

Universidade de Taubaté

Caio Henrique Alves Pereira

**Efeito da Sazonalidade na produção de substâncias
voláteis em *Piper aduncum* L.**

Taubaté

2019

Caio Henrique Alves Pereira

**Efeito da Sazonalidade na produção de substâncias
voláteis em *Piper aduncum* L.**

Trabalho de Graduação apresentado
para obtenção do Título de Bacharel
pelo Curso de Ciências Biológicas do
Departamento de Biologia da
Universidade de Taubaté

Taubaté – SP

2019

Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBi/UNITAU
Biblioteca Setorial de Biociências

P436e Pereira, Caio Henrique Alves
Efeito da sazonalidade na produção de substâncias em
Piper aduncum L. / Caio Henrique Alves Pereira. – 2019.
45 f. : il.

Monografia (Graduação) – Universidade de Taubaté,
Departamento de Biologia, 2019.

Orientação: Prof. Me. Roberto de Oliveira Portella,
Departamento de Biologia.

1. Piper aduncum. 2. Sazonalidade. 3. Pluviosidade. I.
Título.

CDD- 583.25

CAIO HENRIQUE ALVES PEREIRA

**EFEITO DA SAZONALIDADE NA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
VOLÁTEIS EM *Piper aduncum* L.**

Trabalho de Graduação apresentado
para obtenção do Título de Bacharel
pelo Curso de Ciências Biológicas do
Departamento de Biologia da
Universidade de Taubaté,

Data: _____

BANCA EXAMINADORA

Membros / Instituição:

Prof. Dr. _____/Universidade de Taubaté

Prof. Dr. _____/ _____

Orientador

Prof. Me. _____/ _____

Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por ter me dado força para superar os obstáculos nessa empreitada.

Aos meus pais, Paulo Henrique Pereira e Ivanilde Alves Pereira, por sempre estarem ao meu lado e por todo o apoio fornecido para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Me. Roberto de Oliveira Portella, pelas muitas oportunidades de aprendizado e crescimento acadêmico e profissional.

À Universidade de Taubaté pela Bolsa PIBIC, o que me permitiu realizar este trabalho.

À Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques pelo apoio fornecido via IAC, permitindo que as extrações e os processos de captura dos voláteis fossem realizados.

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

"Non nobis, Domine, non nobis, sed Nomini Tuo ad Gloriam"

Salmos 113:9

RESUMO

As plantas apresentam um sistema metabólico altamente complexo o qual é dividido em metabolismo primário, fruto da produção de substâncias fundamentais à vida das plantas, e o metabolismo especializado, cuja produção de substâncias voláteis e não-voláteis é altamente específica para cada espécie vegetal e fornece proteção contra interações bióticas e abióticas. Os chamados compostos voláteis emitidos por meio dos tecidos vegetativos, como parte do sistema de defesa da planta, podem rechaçar ou intoxicar animais, ou ainda atrair inimigos naturais, que serão responsáveis pela proteção da planta indiretamente, por meio de interação trófica. Um dos eventos que leva a alterar significativamente o comportamento da produção de substâncias voláteis é a sazonalidade, sendo considerado um dos principais eventos nos biomas brasileiros que leva a profundas mudanças metabólicas nas plantas. Dentre essas mudanças, podemos observar, desde pequenas alterações químicas, como até mesmo abruptas variações nos teores das substâncias voláteis em diversas espécies nativas. Uma espécie, em especial, a *Piper aduncum*, é muito cultivada em virtude suas propriedades medicinais e aromáticas que despertam um interesse econômico. Por isso, faz-se necessário de uma investigação que se possa caracterizar a composição das substâncias voláteis nas diferentes épocas de coleta e avaliar a interferência da sazonalidade na composição química das substâncias voláteis de *Piper aduncum*. Como resultados, obtive que a precipitação foi o principal fator responsável por promover alterações no perfil químico dos compostos voláteis, onde na época úmida houve predomínio de monoterpenos, já na época seca, houve predomínio de sesquiterpenos. Além disso, observamos que a precipitação não age sozinha na seletividade de rotas químicas, mas também a composição química do solo, fator de extrema importância que promove modulações nas respostas químicas de *P. Aduncum*. Por fim, há necessidade de se ter um aumento no número amostral a ser avaliado, a fim de assegurar que os eventos ambientais realmente sejam os responsáveis pela segregação quanto à produção das substâncias químicas.

Palavras chave: *Piper aduncum*; Sazonalidade; Pluviosidade;

ABSTRACT

Plants have a highly complex metabolic system which is divided into primary metabolism, resulting from the production of substances essential to plant life, and specialized metabolism, whose production of volatile and nonvolatile substances is highly specific to each plant species and provides protection against biotic and abiotic interactions. The so-called volatile compounds emitted through vegetative tissues, as part of the plant's defense system, can repel or intoxicate animals, or even attract natural enemies who will be responsible for protecting the plant indirectly through trophic interaction. One of the events that significantly alters the behavior of volatile substance production is seasonality, being considered one of the main events in Brazilian biomes that leads to profound metabolic changes in plants. Among these changes, we can observe, from small chemical changes, as even abrupt variations in volatile substance contents in several native species. One species, in particular *Piper aduncum*, is widely cultivated because of its medicinal and aromatic properties that arouse economic interest. Therefore, an investigation is needed to characterize the composition of volatile substances at different collection times and to evaluate the interference of seasonality in the chemical composition of volatile substances of *Piper aduncum*. As a result, precipitation was the main factor responsible for promoting changes in the chemical profile of volatile compounds, where in the wet season there was a predominance of monoterpenes, while in the dry season there was a predominance of sesquiterpenes. Moreover, we observed that precipitation does not act alone in the selectivity of chemical routes, but also in the chemical composition of the soil, an extremely important factor that promotes modulations in *P. Aduncum* chemical responses. Finally, there is a need for an increase in the sample size to be evaluated to ensure that environmental events are actually responsible for segregation of chemical production.

Keywords: *Piper aduncum*. Seasonality. Rainfall

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Locais de coleta na Fazenda Renópolis, no município de Santo Antônio do Pinhal, Estado de São Paulo, Brasil. A linha verde corresponde à Trilha Principal e a linha branca corresponde à Trilha Baixa. O ponto TP01 possui por coordenadas geográficas (Latitude: 22°48'22.45" S; Longitude: 45°37'25.55" O). O ponto TP03 possui por coordenadas geográficas (Latitude: 22°48'22.05" S; Longitude: 45°37'18.34" O). O ponto TB02 possui por coordenadas geográficas (Latitude: 22°48'15.18" S; Longitude: 45°37'31.24" O).....19

Figura 2: A Quantidade de chuva no período de janeiro a dezembro de 2019. Setas laranja indicam os meses onde foram realizadas as duas coletas correspondendo ao mês de junho (época chuvosa) e setembro (época seca). Não foi possível obter os dados referentes aos meses de outubro, novembro e dezembro.....20

Figura 3 – Análise de Componentes Principais (PCA) das substâncias voláteis de *Piper aduncum* em duas épocas de coleta. A: época úmida; B: época seca.....27

Figura 4 - *Loadings* da análise de componentes principais (PCA). Pode-se observar de maneira mais clara a variação existente na distribuição das substâncias químicas e sua relação com as épocas de coleta.....28

Figura 5 - Perfil cromatográfico das substâncias voláteis relacionadas com os pontos e épocas de coleta. Cromatogramas de *Piper aduncum* L. por cromatografia gasosa. Cada cromatograma corresponde a uma amostra estudada por ponto de coleta. (A) corresponde a época de coleta úmida - Trilha Principal 01. (B) corresponde a época de coleta úmida - Trilha Principal 03. (C) corresponde a época de coleta úmida - Trilha Baixa 02. (D) corresponde a época de coleta seca - Trilha Principal 01S. (E) corresponde a época de coleta seca - Trilha Principal 03S. (F) corresponde a época de coleta seca - Trilha Principal 02S.....29

Figura 6 - Análise Hierárquica de Cluster (HCA), realizada com a Distância Euclidiana com enlace de Ward . A letra **A** em vermelho representa a época

úmida e a letra **B** em verde representa a época seca. Esse tipo de análise se utiliza da padronização dos dados, e também, pelo emprego da distância euclidiana que permite o controle na diferença de dois valores quando eles são comparados.30

Figura 7 – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A letra **A** em vermelho representa a época úmida e a letra **B** em verde representa a época seca. É possível verificar um comportamento de separação entre as épocas.....31

Figura 8 – Z score da componente 1 (C1) da análise discriminante. Nesse ponto, verificou-se a participação da precipitação como fator limitante na ocorrência dessas substâncias que a sua disponibilidade foi importante para a dissociação dos íons no solo.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise da composição química do solo realizada nas amostras pelo laboratório de solos e plantas da UNITAU21

Tabela 2 – Composição química das substâncias voláteis encontradas em *Piper aduncum*. TP01 corresponde a Trilha Principal. TP03 corresponde a época de coleta úmida na Trilha Principal. TB02 corresponde a época de coleta úmida na Trilha Baixa. TP01S corresponde a época de coleta seca na Trilha Principal. TPS03 corresponde a época de coleta seca na Trilha Principal. TP2S corresponde a época de coleta seca na Trilha Principal. TR- Tempo de Retenção. IR Lit - corresponde ao índice de Retenção encontrado na Literatura. MI - corresponde ao Método de Identificação. EM - Espectrometria de Massas.....24

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
1. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2. INTRODUÇÃO.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 <i>Objetivo geral:</i>	20
3.2 <i>Objetivos específicos:</i>	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. <i>Material e delineamento experimental</i>	21
4.2. <i>Extração de componentes voláteis por Microextração em fase sólida em headspace (HE-SPME)</i>	24
4.3. <i>Caracterização química das substâncias voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)</i>	24
4.4. <i>Análises estatísticas</i>	24
5. RESULTADOS	25
5.1. <i>Composição química volátil de Piper aduncum</i>	25
5.2. <i>Efeito da sazonalidade e composição química do solo sobre a composição química do Piper aduncum</i>	29
6. DISCUSSÃO	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. REFERENCIAL TEÓRICO

As plantas apresentam um sistema metabólico altamente complexo, o qual é dividido em metabolismo primário, responsável pela produção de substâncias fundamentais à vida das plantas, e o metabolismo especializado, cuja produção de substâncias voláteis e não-voláteis é altamente específica para cada espécie vegetal, e fornece proteção contra interações bióticas, abióticas e comunicação planta-planta (DEGENHARDT et al., 2009; TAIZ & ZEIGER, 2013).

O processo fotossintético, pelo qual as espécies vegetais podem assimilar CO₂ e fixá-lo em moléculas orgânicas fundamentais para o seu crescimento e desenvolvimento, é caracterizado por apresentar um nível elevado de integração metabólica, podendo assim, instigar vários outros processos, uma vez que seu produto é aproveitado em praticamente todas as vias que integram o metabolismo vegetal (PORTES, 2010).

Em oposição as principais vias metabólicas que realizam as funções de síntese, degradação e conversão dos compostos comuns de serem encontrados em todos os organismos, existem vias metabólicas que envolvem compostos com distribuição muito limitada na natureza. Estes compostos, denominados metabólitos especializados são encontrados em organismos específicos ou grupos de organismos e são uma expressão da individualidade das espécies (DEWICK, 2009).

O metabolismo especializado vegetal está dividido em três rotas bioquímicas centrais, sendo elas a rota do ácido mevalônico (MVA), a rota do metil-eritritol-fostato (MEP) e a rota do ácido chiquímico, responsáveis pela produção de terpenos de cadeias carbônicas curtas e longas, mas também de flavonoides, flavonas, flavanonas, taninos, alcaloides e compostos nitrogenados (FAGAN et al., 2015; DEGENHARDT et al., 2009). As rotas bioquímicas do MVA e do MEP são evolutivamente antigas, surgindo em organismos procariontes e sendo eles mantidos nos organismos eucariontes via processo de endossimbiose, associado aos mais diversos processos evolutivos que afetam a dinâmica das populações e comunidades de organismos (MARTIN, 2001). Essas rotas são as

principais rotas que controlam a produção dos componentes voláteis constituintes de óleos essenciais nas plantas atuais.

As vias de produção de óleos essenciais e substâncias voláteis, como a via do MVA, do MEP e do ácido chiquímico, são encontradas em diferentes estruturas celulares, como também em estruturas especializadas. A rota do MVA ocorre no citoplasma celular e está relacionada com a produção de esteroides, ubiquinonas e terpenóides (AHARONI et al., 2006; DHAR et al., 2013). Já a rota MEP ocorre nos plastídios e é responsável pela biossíntese de plastoquinonas, carotenoides, clorofilas, terpenos e fitóis (EISENREICH et al., 2004; PHILLIPS et al., 2008). Alguns compostos intermediários possuem atuação nas duas rotas, mas ainda não se determinou totalmente quais desses compostos são produzidos na rota MEP e enviados para a rota do ácido mevalônico e vice-versa (HEMMERLIN et al., 2013).

Para a maioria dos autores, a produção desses metabólitos é regida por radicais de Isopreno, hidrocarboneto que contem cinco carbonos. Esse hidrocarboneto é convertido em diversos radicais, como por exemplo, o geranil difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP), geranil-geranil difosfato (GGPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), os quais são convertidos a uma dos 30.000 esqueletos carbônicos terpênicos pela ação catalítica das terpeno-sintases (SCHMIDT & GERSHENZON, 2007; DEGENHARDT et al., 2009; JONES et al., 2011; LI & FAN, 2011).

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) das plantas são compostos que possuem baixo peso molecular (abaixo de 300 Da), sendo liberados por praticamente todos os tecidos vegetais, sendo agrupados em diferentes classes, como a classe: terpenóides, fenilpropanóides/benzenóides, derivados de ácidos graxos e o compostos C5-ramificados (DUDAREVA; PICHERSKY, 2008). Existem também os derivados de aminoácidos, que são comumente encontrados como ingredientes presentes em aromas durante a liberação por flores e frutos (DUDAREVA; PICHERSKY, 2008). Os COVs são geralmente líquidos lipofílicos de alta pressão de vapor e podem atravessar membranas celulares facilmente, sendo assim, liberados tanto na atmosfera quanto no solo, quando não existe uma barreira de difusão (PICHERSKY et al., 2006).

As funções básicas dos COVs estão relacionadas com a defesa da planta contra ataque de herbívoros ou patógenos, e também, na atração de polinizadores e dispersores de sementes, proporcionando vantagem reprodutiva às plantas (PICHERSKY; GERSHENZON, 2002). Os COVs emitidos por meio dos tecidos vegetativos, como parte do sistema de defesa da planta, podem rechaçar (KESSLER; BALDWIN, 2001) ou intoxicar (VANCANNEYT et al., 2001) animais, ou ainda atrair inimigos naturais, que serão responsáveis pela proteção da planta indiretamente, por meio de interação trófica (ARIMURA et al., 2004). Além disso, os COVs podem realizar a função de alerta para plantas vizinhas a respeito de um ataque de algum herbívoro ou patógeno (PINTO-ZEVALLOS et al., 2013), induzindo defesa, ou preparando estas plantas para responder mais rapidamente em um ataque futuro, evento denominado de Efeito Priming (ENGELBERTH et al., 2004). As funções biológicas dos COVs são reguladas, não somente por interações bióticas, como também por interações abióticas.

Um dos mais marcantes eventos para alguns biomas brasileiros é a sazonalidade (RIZZINI, 1998). A sazonalidade é classificada como uma janela ambiental, bem estabelecida, a qual apresenta valores distintos de temperatura, umidade relativa e precipitação, capaz de modificar o metabolismo das plantas, gerando possíveis padrões metabólicos (ALMEIDA et al., 2016). Por isso termo sazonalidade foi definido nesse trabalho como variação pluviométrica ao longo de duas épocas avaliadas, o que caracteriza uma época seca e outra chuvosa. Os metabólitos especializados produzidos em rotas bioquímicas complexas são constantemente selecionados por mecanismos ambientais, tais como variações de temperatura e precipitação (ALMEIDA et al., 2016), variações na incidência luminosa (PORTELLA et al., 2014), na altitude (CIRAK et al., 2017), na umidade relativa (ALMEIDA et al., 2014), mas também por diferentes interações biológicas. Esses fenômenos agem nas plantas, modulando seu metabolismo os quais alteram, mesmo que temporariamente, os teores das substâncias nas plantas.

Estudo conduzido por (VIVALDO et al., 2017) relatou a influência ambiental na produção dos COVs onde ficou a importância da espécie quanto a produção desses compostos foi destacada. Nesse estudo foram avaliados 75 grupos de COVs produzidos por 109 espécies de plantas. As condições ali estudadas mostraram a importância do local onde a planta estava inserida, em um contexto de variação de

época de coleta. Tal ação, foi também abordada por (BRACHO-NUNEZ et al., 2013) quando as concentrações dos compostos produzidos por plantas na Amazônia e no Mediterrâneo foram comparadas. Com uma variação quanto ao percentual de monoterpenos e sesquiterpenos produzidos em épocas distintas, como no caso, a sazonalidade. Pois a variação das condições ao longo do período avaliado é responsável por interferir na quantidade e no ritmo de produção dos COVS.

A mudança na dinâmica de liberação dos COVs para o ambiente traz consequências para as funções ecológicas e fisiológicas para as plantas (PEÑUELAS & STAUDT, 2009). Segundo o IPCC, biomas os quais apresentam variações de precipitação, umidade relativa e temperatura apresentarão eventos de sazonalidade mais marcantes, podendo influenciar significativamente na dinâmica dos processos ecológicos e evolutivos dessas áreas (PACHAURI et al., 2014). Pensado sobre esse aspecto, a produção e a composição química dos óleos essenciais de plantas nativas poderá ser comprometido, influenciando significativamente nas relações ecológicas dessas plantas, como também em seus potenciais usos industriais.

No Brasil, espécies da família Piperaceae estão espalhadas por uma grande variedade de áreas de floresta primária e secundária, indo desde o nível do mar até 2000 m de altitude (FAZOLIN et al., 2006). O gênero *Piper* constitui um importante grupo dentro da família Piperaceae, por abarcar uma grande quantidade de espécies que possuem importância econômica por apresentarem propriedades aromáticas e medicinais (PICARD et al., 2014; RAUTAND KARUPPAYIL, 2014)

A família é muito importante como fonte de substâncias com atividade farmacológica, especialmente do gênero *Piper*, o mais estudado e conhecido do ponto de vista químico (DI STASI et al., 2002) e pode ser considerado o de maior importância, pois apresenta diversas aplicações estando essas atividades relacionadas a sua importância comercial, econômica e medicinal (FAZOLIN et al., 2006).

A fitoquímica do gênero *Piper* apresenta cerca de 600 componentes químicos, pertencentes a diversas classes dos chamados bioativos, como é o caso dos: alcaloides, amidas e propenilfenóis (BERNARD, et al., 1995). Os metabólitos acumulados pelas espécies dessa família de plantas são caracterizados por

apresentarem uma biossíntese mista (chiquimato/mevalonato), resultando na produção de amidas ou de compostos aromáticos do tipo lignanas e neolignanas (FAZOLIN, et al., 2006). De acordo com (BERNARD, et al., 1995), espécies do gênero *Piper* produzem nas suas folhas diversos tipos de produtos biologicamente ativos, incluindo fenilpropanóides, lignóides, e flavonóides.

Uma das plantas investigadas sobre o ponto de vista da sazonalidade é a *Piper aduncum* L. (Piperaceae), conhecida como jaborandi-falso, pimenta-de-fruto-ganchoso, tapa-buraco, aberta-ruão e pimenta-de-macaco. Devido a sua importância no âmbito medicinal e econômico a espécie foi listada na primeira edição da Farmacopeia Oficial, publicada em 1926 do, então Estados Unidos do Brasil, como “Extrato Fluido de Aberta-Ruão” (*Extractum piperis aduncifluidum*), um tipo de extrato hidroalcoólico feito a partir da folha dessa espécie (BRANDÃO et al., 2008). Esse fato pode ser verificado quando populações fazem o uso de chás ou via infusão alcoólica de suas folhas, raízes e frutos que são empregados como: tônico, carminativo, antiespasmódico, contra blenorragia e para infecções do fígado, vesícula e baço (VAN DEN BERG, 1993). Tal ação reflete a importância do estudo do *Piper aduncum* não só devido aos aspectos botânicos, mas como suas implicações nos ramos medicinal, social e econômico.

Em estudos realizados em diferentes locais da região Amazônica (FAZOLIN, et al., 2006), foi constatado a presença de dilapiol, um éter fenílico, como o componente mais abundante encontrado no óleo essencial de *Piper aduncum*, sendo que algumas variedades dessa planta apresentam teores de dilapiol próximos a de 90%. Outras substâncias como o Sarisan e Safrol, que possuem estruturas químicas como o metilendioxifenil são produzidas em menor quantidade junto ao dilapiol (FAZOLIN, et al., 2006). O Safrol, um dos componentes químicos encontrados no óleo essencial de *Piper aduncum*, é um alilbenzeno (BARREIRO & FRAGA, 1999) sendo utilizado como matéria-prima da heliotropina, um tipo importante fixador de fragrâncias e do butóxido de piperonila, agente sinérgico de inseticidas piretróides. Também possuem aplicações, no que tange a função como fragrância em muitos produtos, como ceras de assoalho, pomadas, sabões, detergentes e produtos de limpeza (ROCHA & MING, 1999).

O óleo essencial de *Piper aduncum* apresenta um rendimento de (2,5 a 3,5%) e é rico em linalol (31,5 a 91,1%), um éter fenílico com elevado padrão de oxigenação (MAIA et al., 1998). Este composto com grau de pureza de 99,0% (ALMEIDA, 2004) foi testado e comprovou ser o responsável pelas atividades fungicida, larvicida, inseticida e moluscicida. Ainda é utilizado como matéria-prima na preparação de fármacos de natureza catecólica como a dopamina, a dopa, a α -metildopa, o isoproterenol, entre outros (COSTA, 2000). Em coleta realizada em indivíduos de *Piper aduncum* ocorrentes no estado de São Paulo, (NAVICKIENE et al., 2006) encontraram o linalol (31,7%) como composto majoritário do óleo essencial das folhas, além de biciclogermacreno (11,2%), nerolidol (10,4%) e α -humuleno (5,5%).

Os estudos anteriores, em consonância com os estudos realizados por GAIA et al. (2004), trouxeram mais evidências em favor da visão tradicional que à altas altitudes o material coletado apresenta mais compostos ativos que os localizados a altitudes mais baixas. Somados a esses fatores já citados, pode-se acrescentar que a diversidade genética dentro da população analisada parece interferir nessa produção de COVs (GAIA et al., 2004). Além disso, as diversas composições químicas observadas quanto à composição dos óleos parecem ser explicadas, no tocante, a variação existente entre os fatores ambientais, edafoclimáticos e também pela diversidade genética possivelmente presente em plantas coletadas em distintas regiões geográficas.

Diante de todos os fatos apresentados anteriormente, ainda é escasso o estudo da complexidade volátil de *Piper aduncum* L., no quesito sazonalidade, levantando questionamentos sobre sua capacidade de manutenção, ou alteração do perfil químico volátil. As rotas metabólicas representam uma interface química entre as plantas e o ambiente, por isso é extremamente importante compreender qual é a resposta que a planta terá mediante um estímulo ambiental, pois esse fator certamente poderá influenciar na modulação química da resposta fornecida pela planta ao meio.

2. INTRODUÇÃO

A sazonalidade se refere a um fator que controla significativamente a composição química das plantas. A sazonalidade pode ser traduzida como a diferença de pluviosidade quando duas épocas do ano são comparadas, têm-se uma época mais chuvosa e outra mais seca. Isso reflete uma mudança na produção dos compostos pela planta. Tal fato pode ser gerado quando fatores interferem no metabolismo das plantas, como a idade da planta, estágio de desenvolvimento, condições do local de plantio (FAZOLIN et al., 2006), constituição do solo (NASCIMENTO et al., 2016), temperatura, pluviosidade, umidade relativa do ar, intensidade e direção do vento (MESQUITA et al., 2005) luminosidade e altitude (KORNER, 1999) são avaliados. Esses fatores atuam sobre todo o ciclo vital das plantas moldando-os.

As alterações nos fatores edáficos são responsáveis pelas modificações da biossíntese dos COVs o que produz transformações nas rotas de produção dos compostos especializados. Por exemplo, os sesquiterpenos não são produzidos em grandes quantidades, mas quando há um regime de estresse para a planta, como: baixa temperatura ou pluviosidade a produção desses compostos é moldada para suprir as necessidades das plantas (LORETO & SCHNITZLER, 2010).

A família Piperaceae é uma das mais estudadas quando o metabolismo especializado é alvo de investigação, pois possui uma rota de biossíntese mista (chiquimato/mevalonato), de formação das substâncias especializadas e isso está ligada a produção dos mais de 600 componentes químicos que compõem o principal gênero da família, o *Piper*. Ele é o mais explorado em razão dos bioativos encontrados, como: alcaloide, amidas e propenilfenóis (BERNARD, et al., 1995) que são muito apreciados pelas indústrias farmacêutica e alimentar, além do valor econômico agregado (FAZOLIN, et al., 2006). Por essas razões optou-se por trabalhar com *Piper aduncum* L, uma planta de amplo uso medicinal e de importância ecológica. Pouco se sabe sobre a interação da sazonalidade e composição do solo nas rotas de substâncias voláteis de *P. aduncum*. Portanto, temos como objetivo identificar os efeitos da sazonalidade e da composição química do solo em *P. aduncum*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos da sazonalidade na composição química das substâncias voláteis na planta *Piper aduncum* L.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar a composição das substâncias voláteis nas diferentes épocas de coleta; e
- Avaliar a composição química do solo e sua ação na produção de componentes voláteis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material e delineamento experimental

Foram coletadas três folhas de seis indivíduos adultos de *Piper aduncum* L. (totalizando 100 g) na *Reserva Particular do Patrimônio Natural* Fazenda Renópolis, em Santo Antônio do Pinhal/SP (Fig. 1), seguindo como referência as quatro bases meteorológicas instaladas na Fazenda, em duas épocas distintas, (Junho e Setembro de 2019, Fig. 2). As coletas foram realizadas entre as 9h e 11h. A janela de coleta foi determinada de acordo com os dados de precipitação total (mm) no intervalo entre os anos 2000 e 2018 para a determinação da época de sazonalidade, retirados da estação meteorológica da cidade de Campos do Jordão (OMM: 83714; Latitude:- 22.75°; Longitude: - 45.6°; Altitude: 1642m) (BDMEP-INMET, 2018).

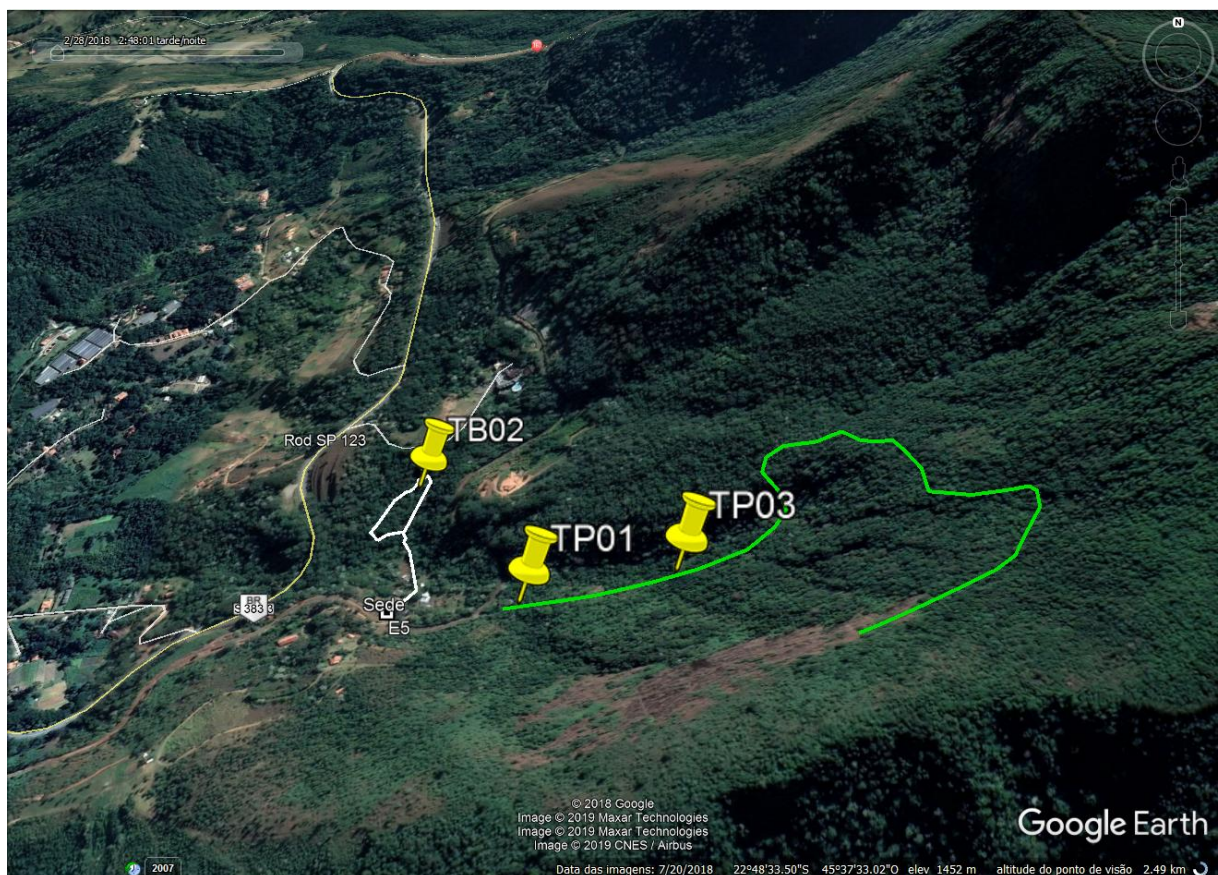


Figura 1: Locais de coleta na Fazenda Renópolis, no município de Santo Antônio do Pinhal, Estado de São Paulo, Brasil. A linha verde corresponde à Trilha Principal e a linha branca corresponde à Trilha Baixa. O ponto TP01 possui por coordenadas geográficas (Latitude: 22°48'22.45" S; Longitude: 45°37'25.55" O). O ponto TP03 possui por coordenadas geográficas (Latitude: 22°48'22.05" S; Longitude: 45°37'18.34" O). O ponto TB02 possui por coordenadas geográficas (Latitude: 22°48'15.18" S; Longitude: 45°37'31.24" O).

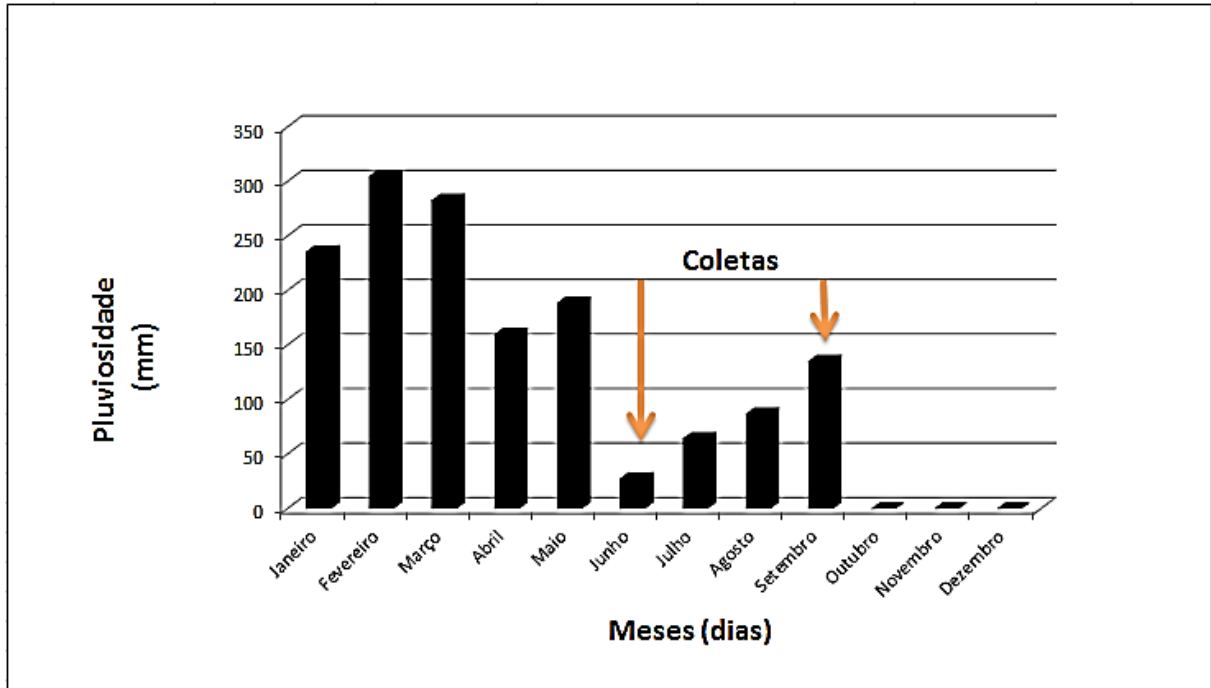


Figura 2: A Quantidade de chuva no período de janeiro a dezembro de 2019. Setas laranja indicam os meses onde foram realizadas as duas coletas correspondendo ao mês de junho (época chuvosa) e setembro (época seca). Não foi possível obter os dados referentes aos meses de outubro, novembro e dezembro.

O termo sazonalidade abrange que sejam destacados diversos fatores ambientais avistados em cada local de coleta, já que modificações pequenas no ambiente podem acarretar grandes alterações no rendimento do extrativo (SCHINDLER et al., 2018). Por isso é importante definir nesse trabalho que o termo sazonalidade se refere apenas ao quesito hidrológico, onde existe uma época seca e uma chuvosa.

Consideramos a época seca com valores de precipitação de 315 mm, no intervalo de Junho a Setembro; e a época úmida com valores de precipitação de 1201 mm, com intervalo de Janeiro a Junho.

Com o objetivo de homogeneizar o processo de recolhimento do material botânico a ser estudado, concernente à espécie *Piper aduncum* alguns parâmetros foram abordados. Foram coletadas três folhas adultas por indivíduos, estando essas, localizadas entre o terceiro e sexto nó, no sentido ápice-base. As folhas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40°C. Após secagem, as folhas foram armazenadas em sacos de papel Kraft® até o momento de extração das substâncias voláteis.

Junto com a coleta das folhas do *Piper aduncum* L. foi realizada a coleta de amostras de solos para que estes também pudessem ser avaliados quanto a sua constituição. Para isso, as coletas foram realizadas por meio do emprego de uma pá onde o solo foi escavado até a profundidade de 30 cm, quando este limite era obtido, então, realizava-se a retirada da terra que era colocada em uma sacola plástica e imediatamente identificada, com o número de coleta, e local na trilha. As amostras de solo foram analisadas no laboratório de solos e plantas da UNITAU. (Tabela 1).

Tabela 1 – Análise da composição química do solo realizada nas amostras onde (EU- corresponde à época úmida e ES- corresponde à época seca) pelo laboratório de solos e plantas da UNITAU. Legenda: pH, MO (matéria orgânica), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio), H+AL (hidrogênio + alumínio), SB (soma de bases), CTC (capacidade de trocas catiônicas), V (saturação por bases), Cu (cobre), Fe (ferro), Mn (manganês), Zn (zinco), S(enxofre), Al (alumínio), m% (saturação de alumínio).

Coleta	Amostra	pH	MO g/dm ³	P mg/dm ³	K	Ca	Mg mmol/dm ³	H+Al	SB	CTC	V %	Cu	Fe mg/dm ³	Mn	Zn	K/CTC	Ca/CTC	Mg/CTC %	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
EU1	TP01a	5	59	26	3,5	50	14	67	67,5	134,5	50	0,5	58	20,2	2,2	2,6	37,2	10,4	4	14	4
EU2	TP03a	5,8	82	24	5,7	82	14	30	101,7	131,7	77	0,4	37	22,8	2,6	4,3	62,3	10,6	6	14	2
EU3	TB02a	5,7	53	55	9,6	70	14	24	93,6	117,6	80	0,6	124	6,1	1,4	8,2	59,5	11,9	5	7	1
ES1	TP01b	4,2	38	35	1,8	9	2	97	12,8	109,8	12	1	161	5,6	2,3	2,6	37,2	10,4	4	14	4
ES2	TP03b	4,8	32	13	2,6	12	3	83	17,6	100,6	17	0,9	54	6,7	2,2	2,6	11,9	3	4	5	1
ES3	TB02b	4,4	60	25	3,3	12	4	120	19,3	139,3	14	0,1	6	1,2	0,7	2,4	8,6	2,9	3	4	1

4.2 *Extração de componentes voláteis por Microextração em fase sólida em headspace (HE-SPME)*

As substâncias voláteis foram extraídas por HE-SPME. Para tanto, as seis amostras (três correspondentes a época úmida e as outras três à época seca) foram pesadas até alcançar 0,1g, quando então foram colocadas em um tubo contendo 10 ml de água destilada. Em seguida, cada amostra foi exposta ao *banho-maria* à 50°C, por 30 min. Na sequência, a fibra foi exposta ao *headspace* do tubo por 60 min, cuja finalidade era a captura dos voláteis.

4.3. *Caracterização química das substâncias voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)*

A análise qualitativa das substâncias voláteis foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W Scientific; 30m × 0.25 mm × 0.25 µm), operando por impacto de elétrons (70eV), injetor a 240°C, detector a 230°C, split 1/60, e programa de temperatura 60°C(2')-240°C, 3°C.min⁻¹. Os índices de retenção lineares foram obtidos por meio da injeção de uma série de *n*-alcanos (C9-C24 - Sigma Aldrich 99%) e cálculo da equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963). A identificação dos constituintes químicos foi efetuada pela análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CG/EM (NIST 62.lib) e de seus índices de retenção (ADAMS, 2007).

4.4. *Análises estatísticas*

A matriz de dados que compõem os componentes voláteis de *Piper aduncum*, valores de pluviosidade e composição química do solo, foram normalizadas pela média, sofreram transformação logarítmica e foram auto-escalonadas, sendo a matriz submetida à análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de cluster (HCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Todas as análises foram realizadas pelo Software MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al., 2019).

5. RESULTADOS

5.1 composição química volátil de *Piper aduncum*

O perfil químico encontrado para a espécie *Piper aduncum*, como mostra a (tabela 2), apresentou um total de 43 compostos volatéis identificados, sendo os valores obtidos quantificados em: monoterpenos (0,16 – 85,73 %), álcool (0,05%), cetona (0,04%), cetona rosa (0,11%), monoterpenos oxigenados (0,36 – 18,92%), aldeídos (0,51 – 4,61 %), compostos olenílicos (0,38%), sequiterpenos (0,11 – 22,57%), os sequiterpenos oxigenados (0,28 – 1,29%), sequiterpeno álcool (3,09 – 41,36%), fenilpropanoides (0,56 – 94,18%) e não-identificados em (2,64 – 2,81%). As substâncias majoritárias foram: apiol (0,94 – 96,43%), *beta*-pineno (0,22 – 54,5%), *alfa*-pineno (16,04 – 26,21 %), exalatacina (41,36%), *allo* epóxido de aromadendreno (0,06 – 19,42 %), canfeno (14,22%), pinocarvona (12,37%) e mirtenal (11,44%).

Z-isoelemecina	-	-	0,38	-	-	-	31,453	1570	EM, IRL
Sesquiterpenos									
<i>Alfa</i> -cubebeno	-	3,71	0,74	-	0,18	-	24,125	1348	EM, IRL
<i>Alfa</i> -copaeno	-	7,29	0,34	-	0,63	-	25,193	1376	EM, IRL
<i>E</i> -cariofileno	-	-	-	0,26	-	-	26,957	1419	EM, IRL
<i>Beta</i> -copaeno	-	-	0,34	-	-	-	25,829	1432	EM, IRL
<(Z)-B-> farneseno	-	-	0,98	-	-	0,79	27,012	1442	EM, IRL
Isovarelato de linalool	-	0,37	-	0,04	0,22	-	28,349	1468	EM, IRL
<i>Gama</i> -amorfo	-	-	0,38	-	-	-	28,691	1495	EM, IRL
2-tridecanona	-	-	1,08	-	-	0,19	30,343	1496	EM, IRL
<i>Delta</i> -amorfo	-	-	0,15	-	-	-	29,230	1512	EM, IRL
<i>Gama</i> -cadineno	-	-	0,76	-	-	-	30,860	1513	EM, IRL
<i>Delta</i> -cadineno	0,18	-	0,24	-	-	-	30,070	1523	EM, IRL
<i>Alfa</i> -cadineno	0,33	-	-	0,11	-	0,31	31,233	1538	EM, IRL
Selina-3.7(11)-dieno	0,33	-	-	-	-	0,19	29,644	1546	EM, IRL
Allo epóxido de aromadendreno	19,42	13,41	-	0,06	-	-	34,171	1641	EM, IRL
Sesquiterpeno 1	0,91	0,74	-	-	-	-	34,462	1649	EM, IRL
Germacreno B	-	-	0,38	-	-	1,05	30,138	1661	EM, IRL
Sesquiterpeno 2	1,73	2,07	-	-	-	-	35,472	1676	EM, IRL
Sesquiterpernos oxigenados									
Óxido de <i>alfa</i> -pineno	0,21	-	-	-	-	-	12,857	1099	EM, IRL
Eudesm-7(11)-en-4-ol	0,28	-	-	-	-	-	36	1700	EM, IRL
Óxido de cariofileno	0,29	-	-	-	-	-	32,308	1583	EM, IRL
Guaiol	-	0,96	-	-	0,28	0,67	34,001	1600	EM, IRL
Khusinol	0,31	0,33	-	-	-	-	35,195	1680	EM, IRL
Sesquiterpeno álcool									
Exalatacina	-	-	41,36	-	-	-	35,157	1656	EM, IRL
14-hidróxi-4,5-diidro-cariofileno	1,22	1,85	-	-	-	-	36,739	1706	EM, IRL
14-hidróxi- <i>alfa</i> -humuleno	1,87	1,34	-	-	-	-	36,254	1714	EM, IRL
Fenilpropanóides									
Apiol	2,27	0,56	44,91	96,43	0,49	94,18	35,259	1678	EM, IRL

Monoterpenos	49,1	47,4	-	0,4	85,73	0,16		
Álcool	-	-	-	0,05	-	-		
Cetona	-	-	-	0,04	-	-		
Cetona Rosa	-	-	-	-	-	0,11		
Monoterpenos oxigenados	13,54	18,92	-	-	0,36	-		
Aldeídos	4,28	4,61	-	-	0,51	-		
Composto olefínico	-	-	0,38	-	-	-		
Sesquiterpenos	22,57	11,37	4,81	0,51	1,03	0,11		
Sesquiterpenos oxigenados	1,09	1,29	-	-	0,28	0,67		
Sesquiterpeno álcool	3,09	3,19	41,36	-	-	-		
Fenilpropanóides	2,27	0,56	44,9	96,4	0,49	94,18		
Não identificados	2,64	2,81	-	-	-	-		

5.2. Efeito da sazonalidade e composição química do solo sobre a composição química do *Piper aduncum*

A análise dos componentes principais (PCA) foi aplicada a fim de avaliar padrões na composição do perfil químico de *Piper aduncum* com a sazonalidade (Fig. 3). A análise apresentou 87,9% de explicação total dos dados, quando considerados a primeira componente principal (PC1, 63,6%) e a segunda componente principal (PC2, 24,3%). Fica evidente que o fator pluviosidade é capaz de separar espacialmente as épocas de coleta. Por meio da análise da PCA, pode-se aferir que as áreas de coleta, onde a letra **A** em vermelho representa a época úmida e a letra **B** em verde representa a época seca, estão com ponto de inteseção o que nos indica a ocorrência de fatores limitantes que influenciam estas áreas, neste caso, a pluviosidade.

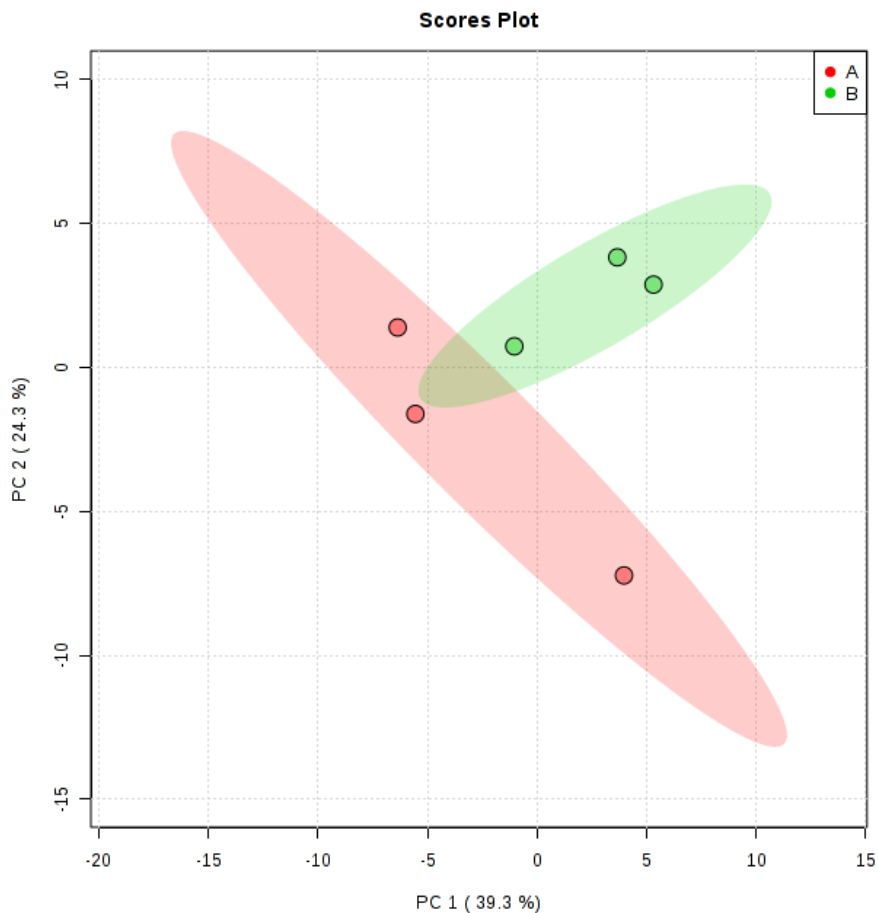


Figura 3 – Análise de Componentes Principais (PCA) das substâncias voláteis de *Piper aduncum* em duas épocas de coleta. A: época úmida; B: época seca

As principais substâncias encontradas na PC1 foram: *E-alfa-ionona*, pinocarvona, mirtental, sesquiterpeno, trans-pinocarveol, 14-hidroxi-*alfa*-humuleno e 14-hidroxi-4,5-diidro-cariofileno, evidenciando processo de seleção de rotas bioquímicas responsivas, provavelmente, pela precipitação (Fig. 4). Indicando assim que a precipitação foi a responsável pela maior ocorrência dessas substancias na época úmida, com exceção a substância *E-alfa-ionona* que apresentou maior concentração na época seca (Fig 4). Em contrapartida, na época seca, temos as substancias *alfa*-pineno, *alfa*-cadideno e o apiol contribuindo para a separação deste grupo.

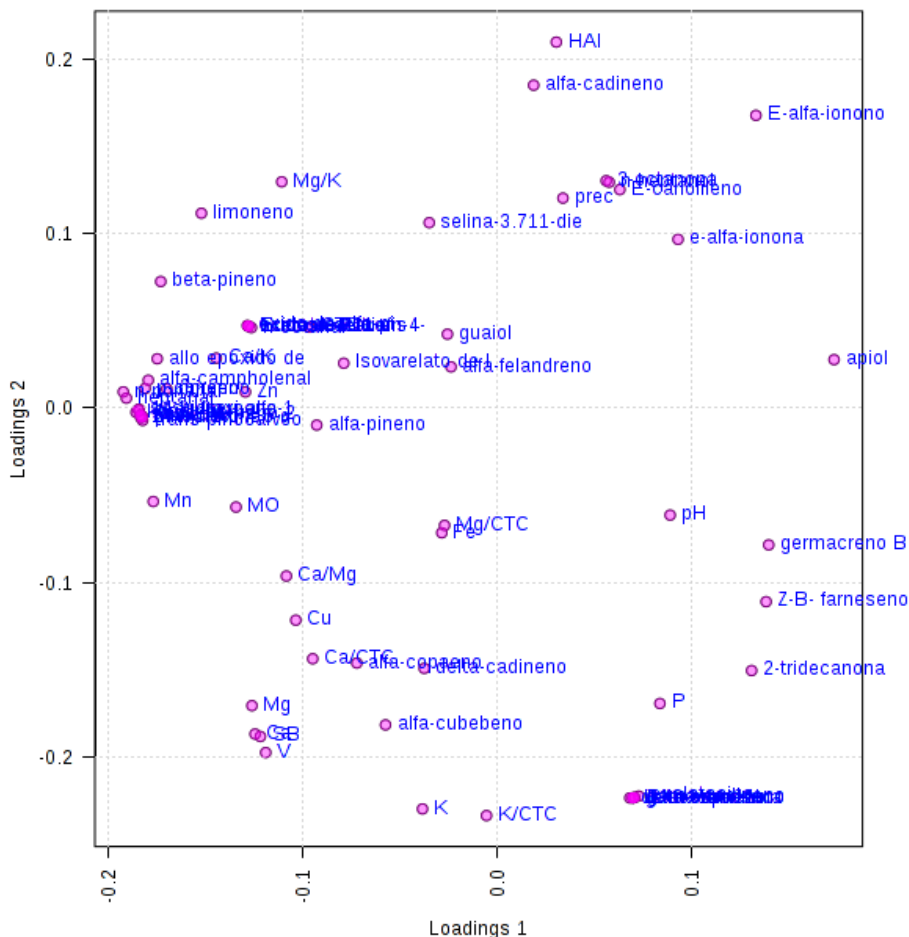


Figura 4 - *Loadings* da análise de componentes principais (PCA). Pode-se observar de maneira mais clara a variação existente na distribuição das substâncias químicas e sua relação com as épocas de coleta

Esse comportamento de separação das substâncias foi verificada quando os perfis de coleta foram comparados. (Fig 5). Pode-se verificar que existe variação quando os perfis cromatográficos das duas épocas de coleta são comparados. Os perfis da época úmida apresentaram tanto monoterpenos quanto sesquiterpenos. Já os da época seca apresentaram uma preponderância de sesquiterpenos em sua composição.

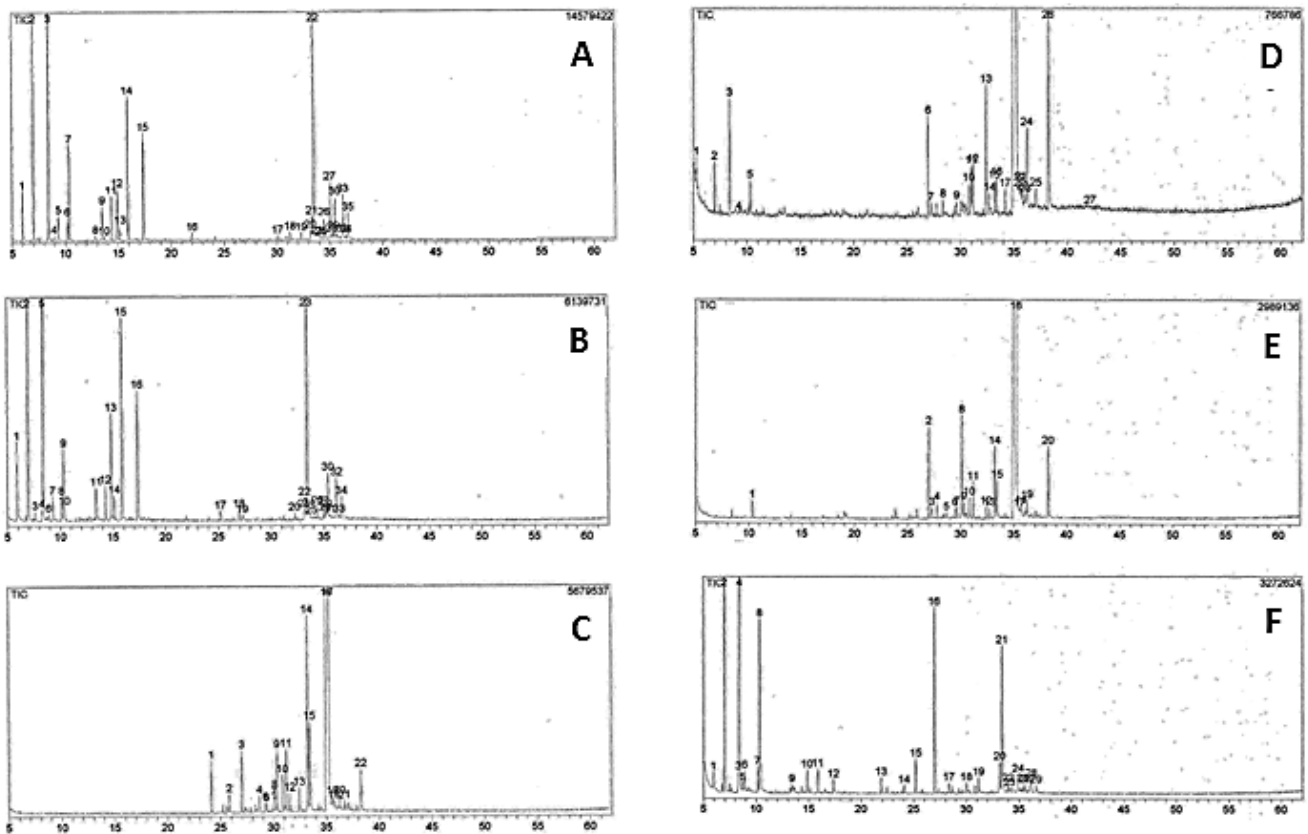


Figura 5 - Perfil cromatográfico das substâncias voláteis relacionadas com os pontos e épocas de coleta. Cromatogramas de *Piper aduncum* L. por cromatografia gasosa. Cada cromatograma corresponde a uma amostra estudada por ponto de coleta. (A) corresponde a época de coleta úmida - Trilha Pricipal 01. (B) corresponde a época de coleta úmida - Trilha Pricipal 03. (C) corresponde a época de coleta úmida - Trilha Baixa 02. (D) corresponde a época de coleta seca - Trilha Pricipal 01S. (E) corresponde a época de coleta seca - Trilha Pricipal 03S. (F) corresponde a época de coleta seca - Trilha Pricipal 02S

A análise de Aglomeração Hierárquica de Clustering (HCA), calculado com a ligação de Ward e a distância euclidiana, relacionam os dados das épocas de coleta entre si. Com isso, pode-se verificar que embora exista um indicativo de separação entre as áreas analisadas pelo evento de sazonalidade, esse processo de ruptura não foi totalmente concluído. Dito isso, essa figura mostra que além da pluviosidade,

a composição química do solo poderia agir como fator de influência na produção de substâncias voláteis, ou seja, as áreas coletadas sofrem do mesmo tipo de influência, (Fig. 6)

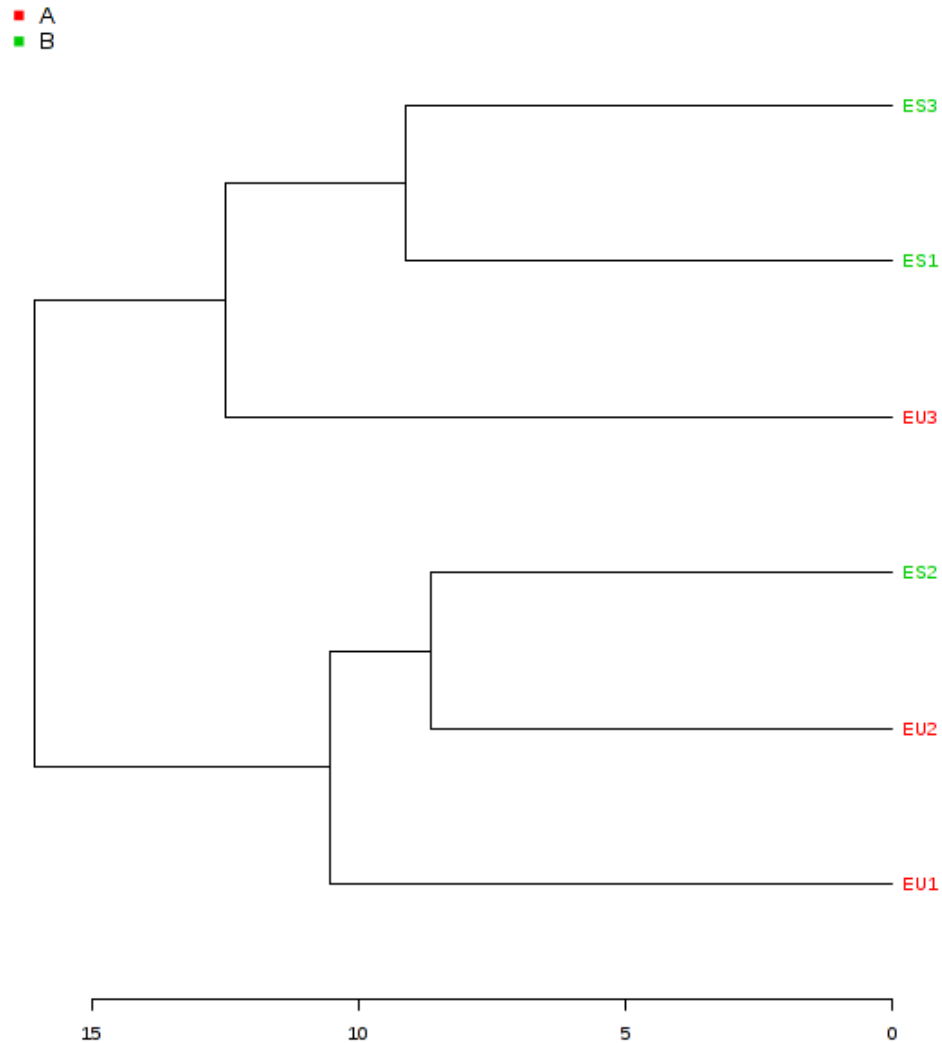


Figura 6 - Análise Hierárquica de Cluster (HCA), realizada com a Distância Euclidiana com enlace de Ward . A letra A em vermelho representa a época úmida e a letra B em verde representa a época seca. Esse tipo de análise se utiliza da padronização dos dados, e também, pelo emprego da distância euclidiana que permite o controle na diferença de dois valores quando eles são comparados.

Segundo as análises anteriores, fica evidente que a pluviosidade e a composição química do solo poderiam modificar a produção de voláteis em *P. aduncum*. Para comprovar tal fato, realizamos a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

A PLS-DA apresentou valores altos na primeira componente (C1), sendo a mais importante na discriminação da matriz de dados. Nela, é possível verificar uma clara divisão entre época úmida e época seca (Fig 7).

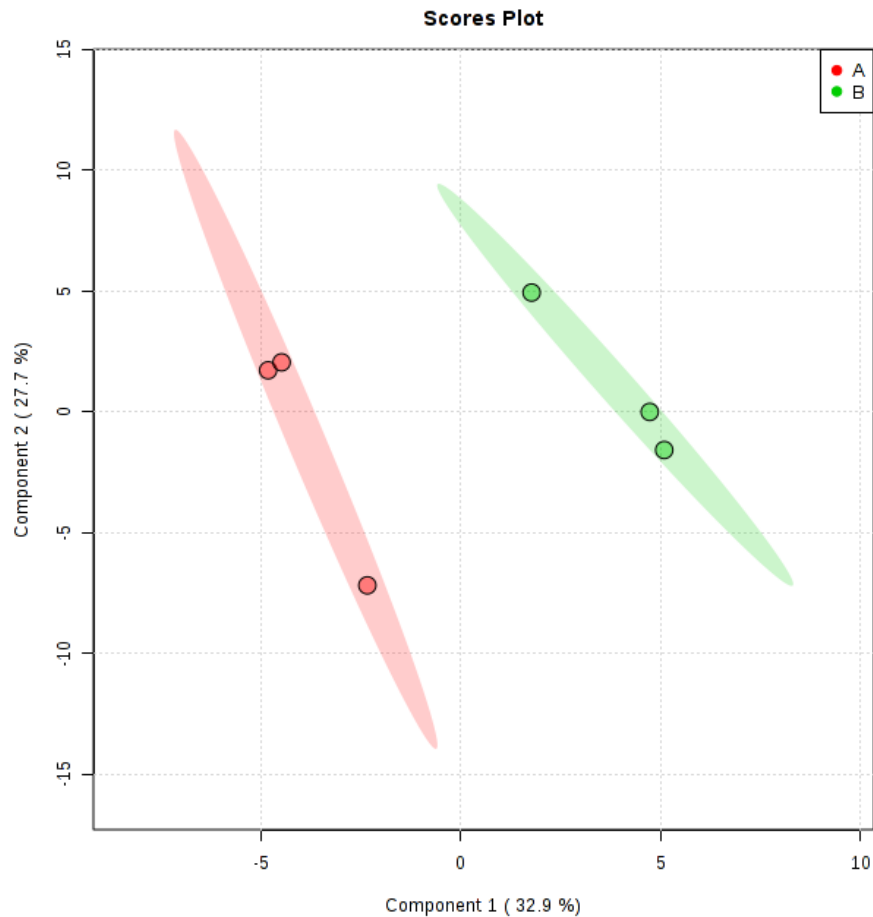


Figura 7 – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A letra A em vermelho representa a época úmida e a letra B em verde representa a época seca. É possível verificar um comportamento de separação entre as épocas.

Os valores de *score Z* (dados transformados pela análise) nos permitem verificar as prováveis relações dos compostos químicos com fatores que os influenciam e, assim, modificam a composição química dos indivíduos de *Piper aduncum*.(Fig. 8), funcionando como uma forma de representação da composição em relação as variáveis e uma melhor visualização de sua distribuição. Podemos observar que, além da composição química sob influência da precipitação, a delimitação das épocas se dá pela composição química do solo.

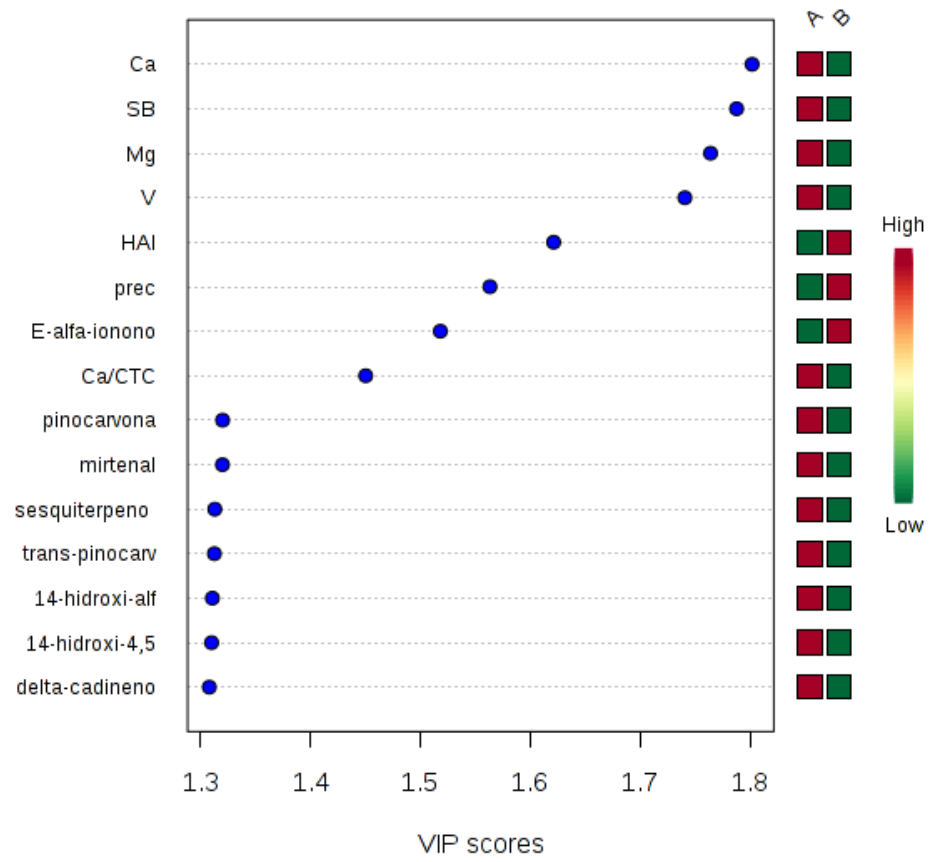


Figura 8 – Z score da componente 1 (C1) da análise discriminante. Nesse ponto, verificou-se a participação da precipitação como fator limitante na ocorrência dessas substâncias que a sua disponibilidade foi importante para a dissociação dos íons no solo.

6. DISCUSSÃO

Os fatores ambientais podem interferir nos processos de produção de substâncias por uma planta. Eles acabam atuando de três maneiras: (1) adaptação evolutiva (filogenética), (2) modificações que não são reversíveis durante a vida de um indivíduo, (3) por ajuste reversível, frequentemente denominado aclimatação ou modulação (KÖRNER, 1999). Se, por qualquer um desses mecanismos adaptativos, uma planta atingir a capacidade de lidar com as demandas de seu ambiente e reproduz com sucesso, é adequado - o que por si só não diz nada sobre o modo adaptativo empregado. Por isso faz-se necessário compreender por meio de análises quais pontos podem forçar uma alteração na composição química de uma planta, seja esse um processo reversível ou não. Neste trabalho, verificamos mudança quanto ao perfil químico volátil de *P. aduncum*, condicionado ao índice de pluviosidade, mas também a composição do solo onde as coletas foram relacionadas.

Foram encontradas maiores teores dos monoterpenos na época de coleta úmida (com maior precipitação) do que na época seca (menor precipitação) que apresentou uma maior concentração de sesquiterpenos. Estudos anteriores (MESQUITA et al., 2005; VIEIRA et al., 2011) indicam uma maior presença dos sesquiterpenos para as folhas do *Piper aduncum*. Em contrapartida, nossos estudos mostram que a variação na precipitação modula a produção das substâncias voláteis em *Piper aduncum*, indicando a sazonalidade como fator seletivo de rotas bioquímicas de substâncias voláteis. Duas substâncias tidas como características quando se analisa o perfil químico de *Piper aduncum* não foram encontradas nessa análise. São elas o Safrol e o Dilapiol. Talvez tal fato se deva a altitude média que o *Piper aduncum* estava localizado na Fazenda Renópolis, onde a altitude média apreciada estava em por volta de 1316 m. Já nos artigos tidos como fonte de consulta para elaboração do referencial teórico altitude média foi 550 m.

A ocorrência de uma diversidade natural dos terpenos vegetais está associada a uma complexa rede que possui por função controlar a biossíntese desses compostos (KITAOKA et al., 2015). Para (SCHUMAN et al., 2016) as várias interações entre os fatores ambientais e os endógenos são responsáveis por

diferenças verificadas de maneira intraespecífica no metabolismo especializado. Isto também pode ser verificado via participação dos fatores abióticos, e neste caso os fatores considerados foram: pluviosidade e sazonalidade que foram examinados e por meio dos resultados obtidos se mostraram como importantes para que os ajustes metabólicos ocorressem no *Piper aduncum*.

Aparentemente, a produção de um composto principal a ser encontrado na folha do *Piper aduncum* L. apresenta variação, de acordo, com o tipo e as condições ambientais impostas ao seu desenvolvimento ou como, por exemplo, a idade da planta (OLIVEIRA et al., 2013). Para TRAPP & CROTEAU (2001), o controle dos metabólitos especializados se dá ao nível genético, entretanto, a quantidade e a concentração desses metabólitos variam em razão da atuação dos fatores bióticos e abióticos o que inclui intensidade luminosa, latitude, temperatura média, composição do solo, força do vento, disponibilidade de água.

A composição do solo é um dos principais fatores que certamente vão influenciar no desenvolvimento das plantas (PALEVITCH, 1987). Sendo este o fator que exerceu maior influência no resultado para a composição perfil do químico, atrelado à precipitação e a sazonalidade que levou a deposição de mais íons dissolvidos no solo. Essa variação aconteceu, pois quanto maior o índice de pluviosidade maior será a quantidade de chuva a percolar, considerando as características do solo onde as coletas foram realizadas, fazendo com que haja uma maior dissolução dos íons presentes nos solos (MARSCHNER, 2011). Somados a isso temos que tal ação está relacionada ao processo de nutrição vegetal, aumentando a disponibilidade de íons já dissociados no solo, permitindo que a planta aproveite-os para realizar suas funções.

É sabido da importância dos íons para com as espécies vegetais, pois esses podem desempenhar múltiplas funções como o Nitrogênio, considerado o elemento essencial requisitado em maior quantidade pelas plantas, já que, participa da constituição de muitos compostos da planta, sendo incluídas todas as proteínas e os ácidos nucléicos (TAIZ & ZAIGER., 2013). Cerca de 90% do Nitrogênio na planta é encontrado de forma orgânica e assim desempenha as suas funções, seja como um componente estrutural de macromoléculas ou ainda como um constituinte de enzimas (MARSCHNER, 2011). Nos compostos orgânicos o N aparece na forma

reduzida ($^{-3}$), o que corresponde ao NH_3 . Como é absorvido predominantemente como N^-NO_3 ($^{+5}$) que indica uma incorporação a compostos orgânicos. Devido ao papel desempenhado por esse íon, vale ressaltar que a deficiência de Nitrogênio tende a inibir rapidamente o crescimento da planta. Contudo, se essa deficiência é persistente, então, a maioria das plantas apresenta a Clorose, especialmente nas folhas velhas (TAIZ & ZAIGER., 2013).

Já o elemento Fósforo (P), como fosfato (HPO_4^{2-}) é um componente fundamental para a vida da planta, pois está inserido na composição dos açúcares-fosfato (p.ex. glicose 6P, Frutose 6P), fosfolipídios de membranas, nucleotídeos que são usados como fonte de energia (ATP) e nos ácidos nucléicos (FARDEAU, 1996). Além de que estão relacionados às rotas metabólicas e suas modificações quanto à quantificação interfere na formação do o geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP), geranyl-geranyl difosfato (GGPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) que são radicais participantes de rotas metabólicas (SCHMIDT & GERSHENZON, 2007; DEGENHARDT et al., 2009; JONES et al., 2011; LI & FAN, 2011). Porém, mesmo esse elemento sendo importante para o crescimento, desenvolvimento e como parte formadora de compostos químicos das plantas, ele está presente em baixa quantidade nos solos tropicais, segundo (FARDEAU, 1996). O que lhe garante um papel ainda mais importante.

Mediante todas essas observações foi possível estabelecer um paralelo na disponibilidade dos íons do solo em função da pluviosidade. Essa relação apresentou que a quantidade de precipitação na época úmida e impressionante por atuar como agente selecionador de rotas bioquímicas nas plantas, ainda que, isso ocorra de forma indireta, já que a verdadeira seleção está condicionada ao tipo de solo. Como principal apontamento, verificamos que as altas taxas de produção de monoterpenos podem estar relacionadas com a disponibilidade de metais no solo, influenciando o funcionamento enzimático e metabólico que converge na produção dessas substâncias.

Os íons Cálcio (Ca^{2+}) e Magnésio (Mg^{2+}) e foram pontuados como os principais íons capazes de segregar as épocas de coleta. Segundo a literatura, esses íons são classificados como macronutrientes secundários (FAQUIN, 2005), ainda que do ponto da nutrição vegetal nenhum nutriente possa ser considerado

secundário, sendo essa uma classificação dada pela concentração dos íons presentes na solução, e não estando relacionada ao papel que os íons exercem dentro do metabolismo vegetal (MARSCHNER, 2011).

O Cálcio que fica retido no solo encontra-se adsorvido nos colóides presentes no próprio solo ou ainda nos componentes da matéria orgânica. O Cálcio apresenta como uma de suas principais funções ajudar na estrutura da planta, como integrante da parede celular promovendo uma resistência mecânica dos tecidos e também atuando como um neutralizador de ácidos orgânicos no citosol (MARSCHNER, 2011). É devido a este fato que o Cálcio ao se integrar à lamela média das paredes celulares, forma ligações entre os grupos carboxílicos ($R-COO^-$) dos ácidos poligalacturônicos e propicia a formação dos chamados Pectatos de Cálcio (FAQUIN, 2005). Outro papel importante desempenhado pelo Ca é o de participar do processo de alongação e divisão celular, sendo que esta ação reflete no crescimento radicular. A ação mais importante do Ca citoplasmático é desempenhada na forma ativa da coenzima Calmodilina, pois ela é exigida para que as enzimas: fosfolipase, nucleotídeo fosfodiesterase, NAD-quinase, ATPase-Ca de membranas, realizem suas atividades (NASCIMENTO, 2016). Uma outra função do íon Ca^{2+} faz-se necessário para que ocorra a germinação do grão de pólen e para o crescimento adequado do tubo polínico o que pode estar relacionado ao seu papel na síntese da parede celular ou mesmo ao funcionamento da membrana plasmática (NASCIMENTO, 2016). Apesar das diversas funções metabólicas apresentadas pelo Cálcio, pouco se sabe sobre sua influência no metabolismo especializado, principalmente na modulação química das substâncias voláteis em espécies nativas, como é o caso de *P. aduncum*.

O íon Mg^{2+} , por sua vez, tem sua origem primária no solo, pelas rochas ígneas, metamórficas e sedimentares, além de compor as estruturas de minerais de argila (NASCIMENTO, 2016). Dentre as funções desempenhadas do Mg^{2+} nas plantas, pode-se destacar a sua participação como constituinte da molécula da clorofila, compondo as chamadas porfirinas magnesianas; sendo o íon Mg^{2+} o elemento central (MARSCHNER, 2011). Outro importante papel relacionado ao Magnésio se refere a ação que ele juntamente com o Potássio exercem no processo de ativação de enzimas sendo, contudo, o Mg^{2+} a exercer esse papel mais fortemente como no caso de sua atuação como cofator de enzimas fosforilativas que

acabam por formar uma ponte entre o pirofosfato da molécula do ATP ou ADP com a molécula da enzima (NASCIMENTO, 2016). Esse processo, pode explicar a alta concentração de Mg^{2+} presente nos cloroplastos e nas mitocôndrias, locais onde ocorrem as reações de síntese de ATP que se dá pelo processo de fotofosforilação e fosforilação oxidativa. Em suma, o papel realizado pelo Mg^{2+} está elencado a estabilização das partículas do ribossomo o que necessário para a síntese proteica, além de, participar de processos como a fotossíntese, respiração e por último a síntese de macromoléculas. Tem-se por conclusão a mesma obtida para o cálcio, ou seja, ainda há pouca informação acerca da ação direta destes metais na produção de substâncias químicas voláteis. Logo, mais estudos de síntese orgânica deverão ser desenvolvidos a fim de suprir uma necessidade da área do metabolismo vegetal.

O íon Manganês também é importante para o desenvolvimento da planta, pois participa da vida desta atuando dentro da célula como, Mn^{2+} e forma ligações fracas com ligantes orgânicos e pode rapidamente ser oxidado em Mn^{3+} , Mn^{4+} e Mn^{6+} (NASCIMENTO, 2016). Em virtude, dessa aparente facilidade de mudança no estado de oxidação, o Mn^{2+} apresenta importante função nos processos de oxirredução na planta, como o transporte de elétrons na fotossíntese e desintoxicação dos radicais livres de $O^{2\cdot}$ (MARSCHNER, 2011). Ele também está envolvido com sistemas enzimáticos das plantas seja como constituinte (cofator), ou seja, como ativador de mais de 30 enzimas. A deficiência do Mn^{2+} pode provocar Clorose na planta.

Outro íon que merece destaque é o Alumínio. Ele é o cátion mais abundante na crosta terrestre (FAQUIN, 2005). Quando está presente na solução do solo, os íons Al^{3+} sofrem o processo de hidrólise, o que forma hidróxidos incompletos de alumínio sendo ele tóxico para as plantas. O Al^{3+} é assim caracterizado por produzir um caráter pernicioso na acidez do solo. E também por gerar um efeito fitotóxico nas formas catiônicas solúveis, além disso, o Al^{3+} está implicado na redução da disponibilidade e absorção de P do solo, na inibição competitiva da absorção de nutrientes catiônicos, como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ e micronutrientes (FAQUIN, 2005). Podem ser mencionados, exemplos do papel desempenhado pelo íon Al^{3+} como: ação danosa sobre as membranas celulares, com a ligação dessa componente reduz a capacidade de permeabilidade. No interior da célula, o Al^{3+} pode gerar uma alteração na atividade de vários íons e metabólitos, resultando em implicações de

fitotoxidez. Por se concentrar preferencialmente no núcleo e o sítio primário de ligação ser o grupo fosfato do DNA, ocorre uma redução na atividade de replicação e de transcrição. O que compromete o processo absorptivo da planta, além das funções de crescimento e desenvolvimento.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Efeito da sazonalidade aqui abordado neste trabalho teve por caracterização do termo como duas épocas diferentes de coletas foram empregadas, sendo uma úmida e a outra seca. Tal escolha permitiu que os perfis químicos da planta *Piper aduncum* L fossem avaliados e comparados quanto a sua composição ao longo do período amostrado e possíveis explicações para tais ações fossem levantadas.

Fica evidente que a precipitação é fator que controla a composição química de *P. aduncum*, mas não é o principal fator regulador. A composição química do solo, juntamente da precipitação modula as repostas dadas pelas plantas, visto que, alterações quanto a percentual de composição do perfil químico foi detectado para as duas épocas de coleta, o que demonstra um tipo de ajuste como resposta aos estímulos, como a precipitação, sazonalidade, composição química do solo e também a altitude, embora, esse não tenha sido uma variável estudada nesse trabalho.

As dificuldades quanto a elucidação das rotas bioquímicas se deu, em virtude, do tempo disponível para que mais testes pudessem ser aplicados.

Por fim, há necessidade de se ter um aumento no número amostral a ser avaliado, a fim de assegurar que os eventos ambientais realmente sejam os responsáveis pela segregação quanto à produção das substâncias químicas. Em virtude do pouco tempo para que as etapas de realização das análises laboratoriais fossem efetuadas não foi possível inferir de maneira clara sobre os resultados obtidos, contudo, eles servem como um bom indicativo e merecem ser mais bem avaliados. Para isso é necessário da continuidade nesse trabalho a fim de se confirmar as hipóteses e os resultados aqui obtidos. O que confere uma abertura de janelas para a exploração dos efeitos aqui abordados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4 ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.

ALMEIDA, R. R. P. Isolamento, purificação e isomerização do dilapiol, componente majoritário do óleo essencial de *P. aduncum* para comprovação de sua atividade biológica. (**Unpublished**), 2004.

AHARONI, Asaph, et al. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.5, n.1, p.49-58, 2006

ARIMURA, Gen-ichiro et al. Herbivore-induced defense response in a model legume. Two-spotted spider mites induce emission of (E)- β -ocimene and transcript accumulation of (E)- β -ocimene synthase in *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1976-1983, 2004.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos AM. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e antitrombóticos. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 744-759, 1999.

BERNARD, C. B. et al. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 6, p. 801-814, 1995.

BRACHO-NUNEZ, A., et al. Leaf level emissions of volatile organic compounds (VOC) from some Amazonian and Mediterranean plants. **Biogeosciences**, v. 10, n. 9, p. 5855-5873, 2013.

BRANDÃO, Maria das Graças Lins et al. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, p. 127-134, 2008.

CHONG, J. et al. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**. n.68, v.86, p.128, 2019.

CIRAK, Cuneyt et al. Altitudinal changes in secondary metabolite contents of *Hypericum androsaemum* and *Hypericum polyphyllum*. **Biochemical systematics and ecology**, v. 70, p. 108-115, 2017.

COSTA, Paulo RR. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.

DE ALMEIDA, Luiz Fernando Rolim et al. Non-oxygenated sesquiterpenes in the essential oil of *Copaifera langsdorffii* Desf. increase during the day in the dry season. **PLoS one**, v. 11, n. 2, p. e0149332, 2016.

DE ALMEIDA, Luiz Fernando Rolim, et al. Dry and wet seasons set the phytochemical profile of the *Copaifera langsdorffii* Desf. essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 4, p. 292-300, 2014.

DE ALMEIDA, Roseli RP et al. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole-rich essential oil. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 9, p. 1427-1434, 2009.

DEGENHARDT, Jörg; KÖLLNER, Tobias G.; GERSHENZON, Jonathan. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1621-1637, 2009.

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

DHAR, Manoj et al., Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug

DI STASI, LC et al. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP, p.323-330. 2002development. **New biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 114-123, 2013.

DUDAREVA, Natalia; PICHERSKY, Eran. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 181-189, 2008.

EISENREICH, W. et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 12, p. 1401-1426, 2004.

ENGELBERTH, Juergen et al. Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 6, p. 1781-1785, 2004.

FAGAN, Evandro Binotto et al. **Fisiologia vegetal: reguladores vegetais**. 2015.

FARDEAU, J. C. Dynamics of phosphate in soils. An isotopic outlook. **Fertilizer Research**, v. 45, n. 2, p. 91-100, 1995.

FAQUIN, Valdemar. Nutrição mineral de plantas. UFLA/FAEPE. 2005.

FAZOLIN, Murilo et al. Potencialidades da pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): características gerais e resultados de pesquisa. **Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

GAIA, José Maria D. et al. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2004.

HEMMERLIN, Andréa et al. Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in tobacco bright yellow-2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26666-26676, 2003.

INMET. Instituto nacional de meteorologia. 2018. Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa. « Dados da Rede do INMET ».

JONES, Christopher G. et al. Sandalwood fragrance biosynthesis involves sesquiterpene synthases of both the terpene synthase (TPS)-a and TPS-b subfamilies, including santalene synthases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 20, p. 17445-17454, 2011.

KESSLER, André; BALDWIN, Ian T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, v. 291, n. 5511, p. 2141-2144, 2001.

KITAOKA, Naoki et al. The application of synthetic biology to elucidation of plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. **Molecular plant**, v. 8, n. 1, p. 6-16, 2015.

KÖRNER, Christian. **Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems**; Springer Science & Business Media, 1999. LI, Ruihong; FAN, Yanping. Molecular cloning and expression analysis of a terpene synthase gene, HcTPS2, in *Hedychium coronarium*. **Plant molecular biology reporter**, v. 29, n. 1, p. 35-42, 2011.

LORETO, Francesco; SCHNITZLER, Jörg-Peter. Abiotic stresses and induced BVOCs. **Trends in plant science**. v.15, n.3, p. 154-166, 2010.

MAIA, José Guilherme S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 269-272, 1998.

MARTIN, William et al. An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle. **Biological chemistry**, v.382, n.11, p. 1521-1539, 2001.

MARSCHNER, Horst. Mineral nutrition of higher plants. **Academic press**, 2011.

MESQUITA, J.M.O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 15, n. 1, p. 6-12, Mar. 2005.

NASCIMENTO, César Augusto. **Caracterização funcional de terpeno sintases de citros**. Diss. Instituto agrônomo, 2016.

NAVICKIENE, Hosana M. Deboni et al. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 467-470, 2006.

OLIVEIRA, Gisele L et al. Growth study and essential oil analysis of *Piper aduncum* from two sites of Cerrado biome of Minas Gerais State, Brazil. **Bras. J. Pharmacog.** v. 23, p. 743–753, 2013.

PACHAURI, Rajendra K. et al. **Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Ipcc, 2014.

PALEVITCH, D. Recent advances in the cultivation of medicinal plants. In: **VI International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, XXII IHC 208**. p. 29-36. 1986.

PEÑUELAS, Josep; STAUDT, Michael. BVOCs and global change. **Trends in plant science**, v. 15, n. 3, p. 133-144, 2010.

PHILLIPS, Michael A. et al. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in plant science**, v. 13, n. 12, p. 619-623, 2008.

PICARD, G. et al. Assessment of in vitro pharmacological effect of Neotropical Piperaceae in GABAergic bioassays in relation to plants traditionally used for folk illness by the Yanasha (Peru). **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1500-1507, 2014.

PICHERSKY, Eran; GERSHENZON, Jonathan. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 3, p. 237-243, 2002.

PICHERSKY, Eran; NOEL, Joseph P.; DUDAREVA, Natalia. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PINTO-ZEVALLOS, Delia M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

PORTELLA, Roberto de Oliveira. Diferentes níveis de luminosidade determinam o perfil fitoquímico de plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf.. **Trends in Bioscience & Biotechnology**, v. 1, p. 13-15, 2014.

PORTES, Maria Teresa. A interação ecofisiológica planta-ambiente: o papel da aclimação fotossintética na resposta a fatores ambientais em espécies arbóreas. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências, Rio Claro, 2010.

RAUT, Jayant Shankar; KARUPPAYIL, Sankunny Mohan. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

ROCHA, Sergio FR; MING, Lin Chau. Piper hispidinervum: a sustainable source of safrole. **ASHS Press**, p.479-481, 1999.

SCHMIDT, Axel; GERSHENZON, Jonathan. Cloning and characterization of isoprenyl diphosphate synthases with farnesyl diphosphate and geranylgeranyl diphosphate synthase activity from Norway spruce (*Picea abies*) and their relation to induced oleoresin formation. **Phytochemistry**, v. 68, n. 21, p. 2649-2659, 2007.

SCHUMAN, Meredith C. et al. How does plant chemical diversity contribute to biodiversity at higher trophic levels?. **Current opinion in insect science**, v. 14, p. 46-55, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 5ªed. **Porto Alegre: Editora Artmed**, 2013.

TRAPP, S.C., CROTEAU, R.B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 158, p. 811-832, 2001.

VAN DEN BERG, Maria Elisabeth; SILVA, Milton Hélio Lima da. Contribuição ao conhecimento da flora medicinal de Roraima. **Acta amazônica**, v. 18, p. 23-35, 1993.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. **A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography**. 1963.

VANCANNEYT, Guy et al. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 98, n. 14, p. 8139-8144, 2001.

VIEIRA, Silvia Cristina Heredia et al . Antifungal activity of Piper diospyrifolium Kunth (Piperaceae) essential oil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 42, n. 3, p. 1001-1006, Sept. 2011 .

VIVALDO, Gianna et al. The network of plants volatile organic compounds. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11050, 2017