioassays performed during 10 days after inoculation presented total inhibition of micellial growth when the essential oil was employed in concentrations of 0.5 µL/mL (contact technique) and 1.0 µL/mL (fumigation technique). The essential oil inhibited the occurrence of sporulation at the concentration of 0.5 µL/mL with both techniques.

Keywords: essential oil; fungitoxic action; *Tanaecium nocturnum*, *Aspergillus flavus*

* Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso - UFLA (Major Professor); Fabiana Queiroz – UFLA and Luiz Roberto Batista – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Amazônica detém a mais notável e diversificada fonte de produtos naturais do planeta. Devido a sua grande biodiversidade, existe uma elevada demanda por pesquisas em produtos florestais, visando ao fornecimento de informações científicas para apoiar políticas de desenvolvimento sustentável com proteção aos seus ecossistemas. Entre os recursos naturais existentes, destacam-se a castanha-do-Brasil e as espécies produtoras de óleos essenciais (Chaar, 2000; Müller et al., 1995; Pletsch & Sant'Ana, 1995).

A castanha-do-brasil possui participação significativa na geração de divisas para a região, cujas exportações para os mercados internos e externos têm ocupado importantes espaços na indústria de cosmético (óleos, cremes, xampus, etc) e, de forma mais acentuada, na área de alimentos (amêndoas, farinha, coberturas de sorvetes, etc). Sua produção extrativista é considerada orgânica, uma vez que não são utilizados adubações e defensivos químicos para o seu manejo (Cavalcante, 1996; Souza, 1984). No entanto, o baixo nível tecnológico característico da cadeia produtiva, associado às condições climáticas (umidade e precipitação pluviométricas elevadas) no período de colheita (novembro a março), tem favorecido a contaminação das amêndoas em casca, principalmente por fungos produtores de aflatoxinas e, mais especificamente, pelo *Aspegillus flavus*. Esses problemas constituem um forte entrave para a comercialização do produto, principalmente no mercado externo, dado o rigoroso controle de países europeus e Estados Unidos em relação aos níveis de toxinas presentes nos alimentos. Com esses problemas encontrados, os habitantes, juntamente com as instituições governamentais e não-governamentais, vêm buscando alternativas que reduzam os riscos de contaminações, sem que haja descaracterização da cadeia produtiva,

ênfatizando, nesse sentido, a possibilidade da utilização de substâncias naturais encontradas nas localidades de produção (Souza, 2004).

Os organismos vegetais, na sua maioria, não caracterizados quimicamente, são um universo rico e complexo de compostos orgânicos, com inúmeros centros estereogênicos que participam ativamente do seu crescimento e desenvolvimento. Tais compostos, definidos como metabólitos secundários, são originados por vias biossintéticas alternativas e podem ser caracterizados como elementos de diferenciação e especialização celular, atuando com função de defesa e perpetuação do vegetal no ecossistema (Wink, 1990). Entre esses, destacam-se os óleos essenciais, que apresentam larga atividade biológica, entre elas, a fungitóxica (Müller-Riebau et al., 1995).

Entre as espécies amazônicas produtoras de óleos essenciais com potencial antiaflatognico a serem testados, encontra-se a *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum, pertencente à família Bignoniaceae. Conhecida como cipó vick ou cipó-carimbó, é uma planta trepadeira, cujas partes apresentam forte cheiro, característico de amêndoas amargas. Suas folhas são utilizadas externamente pela população como analgésico. Os ndios da aldeia de Gotira, localizada às margens do rio Fresco, afluente do rio Xingu, utilizam o cipó para combater abelhas e formigas (saúvas), bem como para descongestionar vias respiratórias (Gottlieb et al., 1981; Ming, 1995).

O uso de técnicas de contato ou fumigação com óleos essenciais, extraídos de várias espécies vegetais, com potenciais inseticidas e fungicidas, para controle de pragas de grãos armazenados, tem sido, nos últimos anos bastante difundida em diversos países (Brito, 2006; Chu et al., 2001; Estrela et al., 2006; Suhr & Nielsen, 2003). Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* a toxicidade do óleo essencial do cipó vick sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-brasil, bem como identificar e quantificar os seus constituintes químicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Colheita

O material genético foi coletado de população nativa de *Tanaecium nocturnum*, situada na Reserva Florestal da Embrapa Acre, localizada no município de Rio Branco, AC. A colheita foi realizada no mês de janeiro/2005, entre 8 e 10 horas, desprendendo o cipó das árvores e cortando-se a parte aérea da planta a 10 cm acima do solo. A temperatura local encontrava-se em torno de 25°C. Em seguida, as plantas foram submetidas às operações de desfolha e seleção, descartando-se os materiais atacados por praga ou doenças. Posteriormente, o material vegetal foi acondicionado em caixas de isopor, sob refrigeração (gelo) e transportado via aérea para o Laboratório de Química Orgânica, da Universidade Federal de Lavras, MG.

Determinação da umidade

Para a determinação da umidade, utilizaram-se 5 gramas de folhas frescas picadas, emergidas em 50 mL de ciclohexano (C₆H₁₂). A matéria-prima foi suspensa no respectivo solvente e colocado em balão volumétrico com capacidade para 250 mL, acoplado a um condensador com coletor volumetricamente graduado. O aquecimento foi realizado por meio de manta aquecedora, controlando-se a temperatura para 100±5°C. Após o processo de destilação, realizado em 3 horas, quantificou-se o volume de água presente na matéria-prima. A umidade foi calculada levando-se o teor de água contido em 100 gramas da amostra (AOCS, 1994; Pimentel et al., 2006).

Obtenção do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada por meio de hidrodestilação, utilizando um aparelho Clevenger modificado e acoplado a um balão de 1L, onde foram colocados 50 gramas de folhas frescas picadas, juntamente com 500 mL de água destilada. O tempo de extração, determinado por meio de testes preliminares, foi de 4 horas, contado a partir do momento de ebulição. O óleo essencial foi extraído da fase aquosa utilizando-se o diclorometano (3 x 30 mL). As frações orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de magnésio anidro, filtradas e o solvente removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo à 35°C. A massa do óleo obtida foi determinada por pesagem em balança analítica com precisão de 0,1 mg. O óleo obtido foi transferido para frascos de vidro com tampa rosqueável (septo de silicone) e armazenado em geladeira a 10°C (Craveiro et al., 1981; Barbosa & Barbosa, 2006).

Densidade relativa

Para a determinação da densidade do óleo essencial, empregou-se o método de picnometria (picnômetros Hubbard Cormick de 30 mL), utilizando água como fluido picnométrico (calibração). A pesagem foi realizada com três repetições em balança analítica com precisão de 0,1 mg (Mohsenin, 1970; Schoch & Leach, 1964).

Análises qualitativa e quantitativa

A análise qualitativa do óleo essencial das folhas frescas de *Tanaecium nocturnum* foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, MG, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-EM), utilizando-se um equipamento da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP 5050A. Para a identificação dos constituintes químicos, foi empregada uma

coluna DB-5, da marca J & W Scientific, com 30 m de comprimento, d.i. de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μm , e hélio como gás carreador. As condi es de opera o do cromatógrafo a gás foram: pressão interna da coluna de 100 KPa, fluxo de gás na coluna de 1,8 mL min⁻¹, temperatura no injetor de 220 C, temperatura no detector ou na interface (GC-EM) de 240 C. A temperatura inicial da coluna foi de 40 C por 2 min, seguido de um incremento de 3 C min⁻¹ até atingir 240 C, sendo mantida constante por 30 min. A razão de split foi de 1:10. O espectômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 29 a 600 Da, em intervalos de 0,5 s, com energia de ioniza o de 70 eV. Foi injetado 1 μL da amostra, na concentra o de 1%, dissolvida em diclorometano. A identifica o dos componentes foi feita pela compara o de seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da espectroteca Willey, 7^a edi o, com dados da literatura e também pelos índices de Kovats (Adams, 1995). Para o dos índices de Kovats, foi injetada no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 a C26) (Thomazini & Franco, 2000).

A quantifica o dos componentes foi realizada no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, MG, utilizando-se um cromatógrafo a gás com detector de ioniza o de chamas (GC-DIC) de marca Shimadzu, modelo GC-17A. As análises foram realizadas em triplicata e nas mesmas condi es descritas para a identifica o dos constituintes.

Bioensaio

As pesquisas da atividade antifúngica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Isolados de *Aspergillus flavus*

As cepas puras de *Aspergillus flavus* produtora de aflatoxina, isoladas da castanha-do-Brasil, foram fornecidas pela Embrapa Acre. Os estudos in vitro da atividade antifúngica do óleo essencial de cipó vick foi realizado utilizando o meio de cultura CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar – sacarose 57,68%, nitrato de sódio 5,77%, fosfato dipotássico 1,92%, sulfato de magnésio 0,002%, cloreto de potássio 0,96%, sulfato ferroso 0,02%, agar bacteriológico 28,84% e extrato de levedura 4,81%), usando-se placas de Petri (Pitt et al., 1999). Para avaliar a toxicidade do óleo essencial, foram utilizados os seguintes processos:

Contato em meio de cultura

Inicialmente foram realizados testes preliminares com o óleo essencial, para estabelecer intervalos de quantidades capazes de provocar inibições crescentes do *Aspergillus flavus*, bem como do solvente utilizado, levando-se em consideração os aspectos de solubilidade e de atoxicidade ao microorganismo. Inicialmente o óleo essencial foi diluído em diferentes proporções em dimetil sulfóxido (DMSO). Assim que o meio de cultura acondicionado em Erlenmeyer atingiu aproximadamente 45°C, adicionou-se a solução, homogeneizando-se com bastão de vidro. Em seguida, essa foi quantitativamente transferida para as placas de Petri (20 mL). Após a solidificação do meio de cultura, realizou-se a inoculação do fungo em um ponto central da placa. Como tratamentos, o óleo essencial foi adicionado nas dosagens de 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 µL/mL da mistura (meio de cultura + DMSO). A testemunha relativa (DMSO) foi incorporada na dosagem de 2,5 µL/mL de substrato (Wang et al., 2005; Viegas, 2005; Jham et al., 2005).

Fumigação

Utilizando o mesmo meio de cultura e procedimento de inoculação anteriormente citado, no processo de biofumigação o óleo essencial puro foi aplicado com micropipeta em superfície de papel de filtro de 4,0 cm de diâmetro, fixado na tampa da placa de Petri ($V_{\text{interno}} = 110 \text{ cm}^3$). Para isso, utilizaram-se os mesmos volumes de óleo essencial, correspondentes a cada tratamento do processo de contato (Brito, 2006; Estreta et al., 2006; Naakahara et al., 2003).

Em ambos os processos de aplicação, após cinco e dez dias da incubação em BOD à temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, foram efetuadas as medições ortogonais do diâmetro das colônias, tendo como referência o seu desenvolvimento na placa-controle (testemunha absoluta = TA). Para a contagem de esporos, foram utilizados câmara de Newbauer e microscópio (Pitt et al., 1999).

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. As variáveis relativas ao crescimento micelial e esporulação foram submetidas a análises de variâncias e às comparações múltiplas de médias feitas pelo teste Tukey (5%), utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização fitoquímica

As folhas frescas com umidade de 62% apresentaram um teor de óleo essencial de 1,55% (b.s.) com densidade de 1,008 g/cm³. De coloração amarelo a transparente, o óleo essencial apresentou-se solúvel em colorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno e em dimetil sulfóxido e parcialmente solúvel em éter de petróleo, hexano e cicloexano.

A análise do óleo essencial por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC/EM), pesquisas em espectroteca, e também pelos índices de Kovats (Adams, 1995) e dados literários, possibilitaram a identificação de doze constituintes químicos (Tabela 1). Observa-se como componente majoritário o benzaldeído (74,70%), seguido de álcool benzílico (7,89 %), mandelonitrila (3,96 %) e benzoato de benzila (3,28 %). Os demais constituintes identificados (4,54 %) consistem, na sua maioria, de uma mistura de benzoatos, aldeídos e álcoois. Não se tem encontrado na literatura a composição do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*; porém, relata-se a presença de benzaldeído como constituinte majoritário, seguido de monoterpenos (Gottlieb et al.). A presença desses constituintes tem sido relatada em outras espécies de plantas, como *Aniba canelilla* e *Cinnamomum zeylanicum* (canela-da-índia), originárias da Amazônia (Lima et al., 2004; Lima et al., 2005; Young-Cheol et al., 2005), bem como de *Cinnamomum osmophloeum* e *Prunus persica*, respectivamente, cultivadas em Taiwan e China (Sung et al., 2006; Wang, 2005). Na composição química dos seus óleos essenciais, citam-se como principais constituintes químicos o benzaldeído, benzoato de benzila, o-cimeno e eugenol. Espectros de massas com similaridade igual aos encontrados neste trabalho, referentes aos benzaldeído, mandelonitrila e benzoato de

mandelonitrila, têm sido relatados em literatura (Ômega et al., 2002). Tais compostos foram identificados em secreções de *Parafontaria tonominea* e *Riukiaria semicircularis semicircularis* (Artrópodes). Para tal, as análises foram realizadas simultaneamente em GC/EM e CLAE, utilizando amostras autênticas de cada componente. Esses dados espectrais, juntamente com o do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*, são apresentados na Tabela 2.

A composição química indicada do óleo essencial desta Bignoniaceae dá indícios de haver uma biotransformação entre a maioria dos constituintes, tendo como precursores os aminoácidos tirosina e fenilalanina (Brenna, 2006; Petrounia et al., 1994; Poulton, 1990; Ribnicky et al., 1998).

Bioensaios

Nos tratamentos com óleo essencial, verificou-se que, com cinco a dez dias de incubação, houve uma redução do crescimento micelial com o aumento da concentração do óleo essencial, utilizando a técnica de contato. Essa redução aumentou de 35,43% (0,125 µL/mL) para 100% (0,50 e 1,0 µL/mL) no décimo dia da incubação. A diferença não-significativa de inibição, nas concentrações de 0,125 e 0,25 µL/mL entre o quinto e décimo dia, foi, respectivamente, de 3,78% e 1,66%. Pelos dados, verificou-se que, a partir da concentração de 0,50 µL/mL, ocorreu inibição de 100% do crescimento micelial (Tabela 3). Com cinco dias de incubação, a técnica de fumigação apresentou efeito semelhante do óleo essencial na inibição micelial, em relação à aplicação por meio de contato. Diferenças significativas ocorreram na técnica de fumigação com as doses equivalentes de 0,25 µL/mL e 0,50 µL/mL, que tiveram seus respectivos efeitos reduzidos em 17,69% e 19,29%, entre cinco e dez dias da incubação. Com essa técnica, a inibição total ocorreu com a dose de 1,0 µL/mL. Avaliando os dois processos de controles micelial, constatou-se superioridade dos efeitos dos

tratamentos T1, T2 e T3 do contato (35,43%; 49,19% e 100%) em relação à fumigação (18,80%; 32,94 % e 80,71%) aos dez dias da inocubação do *Aspergillus flavus*, (Tabelas 3 e 4, Figura 1).

Na Tabela 5, encontra-se apresentado o número de esporos produzidos pelo *Aspergillus flavus*, quando submetido aos tratamentos com óleo essencial, utilizando-se as duas técnicas de aplicação (contato, fumigação). Observou-se uma redução significativa da esporulação com o aumento da concentração do óleo essencial, em ambos os procedimentos utilizados. Aos cinco dias, no processo de fumigação, detectou-se uma redução da densidade de esporos entre os tratamentos T1 (2×10^6) e T2 ($0,68 \times 10^6$). Com dez dias, ocorreram reduções entre esses tratamentos em todas as técnicas de aplicação do óleo essencial (contato, T1 = $2,33 \times 10^6$ e T2 = $1,43 \times 10^6$), (fumigação, T1 = $4,37 \times 10^6$ e T2 = $0,74 \times 10^6$). Na técnica de contato, com exceção dos tratamentos T3 e T4, os demais apresentaram aumentos significativos de densidades de esporos entre cinco e dez dias. Na técnica de fumigação, apenas a testemunha ($3,50 \times 10^6$ e $4,63 \times 10^6$) e o tratamento T1 ($0,68 \times 10^6$ e $0,74 \times 10^6$) apresentaram aumentos significativos na produção de esporos. Em ambas, a inibição total da germinação de esporos ocorreu a partir do tratamento T3 ($0,50 \mu\text{L/mL}$) (Tabela 5, Figura 3).

Com relação aos aspectos morfológicos, constatou-se nas testemunhas, absoluta e relativa, a presença de conídios de coloração esverdeada. Nos demais tratamentos que continham o óleo essencial, os conídios apresentavam-se incolores.

Os resultados da atividade fungitóxica de *Tanaecium nocturnum* estão condizentes com os diversos efeitos biológicos de óleos essenciais relatados por diversos autores. Os constituintes identificados neste trabalho, tais como, benzaldeído, álcool benzílico, benzoatos e eugenol, têm sido pesquisados e seus resultados confirmam atividades antifúngicas (Devarajan et al., 2002; Krebs et al., 1983; Silva et al., 2005; Vaughn & Spencer, 1994). Quando aplicados

isoladamente, o benzaldeído tem apresentado citotoxicidade contra *Aspergillus ninger*, *R. solani*, *Laetiporus sulphureus*, *Coriolus versicolor* e *Cândida albicans*; o álcool benzílico em relação aos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Cândida albicans*; os benzoatos contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. O eugenol, embora encontrado em baixas concentrações no óleo essencial, tem sido relatado com variadas atividades fungitóxicas, Entre elas contra o *Laetiporus sulphureu* e *Coriolus versicolor* (Devarajan et al., 2002; Gupta & Kaisheva, 2003; Pereira, 2001; Silva et al., 2005; Wang et al., 2005). Efeito fungitóxico contra o *Aspergillus flavus* também tem sido publicados com a aplicação do óleo essencial de *Cinnamomum zeilanicum* Breyer. Nas análises da composição química do óleo essencial dessa espécie, também foi evidenciada a presença de eugenol, benzaldeído e de benzoato de benzila (Lima et al., 2005; Viegas, 2005).

As indicações da presença de mandelonitrila e de benzoato de mandelonitrila no óleo essencial, embora muito instáveis, podem estar potencializando o efeito fungitóxico desse metabólito secundário, devido aos seus elevado grau de toxicidade (Darling et al., 2001).

Apesar de neste trabalho a produção de aflatoxina não ter sido avaliada, pesquisadores comprovam uma forte influência da reprodução do fungo com a presença dessa micotoxina. No caso do *Aspergillus flavus*, um decréscimo na esporulação reprime a produção de metabólitos secundários (aflatoxinas B1 e B2). Isso ocorreu provavelmente devido à existência de uma rota metabólica, que é controlada pela proteína G. Fatores como estresse, virulência e principalmente externos são os responsáveis pela redução da esporulação (Brodhagen & Keller, 2006). Com base nesse aspecto, a produção de aflatoxina pode ter sido reprimida, a partir da menor quantidade de óleo essencial aplicada (0,125 µL/mL).

De acordo com alguns trabalhos publicados, o efeito antifúngico do óleo essencial depende da composição química e do método de aplicação (Chu et al., 2001; Suhr & Nielsen, 2003). Alguns compostos fenólicos, como timol e eugenol, têm sido mais eficientes quando aplicados diretamente ao meio de cultura, enquanto compostos menores, como o alil isotiocianato e citral são mais eficazes quando utilizados por meio de fumigação (Suhr & Nielsen, 2003). Neste trabalho, constatou-se uma superioridade da técnica de contato em relação à fumigação para a inibição micelial em dosagens do óleo essencial inferiores a 1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Para a esporulação, os resultados não foram expressivos.

4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* apresentou como componente majoritário o benzaldeído.

Pelos resultados dos bioensaios realizados até 10 dias de incubação, verificou-se que a inibição total do crescimento micelial ocorreu quando utilizou-se o óleo essencial nas concentrações de 0,5 µL/mL na técnica de contato e 1,0 µL/mL na técnica de fumigação. Em ambas as técnicas, o óleo essencial inibiu a esporulação a partir da concentração de 0,5 µL/mL.

A ação fungitóxica do óleo essencial sobre o *Aspergillus flavus* pode ser provavelmente atribuída à presença do benzaldeído, em associação com álcool benzílico, benzoato de metila, etila e benzila, eugenol e mandelonitrila.

AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA - Acre, ao Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio Pesquisa e Extensão de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro e bolsas concedidas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.

AOCS Official Method Da2b-42. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society**. 4. ed. Champaign: American Oil Chemists Society, 1994.

BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C. A. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N, E. Brown. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1221-1225, nov./dez. 2006

BRENNA, E. **Chemistry Today**, v. 23, p. 8, 2006.

BRITO, J. P.; OLIVEIRA, J. E. M.; BORTOLI, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus ssp*. Sobre *Callosobruchus maculants* (Coleoptera : Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p. 96-103, 2006.

BRODHAGEN, M.; KELLER, N. P. Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 7, p. 4, p. 285-301, July 2006.

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 6. ed. Belém: MPEG, 1996.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. 2000. 125 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

CHU, C. L.; LIU, W. T.; ZHOU, T. Fumigation of sweet cherries with thymol and acetic acid to reduce postharvest brown rot and blue mold rot. **Fruits**, Paris, v. 52, n. 2, p. 123-129, 2001.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981.

DARLING, C.; SCHOROEDER, F.; MEINWALD, J.; EISNER, M.; EISNER, T. Production of a cyanogenic secretion by a thyrigid caterpillar (*Calindoea trifascialis*, Thyrididae, Lepdoptera). **Naturwissenschaften**, New York, v. 88, p. 306-309, 2001.

DEVARAJAN, T.; SREEYAPUREDDY, A.; THAMMINENI, P.; REDDY, P. N.; RAMACHANDRAIAH, O. S. Essential oil constituents and in vitro antimicrobial activity of *decalepis hamiltonii*, roots against foodborn pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 11, p. 3147-3149, May 2002.

ESTRELA, J. L. V.; FAZOLIN, M.; CATANI, V.; ALÉRCIO, M. R.; LIMA, M. S. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 217-222, fev. 2006.

FERREIRA, D. F. **Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000.

GOTTLIEB, O. R. ; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T. ; MAIA, J. G. S.; MENDES, A. I. R.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 11, n. 1, p. 143-148, mar. 1981.

GUPTA, S.; KAISHEVA, E. Development of multidose formulation for humanized monoclonal antibody using experimental design techniques. **AAPS PharmaSci**, Alexandria, v. 5, n. 2, p. 8, 2003.

JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; JARDIM, C. M.; VALENTE, V. M. M. Identification on the major fungitoxic component of *Cinnamon bark* oil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 404-408, Aug. 2005.

KREBS, H. A.; WIGGINS, D.; STUBBS, M.; SOLS, A.; BEDOYA, F. Studies on the mechanism of the anti-fungal action of benzoate. **Biochemical Journal**, London, v. 214, n. 3, p. 657-663, 1983.

- LIMA, M. P.; SILVA, T. M. D.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba Canelilla (Kunth) Mez* from Manaus, Brazil. **Acta Amazônica**. Manaus, v. 34, n. 2, p. 329-330, abr./jun. 2004.
- LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M. D.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum Zeylanicum Blume (Lauraceae)*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 3, p. 363-366, jul./set. 2005.
- MATSUOKA, H.; YOSHIKAZU, I.; TAKEKAWA, Y.; TERAOKA, T. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 12, p. 3779-3784, Dec. 1990.
- MING, L. C. **Levantamento de plantas medicinais na reserva extrativista Chico Mendes – Acre**. 1995. 192 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Julho de Mesquita Filho, Botucatu, SP.
- MOHSENIN, N. N. **Physical properties of plant and animal materials**. 14. ed. New York: Gordon and Breach, 1970.
- MÜLLER, C. H.; FIGUERÊDO, F. J. C.; KATO, A. K.; CARVALHO, J. E. U.; STEIN, R. L. B.; SILVA, A. **A cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: EMBRAPA, 1995.
- MÜLLER-RIEBAU, F.; BERGER, B.; YEGEN, O. Chemical-composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2262-2266, Aug. 1995.
- NAAKAHARA, K.; ALZOREKY, N. S.; YOSHIHASHI, T.; NGUYEN, H. T. T.; TRAKOONTIVAKORN, G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *cymbopogon nardus (citronella grass)*. **Japan Agricultural Research Quartely**, Tsukuba, v. 37, n. 4, p. 249-252, Oct. 2003.
- ÔMURA, H.; KUWAHARA, Y.; TANABE, T. Species-specific chemical compositions of defense secretions from *Parafontaria tonominea attems* and *Riukiaria semicircularis semicircularis* Takakuwa (*Polydesmida: Xystodesmidae*). **Applied Entomology Zoology**, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 73-78, Feb. 2002.

PEREIRA, M. C. **Efeito da adição de condimentos no controle de microorganismos, na conservação de produtos de panificação e na inibição de metabólitos produzidos por fungos associados ao café.** 2001. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PETROUNIA, I. P.; GOLDBERG, J.; BRUSH, E. J. Transient inactivation of mandelonitrile lyase By 3-methyleneoxindole – A photooxidation product of the natural plant hormone indole – 3-acetic-acid. **Biochemistry**, Washington, v. 33, n. 10, p. 2891-2899, Mar. 1994.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, maio/abr. 2006.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage.** 7. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.

PLETSCH, M.; SANT'ANA, A. E. G. Secondary compound accumulation in plants – The application of plant biotechnology to plant improvement. **Chemistry of the Amazon ACS Symposium Series**, Washington, v. 588, p. 51-64, 1995.

POULTON, J. E. Cyanogenesis in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, n. 2, p. 401-405, Oct. 1990.

RIBNICKY, D. M.; SHULAEV, V.; RASKIN, L. Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 2, p. 565-572, Oct. 1998.

SCHOCH, T. J.; LEACH, W. H. Determination of Absolute Density Liquid Displacement. In: WHESTLES, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Methods in Carbohydrates Chemistry.** Academic Press, v. 4, p. 101-103, 1964.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A. R. New bioactive metabolites produced by, *Phomopsis cassiae*, and endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6B, p. 1463-1466, Dec. 2005.

SOUZA, J. M. L. **Manual de segurança e qualidade para a cultura da castanha-do-brasil**. Brasília: CampoPAS, 2004.

SOUZA, M. L. **Estudos de processos tecnológicos para a obtenção de produtos derivados de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, H. B. K.)**. 1984. 139 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

SUHR, K. I.; NIELSEN, P. V. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye spoilage fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 665-674, 2003.

SUNG, B. K.; LIM, J. H.; LEE, H. S. Food protective and color alteration effects of acaricidal aldehydes on *tyrophagus putrescentiae* (Schrank). **Journal of Food Protection**, Ames, v. 69, n. 7, p. 1728-1731, July 2006.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 52-59, jan./jun. 2000.

VAUGHN, S. F.; SPENCER, G. F. Antifungal activity of natural compounds against thiabendazole resistant *fusarium-sambucinum* strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 1, p. 200-203, Jan. 2004.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V. Toxidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 915-919, dez. 2005.

WANG, S. Y.; CHEN, P. F.; CHANG, S. T. Antifungal activities of essential oils their constituents from *indigenus cinnamom* (*Cinnamomum osmoplaloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 813-818, May 2005. WINK, M. **Physiology of secundar product formation in plants**. Oxford: Clarendon Press, 1990.

YOUNG-CHEOL, Y.; HOI-SEON, L.; LEE, S. H.; CLARK, J. M.; YOUNG-JOON, A. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum Zeylannicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus Capitis* (*Anaplura: Pediculidae*). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, n. 14, p. 1595-1600, Dec. 2005.

ANEXO

TABELA 1. Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Tanaecium nocturnum*.

Constituintes	IK*	% Área
Benzaldeido	962	74,70
1-Octen-3-ol	981	0,81
o-Cimeno	1022	0,21
Alcool benzílico	1035	7,89
Fenilacetaldeido	1041	0,60
Benzoato de metila	1090	0,65
Benzoato de etila	1168	0,93
Salicilato de metila	1188	0,26
Safrol	1283	0,87
Mandelonitrila	**	3,96
Eugenol	1354	0,21
Benzoato de benzila	1758	3,28
Total identificado		94,37

* Índices de Kovats calculados

** Não encontrado em literatura

TABELA 2. Dados de massas espectral (GC/EM) de constituintes químicos identificados em secreções de *Parafontaria tonominea* (*) e *Riukiaria semicircularis semicircularis* (*) e no óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*.

Constituintes	m/z (int.rel.)
Benzaldeido	106 ([M] ⁺ , 100), 105 (98), 77 (79), 51(26)* 106 ([M] ⁺ , 66), 105 (71), 77 (100), 51 (64)
Mandelonitrila	133 ([M] ⁺ , 32), 115 (19), 106 (93), 105 (100), 77 (88), 51 (28)* 133 ([M] ⁺ , 52), 115 (31), 106 (45), 105 (82), 77 (100), 51 (35)

TABELA 3. Valores médios da inibição do crescimento micelial (ICM) em função do efeito fungitóxico do óleo essencial utilizando a técnica de contato.

Tratamentos	ICM (%)	
	5 dias	10 dias
TA	0,0aA	0,0aA
DMSO	0,0aA	0,0aA
T1 = 0,125 µL/mL	31,65bA	35,43bA
T2 = 0,25 µL/mL	50,85cA	49,19cA
T3 = 0,50 µL/mL	100,00dA	100,00dA
T4 = 1,0 µL/mL	100,00dA	100,00dA

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CV(%) = 6,91 Média Geral = 47,43

TABELA 4. Valores médios da inibição do crescimento micelial ((ICM) em função do efeito fungitóxico do óleo essencial utilizando a técnica de fumigação.

Tratamentos	ICM (%)	
	5 dias	10 dias
TA	0,0aA	0,0aA
T1 = 0,125 µL/mL	23,56bA	18,80bA
T2 = 0,25 µL/mL	50,63cA	32,94cB
T3 = 0,50 µL/mL	100,00dA	80,71dB
T4 = 1,0 µL/mL	100,00dA	100,00eA

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

CV(%) = 5,84 Média Geral = 48,60

TABELA 5. Valores médios da produção de esporos em função do efeito fungitóxico do óleo essencial utilizando as técnicas de contato e fumigação.

Tratamentos	Contato*		Fumigação**	
	N° de esporos/cm ³		N° de esporos/cm ³	
	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias
TA	3,50 x 10 ⁶ aA	4,63 x 10 ⁶ aB	3,50 x 10 ⁶ aA	4,63 x 10 ⁶ aB
DMSO	3,63 x 10 ⁶ aA	5,00 x 10 ⁶ aB	-	-
T1 = 0,125 µL/mL	0,45 x 10 ⁶ bA	2,33 x 10 ⁶ bB	2,00 x 10 ⁶ bA	4,37 x 10 ⁶ aB
T2 = 0,25 µL/mL	0,45 x 10 ⁶ bA	1,43 x 10 ⁶ cB	0,68 x 10 ⁶ cA	0,74 x 10 ⁶ bA
T3 = 0,50 µL/mL	0,00cA	0,00dA	0,00dA	0,00cA
T4 = 1,0 µL/mL	0,00cA	0,00dA	0,00dA	0,00cA

Médias seguidas de mesma letra, sendo minúscula na coluna e maiúscula na linha, para cada técnica de aplicação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

*CV (%) = 19,31 Média Geral = 1,79 x 10⁶ **CV(%) = 12,16 Média Geral = 1,59 x 10⁶.

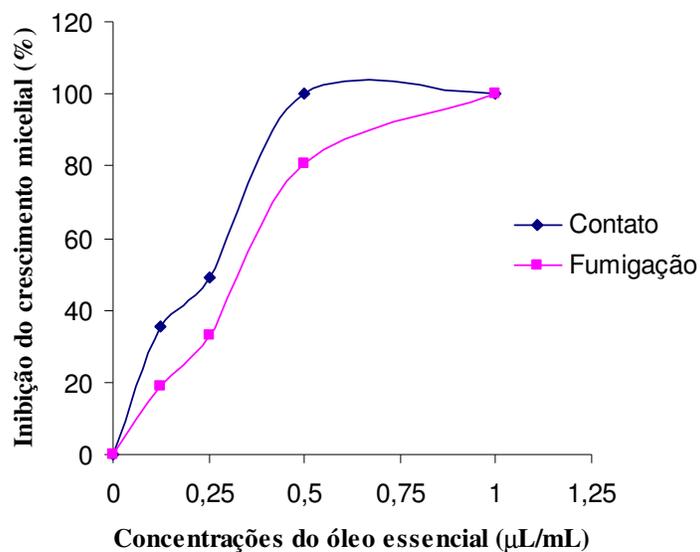


FIGURA 1. Efeito do óleo essencial sobre a inibição do crescimento micelial do *Aspegillus flavus* utilizando técnicas de contato e fumigação.

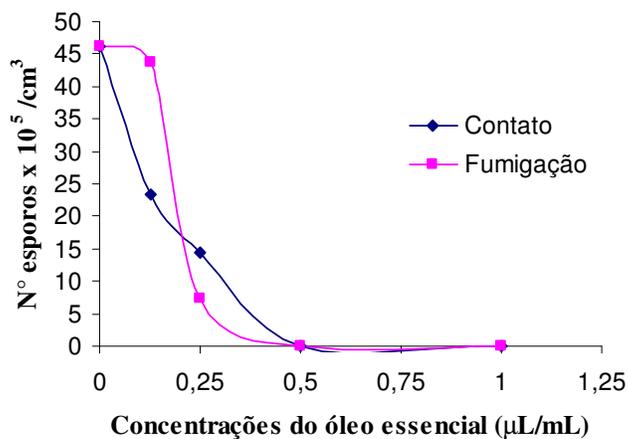


FIGURA 2. Efeito do óleo essencial sobre a produção de esporos do *Aspegillus flavus* utilizando técnicas de contato e fumigação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste projeto de pesquisa, foram atingidos os objetivos pré-estabelecidos, em função de demandas apresentadas pela comunidade Amazônica. O volume de informações geradas e divulgadas posteriormente vão de encontro aos vários seguimentos da Amazônia e especificamente no Estado do Acre. Entre estes estão:

- os consumidores diretos, que utilizam essas plantas sem nenhum controle do potencial biológico;
- os pesquisadores das áreas fitogenética, fitotécnica, entomológica e farmacêutica, que vêm conduzindo uma gama de projetos sem conhecimento fitoquímico das referidas espécies;
- os extrativistas orgânicos (seringueiros e colonos) de castanha-do-brasil, que vêem nos produtos naturais uma forma de controle para a aflatoxina;
- para os químicos que buscam princípios ativos naturais para desenvolvimento de novas drogas.

Entre os principais resultados obtidos destacam-se:

- a identificação de três amidas anestésicas na espécie *Piper piscatorum*;
- o efeito antiaflatogênico do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* ;
- os cuidados que se devem ter com a matéria-prima das referidas espécies, devido à instabilidade de compostos fixos e voláteis apresentados durante o processo de secagem;
- a eficiência do CO₂ supercrítico na extração das amidas identificadas.

ANEXOS GERAIS

ANEXOS GERAIS

1. Tabelas de Análises de Variância

1.1 CAPÍTULO 2

1.1.1. Rendimento de óleo essencial de *Piper piscatorum*

TABELA 1.1.1. Quadrados médios da análise de variância do rendimento de óleo essencial extraído de raízes de *Piper piscatorum*, submetidas às diferentes temperaturas de secagem (30°C e 40°C).

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamentos	2	0,177880	0,088940	142,684	0,0000
Resíduo	12	0,007480	0,000623		
Total corrigido	14	0,185360			
		CV (%) = 26,01		Média geral = 0,096	

1.1.2. Rendimento do extrato de *Piper piscatorum*

TABELA 1.1.2. Quadrados médios da análise de variância do rendimento do extrato (%b.s.) obtido de raízes de *Piper piscatorum* em função do tipo de solvente e técnicas de extrações

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Téc. de ext. (TE)	1	14,347260	14,347260	305,358	0,0000
Matéria-prima (MP)	1	4,873500	4,873500	103,725	0,0000
Solventes (S)	4	421,200450	10,5,300112	2241,143	0,0000
TE*MP	1	1,029660	1,029660	21,915	0,0000
TE*S	4	9,261390	2,315347	49,278	0,0000
MP*S	4	8,410950	2,102738	44,723	0,0000
TE*MP	4	0,717690	0,179423	3,819	0,0101
Resíduo	40	1,879400	0,046985		
Total corrigido	59	461,720300			
		CV (%) = 5,65		Média geral = 3,84	

1.2. CAPÍTULO 3

1.2.1. Rendimento do extrato de *Piper piscatorum*

TABELA 1.2.1. Quadrados médios da análise de variância do rendimento do extrato (%b.s.) de *Piper piscatorum*, obtido durante o tempo dinâmico, em função da matéria-prima, tipo de solvente e temperatura de extração.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Temperatura (T)	1	1,698678	1,698678	116,570	0,0000
Matéria-prima (MP)	1	0,448900	0,448900	30,805	0,0000
Solventes (S)	2	14,803006	7,401503	507,919	0,0000
T*MP	1	0,435600	0,435600	29,892	0,0000
T*S	2	0,569872	0,284936	19,553	0,0000
MP*S	2	3,280550	1,640275	112,562	0,0000
T*MP	2	0,146617	0,073308	5,031	0,0150
Resíduo	24	0,349733	0,014572		
Total corrigido	35	21,732956			
CV (%) = 6,75		Média geral = 1,79			

1.2.2. Teores de piperovatina no extrato (% Área)

TABELA 1.2.2. Quadrados médios da análise de variância do teor de piperovatina (% Área) de *Piper piscatorum*, obtido durante o tempo dinâmico, em função da matéria-prima, tipo de solvente e temperatura de extração.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Temperatura (T)	1	729,186178	729,186178	345,993	0,0000
Matéria-prima (MP)	1	1938,640900	1938,640900	883,521	0,0000
Solventes (S)	2	382,646772	191,323386	87,194	0,0000
T*MP	1	37,699600	37,699600	17,181	0,0004
T*S	2	127,545839	63,772919	29,064	0,0000
MP*S	2	493,104817	246,552408	112,364	0,0000
T*MP	2	42,393150	21,196575	9,660	0,0008
Resíduo	24	52,661333	2,194222		
Total corrigido	35	3833,878589			
		CV (%) = 7,69		Média geral = 19,27	

1.2.3. Massa de piperovatina (g/100g de matéria-prima b.s.)

TABELA 1.2.3. Quadrados médios da análise de variância da massa de piperovatina (g/100g b.s) de *Piper piscatorum*, obtido durante o tempo dinâmico, em função da matéria-prima, tipo de solvente e temperatura de extração.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Temperatura (T)	1	0,115600	0,115600	378,327	0,0000
Matéria-prima (MP)	1	0,313600	0,313600	1026,327	0,0000
Solventes (S)	2	0,653906	0,326953	1070,027	0,0000
T*MP	1	0,030044	0,030044	98,327	0,0000
T*S	2	0,248150	0,124075	406,064	0,0000
MP*S	2	0,154550	0,077175	252,573	0,0000
T*MP	2	0,051772	0,25886	84,718	0,0000
Resíduo	24	0,007333	0,00306		
Total corrigido	35	1,574756			
CV (%) = 5,66			Média geral = 0,31		

1.2.4. Teores de pipercollosidina no extrato (% Área)

TABELA 1.2.4. Quadrados médios da análise de variância do teor de pipercollosidina (% Área) de *Piper piscatorum*, obtido durante o tempo dinâmico, em função da matéria-prima, tipo de solvente e temperatura de extração.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Temperatura (T)	1	28,604669	28,604669	615,743	0,0000
Matéria-prima (MP)	1	122,803336	122,803336	2643,459	0,0000
Solventes (S)	2	42,643817	21,321908	458,974	0,0000
T*MP	1	3,603669	3,603669	77,572	0,0000
T*S	2	51,029839	25,514919	549,233	0,0000
MP*S	2	16,138706	8,069353	173,700	0,0000
T*MP	2	18,939106	9,469553	203,841	0,0000
Resíduo	24	1,114933	0,046456		
Total corrigido	35	284,878075			
		CV (%) = 8,12		Média geral = 2,65	

1.2.5. Massa de pipercollosidina (g/100g de matéria-prima b.s.)

TABELA 1.2.5. Quadrados médios da análise de variância da massa de pipercollosidina (g/100g b.s) de *Piper piscatorum*, obtida durante o tempo dinâmico, em função da matéria-prima, tipo de solvente e temperatura de extração.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Temperatura (T)	1	0,011025	0,011025	380,172	0,0000
Matéria-prima (MP)	1	0,044944	0,044944	1549,793	0,0000
Solventes (S)	2	0,044155	0,022078	761,300	0,0000
T*MP	1	0,002116	0,002116	72,966	0,0000
T*S	2	0,013997	0,006998	241,319	0,0000
MP*S	2	0,033462	0,016731	576,934	0,0000
T*MP	2	0,008396	0,004198	144,761	0,0000
Resíduo	24	0,000696	0,000029		
Total corrigido	35	0,158791			
CV (%) = 10,71			Média geral = 0,05		

1.3. CAPÍTULO 4

1.3.1. Rendimento de óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*

TABELA 1.3.1. Quadrados médios da análise de variância do rendimento de óleo essencial extraído de raízes, caules e folhas de *Tanaecium nocturnum*, submetidas a diferentes temperaturas de secagem (30°C e 40°C).

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Matéria-prima (MP)	2	0,023284	0,011642	7,604	0,0018
Tratamentos (T)	2	5,307124	2,653562	1733,096	0,0000
MP*T	4	2,957529	0,739382	482,906	0,0000
Resíduo	36	0,055120	0,001531		
Total corrigido	44	8,343058			
CV (%) = 6,73		Média geral = 0,58			

1.4. CAPÍTULO 5

1.4.1. Inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus*

TABELA 1.4.1.1. Quadrados médios da análise de variância da inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus*, utilizando a técnica de contato.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamentos	5	60797,4682	12159,4936	1133,288	0,0000
Dias	1	1,0000	1,0000	0,093	0,7628
Tratamentos*Dias	5	24,5569	4,9114	0,458	0,8035
Resíduo	24	257,5055	10,7294		
Total corrigido	35	61080,5307			
CV (%) = 6,91			Média geral = 47,4250		

TABELA 1.4.1.2. Quadrados médios da análise de variância da inibição do crescimento micelial de *Aspergillus flavus*, utilizando a técnica de fumigação.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamentos	4	40738,3711	10184,5928	1264,198	0,0000
Dias	1	1168,2528	1168,2528	145,013	0,000
Tratamentos*Dias	4	1729,0599	432,2650	53,656	0,000
Resíduo	20	161,1234	8,0562		
Total corrigido	29	43796,8072			
CV (%) = 5,84			Média geral = 48,5983		

1.4.2. Efeito do óleo essencial sobre a produção de esporos de *Aspergillus flavus*

TABELA 1.4.2.1. Quadrados médios da análise de variância da contagem de esporos utilizando a técnica de contato.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamentos	5	113,1133	22,6227	190,19	0,0000
Dias	1	7,2003	7,2003	60,532	0,0000
Tratamentos*Dias	5	4,3079	0,8616	7,243	0,0003
Resíduo	24	2,8548	0,1190		
Total corrigido	35	127,4763			
CV (%) = 19,31			Média geral = 1,79 x10 ⁶		

TABELA 1.4.2.2. Quadrados médios da análise de variância da contagem de esporos utilizando a técnica de fumigação.

Fatores de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Tratamentos	4	86,9838	21,7459	579,689	0,0000
Dias	1	3,8021	3,8021	101,353	0,0000
Tratamentos*Dias	4	6,5317	1,6329	43,529	0,0000
Resíduo	20	0,7503	0,0375		
Total corrigido	29	98,0678			
CV (%) = 12,16			Média geral = 1,59 x10 ⁶		