

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

JOÃO HOMERO DO AMARAL

**Variações diárias, sazonais e  
intraespecíficas em *Piper solmsianum***

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
14/07/2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO HOMERO DO AMARAL

**Variações diárias, sazonais e  
intraespecíficas em *Piper solmsianum***

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Química  
(Química Orgânica)*

*Orientador: Prof. Dr. Massuo Jorge Kato*

São Paulo  
2008

João Homero do Amaral

Variações diárias, sazonais e intraespecíficas em *Piper solmsianum*.

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Química  
(Química Orgânica)*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho

A minha mãe, que pavimentou a estrada que percorro hoje.

Ao Wil, pelo carinho, paciência e compreensão durante essa jornada tão pessoal.

A todos os meus grandes amigos que deixam meu dia-a-dia mais feliz!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato pela amizade, pela orientação firme e cuidadosa, e por contagiá-me com o seu amor, respeito e dedicação ao trabalho lento e minucioso de construir Ciência.

À Lydia por sua imensa prontidão em ajudar e sua grande generosidade em compartilhar seus conhecimentos facilitando o trabalho no laboratório.

À todos os integrantes do LPQN com quem eu convivi nesses últimos anos. Obrigado por tornar a minha passagem tranqüila e fácil deixando sempre um ambiente amigo e divertido.

À todos os professores e funcionários do Instituto de Química com quem tive contato direta ou indiretamente durante esse longo período. O meu caminho foi construído por muitas mãos, algumas quase anônimas para mim, mas fundamentais para permitir que eu chegasse até aqui.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelo privilégio de cursar este programa de pós-graduação reconhecido pela sua qualidade, e que poucas instituições públicas no mundo têm condições de oferecê-lo.

## RESUMO

Amaral, J. H. **Variações diárias, sazonais e intraespecíficas em *Piper solmsianum***. 2008. 150p. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Química Orgânica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os extratos de média polaridade de sete indivíduos de *Piper solmsianum* coletados em diferentes localidades foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência para se verificar diferenças quantitativas na concentração relativa de apiol, dilapiol, miristicina, grandisina, elemicina, isoelemicina e lignana tetraidrofurânica *rel-(7R, 8R, 7'R, 8'R)-3,4,3',4'-dimetilenodioxi-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana*. Todos os perfis cromatográficos consistiam de apenas dois, três ou quatro picos majoritários. O(s) composto(s) majoritário(s) era(m) distinto(s) de planta para planta, e em um dos espécimes o pico predominante não era nenhum dos sete metabólitos secundários avaliados. Estudaram-se as variações diárias e anuais em três espécimes de uma população selvagem de *P. solmsianum* localizada na Reserva da CUASO, em São Paulo. A grandisina apresentou teores máximos no início da noite e teores mínimos no início da manhã. Apiol/dilapiol apresentou variação circadianas evidentes apenas em dois indivíduos, sendo que em um deles o teor máximo ocorreu por volta das oito horas da noite, e no outro, o teor máximo ocorreu por volta das cinco horas da manhã. A variação sazonal mostrou pequena amplitude de oscilação. Em dois espécimes o máximo teor de apiol/dilapiol e grandisina ocorreu no verão. No terceiro espécime não se observou variação periódica anual.

**Palavras-chave:** *Piper solmsianum*, variação intraespecífica, variação sazonal, variação diária.

## ABSTRACT

Amaral, J. H. **Diurnal, seasonal and intraspecific changes in *Piper solmsianum***. 2008. 150p. Masters - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The crude extracts of seven individuals of *Piper solmsianum* collected in different places were analyzed by high efficiency liquid chromatography (HPLC) in order to determine changes in the relative content of apiol, dillapiol, myristicin, grandisin, elemicin, isoelemicin, and tetrahydrofuran lignan *rel*-(7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-3,4,3',4'-dimethylenedioxy-5,5'-dimethoxy-7,7'-epoxylignan. All chromatographic profiles consisted of two, three or four major peaks with significant qualitative and quantitative differences. Major components were different from plant to plant and in one specimen an component different from the seven metabolites observed in most cases. The leaf extracts from three wild specimens of *P. solmsianum* collected at CUASO Reserve, showed annual and diurnal variations in apiol/dillapiol and grandisin relative concentrations. Three plants presented circadian variation with maximum content of grandisin late afternoon, and minimum content in the dawn. Apiol/dillapiol displayed clear circadian variation in two individuals, but without synchrony between phases. The maximum content was observed and in a second specimen around 8 p.m., and in the another specimen, the maximum content occur was observed at 5 a.m. The seasonal variation showed small amplitude of oscillation and in two individuals the maxima contents of apiol/dillapiol and grandisin were observed in summer.

**Key-words:** *Piper solmsianum*, intraspecific variation, seasonal variation, circadian variation

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	9
1.1. Metabólitos secundários.....	10
1.1.1. Definição.....	10
1.1.2. Funções.....	10
1.1.3. Variabilidade quantitativa.....	14
1.2. Relógio biológico.....	17
1.2.1. Controle gênico do relógio biológico.....	19
1.2.2. Biossíntese de metabólitos secundários e relógio biológico.....	22
1.2.3. Variações sazonais e relógio biológico.....	24
1.3. Variações intraespecíficas.....	25
1.4. A família Piperaceae e o gênero <i>Piper</i> .....	32
1.5. <i>Piper solmsianum</i> .....	35
1.5.1. Descrição da espécie.....	35
1.5.2. Metabólitos secundários em <i>Piper solmsianum</i> .....	36
<b>2. Objetivos</b> .....	41
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	43
3.1. Equipamentos e solventes utilizados.....	45
3.2. Método de análise por CLAE.....	45
3.3. Variação no perfil metabólico por secagem em estufa.....	49
3.4. Variação intraespecífica .....	50
3.4.1. Procedências das amostras vegetais .....	50
3.4.2. Tratamento das amostras vegetais .....	51
3.5. Variações diária, interfolhas e sazonal .....	53
3.5.1. Procedência das amostras vegetais .....	53

3.5.2. Primeiro estudo de variação diária .....	53
3.5.3. Variação interfolhas .....	55
3.5.4. Segundo estudo de variação diária .....	55
3.5.5. Variação sazonal .....	57
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>58</b>
4.1. Avaliação do método analítico .....	59
4.1.1. Reprodutibilidade das análises cromatográficas .....	59
4.1.2. Identificação dos picos cromatográficos .....	62
4.2. Variação no perfil metabólico por secagem em estufa .....	64
4.3. Variação intraespecífica.....	77
4.4. Primeiro estudo de variação diária.....	76
4.5. Variação intraespecífica interfolhas .....	85
4.6. Segundo estudo de variação diária .....	92
4.7. Variação sazonal .....	108
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>116</b>
5.1. Metodologia .....	117
5.2. Variação intraespecífica .....	117
5.3. Variação diária e sazonal .....	118
<b>6. Referências.....</b>	<b>123</b>
<b>7. Apêndices.....</b>	<b>140</b>
7.1. Primeiro estudo de variação diária .....	141
7.2. Segundo estudo de variação diária.....	144
7.3. Variação sazonal .....	150

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Metabólitos secundários

### 1.1.1. Definição.

Em 1891, seguindo o trabalho de Stahl em bioquímica vegetal, Kössel sugeriu uma distinção entre metabólitos básicos (primários) e metabólitos secundários. Os metabólitos primários, como lipídeos, protídeos e glicídeos, de ocorrência universal em todos os seres vivos, estão envolvidos na respiração, assimilação de nutrientes, crescimento e desenvolvimento. Os metabólitos secundários, ainda segundo Kössel, estão presentes em células especializadas e não seriam essenciais para a sobrevivência das células (Kliebenstein, 2004).

Comparados com a grande abundância dos metabólitos primários nas plantas, os secundários perfazem apenas 1% ou menos do total de carbono, mas a sua diversidade estrutural entre todas as espécies vegetais é enorme. Já foram elucidadas mais de 50.000 estruturas diferentes, e a cada ano mais algumas centenas são determinadas (Pichersky e Gang, 2000).

### 1.1.2. Funções

A grande variedade de metabólitos secundários teria paralelo na diversidade de funções? Adjetivos como *resto* ou *excremento metabólico* já foram utilizados para descrevê-los. Na década de 1970, duas escolas de pensamento começaram a se delinear. Uma delas acreditava que havia uma função ecológica crítica, e a outra corrente acreditava que não possuíam significado fisiológico especial. Kurt Mothes, bioquímico de plantas alemão, defendendo a segunda vertente, afirmou que “muitas pessoas aparentemente não conseguem viver sem a idéia de que tudo na Natureza

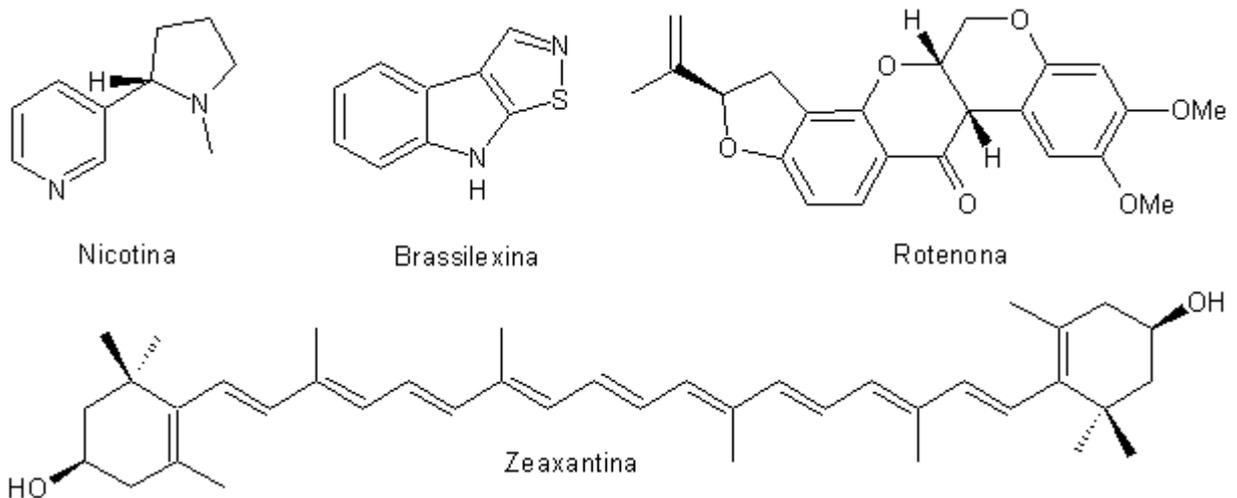
tem uma razão de ser” (Kutchan, 2001).

Mas, a partir do trabalho pioneiro de Miriam Rothschild e Jeffrey Harborne da Universidade de Reading, e de Tom Eisner e Jerrold Meinwald da Universidade de Cornell estabeleceu-se um novo campo de estudo, a ecologia química (Kutchan, 2001). As sutis relações ecológicas planta-animal, planta-inseto, planta-bactéria e planta-planta passaram a ser melhor compreendidas através da lente das mediações químicas feitas essencialmente pelos metabólitos secundários (Harborne, 1993).

O paradigma atual já vê a existência desses compostos sob o ponto de vista evolutivo, sendo eles características adaptativas que foram selecionadas durante a evolução e essenciais em algumas funções vegetais. Sem eles as plantas perderiam muito de sua capacidade adaptativa ao ambiente. Portanto, segundo essa concepção, essa classe de compostos já não pode ser concebida como *secundária* diante das importantes funções desempenhadas (Wink, 2003).

Nas últimas décadas têm crescido as evidências experimentais que ajudam a elucidar as funções dos metabólitos secundários. Steppuhn e seu grupo (2004) mostraram através de estudos com *Nicotiana attenuata* transgênica e que não sintetizava nicotina (fig. 1.1.), a importância deste alcalóide como parte do mecanismo de defesa dessa planta na proteção contra herbívoros como *Manduca sexta*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Spodoptera exigua* e *Trimerotropis ssp.* A rotenona (fig. 1.1.), obtida de *Derris elliptica*, apresenta ação como deterrente de *Bactrocera oleae* (Stavroulakis *et al.*, 2001). A brassilexina (fig. 1.1.) é um potente alcalóide antifúngico que atua em *Brassica spp.* (Pedras *et al.*, 2000). Compostos indólicos e fenilpropanoídicos agem na proteção de *Arabidopsis thaliana* contra infestações do patógeno *Pythium sylvaticum* (Bednarek *et al.*, 2005). Carotenóides, como zeaxantina (fig. 1.1.), tem função fotoprotetora em *Agrostis stolonifera* (MacElroy *et al.*, 2006).

Assim, esses metabólitos serviriam como: (i) defesa contra herbívoros, bactérias, fungos, amebas, insetos, vírus ou plantas competidoras, (ii) mediadores químicos na simbiose entre plantas e micróbios, insetos ou animais maiores, (iii) hormônios sexuais, (iv) sinalizadores para atração de polinizadores e dispersão de sementes, (v) agentes protetores contra as intempéries, como radiação ultravioleta e congelamento (Bennett e Wallsgrove, 1994; Demain e Fang, 2000).



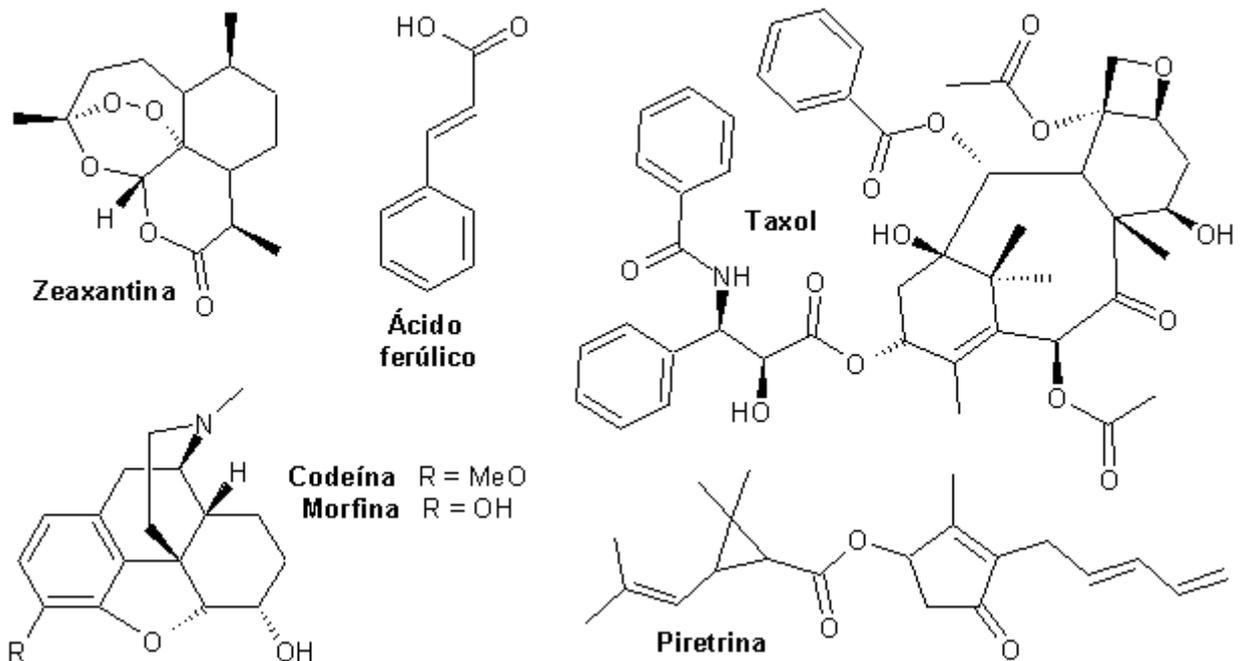
**Figura 1.1.** Metabólitos secundários que apresentam funções de defesa ou de proteção em espécies vegetais.

Além das funções de proteção, defesa e sinalização mencionadas, fundamentais na sobrevivência e no desenvolvimento das espécies vegetais, o ser humano tem feito uso dos metabólitos secundários desde os primórdios da civilização. O ópio, por exemplo, retirado do bulbo floral de *Papaver somniferum* e fonte natural dos alcalóides morfina e codeína (fig. 1.2.), já era conhecido pelos Sumérios em 4.000 a.C. O uso recreativo do ópio foi tão importante que a *P. somniferum* foi a primeira planta cultivada sem fins alimentícios. Atualmente esses dois alcalóides são usados em medicina como bloqueadores de dor (Theis e Lerda, 2003). Terpenóides, como o piretrina (fig. 1.2.) presente nas flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, são inseticidas comerciais com uso cada vez mais

freqüentes no controle de pragas agrícolas e urbanas (Viegas Júnior, 2003). A descoberta de novos compostos com atividade farmacológica tem nos metabólitos secundários de vegetais importante fonte (Verpoorte, 1998), como o taxol (fig. 1.2.), extraído de *Taxus brevifolia* e que possui potente atividade antileucêmica e antitumoral (Wani *et al.*, 1971), ou a lactona sesquiterpênia artemisina e seus derivados, produzido pela planta *Artemisia maritima* e usado no tratamento de malária (Wainwright e Amaral, 2005).

No setor agrícola, os metabólitos secundários têm se mostrado úteis no melhoramento de cultivares. Técnicas de manipulação gênica estão possibilitando alterar as vias metabólicas de determinadas culturas de modo a acumular compostos de interesse para aumentar sua resistência a pragas. Milho (*Zea mays*) modificado geneticamente mostrou-se mais resistente ao ataque de *Ostrinia nubilalis* por acumular ácido ferúlico (fig. 1.2.) do que a espécie não modificada (Mao *et al.*, 2007). Contudo, a presença de metabólitos secundários pode afetar o sabor de determinados alimentos. O tremoço (sementes de plantas do gênero *Lupinus*) selvagem, rico em alcalóides, é mais amargo do que aquele selecionado artificialmente por agricultores (“tremoço doce”), que, apesar de possuir gosto mais suave pela menor presença desses alcalóides, é mais suscetível ao ataque de herbívoros (Wink, 1988).

A habilidade de sintetizar classes particulares de metabólitos secundários é geralmente restrita a certos grupos de plantas, e a evolução parece ter sido o motor dessa diferenciação. Cada espécie contém apenas um subconjunto de genes responsáveis pelo metabolismo secundário, e que permite montar mapas filogenéticos aproximando ou afastando espécies dentro da árvore evolutiva (Pichersky e Gang, 2000).



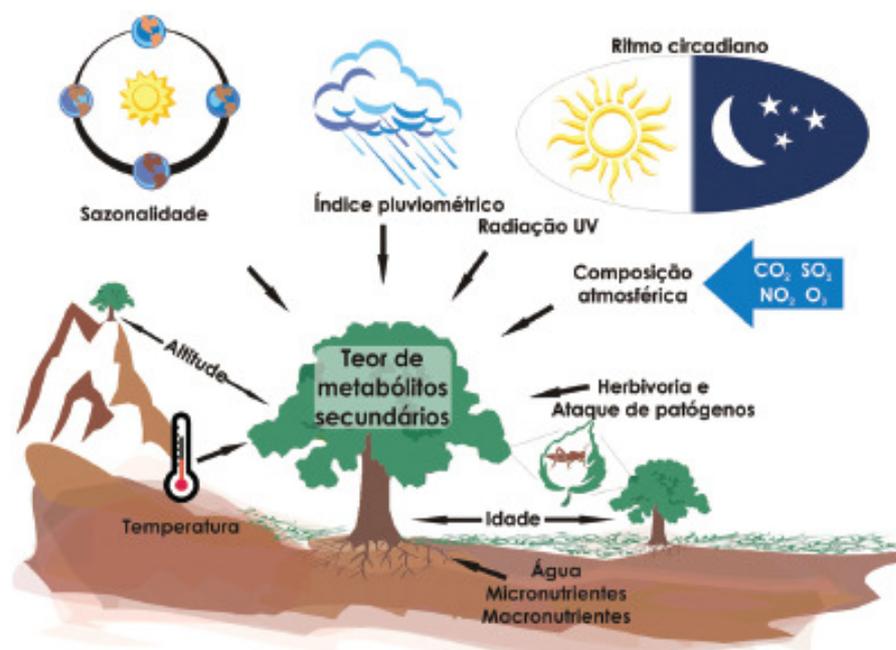
**Figura 1.2.** Metabólitos secundários com importância econômica.

### 1.1.3. Variabilidade Quantitativa

Além da grande variabilidade qualitativa dos metabólitos secundários entre as espécies, fruto de evolução e adaptação, há uma grande variabilidade quantitativa quando se avalia indivíduos de uma mesma espécie. A produção de metabólitos secundários pelas plantas está longe de ser um fenômeno linear e/ou facilmente previsível. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas desses compostos em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diários, intraplanta, intraespecífico e interespecífico). Esse fenômeno já é bem conhecido, principalmente em espécies que apresentam algum valor, seja medicinal ou econômico. O ser humano percebeu há muito tempo que existem condições mais propícias para coleta de plantas, principalmente as medicinais, como certas épocas do ano, ou certas horas do dia, além de melhores localizações (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Estudos de etnobotânica têm mostrado que o

conhecimento popular, por exemplo, pode ser um norteador na busca de condições que potencializem a coleta de espécies vegetais indicando os melhores momentos para tal (Gottlieb *et al.*, 2002).

Fatores tão diversificados como ritmo circadiano, umidade, composição do ar atmosférico, herbivoria e ataque de patógenos, altitude, radiação ultravioleta e visível, índice pluviométrico, disponibilidade de macro e micronutrientes, sazonalidade, idade da planta e temperatura têm se mostrado como fatores fundamentais para compreender a variabilidade quantitativa, e até mesmo qualitativa, na produção de metabólitos secundários em uma mesma espécie (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).



**Figura 1.3.** Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas. Reproduzido de (Gobbo-Neto e Lopes, 2007)

São relatadas variações temporais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais (Schwob *et al.*, 2004), lactonas sesquiterpênicas e ácidos fenólicos (Zidorn e Stoppner, 2001), flavonóides (Atkinson e Blakeman, 1982), cumarinas (Wilt e Miller, 1992), saponinas (Ndamba *et al.*, 1994), alcalóides (Roca-Pérez *et al.*, 2004), taninos (Salminen *et al.*, 2001),

graxas epicuticulares (Faini *et al.*, 1999), iridóides (Høgedal e Mølgaard, 2000), glucosinolatos (Agerbirk *et al.*, 2001) e glicosídeos cianogênicos (Kaplan *et al.*, 1983).

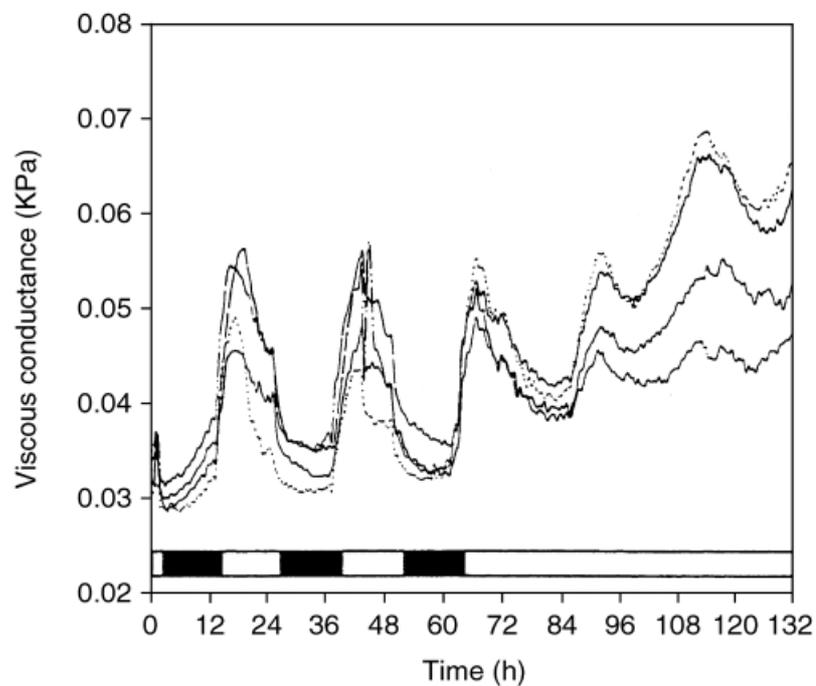
As próximas seções buscam discutir alguns desses fatores anteriormente expostos procurando explorar algumas causas dessa variabilidade qualitativa e quantitativa.

## 1.2. Relógio Biológico

Ciclos biológicos nos organismos vivos já são bem conhecidos em nossa experiência cotidiana. Queda de folhas em árvores, ciclo menstrual, cio e hibernação em mamíferos, florescimento e frutificação, todos esses fenômenos variam temporalmente e possuem comportamento periódico. Esses diversos ciclos apresentam diferentes frequências. A queda de folhas e a hibernação de mamíferos, por exemplo, possuem variações que se repetem em um espaço de um ano aproximadamente (ciclos *circanuais*). O ciclo menstrual já possui uma frequência menor, de aproximadamente 28 dias. Outros são muito mais rápidos, como os *circadianos*, que têm duração média de 24 horas, como abertura e fechamento de estômatos ou a sucessão vigília/sono em seres humanos (Ishida *et al.*, 1999).

Um mesmo organismo pode apresentar vários ciclos, e cada um com diferentes frequências. Talvez o que contraria o senso comum é saber que grande parte desses fenômenos circulares não é controlada pela simples presença/ausência de luz que ocorre nas mudanças de dia para noite. Mesmo em situações de total escuridão (chamadas de “livre curso”), muitos eventos circadianos ainda se manifestam com frequência de 24 horas aproximadamente. A primeira observação científica sobre um ciclo biológico em plantas ocorreu em 1729 com a publicação, por De Mairan, astrônomo francês, de suas observações sobre os movimentos foliares de *Mimosa pudica* em condições de total ausência de luz. Assim, percebeu-se que deveria existir um mecanismo endógeno, auto-sustentado, que funcionaria mesmo na falta da sucessão claridade/escuridão. Essa estrutura foi chamada de relógio biológico e sua presença já foi detectada desde organismos mais simples, como cianobactérias, até em seres humanos, passando por plantas e insetos (Salomé e McClung, 2004).

Mas nem todos os ciclos são regulados por um relógio biológicos. Por exemplo, o heliotropismo (movimento das flores em direção à luz, presente no girassol, por exemplo) é controlado apenas pelo percurso do sol durante o dia. Se a fonte de luz ficar estática, o movimento floral cessa. Assim, para se determinar se um ciclo biológico é regulado por esse relógio endógeno, ele deve persistir em condições constantes tendo uma frequência aproximada de 24 horas (livre-curso) (Sweeney, 1963).



**Figura 1.4.** Variação circadiana de abertura de estômatos com alternância claro/escuro e em condição de livre-curso. Reproduzido de (Webb, 2003)

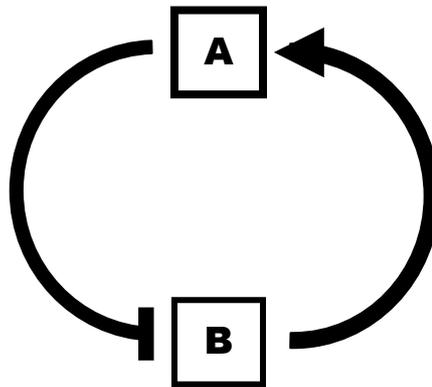
O movimento dos estômatos em *Arabidopsis thaliana* é um fenômeno regulado por relógio biológico. No gráfico (fig. 1.4.), cada linha representa medidas feitas em uma única folha de um indivíduo. Esse movimento foi detectado pela medida da condutância das folhas ao fluxo de ar, alta condutância viscosa indica estômatos abertos, e baixa condutância viscosa indica estômatos fechados. O regime de luz é indicado por uma barra clara acima da abscissa, e a escuridão é

indicada por uma barra escura. A partir de 65 horas, a planta foi submetida a regime de livre-curso (luminosidade constante). A freqüência se mantém devida apenas ao relógio biológico, mas, sem a sincronização promovida pela alternância claro/escuro, a oscilação vai desaparecendo (Webb, 2003)

Um ciclo circadiano que é regulado pelo relógio biológico deve satisfazer três condições. A variação deve persistir em condições constantes (livre-curso) com um período de aproximadamente 24 horas. Deve apresentar arrastamento (“entrainment”), ou seja, fatores externos, como sucessão dia/noite, devem ser capazes de sincronizar o oscilador endógeno. Além disso, também deve apresentar compensação de temperatura. Como a velocidade das reações biológicas é afetada por variações de temperatura, existe algum mecanismo, ainda pouco conhecido, que evita que essas alterações afetem significativamente a freqüência do relógio endógeno (Millar, 2004).

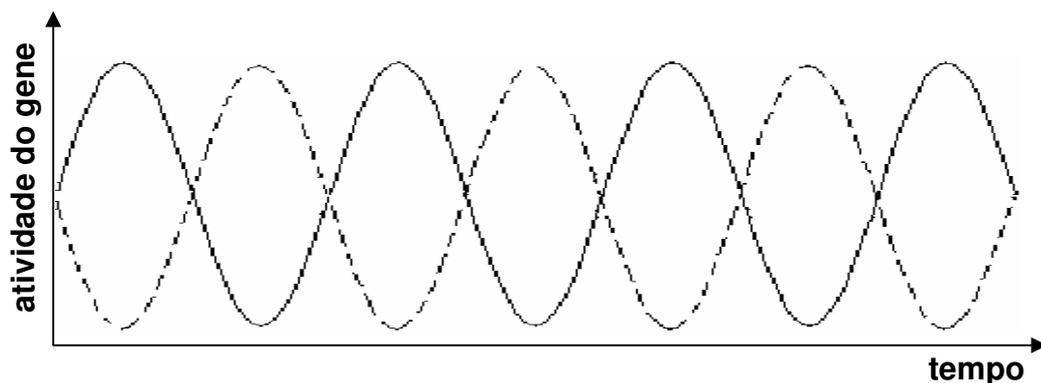
### **1.2.1. Controle Gênico do Relógio Biológico**

Entre todos os relógios biológicos já estudados e pertencentes a grupos distintos, como insetos, plantas, animais ou seres unicelulares, há pouca ou nenhuma semelhança entre eles em termos de genes ou proteínas envolvidas. Apesar de que, dentro do reino Plantae, evidências indicam que os relógios biológicos de diferentes espécies apresentam mecanismos semelhantes. Apesar dessa diversidade, todos os relógios biológicos apresentam pelo menos uma etapa de alimentação negativa da atividade dos genes envolvidos no funcionamento do relógio endógeno e que se constitui no oscilador central do sistema (McClung *et al.*, 2002).



**Figura 1.5.** Diagrama mostrando a alimentação positiva e negativa entre as atividades de dois genes hipotéticos A e B no oscilador de um relógio biológico.

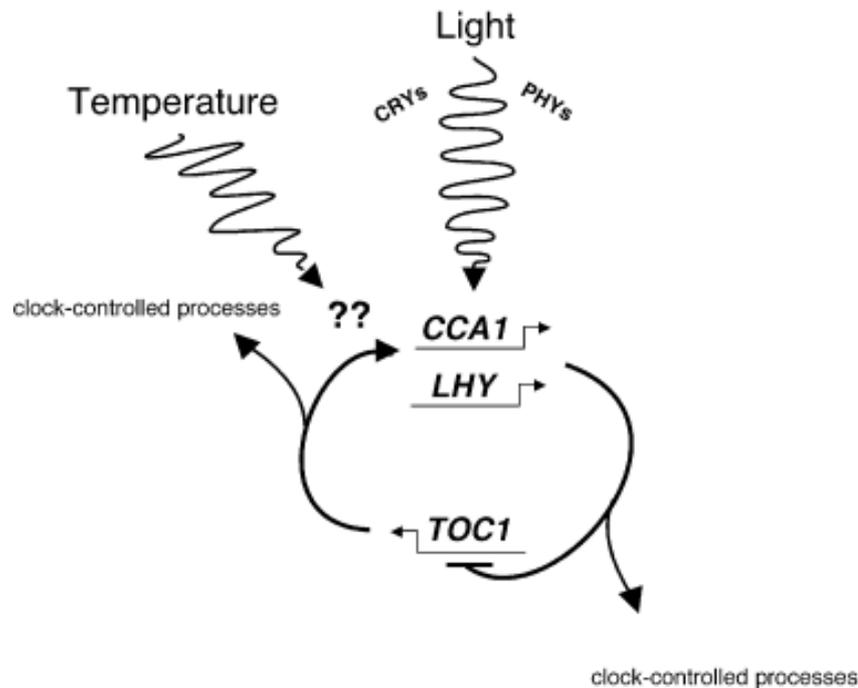
O diagrama anterior (fig. 1.5.) esquematiza a interação entre dois genes hipotéticos A e B e que constituem esse “núcleo de oscilação” (oscilador). Um aumento de atividade do gene B também induz a um aumento de atividade do gene A, indicado no esquema por uma seta curva ( $\curvearrowright$ ). Mas um aumento de atividade do gene A inibe o gene B (alimentação negativa, indicada no esquema por uma seta de ponta trancada). Assim, ao longo do tempo, constata-se uma variação senoidal de atividade dos genes A (linha contínua) e B (linha tracejada) com a mesma frequência e de fases inversas (fig. 1.6.).



**Figura 1.6.** Gráfico esquemático mostrando a variação ao longo do tempo de atividade de dois genes hipotéticos A (representado pela linha contínua) e B (representado pela linha tracejada) que fazem parte do oscilador central de um relógio biológico.

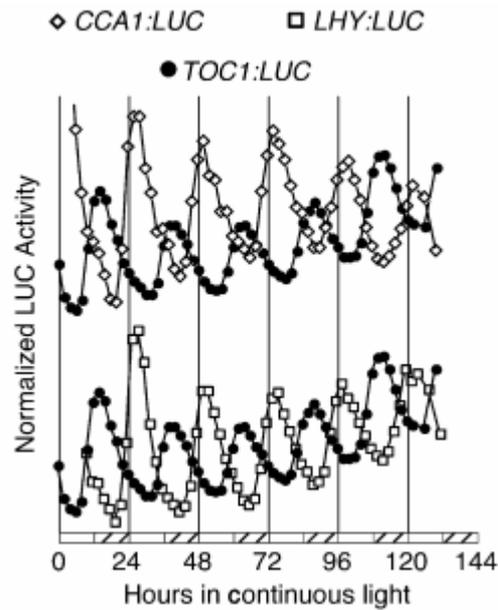
A rede de genes que fazem parte do mecanismo de funcionamento do relógio biológico é pouco compreendida para a maioria dos seres. Porém, o relógio da

planta modelo *Arabidopsis thaliana* vem sendo investigado há mais de 50 anos. Um esquema simples desse oscilador pode ser resumido na interação entre três genes principais: CCA1 (Circadian Clock Associated 1), LHY (Late Elongated Hypocotyl) e TOC1 (Timing of Cab Expression 1) (fig. 1.7.) (Salomé e McClung, 2005).



**Figura 1.7.** Modelo simplificado do oscilador central em *Arabidopsis thaliana* e os três genes, CCA1, LHY e TOC1, envolvidos. Reproduzido de (Salomé e McClung, 2005)

A expressão do gene TOC1 induz a atividade gênica de CCA1 e LHY (alimentação positiva). Contudo, esse aumento inibe a expressão de TOC1 (alimentação negativa) (fig. 1.8.). Há uma cadeia de interações entre esses três genes e outros que permitem o controle temporal da produção de metabólitos primários e secundários. A luz, através de criptocromos (CRYs) e fitocromos (PHYs) e a temperatura, em uma rede de interações ainda não compreendida, são os sinalizadores externos que permitem sincronizar o relógio biológico ao ambiente (processo de arrastamento ou “*entrainment*”) já que a frequência natural do oscilador central não é de 24 horas (Salomé e McClung, 2005).



**Figura 1.8.** O gene LUC, que expressa a enzima luciferase, foi inserido nos *loci* gênicos de CCA1, LHY e TOC1. A expressão desses três últimos foi medida indiretamente pela atividade do gene LUC. Reproduzido de (Salomé e McClung, 2005)

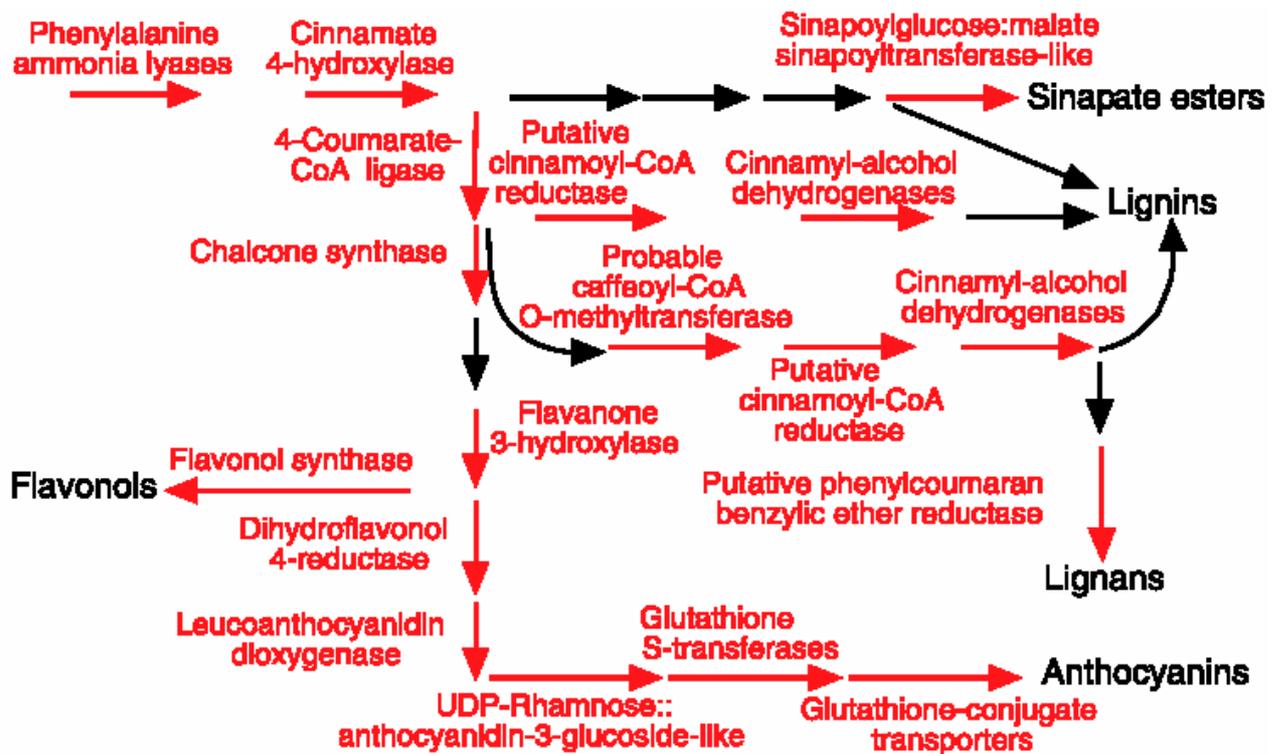
A rigor, não há apenas um oscilador, e o sistema completo depende da sincronia de vários osciladores que resultam em múltiplos ritmos expressos por um único indivíduo. A interação entre fatores ambientais, como temperatura e luz, resultantes das mudanças diárias e anuais, ajustam continuamente a frequência do relógio endógeno (McClung *et al.*, 2002).

### 1.2.2. Biossíntese de Metabólitos Secundários e o Relógio Biológico

Os genes envolvidos no oscilador central do relógio biológico de plantas também atuam na expressão de outros genes ligados à biossíntese de metabólitos secundários. Por exemplo, a biossíntese do isopreno, metabólito fundamental na via dos isoprenóides, ocorre com a participação da enzima isopreno sintase, cujo gene que a codifica apresenta variação regulada por relógio biológico (Loivamäki *et al.*, 2007).

Harmer e seu grupo (2000), usando matrizes de oligonucleotídeos,

encontraram uma vasta rede de genes regulados pelo relógio biológico. Entre 8.200 diferentes genes, 453 deles (6% do total) apresentam variação de atividade na forma de uma curva senoidal com um período entre 20 e 28 horas (fig. 1.9.). O dia começa com a indução de genes fotossintetizantes e para síntese de pigmentos fotoprotetores (biossíntese de fenilpropanóides). Genes que desencadeiam processos que exigem grande demanda energética, como assimilação de nitratos, são mobilizados somente durante o dia. No final da tarde há indução de genes que codificam enzimas de transporte de hexoses, das vias glicolíticas e oxidação de fosfato de modo que os recursos energéticos necessários sejam preparados para o período de noite que se aproxima, além de genes que protegem a planta de efeitos do frio. Genes que codificam enzimas de mobilização de amido e síntese de celulose são ativos durante a noite.



**Figura 1.9.** Via da biossíntese de fenilpropanóides. Genes que codificam as enzimas indicadas em vermelho são controlados pelo relógio endógeno. Reproduzido de (Harmer *et al.*, 2000)

Assim, a síntese de algumas classes de metabólitos secundários, como flavonóides, lignanas, ligninas e antocianinas, é controlada pelo relógio biológico apresentando variações temporais cíclicas. Esse fenômeno já foi estudado dentro da família das Piperaceae, em folhas da espécie *Piper aduncum*, que apresenta um ciclo circadiano de atividade da enzima preniltransferase, envolvida na síntese de cromenos, com pico de atividade no início da manhã (Morandim *et al.*, 2005).

O relógio biológico apresenta-se, portanto, como uma resposta evolutiva que permite maximizar os processos biológicos que dependem da presença/ausência de luz aumentando a adaptação ao ambiente por atuar como um cronômetro que antecipa eventos externos possibilitando que o organismo se prepare para as mudanças (Eriksson e Millar, 2003).

### **1.2.3. Variações Sazonais e Relógio Biológico**

O relógio biológico não regula apenas processos circadianos. Eventos circanuais, como floração, também são regulados pelo mesmo sistema. Já é bem estabelecido que a duração do fotoperíodo afeta o surgimento das flores e a duração do estado vegetativo. A detecção da duração do dia através do sistema circadiano depende da sinalização de luz percebida pelos fotoreceptores criptocromos e fitocromos. Assim, há grande correlação entre os eventos circadianos e os circanuais (Eriksson e Millar, 2003).

### 1.3. Variações Intraespecíficas

A percepção das variações quantitativas de metabólitos primários e secundários como influências do relógio biológico é apenas parte da história. O perfil metabólico em plantas também varia de indivíduo para indivíduo dentro de uma mesma espécie (variabilidade intraespecífica). Há exemplos de variações deste tipo dentro de muitas classes de metabólitos secundários conhecidos: alcanos lineares (Smith e Martin-Smith, 1978), monoterpenos (Gerhold e Plank, 1970; Thompson *et al.*, 2003; Ianson *et al.*, 2005), sesquiterpenos (Curado *et al.*, 2006), diterpenos (Bergstrom, 1992), lactonas sesquiterpênicas (Gershenzon e Mabry, 1984; Spring, 1991), esteróis e triterpenos pentacíclicos (Heupel, 1985), benzenóides (Dötterl *et al.*, 2005), flavonóides (Rolly *et al.*, 1988), alcalóides (Berkov *et al.*, 2004). Fenólicos e taninos são as classes de compostos cuja variação é a mais extensamente estudada, já que o teor de fenólicos é usado como indicativo da quantidade de nitrogênio disponível no solo e da presença/ausência de compostos anti-herbivoria.

Para prever as possíveis respostas das plantas às mudanças ambientais e como essas mudanças afetam as interações das plantas com seu ambiente, incluindo herbívoros, pesquisadores tem aprendido que fatores genéticos, biológicos e físicos são importantes para gerar variações fenotípicas, incluindo defesa (Berenbaum, 1995). Variações na disponibilidade de recursos necessários para o crescimento das plantas (água, luz, nutrientes) são vistos como fatores cruciais nos modelos que buscam explicar mudanças qualitativas e quantitativas nos metabólitos secundários em escala de tempo evolutiva, bem como em variações intra-específicas em escala de tempo ecológica.

Pesquisas com variações na concentração de gás carbônico no ar (Estiarte *et al.*, 1999; Lindroth *et al.*, 2001; Castells *et al.*, 2002), quantidade de radiação

ultravioleta tipo B incidente (Lavola *et al.*, 2000) e qualidade e quantidade de poluentes atmosféricos (Pasqualini *et al.*, 2003) têm demonstrado que esses também são fatores que modificam a produção de metabólitos secundários. Têm sido reportado na literatura muitos estudos relacionando positivamente a concentração de gás carbônico e a produção de fenólicos em plantas considerando a crescente preocupação sobre os efeitos na vegetação com o aumento da concentração de gás carbônico no ar por fontes antropogênicas (Peñuelas e Estiarte, 1998).

No intuito de racionalizar as complexas relações entre qualidade e quantidade de metabólitos secundários e variações ambientais, foram desenvolvidos vários modelos.

A “Hipótese do Balanço Crescimento-Diferenciação” (Growth-differentiation balance hypothesis, GDB) foi primeiramente desenvolvido por Loomis (1932, 1953) e posteriormente reelaborado por Lorio (1986), Herms e Mattson (1992) para ser aplicado em interações planta-inseto. A hipótese GDB prediz como a planta alocará carbono para processos relativos à diferenciação ou processos relativos ao crescimento dentre de uma faixa de disponibilidade de recursos ambientais. Loomis define “crescimento” como processos de divisão e alongação celular resultando em aumento irreversível de tamanho. “Diferenciações” são todos os processos que provocam variações morfológicas e metabólicas em células ou tecidos, como lignificação, produção de cutícula, produção de tricomas, e produção e estoque de metabólitos secundários (alcalóides, fenólicos, terpenos, entre outros). Processos de diferenciação ocorrem tipicamente após o crescimento celular. A hipótese GDB modela três situações distintas em relação ao nível de recursos ambientais disponíveis (água, luz, nutrientes): muito baixo, intermediário, alto.

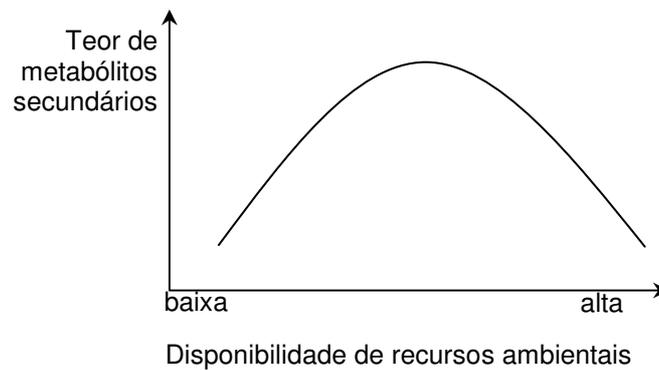
Plantas submetidas a quantidades baixíssimas de recursos têm sua

capacidade fotossintética e de crescimento comprometidas e os poucos recursos disponíveis são alocados para produção de metabólitos primários garantindo a manutenção mínima das condições de sobrevivência e crescimento. Nessa situação, há baixa produção de aleloquímicos e pequena concentração de metabólitos secundários (Waring e Pitman, 1985; Herms e Mattson, 1992).

Plantas submetidas a concentrações intermediárias têm acúmulo intermediário de biomassa em relação às situações extremas com relação a disponibilidade de recursos, mas podem contemplar melhor a produção de metabólitos secundários. Isto ocorre porque a fotossíntese é menos sensível à limitação de recursos do que as funções de crescimento (divisão e alongação celular) (Chapin, 1980; Dietz, 1989; Luxmoore, 1991). Portanto, os metabólitos secundários, que são produtos de fotossíntese, tendem a se acumular em plantas que fotossintetizam a altas taxas, mas que experimentam inibição de crescimento por estar em ambientes com recursos limitados. A produção de aleloquímicos pode ser vista como “custo zero”, pois são construídos a partir de um reservatório de carbonos na planta que está biodisponível por não poder ser alocado para as funções de crescimento.

Finalmente, plantas que crescem em ambientes com boa disponibilidade de recursos não têm limitação nem nas funções de crescimento nem nas funções de diferenciação e, assim, alocam a maior quantidade de carbonos provenientes da fotossíntese para crescer tornando-os pouco disponíveis para a produção de aleloquímico e conseqüentemente menores concentrações de metabólitos secundários (Coley *et al.*, 1985).

A relação entre metabólitos secundários e disponibilidade de recursos pode ser resumida no esquema seguinte (fig. 1.10.), segundo a hipótese GDB.



**Figura 1.10.** Variação de teor de metabólitos secundários em relação à disponibilidade de recursos ambientais, segundo a hipótese *Growth-differentiation balance hypothesis*, GDB.

A “Hipótese de Balanço Carbono-Nutriente” (Carbon-Nutrient Balance Hypothesis, CNB) propõe uma estrutura para entendimento dos efeitos da fertilidade do solo na alocação de recursos para crescimento da planta ou produção de aleloquímicos. Pode-se considerar que a hipótese GDB engloba muitas das previsões feitas pelo modelo CNB (Herms e Mattson, 1992). Em solos pobres em nitrogênio, a planta desamina os aminoácidos tirosina e fenilalanina conduzindo à produção de fenilpropanóides incluindo a biossíntese de flavonóides, cumarinas, ésteres cinâmicos e lignóides em geral. Esse nitrogênio é reciclado e usado na obtenção de proteínas (metabólitos primários) (Bryant *et al.*, 1983). Ao contrário da hipótese GDB, o modelo de balanço carbono-nutriente faz previsões mais explícitas entre a relação C/N e a alocação de recursos da planta para produção de aleloquímicos.

Segundo a hipótese CNB, a disponibilidade de nitrogênio no solo e teor de fenólicos tem correlação negativa. Apesar de alguns estudos corroborarem essa previsão (Estiarte *et al.*, 1994), há casos em que se constatou a produção de somente alguns fenólicos (Lower e Orians, 2003), outros estudos mostraram que as previsões foram parcialmente satisfeitas (Pais e Varanda, 2003), ou que não foram satisfeitas (Koricheva *et al.*, 1998).

Apesar de ambas as hipóteses estarem longe de serem unânimes entre os pesquisadores, elas têm colaborado para melhor entendimento de alguns paradoxos. Ambientes com plantas ornamentais são comumente adubados baseados na racionalização de que aumento na fertilidade do solo se reflete em plantas com maior resistência às pragas. Todavia, muitos estudos mostram que a fertilização do solo diminui a resistência de plantas lenhosas a ácaros, insetos sugadores de seiva, insetos folívoros mandibulados e mamíferos herbívoros, por aumentar o conteúdo nutritivo da planta e/ou diminuir a concentração de metabólitos secundários (Herms, 2002).

A “Hipótese da Defesa Ótima” (Optimal Defense Hypothesis, OD) foi inicialmente formalizada na década de 1970 por dois grupos independentes, um deles liderado por Paul Feeny da Cornell University, e o outro grupo da University of Washington (Gordon Orians, David Rhoades e Rex Cates). A hipótese OD também prediz uma relação negativa entre crescimento e defesa química, mas lança mão de relações evolutivas para explicar a presença dos metabólitos secundários em plantas (Fox, 1981). Segundo a hipótese OD, a alocação de recursos da planta para produção de aleloquímicos para defesa pode somente ser entendida em termos da pressão que os organismos herbívoros exercem em selecionar naturalmente indivíduos mais aptos a produzirem compostos que diminuam a predação, considerando tempos evolutivos (McKey, 1974). Em outras palavras, mecanismos de defesa foram selecionados em resposta às relações planta-herbívoros dentro de uma longa história evolucionária.

Teorias de coevolução planta-inseto – a hipótese OD pode ser incluída nesse grupo – têm sido particularmente evocadas para explicar a imensa diversidade de compostos metabólicos secundários, como os 200 alcalóides de *Catharanthus roseus* (Mersey e Cutler, 1986), ou os 25 terpenóides encontrados na *Satureja*

*douglasii* (Lincoln e Langenheim, 1978). Há uma suposta “guerra silenciosa” entre plantas e insetos na qual as plantas que produzem novos compostos mais tóxicos acabam sendo selecionadas, provocando a seleção de novos insetos capazes de detoxificar esses metabólitos. Assim, os produtos finais nas rotas metabólicas secundárias devem ser os mais efetivos contra os insetos contemporâneos (Berenbaum, 1983; Miller e Feeny, 1983; Harborne, 1988). Suportes para essas idéias podem ser encontrados em estudos que relacionam toxicidade crescente de alcalóides em plantas mais recentes na escala evolutiva (Levin e York, 1978; Gottlieb, 1990), e em evidências que insetos podem agir como agentes de seleção evolutiva em plantas (Shonle e Bergelson, 2000).

Ainda segundo hipóteses de coevolução, pode considerar-se que compostos mais “primitivos” dentro de uma rota metabólica foram mantidos por serem os precursores dos metabólitos mais ativos, enquanto que outros compostos inativos podem simplesmente ser vestígios evolucionários que ainda não foram removidos pela seleção natural (Jones e Firn, 1991).

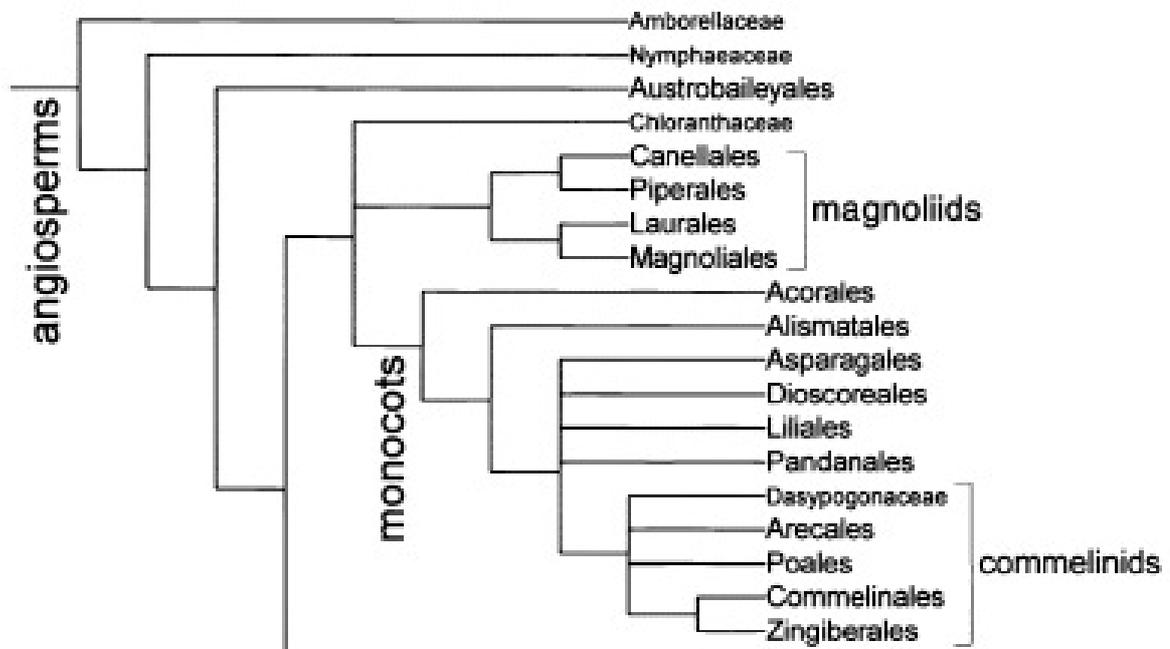
Essas três hipóteses apenas expõem o pano de fundo das discussões sobre as relações entre metabólitos secundários e recursos ambientais. Outras idéias buscam explicar variações intra-específicas qualitativas e quantitativas dos aleloquímicos em função de outras relações planta-ambiente, como o papel adaptativo dos metabólitos secundários na dispersão de sementes (Tsahar *et al.*, 2002; Izhaki *et al.*, 2002).

Todas essas hipóteses, porém, ainda descrevem precariamente a imensa variação de relações que se estabelecem entre plantas, animais e ambiente. Considerando-se que muitas variações metabólicas são controladas por um relógio biológico, o panorama fica ainda mais complexo. Falta uma teoria unificadora que dê conta de estabelecer conexões claras entre fatores genéticos e ambientais (água,

nutrientes, teor de gás carbônico, luz, predação e simbiose) para explicar variações intraespecíficas qualitativas e quantitativas nos metabólitos secundários. Mas esse modelo unificador ainda está longe, considerando que a própria função da imensa maioria dos aleloquímicos ainda é um enigma, e se realmente há função específica para todos esses compostos. Essa hipótese unificadora deve envolver a genética, a ecologia e a fisiologia de modo a compreender as plantas totalmente integradas ao bioma. Ou seja, as variações de metabólitos secundários são uma pálida sombra, e que somente faz sentido quando se avaliam as plantas dentro de um paradigma biológico mais amplo e que contemple a complexa rede de relações entre as macroestruturas: atmosfera, biosfera, litosfera e hidrosfera.

#### 1.4. A família Piperaceae e o gênero *Piper*

Durante a década de 1990, o acúmulo de dados provenientes de estudos de seqüências de DNA das Angiospermas (plantas com flor), principalmente do gene *rbcL*, culminou na proposição de uma nova classificação botânica proposta pelo *Angiosperm Phylogeny Group* (APG). Segundo o APG, o grupo basal das magnoliídeas (Magnoliidae) compreende quatro ordens, Canellales, Laurales, Magnoliales e a ordem Piperales, onde se inclui a família Piperaceae (fig. 1.11.) (APG II, 2003).

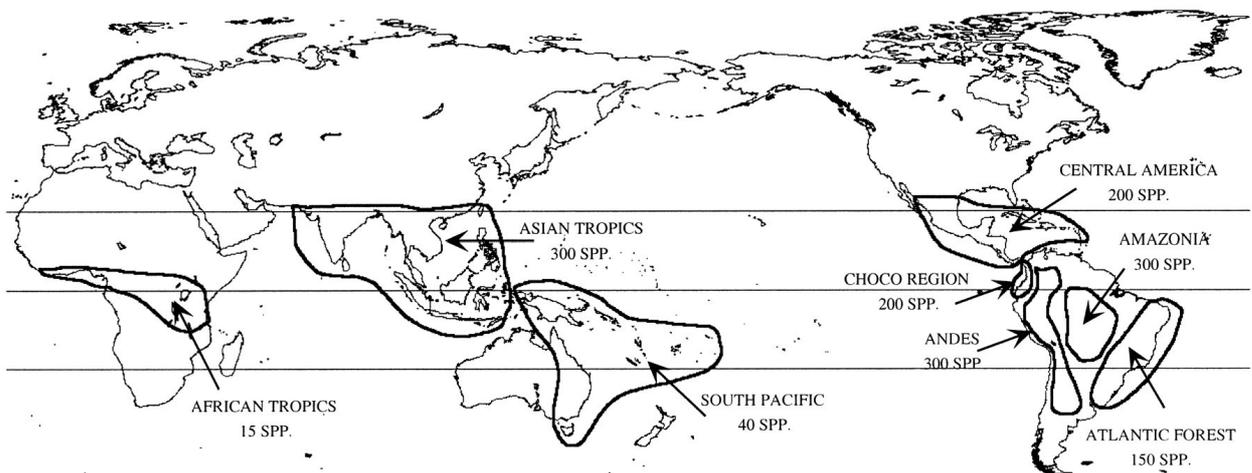


**Figura 1.11.** Trecho do cladograma com a classificação botânica das angiospermas proposta pelo APG. Reproduzida de (APG II, 2003)

A família Piperaceae, com cerca de 1.400 espécies, se distribui amplamente nas zonas tropicais e subtropicais estando bem difundida na América do Sul e em várias regiões do Brasil sendo comuns em ambientes úmidos de floresta densa. Esta família inclui 10 gêneros, mas no Brasil são referidos apenas cinco perfazendo 460 espécies.

Uma ampla variedade de metabólitos secundários já foi identificada nessa família, como amidas, fenilpropanóides, lignanas, neolignanas, ácidos benzóicos, cromenos, alcalóides, policetídeos, e compostos de origem biossintética mista (Kato e Furlan, 2007).

Dentro da família Piperaceae encontra-se o gênero *Piper*, representado por mais de 1000 espécies que estão distribuídas pantropicalmente, e sendo que a maior diversidade está no continente americano, seguida da Ásia. Os padrões de difusão variam de espécies endêmicas até de ampla distribuição (Jaramillo e Manos, 2001).



**Figura 1.12.** Distribuição geográfica do gênero *Piper*. Reproduzida de (Jaramillo e Manos, 2001)

Muitas espécies desse gênero têm grande importância comercial e econômica, e são usadas em medicina tradicional para tratar diferentes problemas, como dor de cabeça, inflamação, asma, bronquite, febre. Índios da América do Sul usam espécies de *Piper* como antídoto para picada de cobra (Parmar *et al.*, 1997). Amidas isoladas de *Piper tuberculatum* apresentaram propriedades hipotensoras (Araújo-Jr *et al.*, 1997). Substâncias contra ansiedade e insônia, chamadas de cavapironas ( $\alpha$ -pironas) foram isoladas de raízes e rizomas de *Piper methysticum* (Blumenthal e Sing, 1997), e atividade analgésica foi observada para o óleo volátil

de *Piper regnellii* (Andrade et al., 1998). Frações de extratos brutos de *Piper arboreum*, *P. hispidum* e *P. tuberculatum*, em estudos bioautográficos, mostraram atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (Kato e Furlan, 2007).

## 1.5. *Piper solmsianum*

### 1.5.1. Descrição da espécie

Segundo a classificação botânica proposta por Cronquist, a espécie *Piper solmsianum* pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Piperales, família Piperaceae, gênero *Piper*.



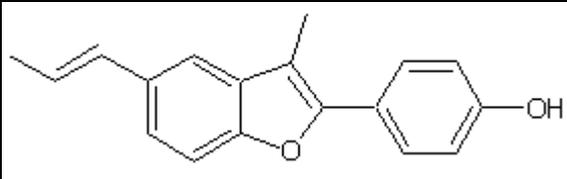
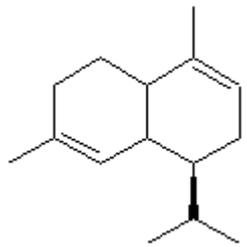
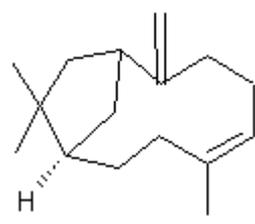
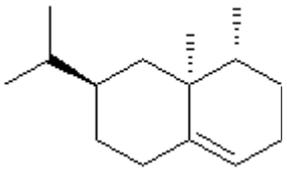
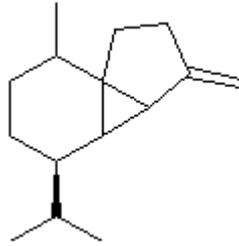
**Figura 1.12.** Folhas de um arbusto de *Piper solmsianum* presente no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ - USP).

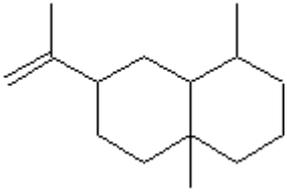
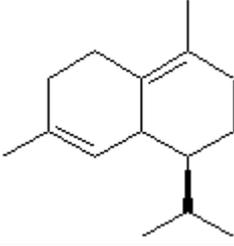
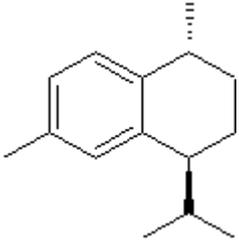
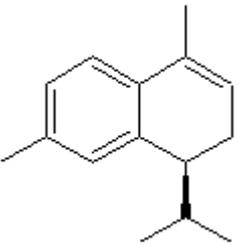
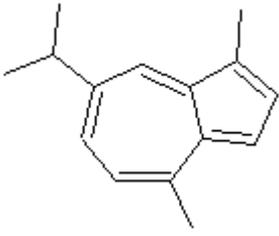
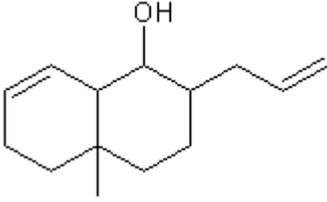
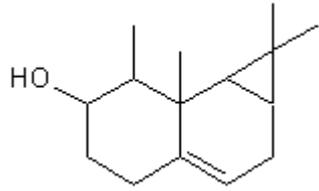
*Piper solmsianum*, espécie pertencente ao gênero *Piper*, é uma planta arbustiva que mede de 1 a 3 metros de altura. Floresce nos meses de outubro, novembro e dezembro, frutificando nos meses de abril, junho e dezembro. Encontra-se com frequência na mata com luz difusa, em planícies alagadiças ou brejos, podendo ocorrer em capoeiras, encostas ou restingas. Possui as sinônimas *Piper leucathum* C. DC. e *Piper santosanum* C. DC. (Joly, 1985; De Candolle, 1985).

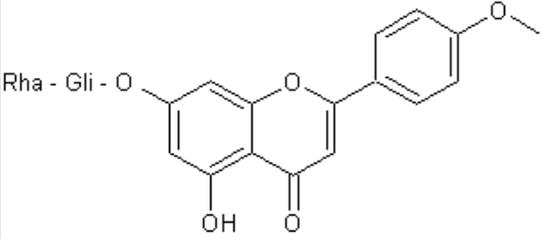
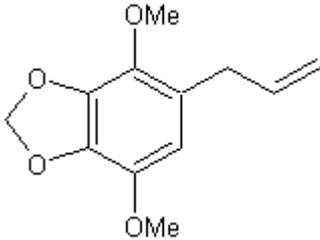
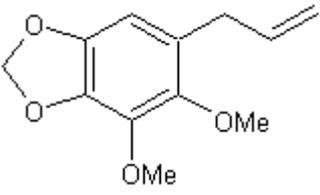
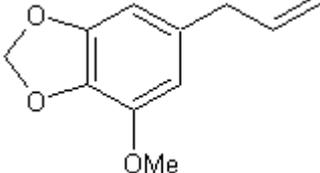
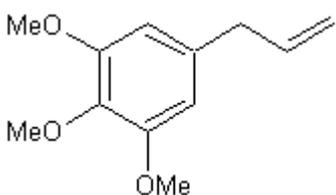
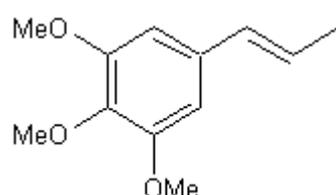
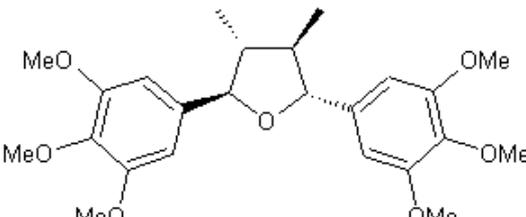
### 1.5.2. Metabólitos secundários em *Piper solmsianum*

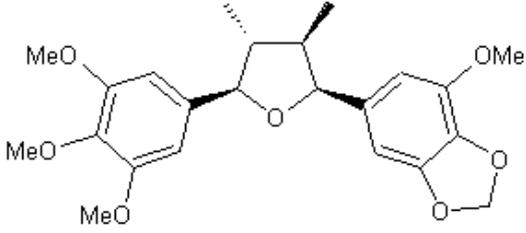
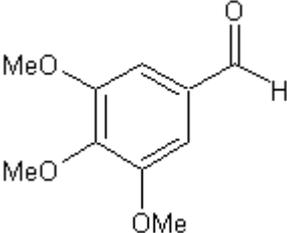
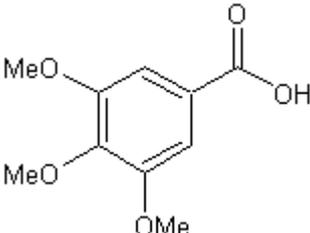
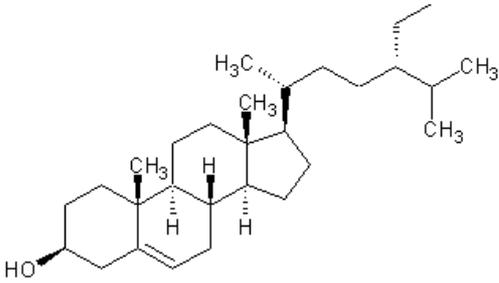
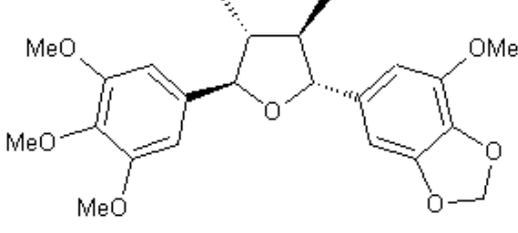
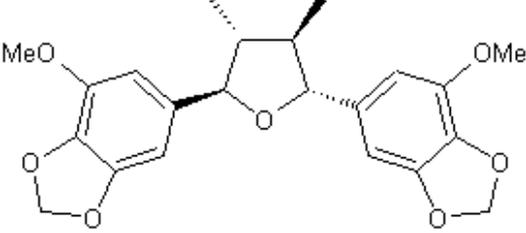
A tabela 1.1. resume o conjunto dos trabalhos publicados e organizados em ordem cronológica sobre os metabólitos secundários encontrados em *Piper solmsianum*.

**Tabela 1.1.** Metabólitos secundários encontrados em tecidos de *P. solmsianum*.

Nome do metabólito	Estrutura	Tecido	Referência
eupomatenóide-6		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
$\delta$ -cadineno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
cis-cariofileno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
valenceno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
$\beta$ -cubebeno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995

Nome do metabólito	Estrutura	Tecido	Referência
$\alpha$ -selineno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
$\alpha$ -muuroleno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
calameneno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
$\alpha$ -calacoreno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
azuleno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
aristo-1,9-em-3-ol		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
2,6-dimetil-9(2-propenil)-10-hidroxiciclo[4,4,0]-ciclododec-2-eno		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995

Nome do metabólito	Estrutura	Tecido	Referência
5-hidroxi-4-metoxi-7-O-rutinosilflavona (acaciina)		folha	Moreira <i>et al.</i> , 1995
apiol		folha caule	Martins <i>et al.</i> , 2000
dilapiol		folha caule	Martins <i>et al.</i> , 2000
miristicina		folha caule	Martins <i>et al.</i> , 2000
elemicina		folha caule	Martins <i>et al.</i> , 2000
isoelemicina		folha caule	Martins <i>et al.</i> , 2000
		inflorescência	Martins <i>et al.</i> , 2003
(-)-grandisina		folha caule	Martins <i>et al.</i> , 2000
		inflorescência	Martins <i>et al.</i> , 2003

Nome do metabólito	Estrutura	Tecido	Referência
(7R, 8R, 7'S, 8'R)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana		folha caule	Martins <i>et al.</i> , 2000
seringaldeído		inflorescência	Martins <i>et al.</i> , 2003
ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico		inflorescência	Martins <i>et al.</i> , 2003
sitosterol		inflorescência	Martins <i>et al.</i> , 2003
rel-(7R, 8R, 7'R, 8'R)-3',4'-metilenodioxi-3,4,5,5'-tetrametoxi-7,7'-epoxilignana		inflorescência	Martins <i>et al.</i> , 2003
rel-(7R, 8R, 7'R, 8'R)-3,4,3',4'-dimetenodioxi-5,5'-dimetoxi-7,7'-epoxilignana (lignana 7)		inflorescência	Martins <i>et al.</i> , 2003

A (-)-grandisina foi identificada como componente majoritário no extrato bruto das raízes e das folhas (Martins *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2003). Esse composto foi

isolado pela primeira vez da planta *Litsea grandis* (Holloway e Scheinmann, 1974). Também foi identificada em outras espécies, como *Rhaphidophora decursiva* (Zhang *et al.*, 2001), *Aglaia leptantha* (Greger *et al.*, 2000), *Virola surinamensis* (Lopes *et al.*, 1996), *Magnolia denudata* (Kuroyanagi *et al.*, 2000) e *Peperomia blanda* (Gaspareto *et al.*, 2005). Essa lignana apresenta forte atividade *in vitro* contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da Doença de Chagas, na sua forma tripomastigota (Lopes *et al.*, 1998), e que motivou a pesquisa de outras atividades biológicas, como na hematopoiese em ratos (Figueiredo *et al.*, 2005), e ação bactericida contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae*, e antifúngica contra os dermatófitos *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (Campos *et al.*, 2007). Há ainda estudos preliminares de tratamento de infecções urinárias utilizando o extrato dessa espécie (Bohatch *et al.*, 2007).

A grandisina também se mostrou eficaz no combate ao mosquito *Aedes aegypti*, o vetor transmissor da doença dengue. Cem microlitros do extrato da planta em um litro de água contaminada com larvas do inseto apresentaram 100% de mortalidade em 24 horas (Cabral *et al.*, 2008)

## **2. OBJETIVOS**

Comparar os perfis cromatográficos dos extratos brutos de média polaridade das folhas e do caule de diferentes espécimes de *Piper solmsianum* coletados em populações distintas.

Avaliar, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), variações diárias nas quantidades relativas dos metabólitos secundários apiol/dilapiol e grandisina no extrato bruto em três indivíduos de uma única população de *P. solmsianum*.

Avaliar, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), variações mensais nas quantidades relativas dos metabólitos secundários apiol/dilapiol e grandisina no extrato bruto em três indivíduos de uma única população de *P. solmsianum*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Equipamentos e solventes utilizados

Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo da marca Shimadzu, Kyoto, Japão. As bombas de injeção são do modelo LC - 10AD, o detector é do tipo “diode array” modelo SPD - M10A; injetor automático modelo SIL - 9A; controlador modelo SCL - 10A; programa de integração e de controle modelo ClassVP versão 6.10. A coluna cromatográfica é do tipo C-18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4,6 mm) da marca Phenomenex.

A acetonitrila grau cromatográfico era da marca Carlo Erba ou J. T. Baker, que foi usado após filtração em malha de PTFE 0,5  $\mu\text{m}$  modelo FHLP 04700 da marca Millipore. O gás hélio usado na deaeração dos solventes era da marca White Martins. A água usada no CLAE foi purificada em aparelho da Labconco, modelo Water PRO OS. Os solventes usados para as extrações (acetato de etila, metanol, acetona e diclorometano) eram da marca Synth, e foram destilados previamente na Central de Solventes do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP). O vórtice (turrax) era da marca IKA - Werke modelo T25 Basic. Os cartuchos de C18 (Sep-pak) eram da marca Waters modelo WAT 051910. A filtração das amostras foi feita em filtros individuais, hidrofílicos, 0,45  $\mu\text{m}$  da marca Millipore modelo 2915-00. As amostras foram pesadas em balança analítica da marca Sartorius modelo BP 110S, ou balança com duas casas de precisão marca Ohaus modelo TS 600S.

Os compostos padrão elemicina, isoelemicina, miristicina, apiol, dilapiol, grandisina, licarina B e a lignana 7 foram isolados e purificados no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (LQPN - IQUSP).

### 3.2. Método de análise por CLAE

Trabalhos desenvolvidos anteriormente com a planta *Piper solmsianum* pelo grupo do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (LPQN - IQUSP) já indicavam como melhor método de análise do extrato bruto o uso de cromatografia em fase reversa, com fase estacionária apolar tipo C-18, e fase móvel água:acetonitrila (Martins *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2003).

Para otimizar a análise por CLAE foi usado um extrato bruto das folhas de *P. solmsianum* obtido a partir de maceração a frio em acetato de etila como referência. Foram testados sete métodos de injeção (tab. 3.1.) com variações nos intervalos de tempo e no gradiente de polaridade, bem como no regime isocrático. Em todos eles a fase móvel era constituída de uma mistura de água e acetonitrila.

**Tabela 3.1.** Métodos de injeção testados para otimizar a análise por CLAE.

Teste número 1		Teste número 2		Teste número 3	
Intervalos (min)	% de acetonitrila	Intervalos (min)	% de acetonitrila	Intervalos (min)	% de acetonitrila
0 até 10	rampa de 30 até 50	0 até 20	tampa de 50 até 100	0 até 5	isocrático em 50
10 até 20	rampa de 50 até 100	20 até 35	isocrático em 100	5 até 20	rampa de 50 até 100
20 até 35	isocrático em 100	35 até 36	rampa de 100 até 50	20 até 35	isocrático em 100
35 até 36	rampa de 100 até 30	36 até 45	isocrático em 50	35 até 36	rampa de 100 até 50
36 até 45	isocrático em 30			36 até 45	isocrático em 50

Teste número 4		Teste número 5		Teste número 6*	
Intervalos (min)	% de acetonitrila	Intervalos (min)	% de acetonitrila	Intervalos (min)	% de acetonitrila
0 até 20	rampa de 60 até 100	0 até 20	rampa de 70 até 100	0 até 15	rampa de 65 até 100
20 até 35	isocrático em 100	20 até 35	isocrático em 100	15 até 30	isocrático em 100
35 até 36	rampa de 100 até 60	35 até 36	rampa de 100 até 70	30 até 33	rampa de 100 até 65
36 até 45	isocrático em 60	36 até 45	isocrático em 70	33 até 40	isocrático em 65

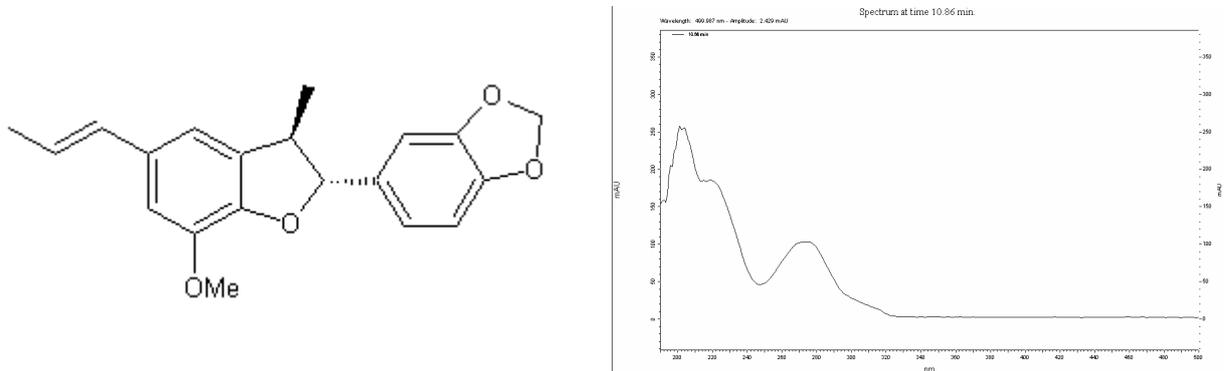
\* esse método também foi testado usando-se 1% de ácido acético na fase móvel (**teste número 7**)

A qualidade da separação foi avaliada pela maior resolução dos picos cromatográficos do extrato bruto, sendo que o teste número 6 apresentou-se como melhor condição de injeção.

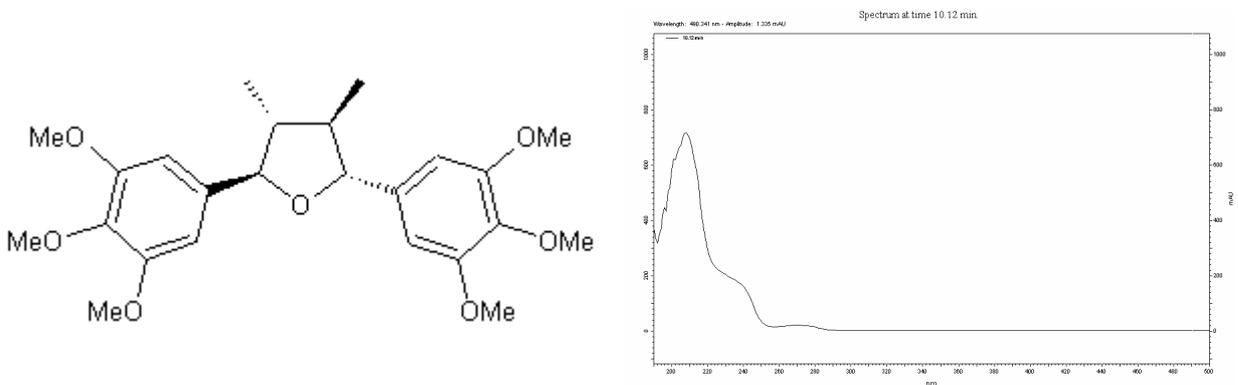
O método cromatográfico adotado para todas as análises desse trabalho consistiu, portanto, em uma rampa inicial de 15 minutos partindo de 65% até 100% de acetonitrila, regime isocrático de 15 minutos em 100% de acetonitrila, rampa com duração de 3 minutos partindo de 100% até 65% de acetonitrila, e regime isocrático de 7 minutos em acetonitrila a 65% (tempo total de corrida de 40 minutos). O volume injetado foi de 20 microlitros, comprimento de onda de 240 nm e fluxo de 1 mL/min.

As substâncias licarina B (fig. 3.1.) e grandisina (fig. 3.2.) foram escolhidas como padrões para se avaliar a reprodutibilidade das análises e como referências de tempo de retenção na identificação dos picos cromatográficos dos metabólitos secundários de interesse. Sendo a grandisina um dos compostos presentes no extrato bruto, disponível em quantidades razoáveis e com grau de pureza cromatográfica aceitável, seu uso como padrão mostrou-se conveniente. A licarina B, apesar de não estar presente no extrato de *Piper solmsianum*, faz parte da

mesma classe química da grandisina, apresenta tempo de retenção próximo e estava disponível nas quantidades necessárias.



**Figura 3.1.** Estrutura da licarina B (à esquerda) e seu espectro UV/vis (à direita).



**Figura 3.2.** Estrutura da grandisina (à esquerda) e seu espectro UV/vis (à direita).

Uma mistura de 2:1 de licarina B e grandisina dissolvidas em acetonitrila grau cromatográfico e de concentração total de 1 mg/mL serviu como mistura padrão. A seqüência de análise se iniciava com injeção de apenas solvente (corrida em branco) para se avaliar o estado da coluna de separação, em seguida injetava-se a mistura padrão licarina B e grandisina, e procedia-se a análise de cinco amostras. Logo após corria-se novamente um branco, a mistura padrão licarina B e grandisina e mais cinco amostras, e assim sucessivamente.

Soluções na concentração de 1 mg/mL dos padrões elemicina, isoelemicina, miristicina, apiol, dilapiol e lignana 7 foram injetadas três vezes para se definir os tempos de retenção relativos dos metabólitos secundários principais na planta. Oito

soluções de extrato bruto de *P. solmsianum* em acetonitrila grau cromatográfico enriquecida com cada um dos padrões mencionados também foram injetadas para se verificar se o tempo de retenção dos compostos isolados são os mesmos comparados ao extrato bruto da planta em estudo.

Foi feita uma avaliação da estabilidade dos extratos brutos estocados em geladeira injetando-se três amostras escolhidas aleatoriamente em três momentos: logo após o preparo, um mês depois e três meses depois.

A atribuição dos picos da grandisina e do apiol/dilapiol nos estudos de variação diária, interfolhas e sazonal foi feita comparando-se os tempos de retenção dos compostos presentes na mistura padrão com os picos nos cromatogramas das amostras.

### 3.3. Variação no perfil metabólico por secagem em estufa

No dia 22 de novembro de 2004, as 15 horas e trinta minutos, foram coletadas seis folhas de um espécime de *Piper solmsianum* próximo ao pequeno riacho que nasce na Reserva da Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira (RCUASO) com código de coleta Kato-548 e que foi nomeada de planta 1 (este indivíduo também foi empregado no primeiro estudo de variação diária descrito na seção 3.5.2.). Sua *exsicata* foi enviada para Profa. Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro para identificação botânica.

As folhas trituradas manualmente em almofariz com nitrogênio líquido foram separadas em dois lotes com aproximadamente 2,5 g cada. Um dos lotes foi secado em estufa a 50°C por 24 h. O outro lote foi liofilizado durante 24 horas aproximadamente até ficar visualmente seco. Cada lote, então, foi macerado a frio separadamente com 20mL de acetato de etila durante dois dias. Após filtração simples, deixou-se o filtrado obtido evaporar até *secura* e pesou-se o extrato bruto.

O extrato bruto de cada lote foi submetido a um “clean-up” prévio à análise por CLAE que consistiu em ressuspender o extrato bruto em acetonitrila grau cromatográfico em volume suficiente para obter uma solução de concentração máxima de 1 mg/mL. Essa solução foi passada em cartuchos de C18 (Sep-pak) para remover compostos de baixa polaridade, e posteriormente filtrada. Cada extrato foi analisado três vezes por CLAE seguindo o método descrito na seção 3.2.

### 3.4. Variação Intraespecífica

#### 3.4.1. Procedência das Amostras Vegetais

A tabela 3.2. apresenta os dados de coleta dos espécimes estudados.

**Tabela 3.2.** Dados de coleta dos espécimes de *Piper solmsianum* para estudo de variação intraespecífica.

Código de coleta	Data de coleta	Tecido coletado	Local	Cidade/ U. F.
Kato-473	21/10/2004	folha e caule	Parque da Serra da Cantareira	São Paulo/SP
Kato-485	02/11/2004	folha e caule	Praia do Félix	Ubatuba/SP
Kato-486-1	02/11/2004	folha	Praia do Félix	Ubatuba/SP
Kato-549	23/02/2005	folha e caule	Reserva CUASO*	São Paulo/SP
Kato-551	19/03/2005	folha	Bairro do Corcovado	Ubatuba/SP
Kato-571	01/05/2005	folha e caule	Parque do Perequê	Cubatão/SP
Kato-626	17/07/2005	folha e caule	IQUSP	São Paulo/SP

\* Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira

As *exsicatas* foram enviadas para Prof. Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro para identificação botânica.

### 3.4.2. Tratamento das Amostras Vegetais

As amostras colhidas foram separadas em caule e folhas e pesadas (massa do tecido fresco). Em seguida foram secas em estufa a 50°C por 48 horas e novamente pesadas (massa do tecido seco). As folhas foram trituradas manualmente em almofariz e os caules foram passados uma vez no moinho de facas. Alguns espécimes foram secados ao ar livre logo após a coleta.

O extrato bruto foi obtido através de extração exaustiva em aparelho tipo Soxhlet com capacidade para 500 mL. O solvente utilizado foi o acetato de etila que, para minimizar degradação térmica dos compostos, foi aquecido em banho de água termostaticado a 85°C. A extração era dada por encerrada quando o solvente em contato com a amostra tornava-se incolor e, em média, o processo durou 4 horas e foram feitos 10 ciclos extrativos. Entre o quinto e o sexto ciclos o solvente era trocado por acetato de etila limpo para evitar que o extrato permanecesse muito tempo aquecido. No final, o solvente era rotaevaporado e a massa do extrato bruto era obtida (massa do extrato bruto).

Para retirar os compostos muito polares e os pouco polares, parte do extrato bruto (entre 0,1 e 0,8 g) foi dissolvido em 100 mL de metanol. Acrescentaram-se aproximadamente 20 mL de água destilada até turvar a solução. O líquido foi filtrado sob pressão reduzida em leito de Celite de 4 cm de altura. O filtrado foi rotaevaporado até todo o metanol ser removido. O líquido resultante sofreu partição com diclorometano e esta fração final foi evaporada até seca e pesada.

Foi feito o “clean up” da fração final ressuspendendo-a em acetonitrila grau cromatográfico na concentração de 1 mg/mL, passada em cartuchos de C18 (Sep-pak) e posteriormente filtrada. A análise por CLAE seguiu o método descrito na seção 3.2. Na seqüência de análise, além da injeção da mistura padrão licarina B e

grandisina, também foram injetados 20  $\mu\text{L}$  dos seguintes padrões preparados em acetonitrila grau cromatográfico e na concentração de 1 mg/mL: isoelemicina, elemicina, dilapiol, apiol, miristicina e lignana 7.

### **3.5. Variação diária, interfolhas e sazonal**

#### **3.5.1 Procedência das amostras vegetais**

A população de plantas selvagens que foi escolhida para os estudos de variação sazonal, variação interfolhas e os dois estudos de variação diária localiza-se na Reserva da Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira (RCUASO). Foram selecionados quatro indivíduos chamados de 1, 2, 3 e 4 e com os códigos de coleta Kato-548, Kato-549, Kato-550 e Kato-663 respectivamente. As *exsicatas* foram enviadas para Prof. Dra. Elsie Franklin Guimarães do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro para identificação botânica.

O espécime 1 era um arbusto com mais de 2 metros de altura e com grande número de folhas, que apresentavam cor verde escura e poucos sinais evidentes de predação ou ataque de patógenos. Os espécimes 2 e 3 eram arbustos mais baixos, em torno de 1,5 metro de altura, também com folhas verde escuras, e algumas com sinais de predação por herbívoros e/ou manchas esbranquiçadas. O espécime 4 apresentava altura média de 1,8 metro com folhas verde escuras e poucos sinais de predação ou manchas. Todas se encontravam nas margens do pequeno riacho cuja nascente está na RCUASO.

#### **3.5.2. Primeiro estudo de variação diária**

Durante os dias 25, 26 e 27 de março de 2005 foram feitas as amostragens das plantas 1, 2 e 3 com retirada de uma folha, uma inflorescência e um trecho de caule de aproximadamente 4 cm a cada 2 horas durante 48 horas. A seleção das amostras foi aleatória e coletadas em diferentes alturas da planta. Evitaram-se

tecidos que apresentassem sinais de predação ou ataque de patógenos. A coleta iniciou-se as 16 horas do dia 25 e encerrou-se as 16 horas do dia 27 gerando 192 amostras. A temperatura do ar local oscilou entre 19°C e 16°C atingindo o mínimo entre 4 e 6 horas da manhã. O tempo foi chuvoso durante parte do dia e da noite, e nos momentos que não chovia, o céu permaneceu encoberto.

Imediatamente após a coleta, os tecidos foram lavados com água destilada, secos com papel toalha, resfriados e transportados em gelo seco. Depois de pesadas (massa do tecido fresco), as amostras ficaram estocadas em freezer a -72°C até o momento de se efetuar a extração.

Para se obter o extrato bruto, os tecidos foram triturados manualmente em almofariz com nitrogênio líquido e desidratados em liofilizador até a amostra ficar visualmente seca (período aproximado de 24 horas). Manteve-se o material congelado com gelo seco durante a liofilização e, em seguida, pesou-se novamente (massa do tecido seco). A amostra só foi manipulada na temperatura ambiente após estar desidratada. Adicionou-se acetato de etila (50mL de solvente/g de massa seca), o material foi mantido em ultrassom por 30 minutos e macerado por 24 horas aproximadamente. Após filtração, o solvente foi evaporado até a secura. Repetiu-se a maceração a frio com acetato de etila mais uma vez. Reuniram-se os dois extratos de cada amostra e pesou-se o extrato bruto (massa do extrato bruto).

Foi feito um tratamento prévio (clean up) à análise por CLAE que consistiu em ressuspender o extrato bruto em acetonitrila grau cromatográfico em volume suficiente para obter uma solução de concentração máxima de 1 mg/mL. Essa solução era passada em cartuchos de C18 (Sep-pak) para remover compostos de baixa polaridade, e posteriormente filtradas (Millipore). Essas amostras foram injetadas no cromatógrafo usando o método de análise descrito na seção 3.2.

### **3.5.3. Variação interfolhas**

No dia 26 de fevereiro de 2006 às 14 horas foram coletadas em diferentes alturas nove folhas da planta 1 e dez folhas da planta 2. A seleção foi aleatória e procurou-se tecidos com poucos sinais de predação ou presença de patógenos .

O tratamento e transporte dos tecidos, bem como a obtenção do extrato bruto e o clean-up, foram feitos seguindo os mesmos procedimentos para o primeiro estudo de variação diária descritos na seção 3.5.2.

### **3.5.4. Segundo estudo de variação diária**

Durante os dias 6, 7 e 8 de abril de 2007 foram feitas as amostragens das plantas 2, 3 e 4 presentes na Reserva CUASO (Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira) com retirada de três folhas de cada espécime em alturas diferentes a cada 2 horas durante 48 horas. As folhas foram selecionadas de modo a não a possuírem sinais de predação ou doenças, como manchas. A coleta iniciou-se as 14 horas do dia 6 e encerrou-se as 12 horas do dia 8 gerando 196 amostras. A temperatura do ar oscilou entre 15°C e 20°C atingindo o mínimo entre 2 e 4 horas da manhã. No dia 07 começou a chover por volta das 18 horas, e a chuva se estendeu até a última coleta.

Após a retirada da planta, as folhas foram lavadas com água destilada, secadas com papel toalha, tomadas as medidas de comprimento e largura, resfriadas e transportadas no gelo seco. Após pesagem (massa do tecido fresco), ficaram estocados em freezer a -72°C até o momento da extração.

A obtenção do extrato bruto seguindo o protocolo de estudo de variação interfolhas e do primeiro estudo diária, descrito na seção 3.5.2, se mostrou muito

moroso, pois o aparelho de liofilização recebia somente sete amostras de cada vez. Para agilizar o processo, optou-se por uma mudança no procedimento de extração que eliminasse a etapa de liofilização, mas ainda evitando secagem em estufa.

Cada folha foi, então, triturada em almofariz com nitrogênio líquido e transferida para um tubo falcon de 20 mL. A seguir colocou-se 15 mL de mistura com 85% de metanol em água, passou-se por aproximadamente 1 minuto por vórtice (turrax) com velocidade de 13.500 rpm e 20 minutos em ultrassom. Deixou-se macerando a frio durante dois dias. Procedeu-se filtração em algodão e evaporação do metanol no centrivap por 6 horas no mínimo. A fase aquosa resultante sofreu partição com 8 mL de diclorometano ficando em repouso por 1 dia. A fase orgânica foi transferida para um recipiente tarado, o diclorometano evaporou até a secura e por fim pesou-se o recipiente para determinar a massa de extrato bruto.

O “clean up” prévio à análise por CLAE consistiu em ressuspender o extrato bruto em acetonitrila grau cromatográfico em volume suficiente para obter uma solução de concentração máxima de 1 mg/mL. Essa solução era passada em cartuchos de C18 (Sep-pak) para remover compostos de baixa polaridade, e posteriormente filtrada.

As amostras foram injetadas no cromatógrafo usando o método de análise e a seqüência de injeção descritas na seção 3.2.

### 3.5.5. Variação sazonal

A amostragem para o estudo de variação sazonal foi feita durante todo o ano de 2007 com as coletas de três folhas das plantas números 2, 3 e 4 uma vez por mês em torno das 14 horas (tab. 3.3.). Nos meses em que vigorava o horário de verão, a coleta foi feita em torno das 15 horas

**Tabela 3.3.** Datas de amostragem do estudo de variação sazonal.

Número da amostragem	Data da coleta
1	12 de janeiro
2	09 de fevereiro
3	09 de março
4	06 de abril
5	11 de maio
6	08 de junho
7	13 de julho
8	10 de agosto
9	14 de setembro
10	05 de outubro
11	09 de novembro
12	07 de dezembro

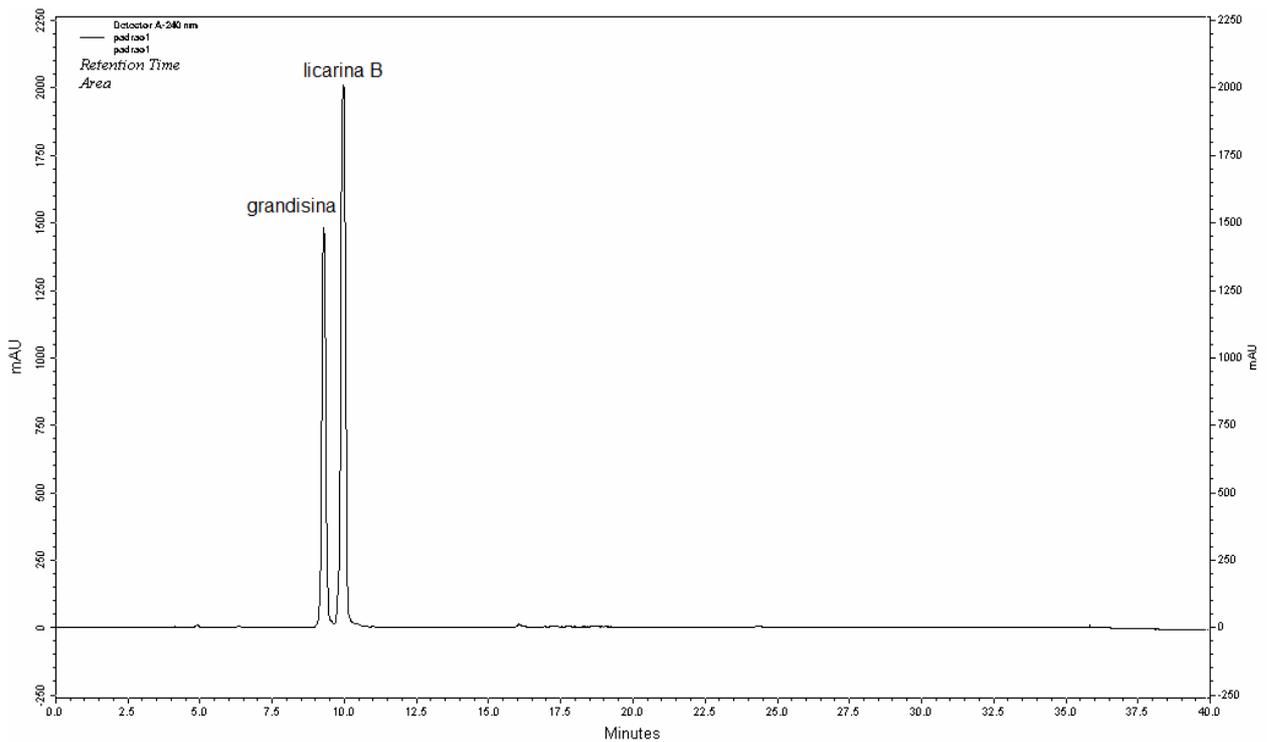
Os critérios de seleção dos tecidos, o tratamento das amostras, a obtenção do extrato bruto, o “clean up” e o método de análise por CLAE seguiram os mesmos procedimentos adotados para o segundo estudo de variação diária descritos na seção 3.5.4.

## **4. RESULTADOS e DISCUSSÃO**

## 4.1. Avaliação do método analítico

### 4.1.1. Reprodutibilidade das análises cromatográficas

A injeção da mistura padrão de licarina B e grandisina nas vinte e uma seqüências de análises cromatográficas, conforme descrito na seção 3.2, para os estudos diários, interfolhas e sazonal, permitiu avaliar a reprodutibilidade do método em termos de tempo de retenção e da porcentagem de área em relação à área integrada total, e atribuir os picos cromatográficos comparando-se os tempos de retenção. A figura 4.1. apresenta o cromatograma típico dessa mistura.



**Figura 4.1.** Cromatograma da mistura licarina B e grandisina usada como padrão nas análises cromatográficas.

Como exemplo, a tabela 4.1. apresenta os valores para três seqüências de injeção.

**Tabela 4.1.** Tempos de retenção e % da área total das injeções da mistura padrão licarina B e grandisina em três seqüências de injeção.

Data da seqüência de injeção	Número da injeção da mistura padrão	Grandisina		Licarina B	
		Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto	Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto
31/10/2007	1	9,056	34,13	9,710	64,61
	2	9,198	33,59	9,854	65,98
	3	9,183	33,82	9,842	65,52
	4	9,142	33,72	9,802	65,79
	5	9,024	34,29	9,670	65,31
	Média	9,121	33,91	9,776	65,44
	Desvio-padrão	0,077	0,29	0,082	0,53
22/01/2008	1	9,663	34,79	10,39	64,11
	2	9,682	34,81	10,39	64,25
	3	9,671	34,76	10,369	61,19
	4	9,546	34,48	10,254	62,22
	5	9,475	34,55	10,182	64,61
	Média	9,607	34,68	10,317	63,28
	Desvio-padrão	0,092	0,15	0,094	1,49
04/02/2008	1	9,889	35,29	10,563	63,73
	2	10,209	34,49	10,898	64,84
	3	10,362	33,32	11,044	66,00
	4	10,124	36,02	10,804	62,93
	5	9,989	35,61	10,671	63,12
	6	10,069	35,05	10,752	64,07
	7	9,988	33,43	10,672	65,05
	8	10,060	35,32	10,792	63,75
	Média	10,086	34,82	10,771	64,19
	Desvio-padrão	0,147	0,99	0,151	1,04

Conforme o número de amostras, a mistura padrão foi injetada até nove vezes em uma única seqüência. A análise estatística dos valores de cada conjunto separadamente mostrou que há boa reprodutibilidade do método considerando os baixos valores dos desvios padrão percentuais, que foram menores ou iguais a 1% para as porcentagens médias das áreas da grandisina e da licarina B, e menores ou iguais a 2% para os tempos de retenção médios.

Também o método se mostrou reprodutível quando se considerou a diferença entre os tempos de retenção da grandisina e da licarina B, que apresentou valor médio de 0,7 minutos com desvio padrão percentual menor ou igual a 1%. Ficou igualmente baixo o desvio padrão percentual da relação entre as porcentagens de

área da licarina B e da grandisina dentro de uma mesma seqüência (menor ou igual a 2%).

No entanto, quando se considera todo o conjunto de seqüências de análise (tab. 4.2.), no qual a mistura padrão foi injetada 92 vezes, os desvios padrão percentuais aumentaram passando para até 5,6%. Os dados mostram que há diferenças significativas entre as séries de injeção com variações nos tempos de retenção médios para os dois padrões, na porcentagem de área em relação à área total do cromatograma, e na relação entre as porcentagens de licarina B e grandisina.

**Tabela 4.2.** Análise estatística de todas as injeções da mistura padrão licarina B e grandisina.

	Tempo de retenção da <b>grandisina</b> (min)	% de área da <b>grandisina</b> em relação à área total do cromatograma	Tempo de retenção da <b>licarina B</b> (min)	% de área da <b>licarina B</b> em relação à área total do cromatograma	Diferença entre os tempos de retenção da grandisina e da licarina B (min)	Relação entre as % de área da licarina B e da grandisina
Média	9,473	34,55	10,155	64,30	0,68	1,86
Desvio-padrão	0,369	1,169	0,376	1,536	0,019	0,104
Desvio percentual	3,9	3,4	3,7	2,4	2,8	5,6
Menor valor	9,024	31,580	9,670	60,030	0,646	1,578
Maior valor	10,362	38,040	11,044	67,510	0,732	2,138

Entre seqüências, o tempo de retenção da grandisina assumiu valores entre 9,0 minutos e 10,4 minutos, ou seja, uma amplitude maior do que um minuto. O mesmo se observa para a licarina B, cujo menor tempo de retenção foi 9,7 minutos, e o maior foi de 11,0 minutos. A relação entre as porcentagens de área da licarina B e da grandisina apresentou a maior variação relativa com desvio padrão de 5,6%.

Considerando cada seqüência isoladamente, o método analítico apresentou boa reprodutibilidade tanto em termos de tempo de retenção quanto de porcentagem da área em relação à área total, mas a comparação entre seqüências apresenta

variações significativas entre os parâmetros, e que poderiam comprometer a atribuição dos picos. Portanto, a injeção intercalada da mistura padrão de licarina B e grandisina entre as amostras em todas as seqüências de análise mostrou-se fundamental na identificação dos picos cromatográficos e acompanhamento da resposta do aparelho.

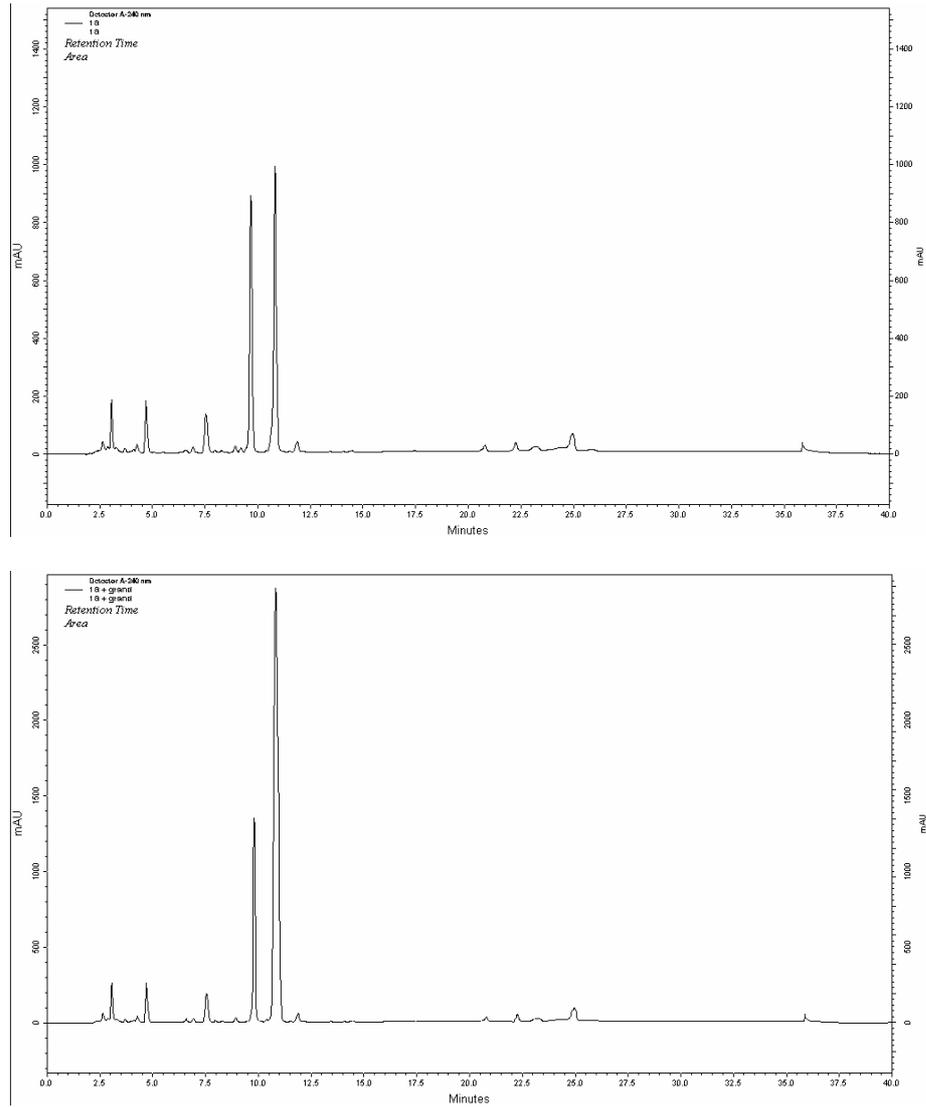
#### 4.1.2. Identificação dos picos cromatográficos

Nos estudos de variabilidade intraespecífica, descritos na seção 3.4, os metabólitos isoelemicina, elemicina, dilapiol, apiol, miristicina, grandisina e lignana 7 foram identificados comparando-se os tempos de retenção dos picos presentes nas amostras com os padrões injetados na mesma seqüência (tab. 4.3).

**Tabela 4.3.** Tempos de retenção médio dos padrões cromatográficos.

Padrão	elemicina isoelemicina	miristicina	apiol/ dilapiol	grandisina	lignana 7
Tempo de retenção médio (min)	7,693	7,936	9,230	9,494	10,838

O enriquecimento da solução acetonitrílica do extrato bruto com os padrões mostrou que não há variação significativa do tempo de retenção quando se compara o padrão isolado e ele junto com os outros compostos que compõem o extrato bruto, como mostra a comparação entre o extrato bruto não enriquecido e enriquecido com grandisina (fig 4.2.).



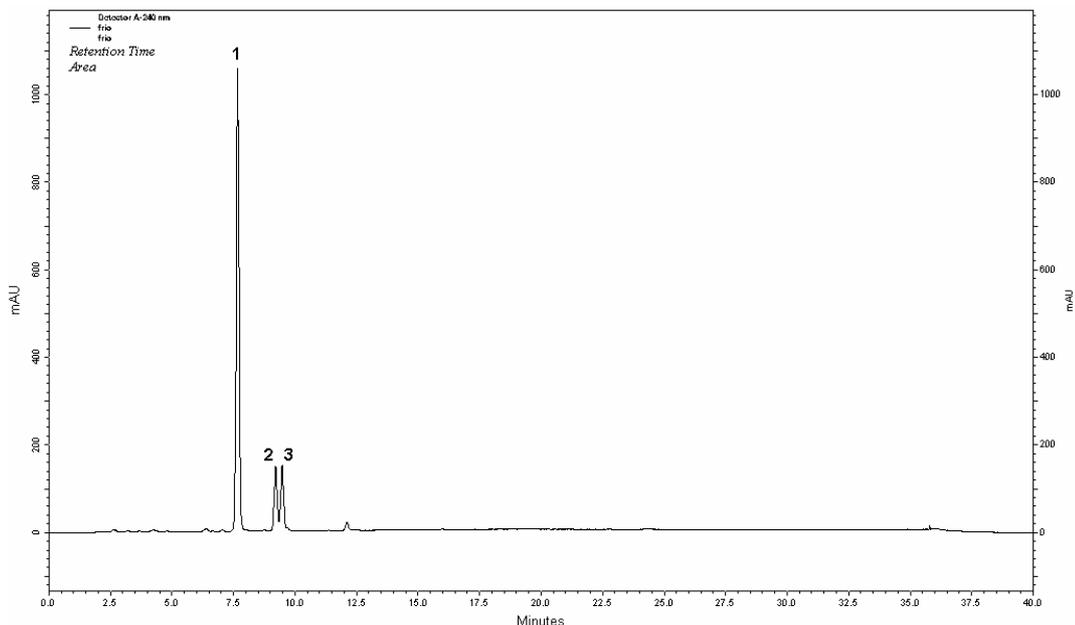
**Figura 4.2.** Cromatograma do extrato bruto (acima) e do extrato bruto enriquecido com grandisina (abaixo).

A identificação da grandisina e do apiol/dilapiol nos cromatogramas dos estudos de variação diária, interfolhas e sazonal foi feita usando-se como referências os picos na mistura padrão licarina B e grandisina.

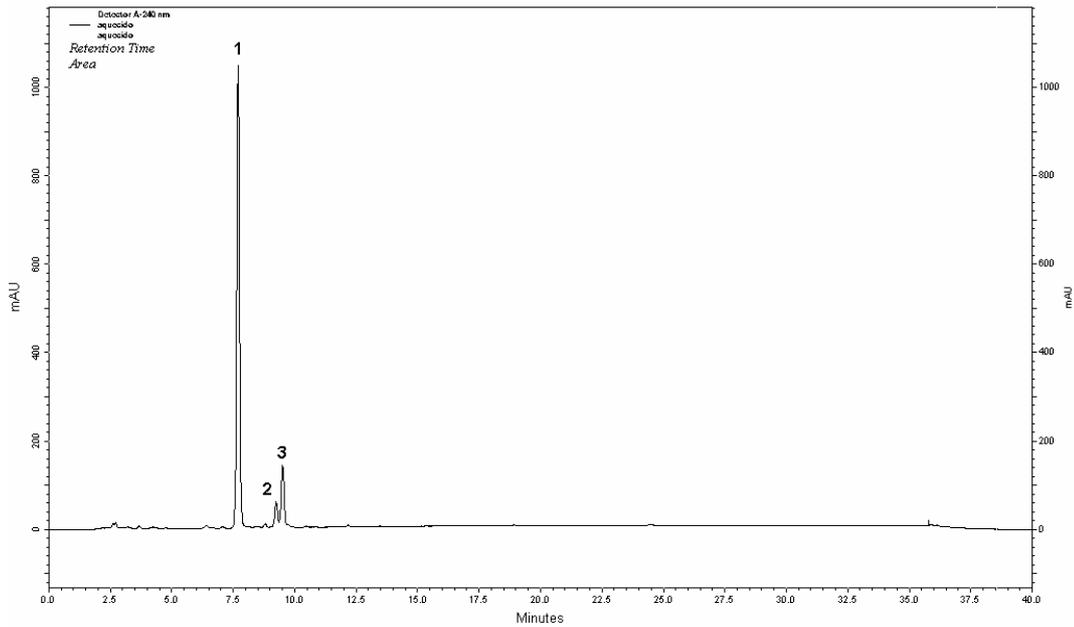
## 4.2. Variação no perfil metabólico por secagem em estufa

Como as enzimas presentes nos tecidos vegetais podem estar ativas o suficiente para manter as vias metabólicas funcionais mesmo após a coleta, as concentrações relativas dos metabólitos poderiam variar com o tempo durante o transporte em temperatura ambiente ou durante a secagem em estufa. Há também a possibilidade de degradação térmica dos metabólitos submetidos à temperatura de 50°C, condição presente na estufa de secagem. Como as análises dos estudos de variação sazonal e diária se baseiam nas concentrações relativas, tornou-se importante verificar a influência da temperatura de manipulação dos tecidos no perfil cromatográfico.

A figura 4.3. e 4.4 apresentam, respectivamente, os cromatogramas típicos do extrato bruto das folhas do lote que foi secado por liofilização, e das folhas do lote que foi secado em estufa.



**Figura 4.3.** Cromatograma das folhas de *P. solianum* do lote que foi secado por liofilização.



**Figura 4.4.** Cromatograma das folhas de *P. solmsianum* do lote que foi secado em estufa a 50°C.

A tabela 4.4. apresenta os valores de integração dos três picos mais intensos, nomeados 1, 2 e 3, dos três cromatogramas do lote que foi secado em liofilizador.

**Tabela 4.4.** Porcentagem de área em relação à área total do extrato bruto de folhas de *P. solmsianum* obtido através de secagem por liofilização.

Número do pico *	1		2		3	
	Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto	Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto	Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto
	7,663	73,42	9,204	11,03	9,463	10,65
	7,756	72,14	9,326	10,56	9,599	10,12
	7,699	72,85	9,305	10,87	9,483	12,46
Média	7,706	72,80	9,278	10,82	9,515	11,08
Desvio-padrão	0,047	0,64	0,065	0,24	0,073	1,23

\* os picos estão numerados no cromatograma da figura 4.3.

A tabela 4.5 apresenta as porcentagens de área em relação à área total dos três picos mais intensos, nomeados 1, 2 e 3, dos três cromatogramas referentes ao lote que foi secado em estufa a 50°C.

**Tabela 4.5.** Porcentagem de área em relação à área total do extrato bruto de folhas de *P. solmsianum* obtido através de secagem em estufa.

Número do pico *	1		2		3	
	Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto	Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto	Tempo de retenção (min)	% do extrato bruto
	7,696	78,93	8,786	1,11	9,499	15,49
	7,623	79,13	9,103	2,12	9,52	16,42
	7,722	79,02	8,889	1,45	9,485	15,67
Média	7,680	79,03	8,926	1,56	9,501	15,86
Desvio-padrão	0,051	0,10	0,162	0,51	0,018	0,49

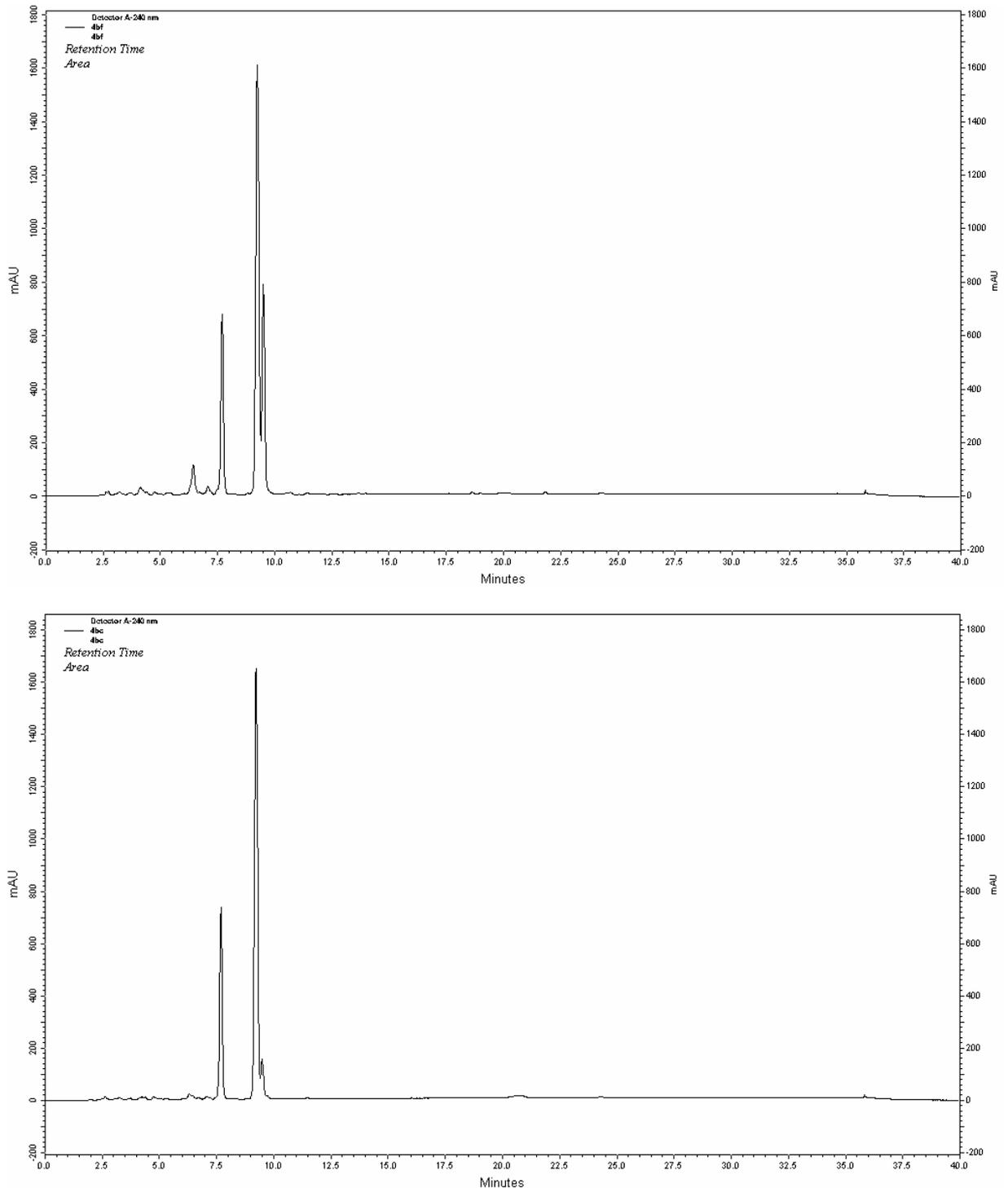
\* os picos estão numerados no cromatograma da figura 4.4.

O composto identificado pelo pico número 2 está presente em menor quantidade no extrato bruto que foi submetido a secagem em estufa em comparação ao extrato obtido por liofilização indicando possível degradação térmica ou consumo durante metabolismo da folha após coleta.

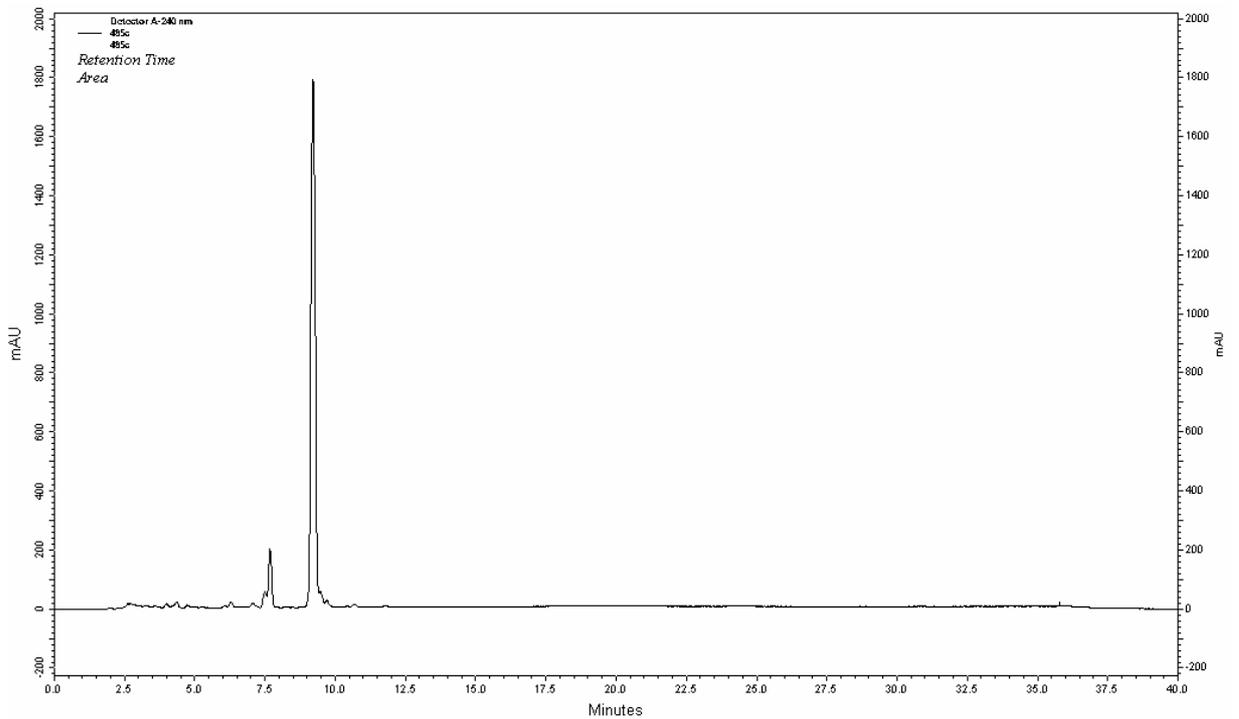
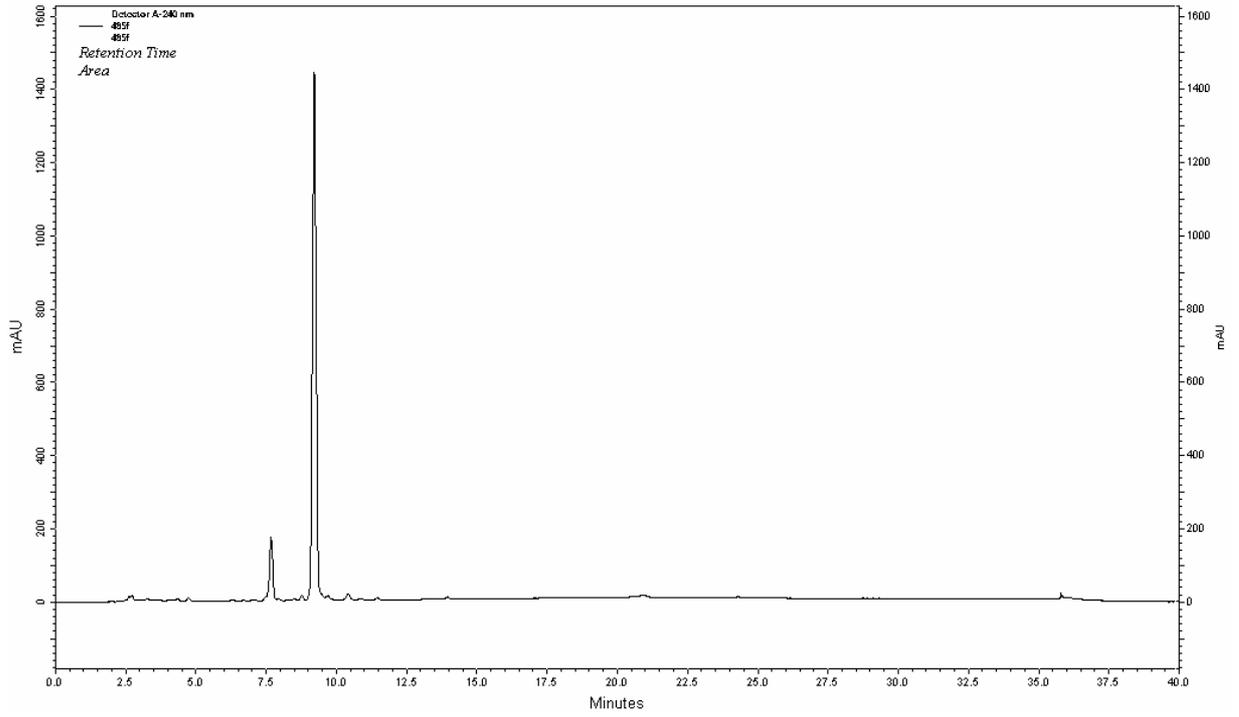
Como há indícios de mudanças nas quantidades relativas dos metabólitos secundários quando a amostra é secada em estufa e manipulada na temperatura ambiente, os protocolos de tratamento dos tecidos vegetais foram elaborados de modo a não usar estufa para remoção da água, e mantê-los congelados durante o transporte e a manipulação até secagem.

### 4.3. Variação intraespecífica

As figuras 4.5. até 4.10 apresentam os cromatogramas obtidos de cada um dos tecidos (folhas ou caules) dos sete espécimes coletados em diferentes localidades.



**Figura 4.5.** Cromatograma da folha (acima) e do caule (abaixo) do espécime Kato-473.



**Figura 4.6.** Cromatograma da folha (acima) e do caule (abaixo) do espécime Kato-485.

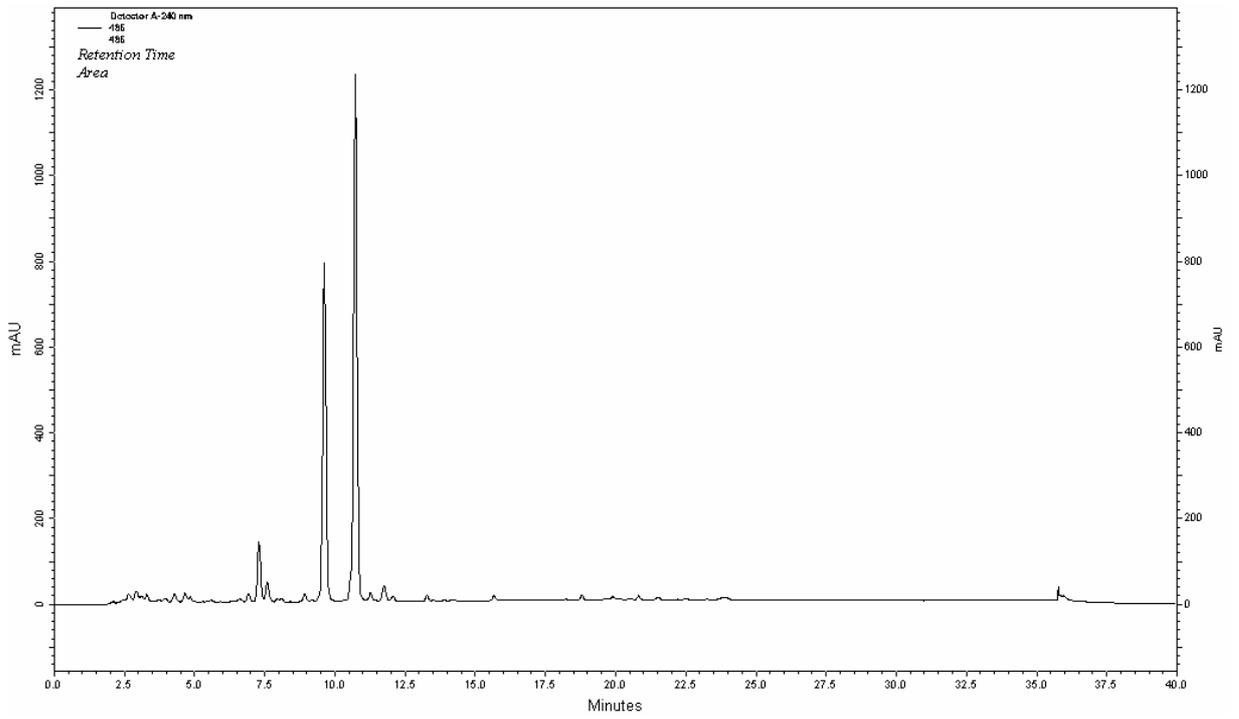


Figura 4.7. Cromatograma da folha do espécime Kato-486-1.

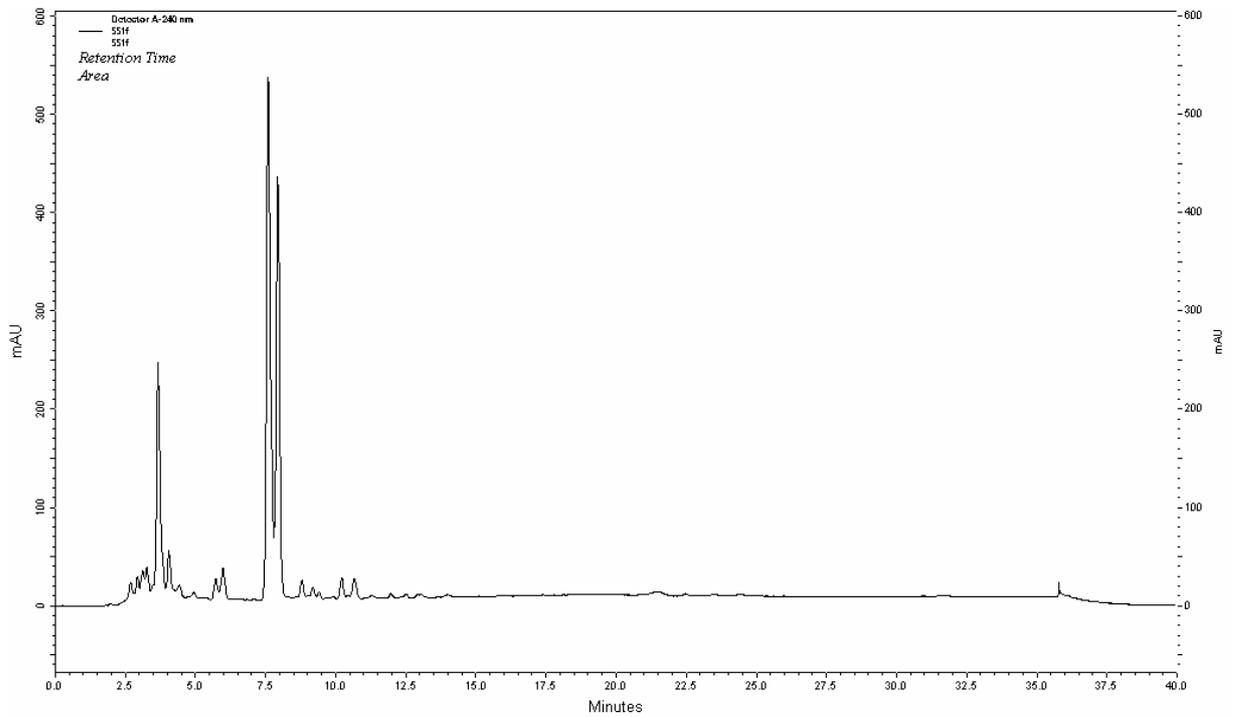
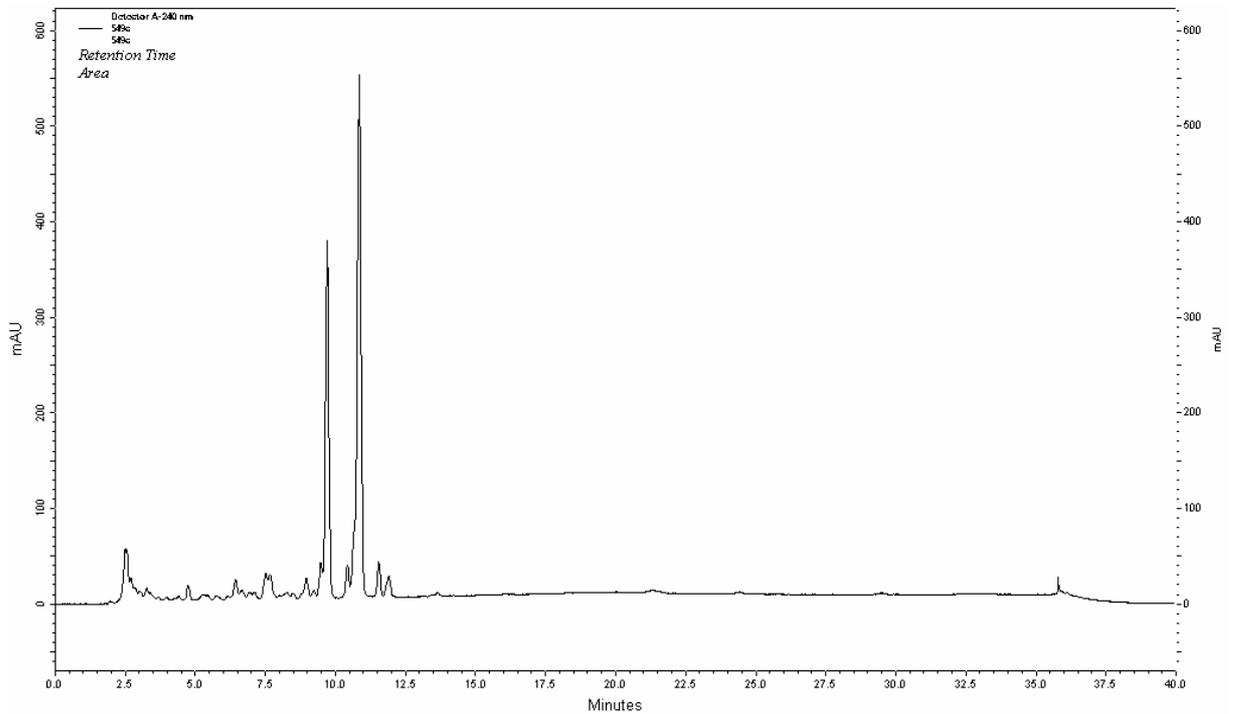
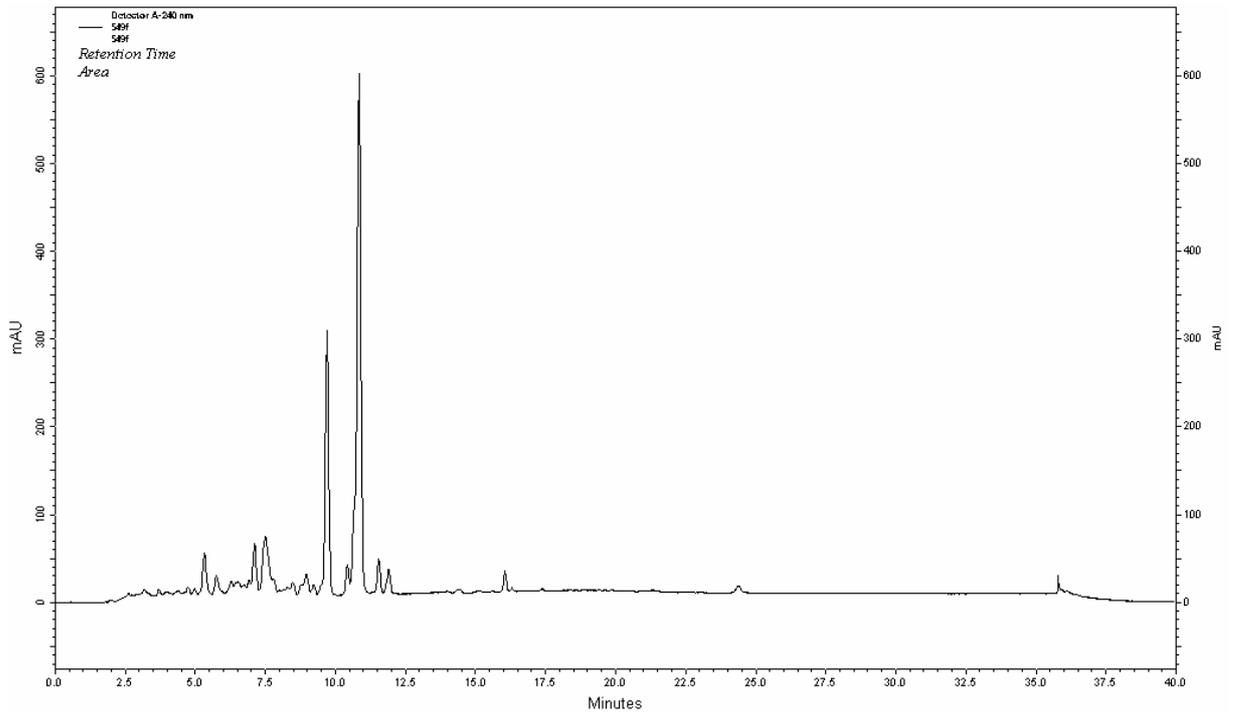
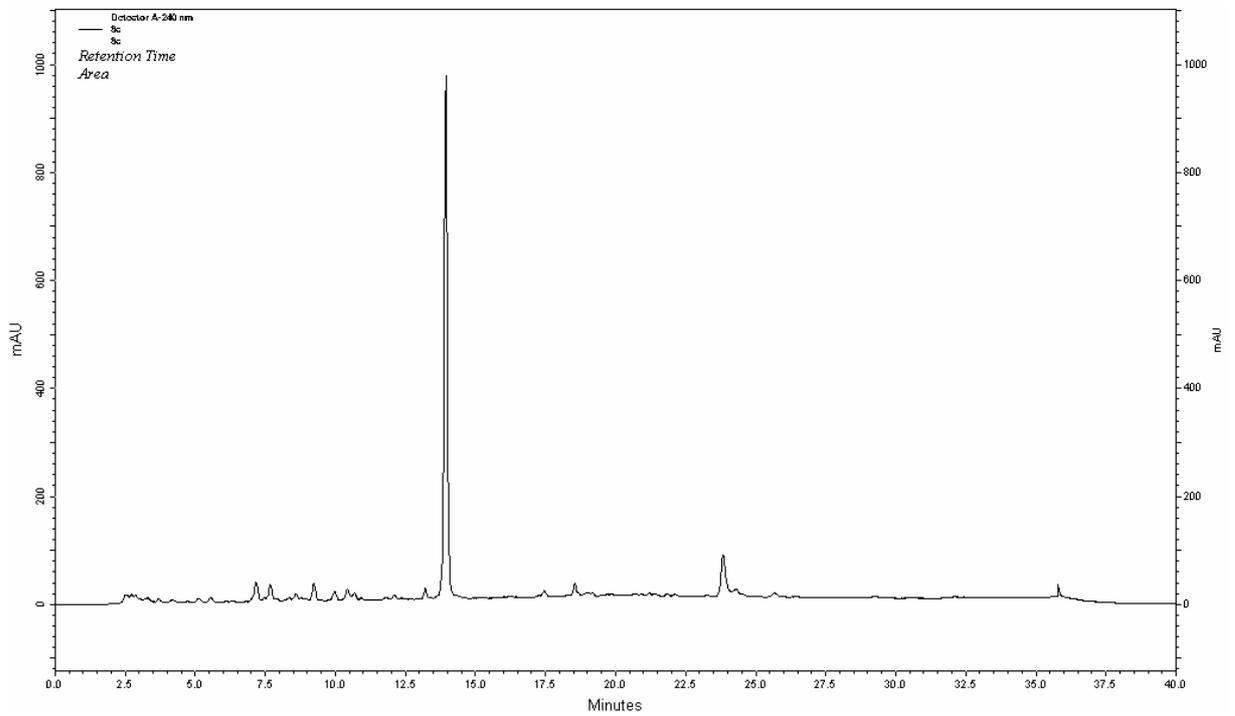
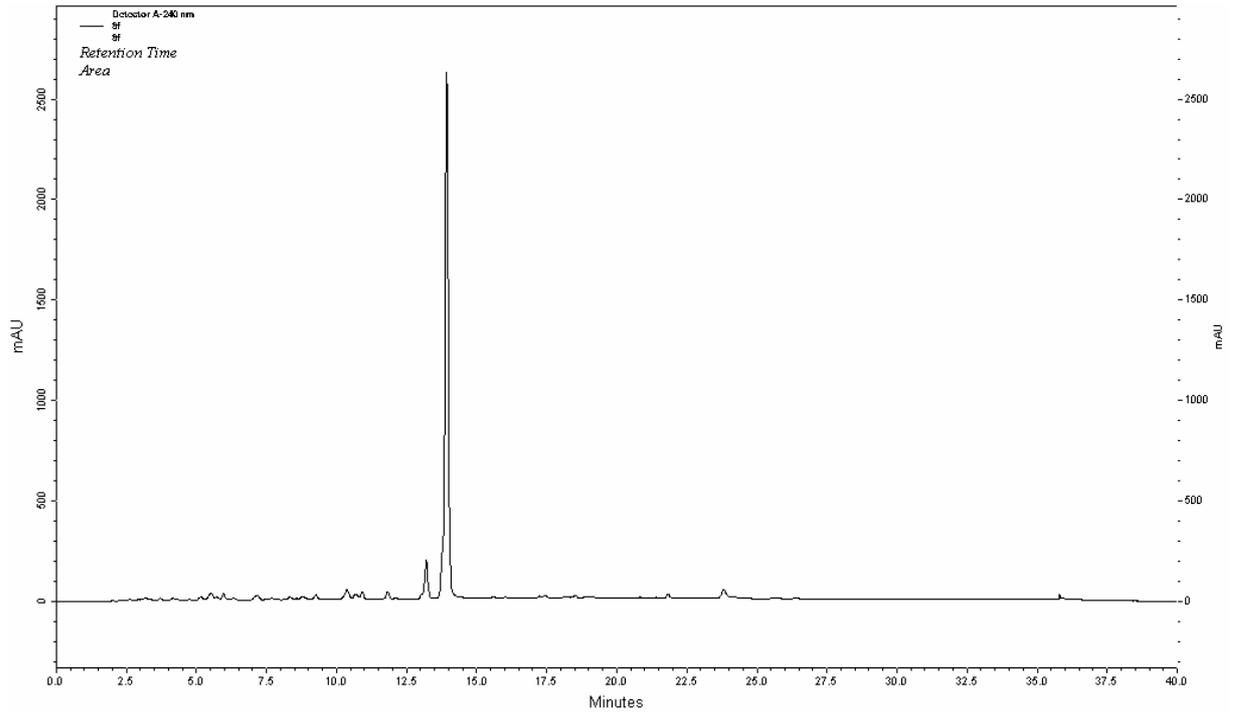


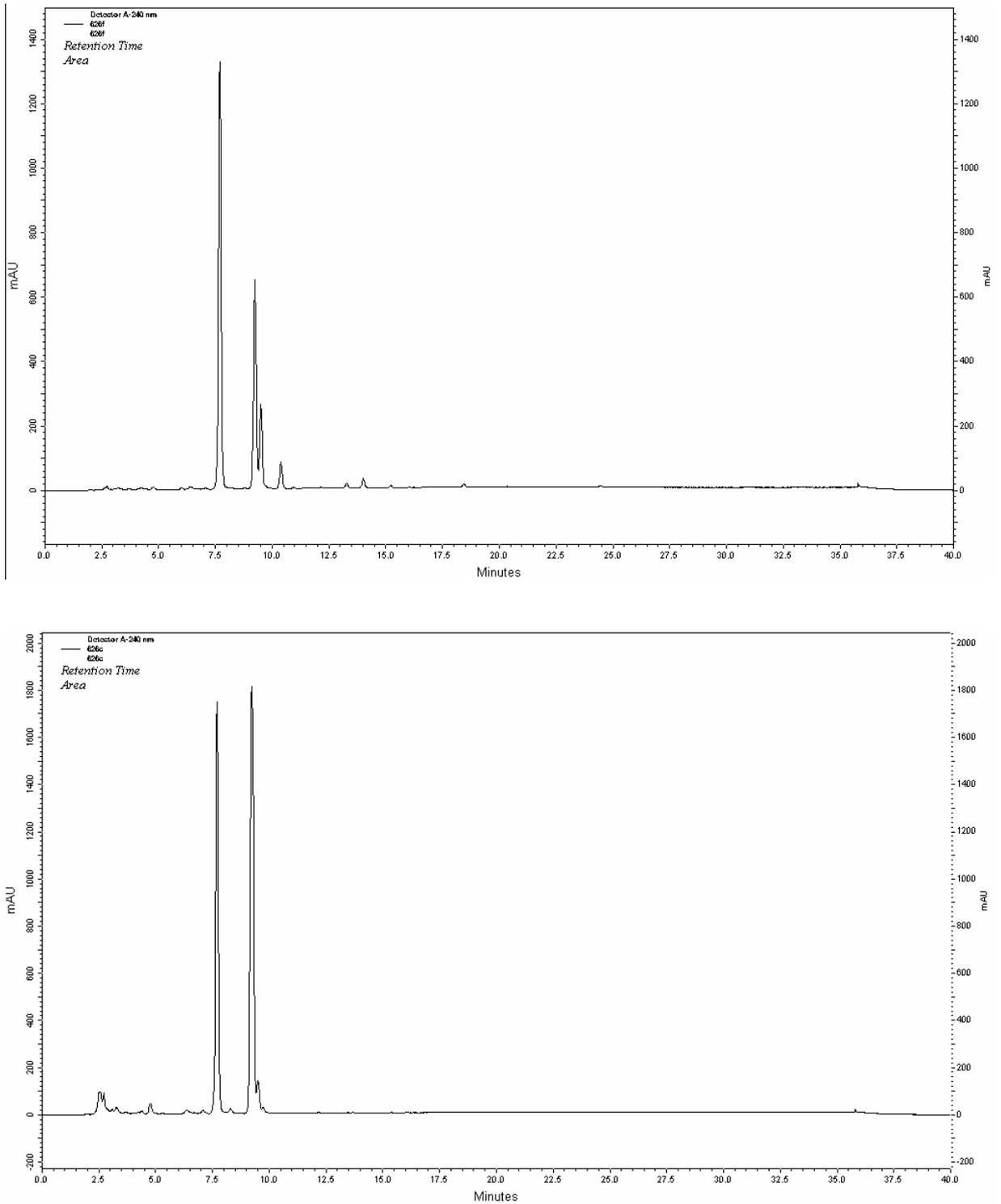
Figura 4.8. Cromatograma da folha do espécime Kato-551.



**Figura 4.9.** Cromatograma da folha (acima) e do caule (abaixo) do espécime Kato-549.



**Figura 4.10.** Cromatograma da folha (acima) e do caule (abaixo) do espécime Kato-571.



**Figura 4.11.** Cromatograma da folha (acima) e do caule (abaixo) do espécime Kato-626.

A tabela 4.6. apresenta os valores de porcentagens de área em relação à área total do cromatograma do extrato bruto para os espécimes coletados e seus respectivos tecidos.

**Tabela 4.6.** Porcentagens da área em relação à área total dos cromatogramas do estudo intraespecífico com as respectivas atribuições dos picos.

Tempo de retenção médio (min)		3,662	7,693	7,936	9,230	9,494	10,838	13,192	13,925
Código de coleta	Tecido		elemicina isoelemicina	mirisiticina	apiol/ dilapiol	grandisina	lignana 7		
Kato-473	folha	0,58	17,42		48,68	20,13	0,67		
	caule		23,62		67,54		0,29		
Kato-485	folha		9,45		81,50				
	caule		8,72		81,16				
Kato-486-1	folha		4,93			28,64	44,89		
Kato-549	folha					16,03	40,76		
	caule		4,13			24,57	43,07		
Kato-551	folha	22,44	32,90	25,78	1,26				0,30
Kato-571	folha							5,46	70,39
	caule							1,42	53,48
Kato-626	folha		53,06		26,17	10,34		0,69	1,27
	caule		36,59		51,93				

Esses dados mostram que há diferenças significativas nos perfis cromatográficos entre os diferentes indivíduos. Não se observou nenhum composto que estivesse presente em todos os espécimes em quantidades detectáveis. Os picos de elemicina, isoelemicina, apiol e dilapiol aparecem em quase todos, mas estão ausentes em Kato-571. Nesta mesma planta há um pico intenso e não identificado em 13,925 min que está ausente ou pouco pronunciado nas outras, além de outro pico menos intenso em 13,192 min e que não foi detectado nas outras plantas. Em Kato-551 também se observa um pico não identificado com tempo de

retenção médio de 3,662 min, e que está ausente, ou com pequena intensidade, nas outras plantas.

Mesmo avaliando indivíduos de uma mesma população, como é o caso dos espécimes Kato-485 e Kato-486-1 que foram colhidos no mesmo dia e próximos um do outro, a diferença entre os perfis cromatográficos é bem marcante. Em um deles o pico referente ao metabólito apiol/dilapiol é predominante, enquanto que na outra planta esse metabólito não é detectado, e sobressaem os picos devidos à grandisina e à lignana 7.

Na comparação entre tecidos de um mesmo indivíduo há poucas diferenças qualitativas. A presença de um composto na folha também pode ser detectado no caule. Exceção para a grandisina, que nos indivíduos Kato-473 e Kato-626 apresenta pico intenso nas folhas, mas não é identificado no caule. Em um caso, Kato-485, o perfil cromatográfico do caule e da folha é bem semelhante com variação quantitativa baixa, menor do que 9%. Para os outros espécimes, as diferenças quantitativas são mais marcantes, como em Kato-626, no qual a diferença está em torno de 100%.

Como semelhança entre os cromatogramas pode-se apontar a pouca complexidade do perfil cromatográfico. Em todos os espécimes estudados localizam-se apenas dois ou três picos predominantes. Considerando-se que esses extratos brutos foram preparados a partir de muitas folhas de um mesmo indivíduo, ou ainda da planta inteira, esse perfil cromatográfico mais simples é um comportamento médio, e que não representa obrigatoriamente o perfil de uma única folha, visto que o estudo interfolhas, cujos dados estão apresentados na seção 4.5, e o segundo estudo diária, seção 4.6, mostram que algumas folhas têm perfil cromatográfico muito mais complexo.

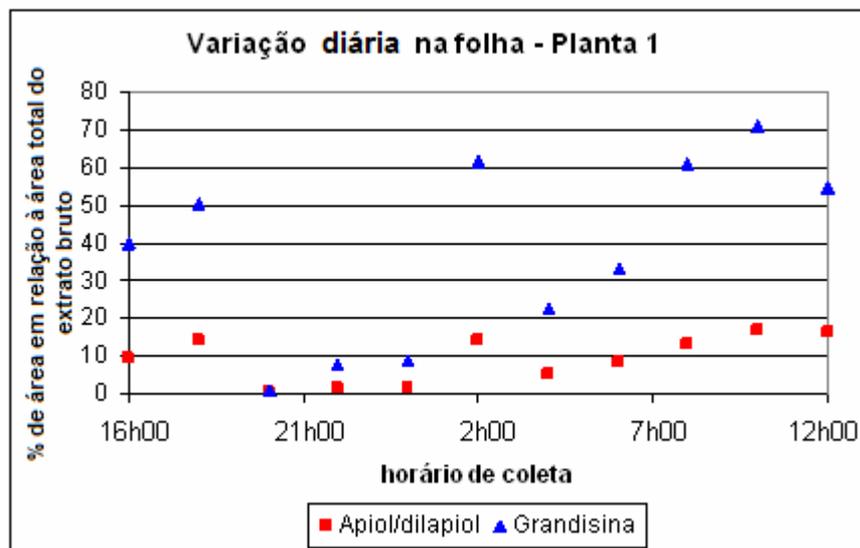
Contudo, esse estudo não permite identificar as razões dessa variabilidade

qualitativa e quantitativa entre espécimes provenientes de diferentes localidades. Como a coleta foi feita em épocas do ano distintas, e em horários diversos, essas diferenças podem ser oriundas de variação diária e/ou sazonal. Outros fatores, como clima, solo, altitude, poluição, estresse hídrico, irradiação solar, também devem ser considerados (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

#### 4.4. Primeiro estudo de variação diária

Os dias e os horários de coleta, as massas do tecido fresco (massa fresca) e do tecido seco (massa após liofilização), e as porcentagens de área de apiol/dilapiol e de grandisina em relação à área total do cromatograma do extrato bruto encontram-se reunidas no anexo I.

Considerando apenas as folhas e comparando as três plantas, há diferenças marcantes na variação de porcentagem de cada metabólito ao longo do tempo. Na planta 1 (fig. 4.12.), as variações são grandes, com a grandisina atingindo valor mínimo em torno das vinte horas, e chegando até o máximo às dez horas da manhã. Apiol/dilapiol apresentou alterações menos acentuadas oscilando entre mínimo também às oito horas da noite até valor máximo às dez horas da manhã.

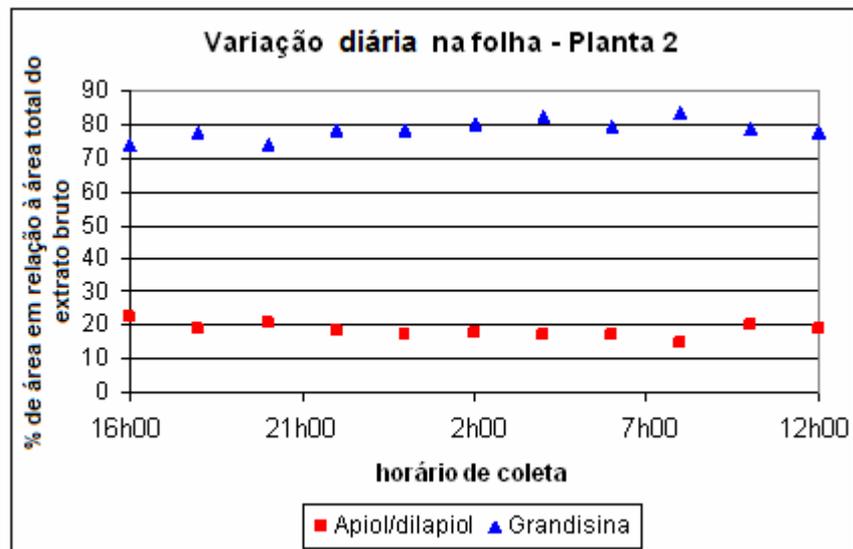


**Figura 4.12.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina nas folhas da planta 1.

Às duas horas da manhã há um abrupto aumento da porcentagem de grandisina, e que contrasta com os valores bem menores desse metabólito nos horários anteriores e posteriores. Como na amostragem desse estudo foram coletadas apenas uma folha em cada horário, não há possibilidade de avaliar se essa mudança é representativa ou decorrente de erro de medida. Assim, surgiu a

necessidade de uma amostragem estatisticamente mais relevante com coletas em triplicata (segundo estudo de variação diária).

Contrastando com a planta 1, na planta 2 (fig. 4.13.) as amplitudes das alterações temporais são bem menores. A porcentagem de área do apiol/dilapiol fica em torno de 20%, e a de grandisina fica em torno de 80% atingindo valor máximo para a grandisina às oito horas da manhã e mínimo às oito horas da noite, e o apiol/ dilapiol atingindo teor máximo às dezesseis horas e teor mínimo às oito horas da manhã (oscilações com fase oposta).

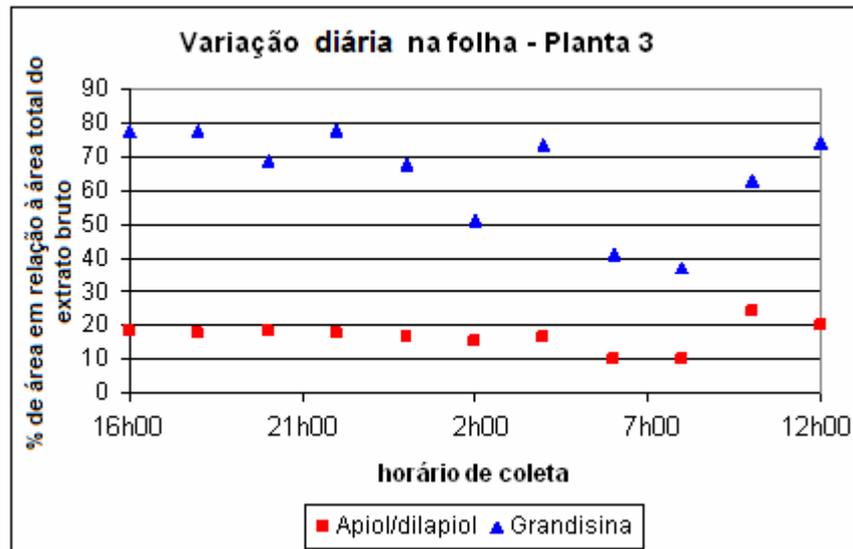


**Figura 4.13.** Variação temporal do teor de apíol/dilapíol e grandisina nas folhas da planta 2.

Na planta 3 (fig. 4.14.) as variações temporais são mais evidentes do que as observadas na planta 2, mas são menos pronunciadas do que na planta 1. A grandisina e o apíol/dilapíol atingem valores mínimos às oito horas da manhã, e valores máximos às seis horas da tarde. Os valores para apíol/dilapíol são mais uniformes tendo oscilações com baixa amplitude ao longo das vinte horas analisadas.

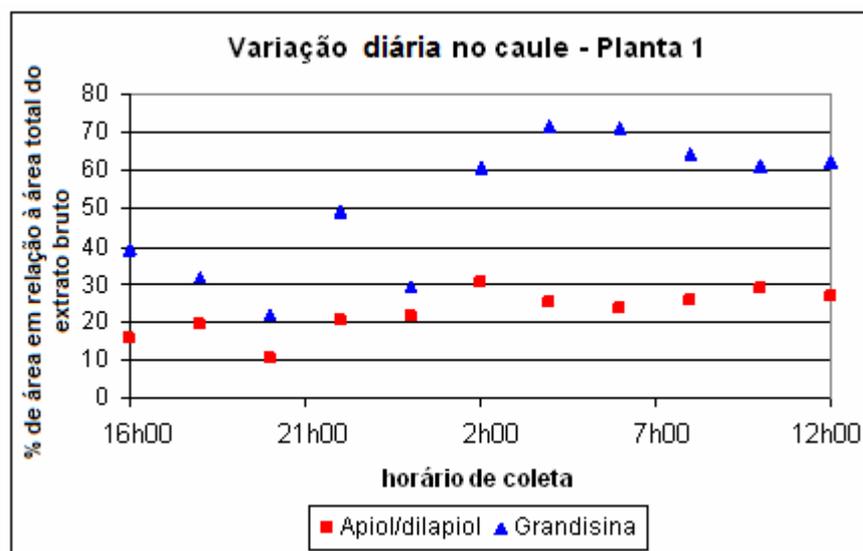
Similar à planta 1, também há um aumento e queda abrupta no teor de grandisina, só que culminando às 4 horas. Novamente a falta de uma amostragem

estatisticamente mais significativa impede de se avaliar se este fato é relevante ou não.



**Figura 4.14.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina nas folhas da planta 3.

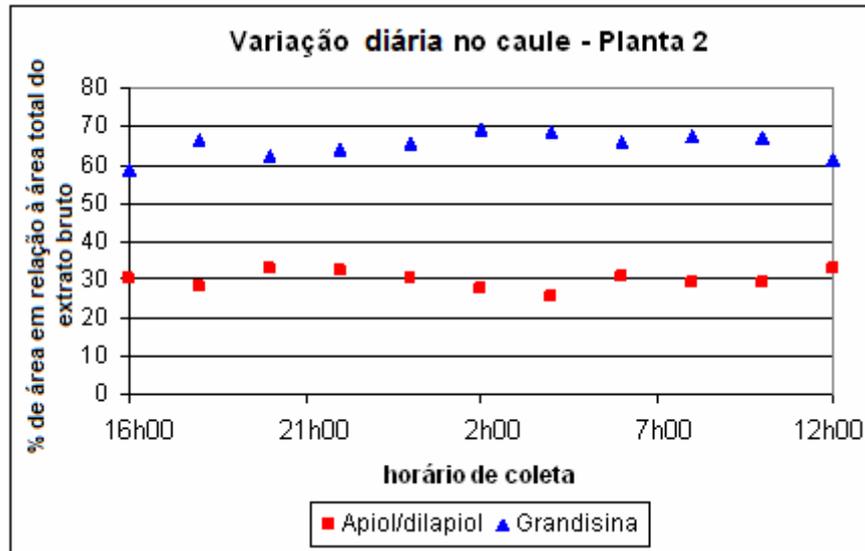
Considerando o caule, a planta 1 (fig. 4.15.) também mostra variações acentuadas na porcentagem de grandisina passando de um valor mínimo às oito horas da noite até atingir um valor máximo às quatro horas da manhã. O apiol/dilapiol apresenta mudanças menos pronunciadas, com o valor mínimo coincidente com a grandisina, até atingir o máximo às duas horas da manhã.



**Figura 4.15.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina no caule da planta 1.

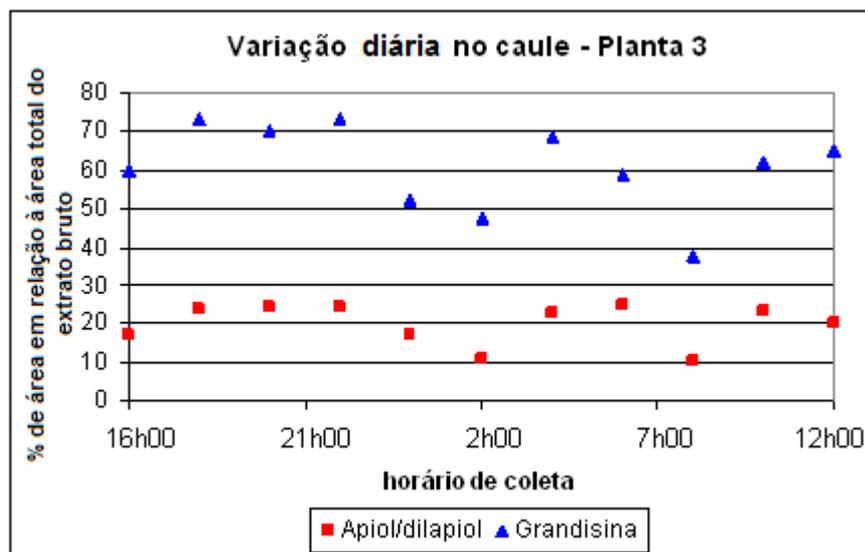
Assim como nas folhas, a variação temporal no caule da planta 2 (fig. 4.16.)

também é pouco pronunciada com os teores de grandisina assumindo valores mínimos às dezesseis horas e máximos às duas horas, e o apiol/dilapiol atingindo o mínimo às quatro horas e máximo às vinte horas.



**Figura 4.16.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina no caule da planta 2.

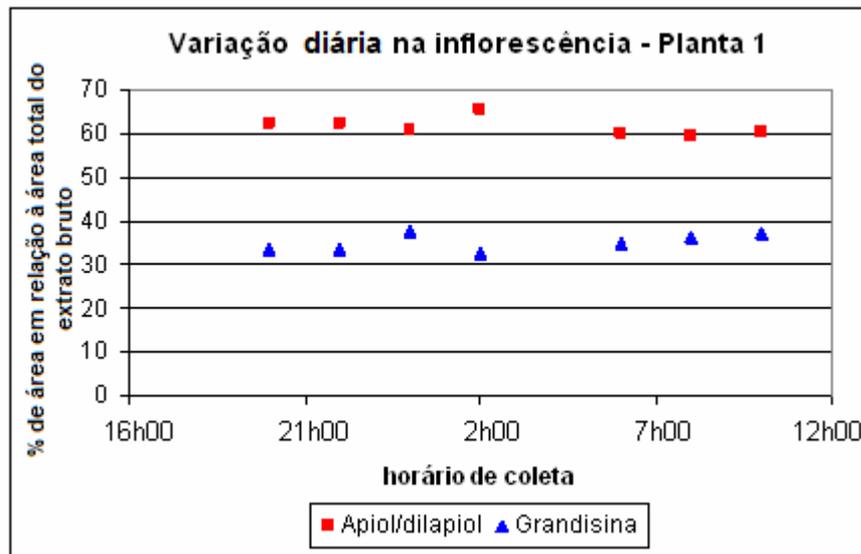
Na planta 3 (fig. 4.17.) as oscilações dos dois metabólitos no caule apresentam amplitudes maiores do que na planta 2, e menores do que na planta 1, semelhante ao que ocorre nas folhas. A grandisina apresenta valores máximos às dezoito horas e vinte e duas horas, e valor mínimo às oito horas da manhã. Já o apiol/dilapiol apresenta valor máximo entre dezoito horas e vinte e duas horas, e valor mínimo às oito horas.



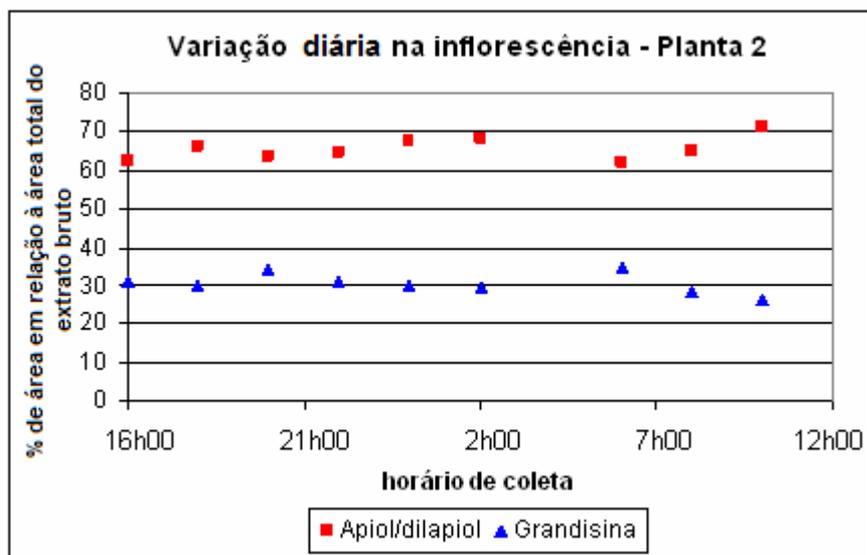
**Figura 4.17.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina no caule da planta 3.

Nas inflorescências da planta 1 (fig. 4.18.), as oscilações apresentam baixa amplitude, em torno de 10%. Como esse tecido não foi coletado em todos os horários de amostragem, e pela pequena oscilação, a avaliação dos valores de mínimo e máximo é incerta.

De modo similar, as oscilações temporais dos metabólitos nas inflorescências da planta 2 (fig. 4.19) variam com baixa magnitude e foram de fase, já que às 10h00 a grandisina atinge teor máximo e o apiol/dilapiol atinge teor mínimo.

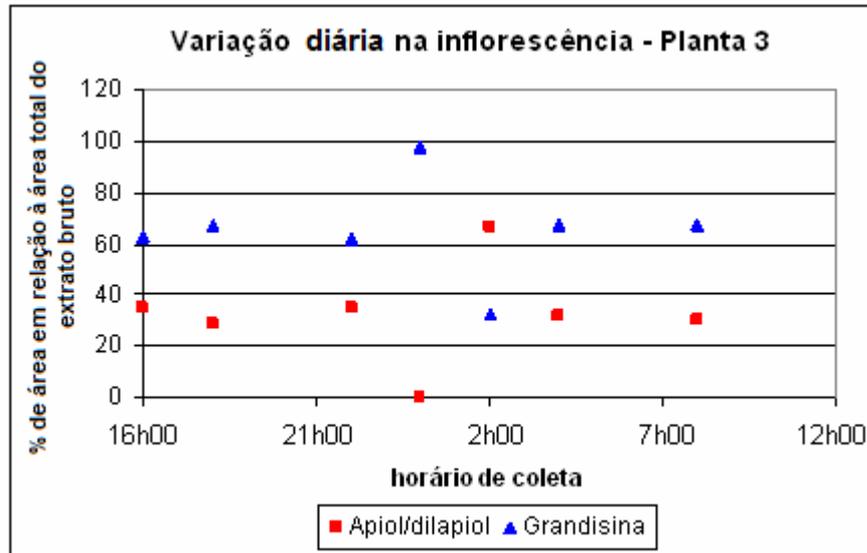


**Figura 4.18.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina nas inflorescências da planta 1.



**Figura 4.19.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina nas inflorescências da planta 2.

As variações temporais dos metabólitos secundários das inflorescências na planta 3 (fig. 4.20.) já são mais acentuadas, com a grandisina atingindo um valor mínimo às duas horas da manhã e um pico máximo a meia noite. O apiol/dilapiol atingiu seu mínimo a meia-noite e seu máximo às duas horas a manhã.



**Figura 4.20.** Variação temporal do teor de apiol/dilapiol e grandisina nas inflorescências da planta 3.

A tabela 4.7 resume os horários de máximo e mínimo para cada um dos metabólitos secundários estudados em cada um dos tecidos.

**Tabela 4.7.** Horários de máxima e de mínima concentração dos metabólitos grandisina e apiol/dilapiol no extrato bruto para as plantas 1, 2 e 3.

Tecido	Metabólito	Planta 1		Planta 2		Planta 3	
		máximo	mínimo	máximo	mínimo	máximo	mínimo
folha	apiol/dilapiol	10h00	20h00	16h00	8h00	18h00	8h00
	grandisina	10h00	20h00	8h00	20h00	18h00	8h00
caule	apiol/dilapiol	2h00	20h00	20h00	4h00	18h00	8h00
	grandisina	4h00	20h00	2h00	16h00	18h00	8h00
inflorescência	apiol/dilapiol	n. a.	n. a.	10h00	16h00	2h00	0h00
	grandisina	n. a.	n. a.	20h00	10h00	0h00	2h00

n. a. = valor não avaliado



**Tabela 4.9.** Coeficientes de correlação entre os tecidos e entre os espécimes considerando as variações temporais do metabólito grandisina. Os quadros em cinza indicam correlações entre tecidos de uma mesma planta.

grandisina								
	Caule planta 1	Infloresc. planta 1	Folha planta 2	Caule planta 2	Infloresc. planta 2	Folha planta 3	Caule planta 3	Infloresc. planta 3
Folha planta 1	0,547	0,691	0,627	0,406	-0,475	-0,567	-0,410	0,167
Caule planta 1		0,683	0,528	0,559	-0,463	-0,521	-0,317	-0,223
Infloresc. planta 1			0,393	0,489	-0,371	-0,465	-0,726	-0,091
Folha planta 2				0,554	0,240	-0,699	-0,227	-0,251
Caule planta 2					0,489	-0,872	-0,421	-0,172
Infloresc. planta 2						0,048	0,237	0,058
Folha planta 3							0,563	0,258
Caule planta 3								0,211

Este coeficiente, que assume valores entre -1 e +1, permite avaliar o grau de dependência linear entre dois parâmetros. Valores positivos e iguais a unidade indicam parâmetros diretamente proporcionais, e valores negativos e iguais a unidade indicam parâmetros inversamente proporcionais (Magalhães e Lima, 2005).

Considerando as plantas separadamente (coeficientes de correlação presentes nos quadros em cinza nas tabelas 4.8 e 4.9), a planta 1 e a planta 3 apresentam a maior e a menor semelhança entre os três tecidos para os dois metabólitos, respectivamente. Os coeficientes negativos que correlacionam as variações ocorridas na planta 3 com as ocorridas nos outros dois espécimes apontam a existência de relações lineares inversamente proporcionais reforçando a análise anterior que mostrou que os teores mínimos e máximos na planta 3 ocorrem em fase inversa comparados com os outros indivíduos.

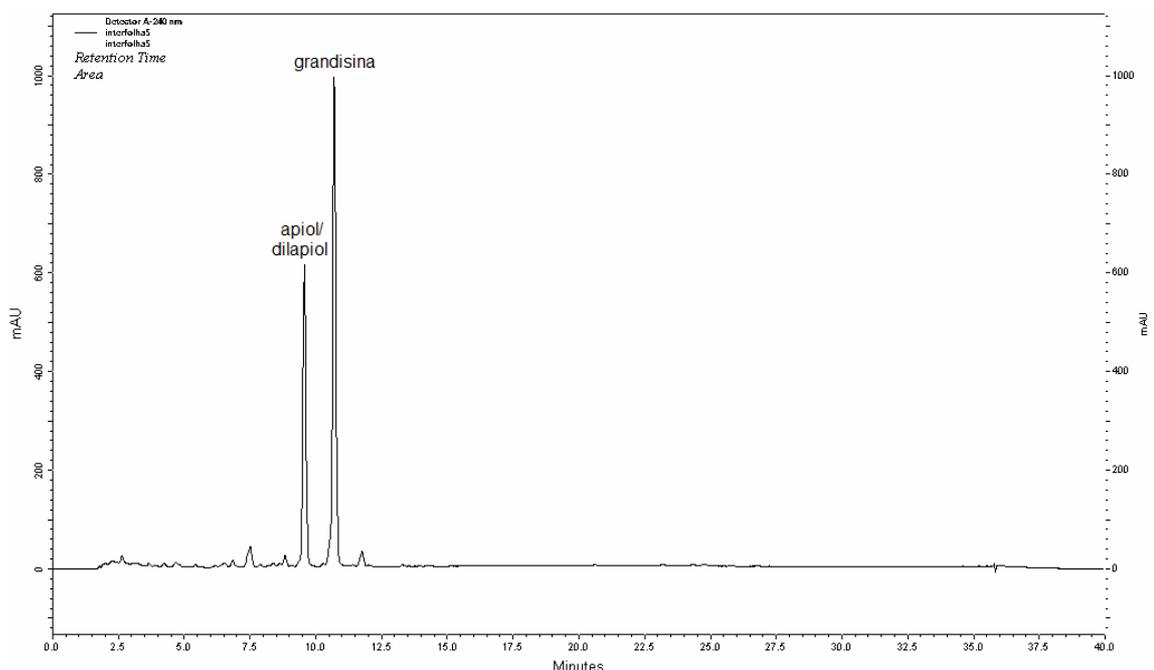
Analisando o conjunto, os valores variaram expressivamente ficando, em módulo, entre 0,048 (parâmetros praticamente independentes, ou seja, a variação que ocorre em um tecido pouco se parece com a variação temporal em outro tecido)

e 0,872 (variáveis com relação linear significativa) sugerindo que as mudanças temporais desses dois metabólitos têm comportamento muito heterogêneo entre indivíduos, como os horários de teores mínimos e máximos (tab. 4.7) indicou. Esses dados reforçam a idéia de que os indivíduos daquela população de *P. solmsianum* possuem variações temporais relativamente independentes; e que entre os tecidos caule, folha e inflorescência em uma mesma planta o grau de semelhança é baixo. O segundo estudo diária, com um universo amostral mais amplo, possibilitou confirmar algumas conclusões desta primeira avaliação.

#### 4.5. Variação intraespecífica interfolhas

Os resultados do primeiro estudo de variação diária dos constituintes químicos das folhas de *P. solmsianum*, apresentados na seção 4.4., sugerem que podem existir variações marcantes entre folhas de um mesmo indivíduo coletadas em um mesmo horário. Este estudo teve como objetivo dimensionar essa diferença.

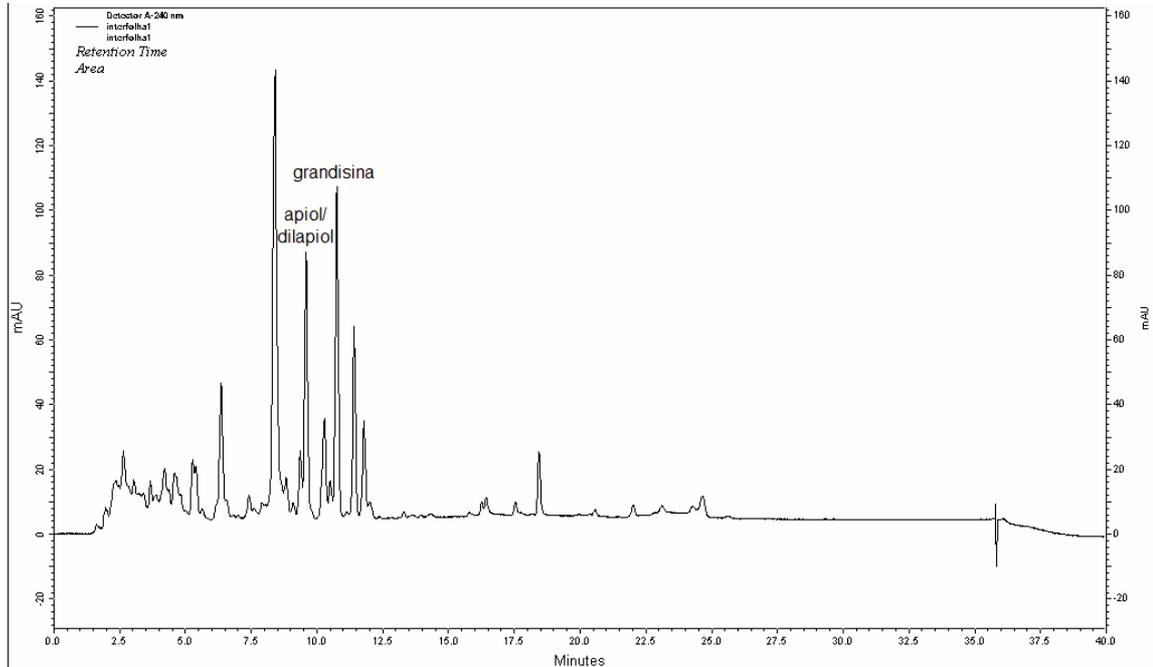
Avaliando-se as quantidades relativas dos compostos no extrato bruto, os cromatogramas obtidos das dezenove folhas foram divididos em dois tipos. Um deles apresenta perfil cromatográfico bem simples tendo a apiol/dilapiol (tempo de retenção médio = 9,122 min) e a grandisina (tempo de retenção médio = 10,068 min) como picos majoritários cujas áreas perfazem mais de 50% da área total do extrato bruto. O cromatograma da folha 5 é mostrado como exemplo (fig. 4.21). Treze cromatogramas podem ser classificados dessa maneira perfazendo 68% do total.



**Figura 4.21.** Cromatograma da folha 5 como exemplo de perfil mais simples.

Um segundo tipo de cromatograma apresenta perfil mais complexo, no qual a participação de outros compostos torna-se mais significativa e a soma das

porcentagens de áreas de apiol/dilapiol e grandisina fica menor do que 50% da área total do extrato bruto. O cromatograma da folha 1 (fig. 4.22) é mostrado como exemplo desse tipo de perfil, que perfaz aproximadamente 32% do total.



**Figura 4.22.** Cromatograma da folha 1 como exemplo de perfil mais complexo.

Como essas amostras foram coletadas no mesmo momento, e esses dois tipos de perfis cromatográficos estão presentes nos dois indivíduos indistintamente, essa variação não deve ser nem de caráter temporal e nem de caráter intraespecífico. Assim, há possibilidade das folhas com teores maiores de outros compostos além do apiol/dilapiol e da grandisina terem sido atacadas por patógenos, e essa mudança indicar resposta daquele tecido a essa agressão.

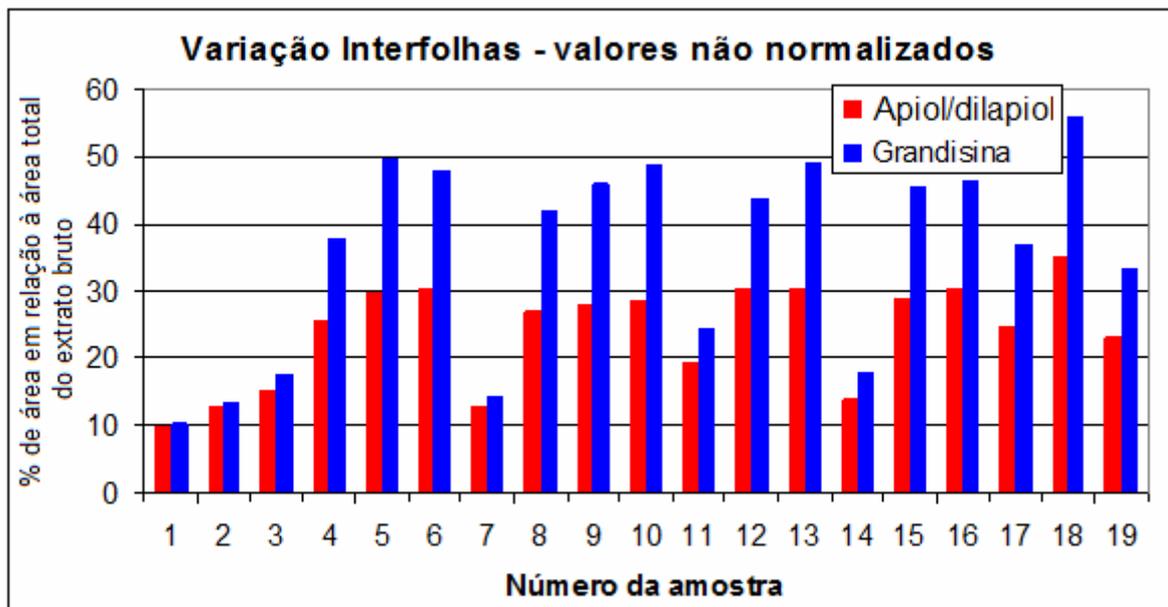
A tabela 4.10. apresenta o comprimento e a largura das folhas coletadas, a massa fresca e os valores de área relativa à área total do cromatograma, em porcentagem, do apiol/dilapiol e da grandisina nas amostras. Também foi calculada a relação porcentual apenas entre a apiol/dilapiol e a grandisina desconsiderando os outros compostos presentes, e que foi chamada de teor normalizado.

**Tabela 4.10.** Dados do estudo da variação intraespecífica interfolhas.

<b>Planta 1</b>							
Nº da folha	Compr. da folha	Largura da folha	Massa fresca	% de área em relação à área total do extrato bruto		teor normalizado	
				Apiol/ Dilapiol	Grandisina	Apiol/ Dilapiol	Grandisina
1	9,2	3,9	0,3537	9,89	10,32	48,94	51,06
2	7,0	3,7	0,2833	12,87	13,21	49,35	50,65
3	8,0	4,0	0,3818	15,29	17,6	46,49	53,51
4	6,7	3,9	0,4000	25,54	37,64	40,42	59,58
5	9,2	4,6	0,5481	29,52	49,74	37,24	62,76
6	13,5	6,2	1,0238	30,45	47,82	38,90	61,10
7	11,5	5,7	0,7355	12,75	14,32	47,10	52,90
8	15,0	8,5	1,7100	26,91	41,79	39,17	60,83
9	14,5	7,2	1,4780	27,88	46,00	37,74	62,26
Média				21,23	30,94	42,82	57,18
Desvio-padrão				8,33	16,66	5,04	5,04

<b>Planta 2</b>							
Nº da folha	Compr. da folha	Largura da folha	Massa fresca	% de área em relação à área total do extrato bruto		teor normalizado	
				Apiol/ Dilapiol	Grandisina	Apiol/ Dilapiol	Grandisina
10	12,3	5,9	0,9744	28,64	48,58	37,09	62,91
11	13,0	5,7	0,8001	19,33	24,42	44,18	55,82
12	17,0	9,7	2,2808	30,18	43,58	40,92	59,08
13	15,5	8,5	1,8572	30,51	48,83	38,45	61,55
14	14,0	7,5	1,1995	13,89	17,93	43,65	56,35
15	17,0	9,0	2,4572	28,91	45,39	38,91	61,09
16	16,5	9,6	2,2570	30,28	46,47	39,45	60,55
17	18,0	10,6	2,4780	24,61	37,02	39,93	60,07
18	18,0	10,0	2,3836	35,08	55,71	38,64	61,36
19	21,5	12,5	3,8344	23,11	33,04	41,16	58,84
Média				26,45	40,10	40,24	59,76
Desvio-padrão				6,27	11,88	2,28	2,28

A figura 4.23. apresenta o gráfico de barras da grandisina e do apiol/dilapiol para cada uma das folhas considerando a porcentagem da área em relação à área total do extrato bruto. A variação interfolhas desses dois metabólitos é muito alta considerando que o desvio padrão percentual é de 20% até 55% do valor médio tanto para o apiol/dilapiol quanto para a grandisina, e que o maior valor é seis vezes o menor valor.

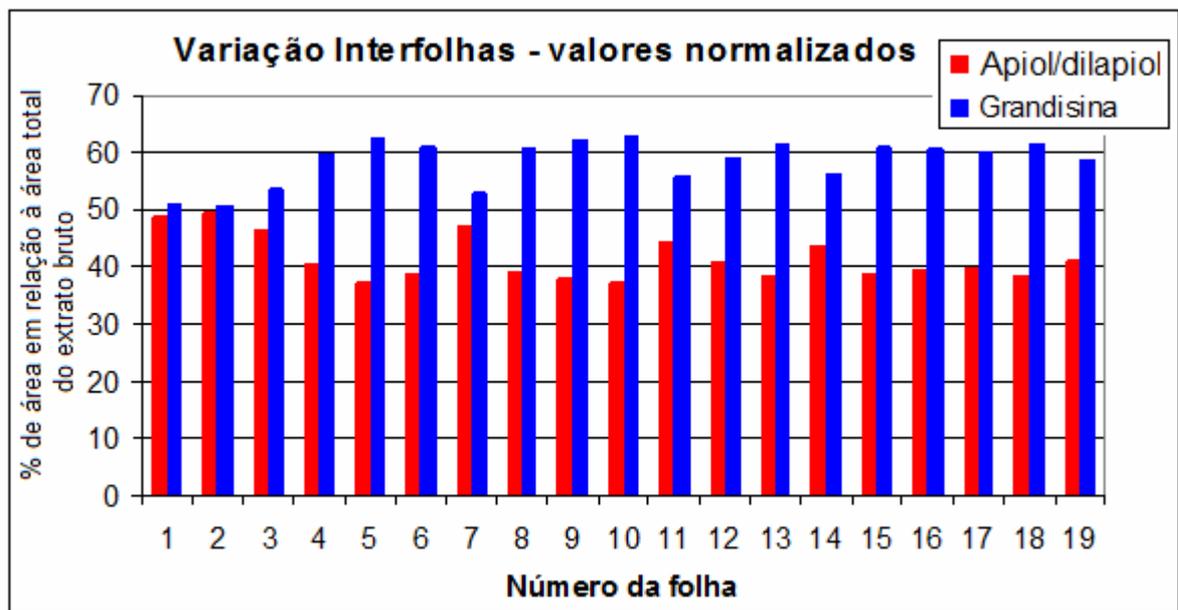


**Figura 4.23.** Variação interfolhas (não normalizada) da % de área do apiol/dilapiol e da grandisina.

As amostras número 1, 2, 3, 7, 11 e 14 apresentaram cromatogramas com perfil mais complexo, e que correspondem àqueles com menores teores de grandisina e apiol/dilapiol, pois há outros compostos cujos picos ficaram mais intensos e diminuíram a participação relativa da área da grandisina e do apiol/dilapiol em relação à área total do extrato bruto. Se essas amostras forem desconsideradas, as folhas apresentam um perfil mais homogêneo com amplitudes de variação menores e com o desvio padrão percentual mais baixo variando de 7% até 15%.

Analisando-se os teores normalizados para o apiol/dilapiol e a grandisina, o desvio padrão cai muito ficando entre 4% a 12% do valor médio. Isto indica que as relações entre as porcentagens de área de apiol/dilapiol e de grandisina presente no

extrato bruto são bem próximas entre as diferentes folhas amostradas (fig. 4.24.).



**Figura 4.24.** Variação interfolhas da % de área normalizada para o apiol/dilapiol e a grandisina.

Além disso, há bastante semelhança entre os dois indivíduos mesmo analisando-se folhas com perfil metabólico mais complexo, já que as médias das porcentagens dos dois metabólitos não apresentam diferenças maiores do que 7% estando, para aquela amostragem, a grandisina 50% maior, em média, do que o apiol/dilapiol. Assim, a avaliação das quantidades relativas (normalizadas) de apiol/dilapiol e grandisina uniformiza diferenças entre os perfis metabólicos das folhas que poderiam ser provocadas por ataques de patógenos ou por outros fatores não conhecidos.

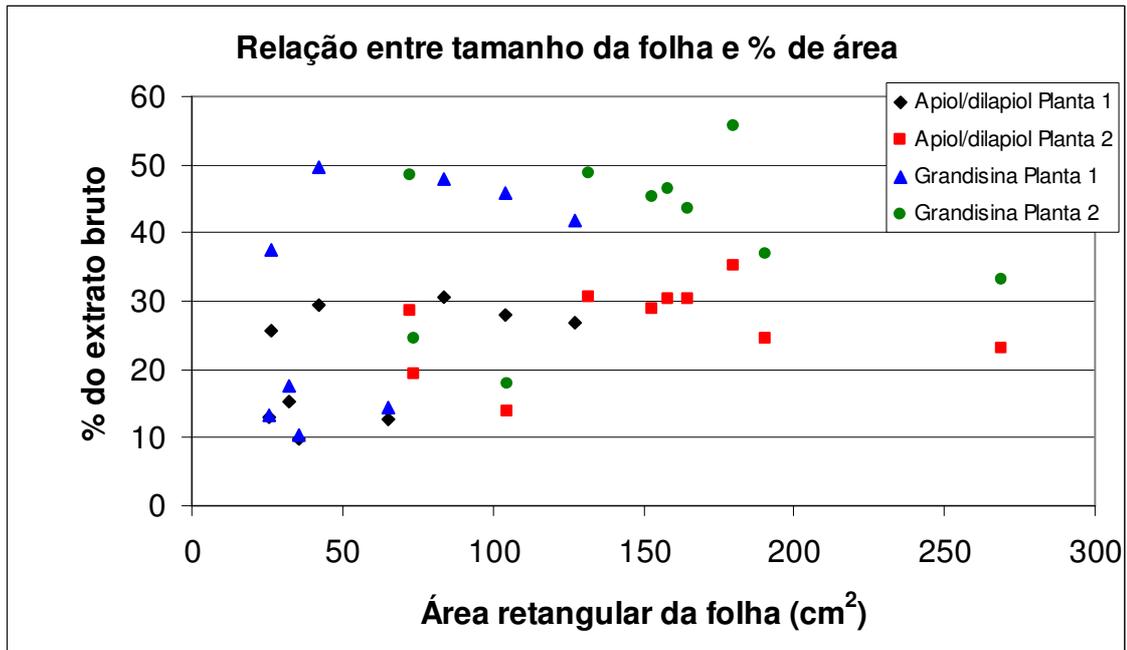
A relação entre os teores dos dois metabólitos secundários e o tamanho da folha também foi avaliado. A partir da largura e do comprimento de cada amostra, calculou-se a área assumindo um formato retangular para cada folha, e esse valor foi tomado como proporcional ao tamanho de cada tecido. A tabela 4.11. mostra os coeficientes de correlação entre as áreas e a porcentagem de grandisina e apiol/dilapiol no extrato bruto (valores não normalizados) para as plantas 1 e 2.

**Tabela 4.11.** Coeficientes de correlação entre % de área dos metabólitos grandisina e apiol/dilapiol e área retangular da folha.

	Planta 1	Planta 2
Apiol/dilapiol	0,51678	0,22457
Grandisina	0,52845	0,15879

Os coeficientes de correlação para a planta 2 são baixos, entre 0,15 e 0,22, indicando que o tamanho da folha não é fator relevante para a quantidade de grandisina ou apiol/dilapiol no extrato. Para a planta número 1 o coeficiente de correlação aumenta para 0,5 apontando que folhas maiores tendem a apresentar teores um pouco maiores de grandisina ou apiol/dilapiol. Como comparação, o coeficiente de correlação entre a massa fresca das folhas e a área retangular é de 0,99 para a planta 1 e 0,98 para a planta 2, valores bem altos que mostram forte dependência linear e indicam, como esperado, que folhas maiores apresentam maiores massas.

Cada ponto no gráfico seguinte (fig. 4.25.) relaciona a área retangular de cada folha com a porcentagem de área de grandisina ou apiol/dilapiol em relação à área total no cromatograma do extrato bruto para as plantas 1 e 2. A distribuição de pontos não indica claramente uma relação proporcional entre tamanho da folha e teor relativo de metabólito secundário. Há folhas tanto pequena quanto grande com a mesma porcentagem de área de grandisina ou de apiol/dilapiol em relação à área total do extrato.



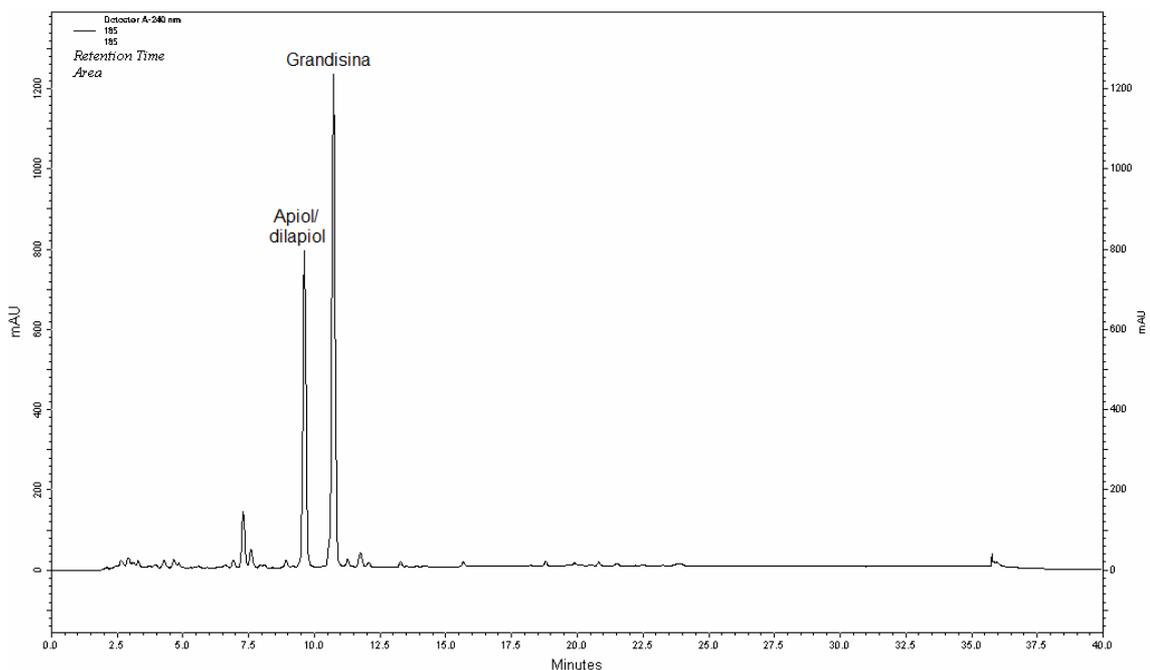
**Figura 4.25.** Relação entre área retangular da folha e % de área dos metabólitos grandisina e apio/dilapiol no extrato bruto nas folhas das plantas 1 e 2.

Desse modo, esses dados indicam que o tamanho da folha tem pouca ou nenhuma influência no teor relativo dos dois metabólitos no extrato bruto. Assim, as análises do segundo estudo de variação diária e de variação sazonal não consideram a relação entre tamanho do tecido e porcentagem de área dos metabólitos secundários.

#### 4.6. Segundo estudo de variação diária

Comparando-se os 196 cromatogramas obtidos neste estudo envolvendo a composição química de folhas de *P. solmsianum*, os perfis das plantas 2, 3 e 4 podem ser agrupados em dois tipos, à semelhança do que foi discutido no estudo de variação interfolhas presente na seção 4.5.

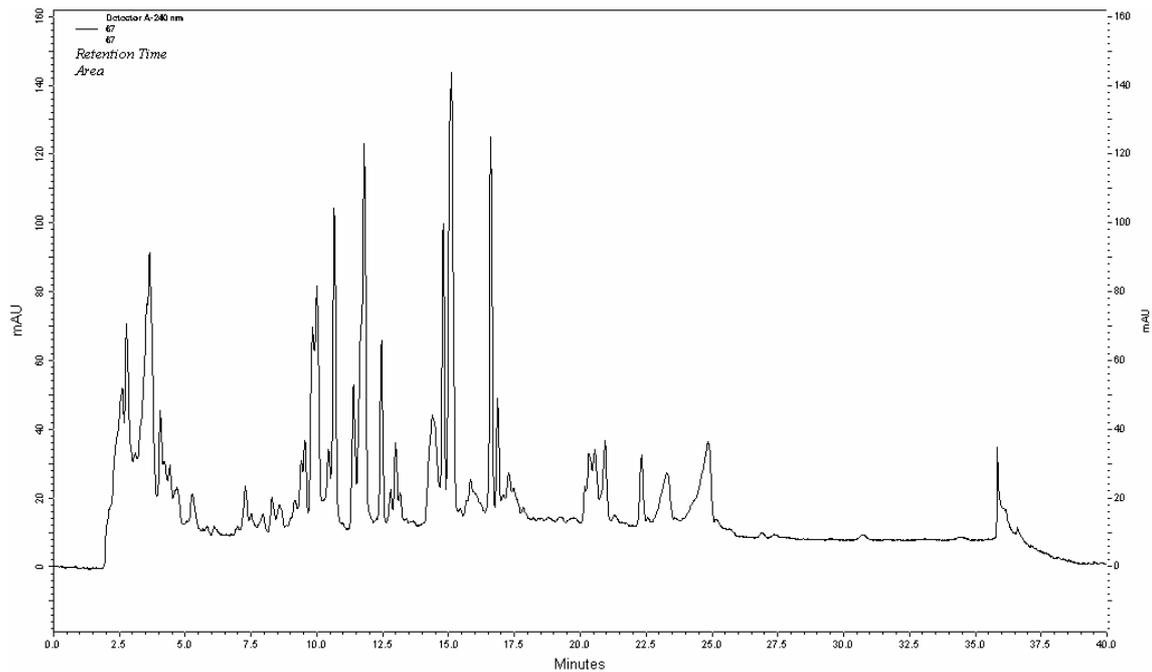
O perfil cromatográfico mais comum apresenta os picos de apiol/dilapiol (tempo de retenção médio = 9,8 min) e da grandisina (tempo de retenção médio = 11,7 min) compondo mais de 50% da área total do extrato bruto, e os demais compostos contribuindo com valores geralmente menores do que 5% da área total. O cromatograma da amostra 185 (fig. 4.26.) possui esse perfil típico e que caracteriza a aproximadamente 80% do total dos cromatogramas obtidos.



**Figura 4.26.** Cromatograma da amostra número 185 e que representa perfil típico.

O restante dos cromatogramas possui um perfil com maior número de picos de intensidade mais significativa. A figura 4.27. apresenta o cromatograma da amostra 67 e que exemplifica esse perfil cromatográfico de maior complexidade,

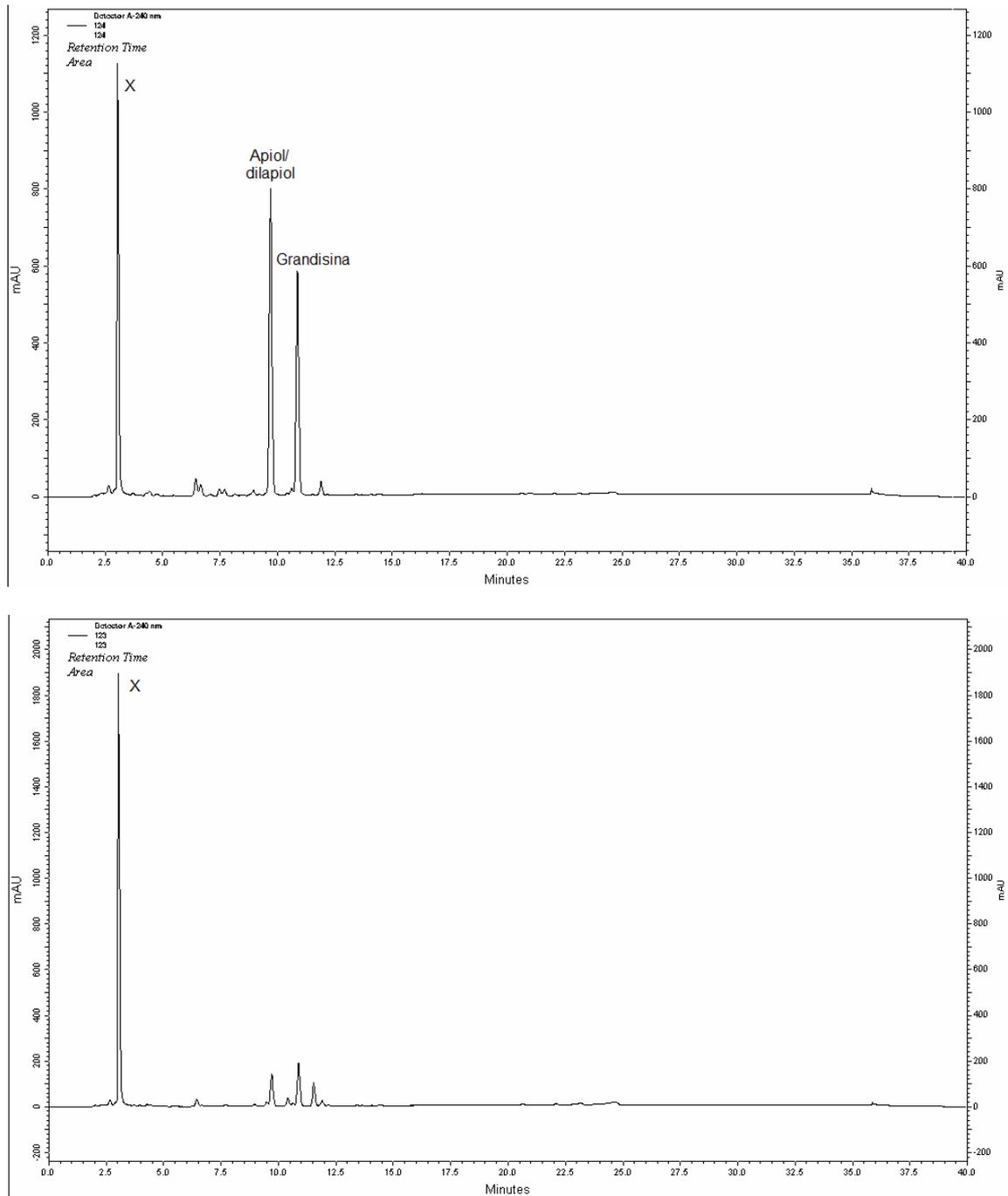
aproximadamente 20% do total de cromatogramas obtidos.



**Figura 4.27.** Cromatograma da amostra número 67 e que possui perfil mais complexo.

Essa diferença, como já foi considerada na seção anterior, pode ser resultante de uma série de fatores abióticos e bióticos, como resposta do tecido às agressões do ambiente (ataque de patógenos, por exemplo), e que modifica as quantidades de metabólitos secundários presentes levando a um perfil cromatográfico mais complexo.

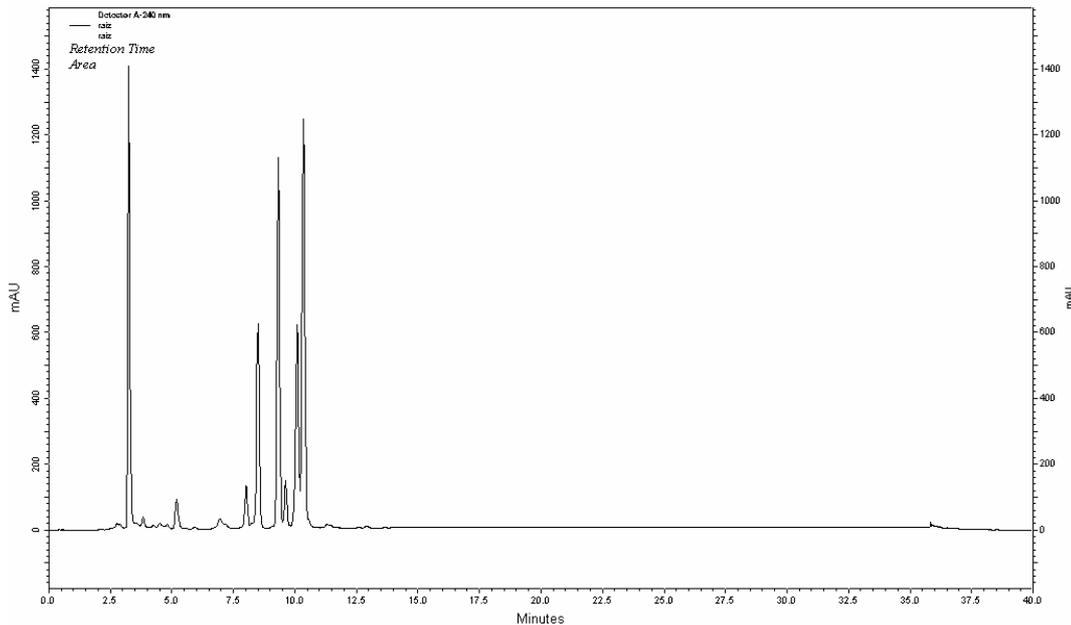
Em alguns cromatogramas se destaca um intenso pico com tempo de retenção em torno de 3 minutos. Na amostra número 124 (fig. 4.28.) há dois picos intensos correspondentes ao apiol/dilapiol e a grandisina, e um terceiro pico que se sobressai no início, e que é o pico majoritário em alguns cromatogramas, como se verifica na amostra número 123 (fig. 4.28.). Esse pico que elui logo no início, doravante chamado de X, também foi avaliado, juntamente com o apiol/dilapiol e a grandisina, nesse segundo estudo de variação diária.



**Figura 4.28.** Cromatogramas das amostras números 124 (acima) e 123 (abaixo).

O estudo da raiz de *Piper solmsianum* feito no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (LQPN IQUSP), ainda em andamento, também apresenta um pico intenso em torno de 3 minutos de eluição quando o extrato bruto foi analisado por CLAE usando o mesmo método de injeção para esse estudo diária (fig. 4.29.). Estudos posteriores necessitariam confirmar se esse material encontrado na raiz é o pico X que se

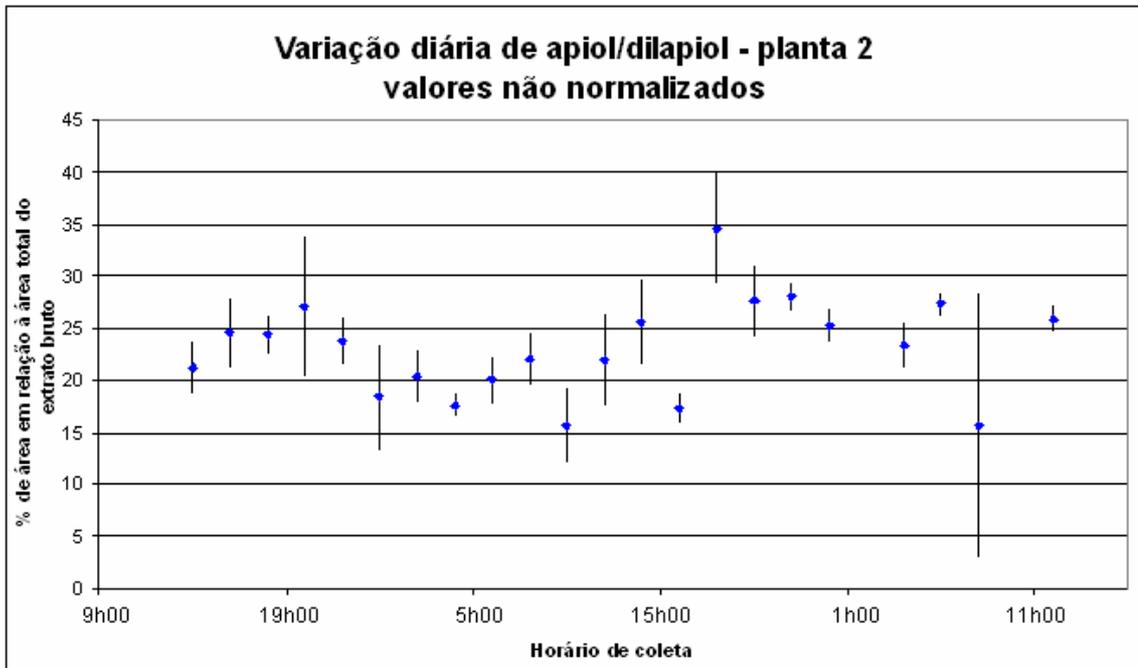
detecta nas folhas em alguns momentos do dia.



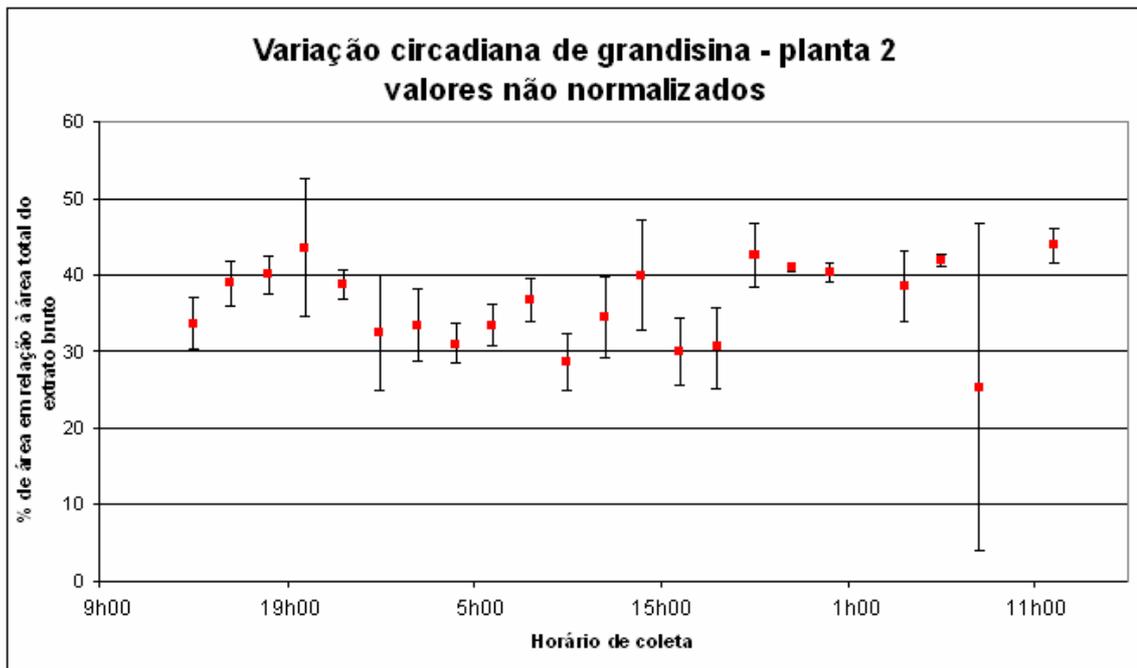
**Figura 4.29.** Cromatograma do extrato das raízes de *P. solmsianum*.

Os dias e os horários de coleta, o comprimento e a largura de cada folha, a massa fresca, e as porcentagens de área em relação à área total para o pico X, o apiol/dilapiol e a grandisina estão tabeladas no apêndice II. Para cada planta e em cada horário calculou-se o valor médio da porcentagem de área dos dois metabólitos em relação à área total do cromatograma do extrato bruto para as três folhas, bem como os desvios padrão.

As figuras 4.30. e 4.31. apresentam a variação diária do apiol/dilapiol e da grandisina, respectivamente, no indivíduo número 2.



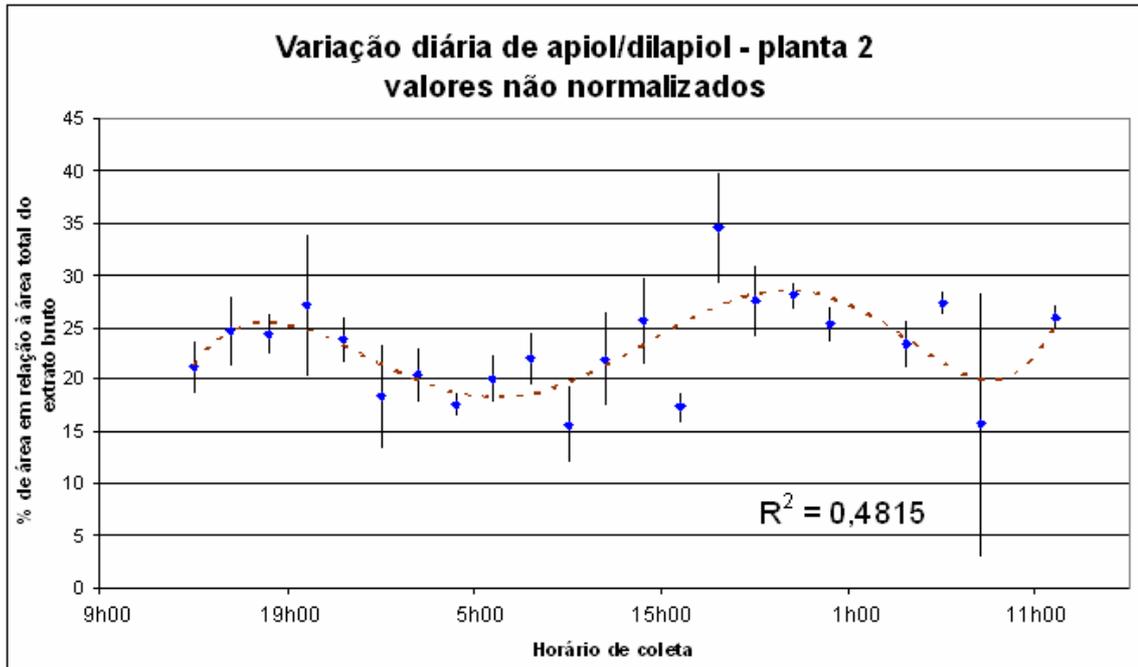
**Figura 4.30.** Variação diária das porcentagens médias de apiol/dilapiol com as respectivas barras de erro na planta 2.



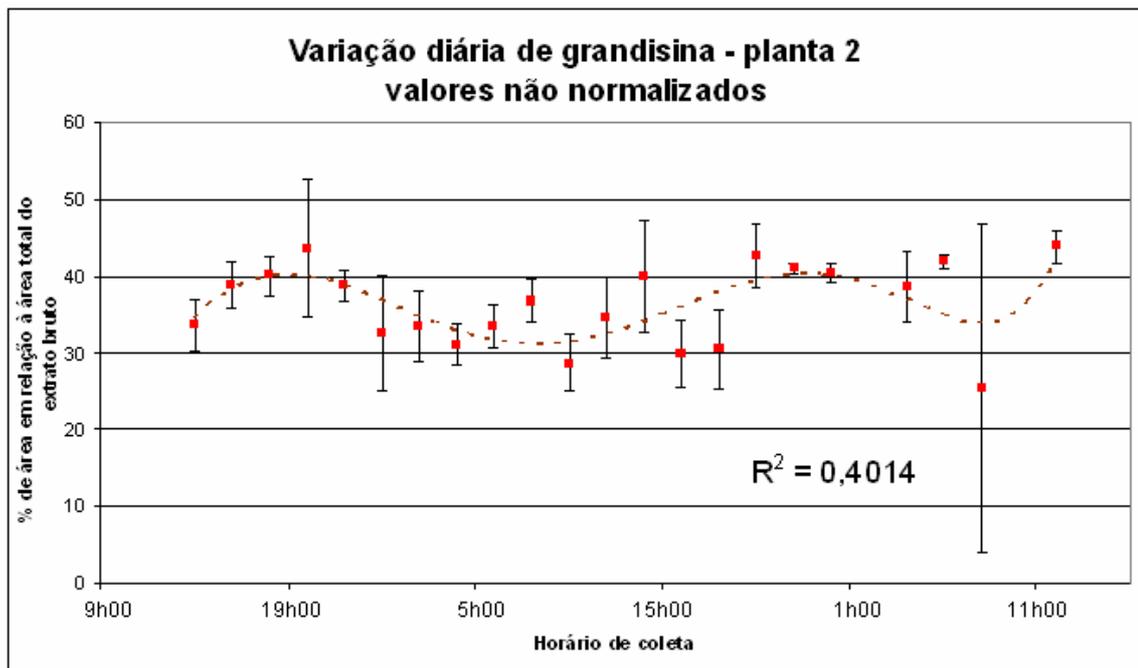
**Figura 4.31.** Variação diária das porcentagens médias de grandisina com as respectivas barras de erro na planta 2.

Percebe-se uma variação periódica na porcentagem de área dos dois metabólitos ao longo do tempo, e para avaliar melhor a frequência dessa oscilação, foram calculadas várias curvas de tendência. A linha que apresentou melhor ajuste, verificado pelo maior valor de  $R^2$ , foi da função polinomial de sexto grau (fig. 4.32. e

4.33.).



**Figura 4.32.** Curva de tendência (indicada pelo tracejado marrom) da variação diária de apiol/dilapiol na planta 2

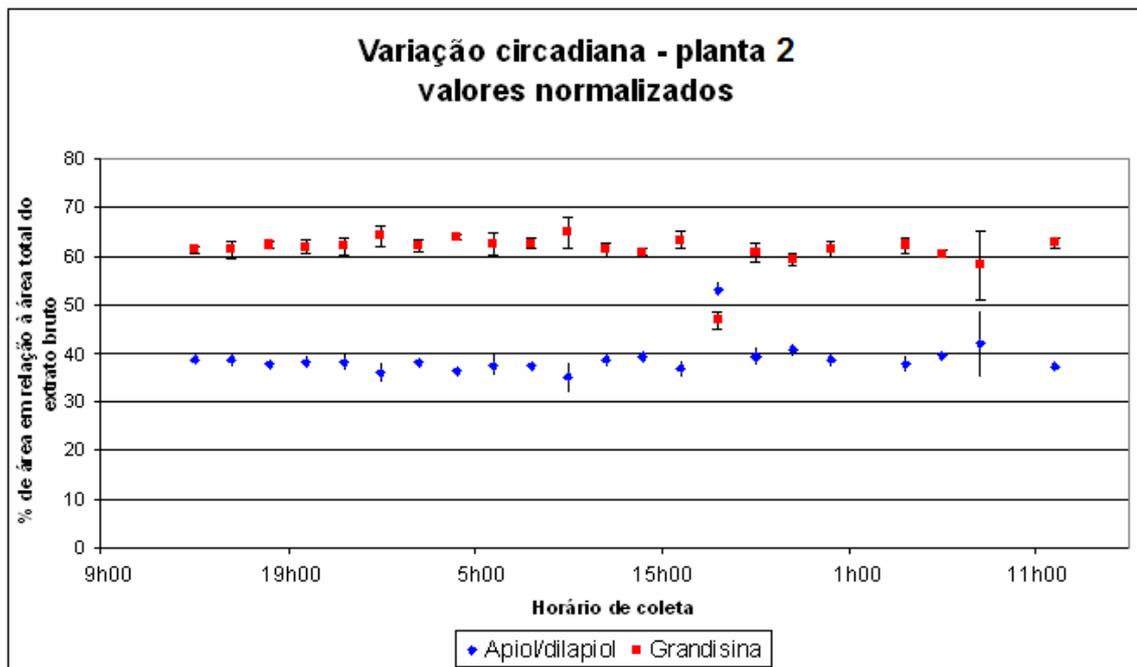


**Figura 4.33.** Curva de tendência (indicada pelo tracejado marrom) da variação diária de grandisina na planta 2

As linhas de tendência indicam que a mudança temporal possui perfil de variação circadiana, já que a frequência de oscilação está em torno de 24 horas. Os dois metabólitos oscilam com a mesma fase, com o teor máximo ocorrendo por volta

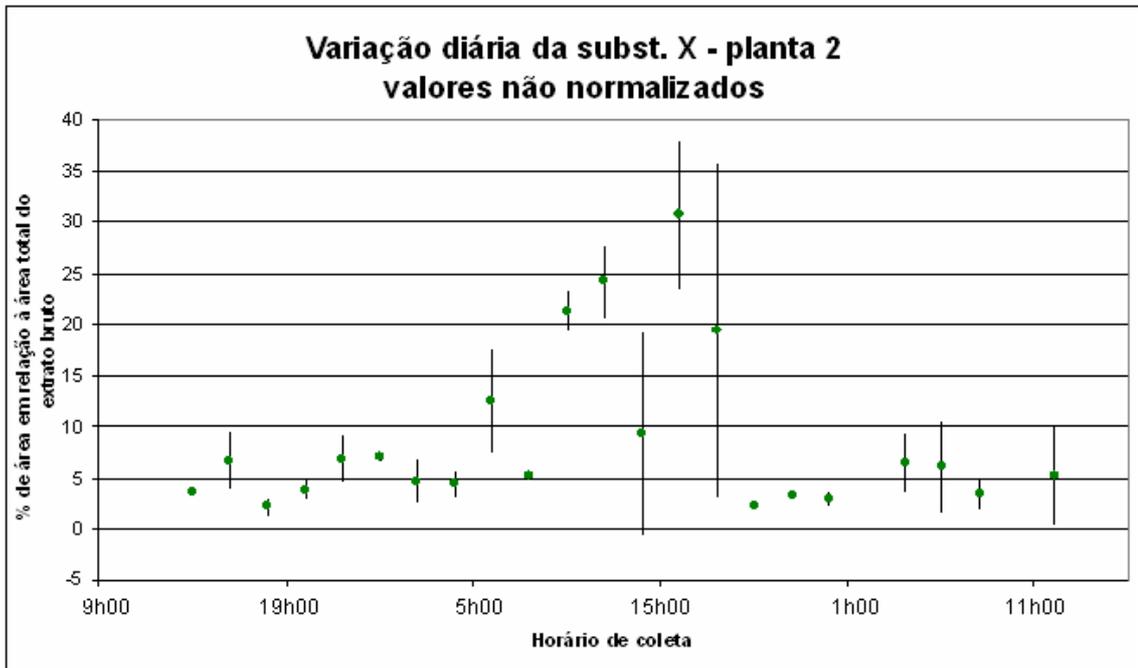
das oito horas da noite, e o mínimo teor ocorrendo por volta das oito horas da manhã.

Os valores normalizados para os dois metabólitos variam com amplitude muito menor (fig. 4.34.), e os desvios padrão também são baixos, indicando que o teor de grandisina em relação ao de apiol/dilapiol no extrato bruto praticamente não varia no tempo em toda série de medidas.



**Figura 4.34.** Variação temporal das porcentagens normalizadas de área de apiol/dilapiol e grandisina em relação à área total na planta 2.

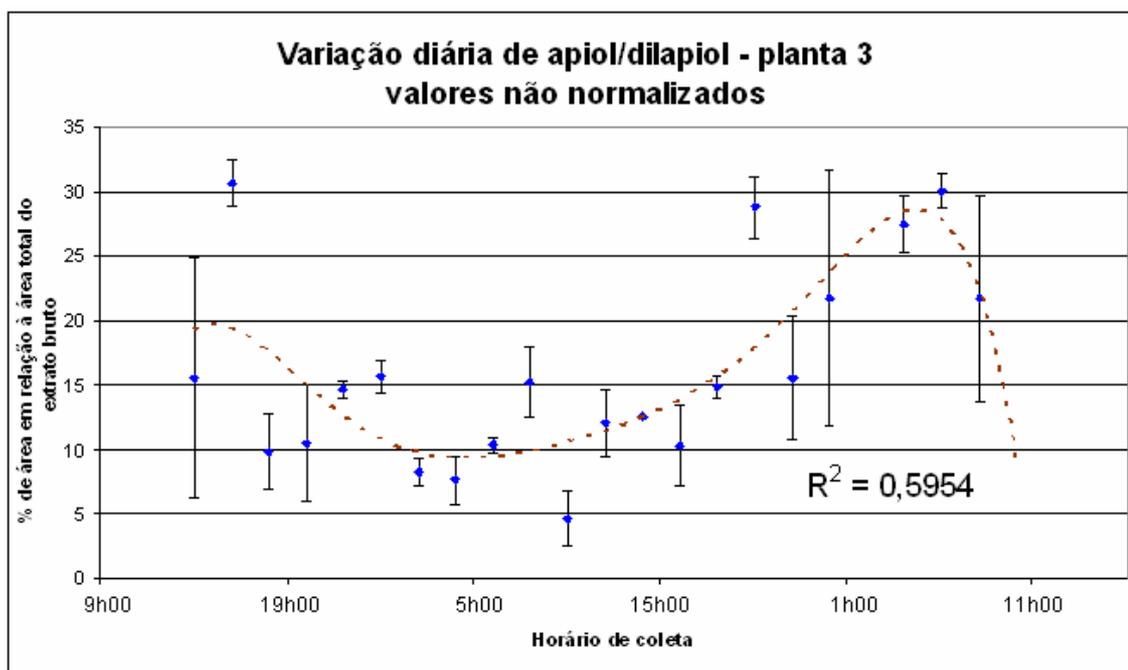
A substância ou substâncias presentes no pico X (fig. 4.35.) mostram um perfil de oscilação que não se encaixa em uma variação circadiana, mostrando um acentuado aumento no teor iniciando-se por volta das oito horas da manhã do segundo dia de coleta, e diminuindo muito no início da noite desse mesmo dia.



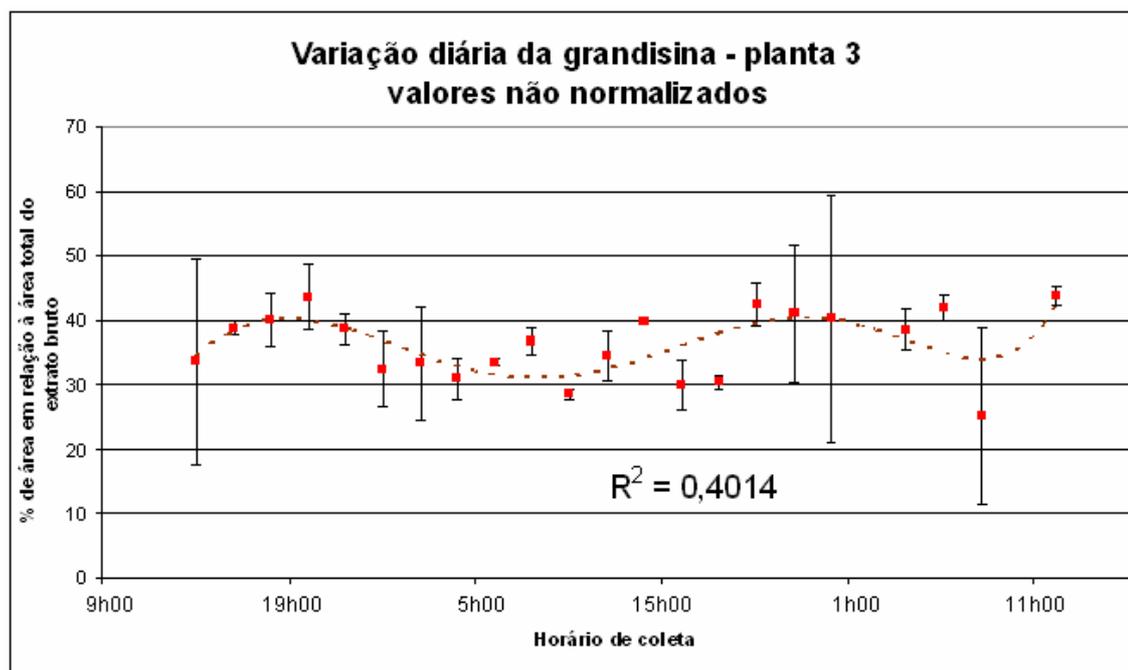
**Figura 4.35.** Variação diária das porcentagens médias com as barras de erro da substância X na planta 2.

Na planta 3, a variação temporal de apiol/dilapiol é menos regular do que na planta 2 apresentando desvios padrão maiores e assumindo amplos valores de porcentagens de área do extrato bruto que variavam de 5% em média até 31% em média (fig. 4.36.). A linha de tendência com melhor ajuste também seguiu uma função polinomial de sexto grau. Há dois aumentos de concentração, sendo que o primeiro ocorre por volta das 18 horas e o segundo ocorre por volta 5 horas. Como a distância temporal entre os dois eventos é superior a 24 horas, não se identifica um perfil periódico de variação circadiana nesse metabólito, ao contrário da planta 2.

A variação temporal de grandisina na planta 3 (fig. 4.37.) já mostra uma maior regularidade na mudança temporal, evidenciada pela linha de tendência, onde os dois picos de máxima concentração no extrato bruto se encontram por volta das vinte horas, e os teores mínimos ocorrendo por volta das oito horas da manhã, período de oscilação semelhante àquele mostrado pela planta 2.

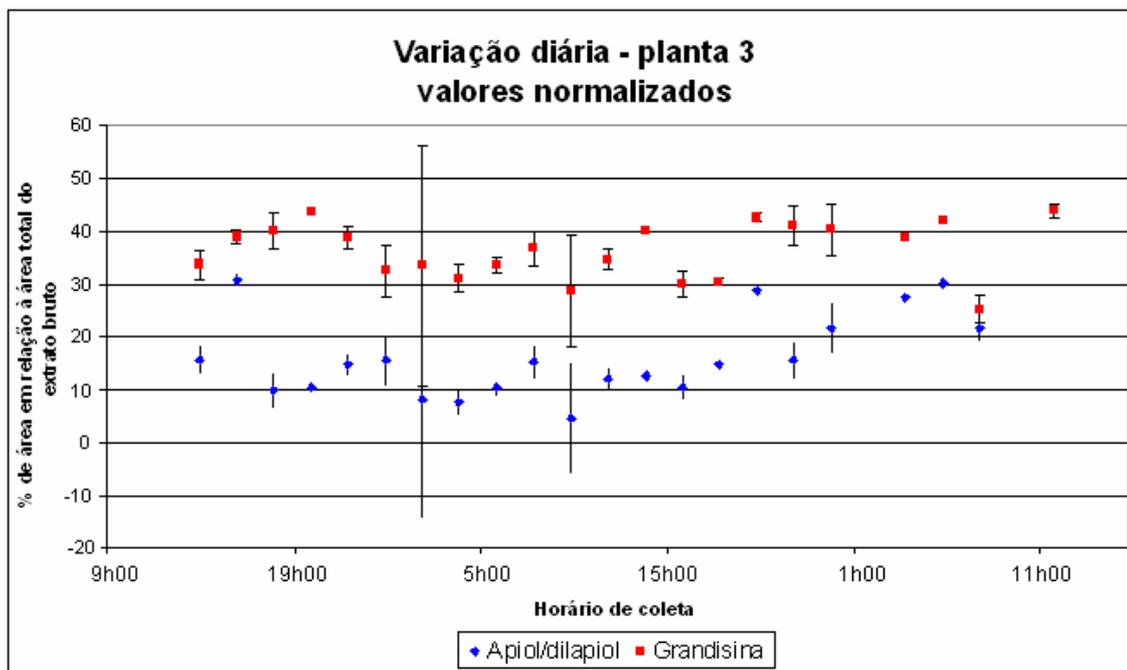


**Figura 4.36.** Variação diária das porcentagens médias de apiol/dilapiol com barras de erro e curva de tendência (indicada pelo tracejado marrom) na planta 3.



**Figura 4.37.** Variação diária das porcentagens médias de grandisina com barras de erro e curva de tendência (indicada pelo tracejado marrom) na planta 3.

Os valores normalizados dos dois metabólitos (fig. 4.38) mostram oscilações mais acentuadas comparada à planta 2 indicando flutuações na relação entre grandisina e apiol/dilapiol ao longo do tempo.

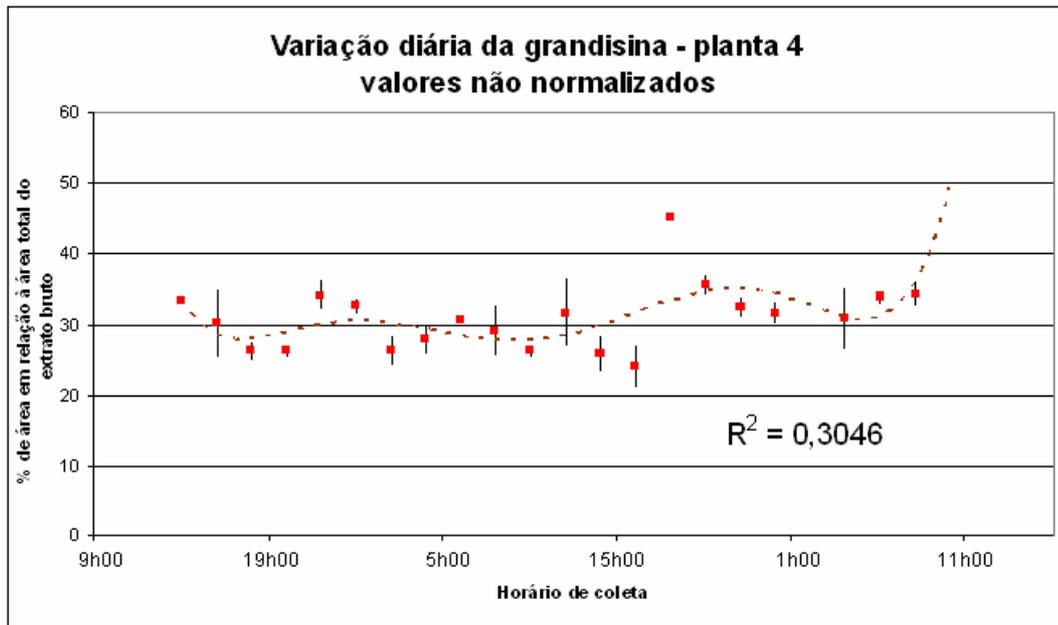


**Figura 4.38.** Variação temporal das porcentagens normalizadas de área de apiol/dilapiol e grandisina em relação à área total na planta 3.

A substância X mostra um comportamento próximo daquele observado na planta 2, com alteração temporal fora do perfil de variação circadiana, e com um grande aumento de concentração no meio do segundo dia de amostragem e que não se observou no primeiro dia (fig. 4.39.).

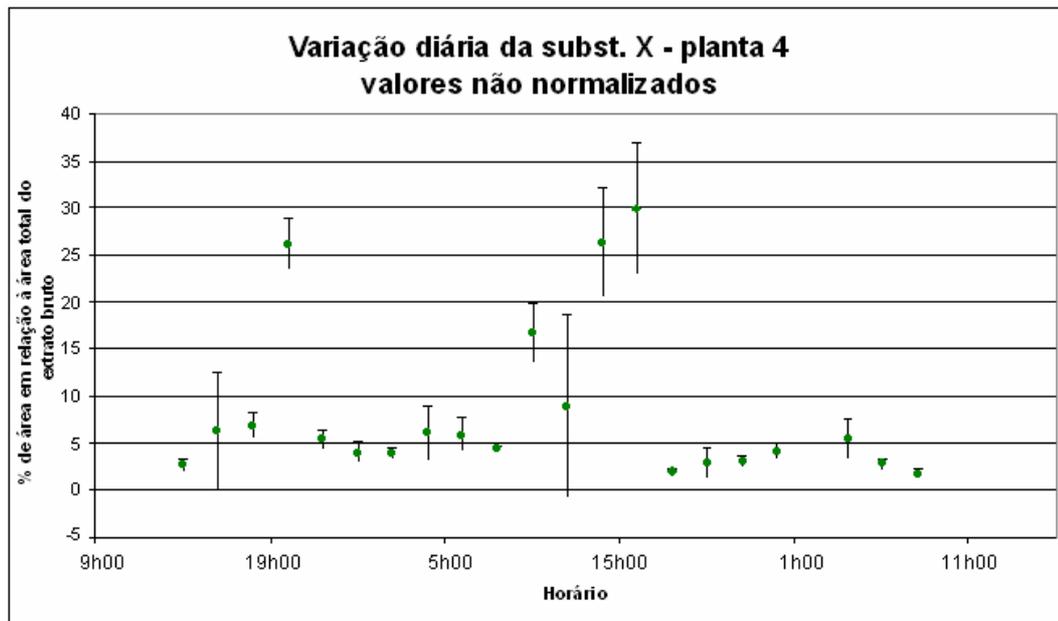
A planta 4 mostrou oscilações temporais nos metabólitos com pequena amplitude assumindo valores entre 28% e 42% da área total e que se ajustam menos à equação polinomial de sexto grau. Variações circadianas nesse caso já são menos evidentes. Para o apiol/dilapiol, a frequência de oscilação é de aproximadamente 24 horas, com teores máximos por volta das cinco horas da manhã, e concentrações menores por volta das dezessete horas (fig. 4.40.).





**Figura 4.41.** Variação diária das porcentagens médias de grandisina com barras de erro e curva de tendência (indicada pelo tracejado marrom) na planta 4.

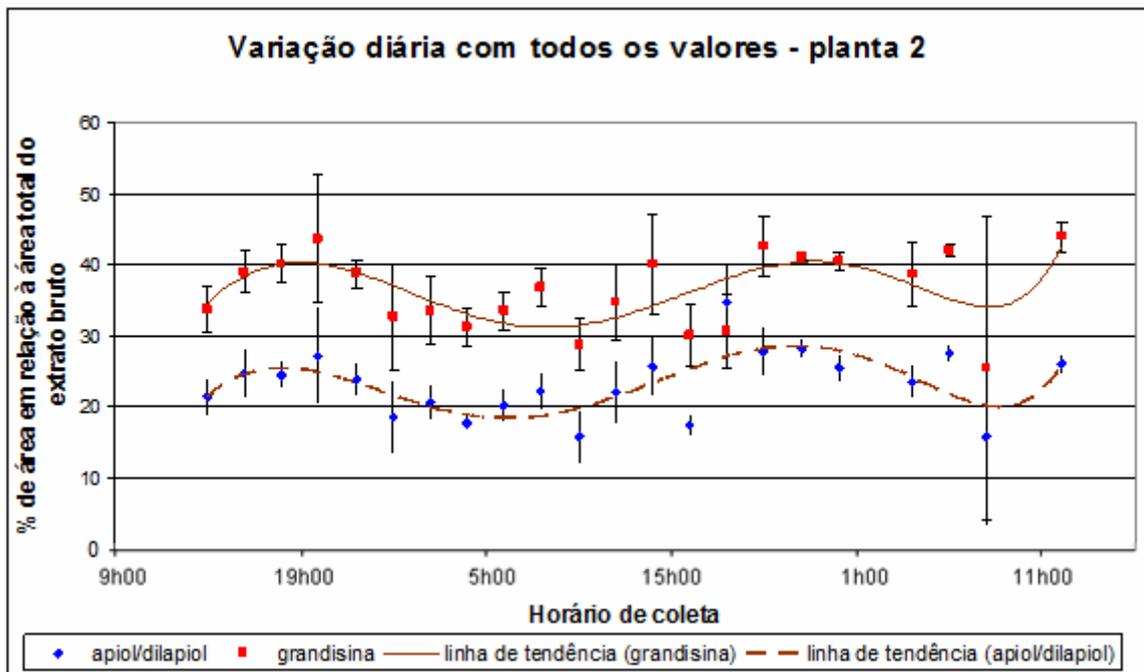
A substância X, de modo semelhante às plantas 2 e 3, não mostrou variação temporal circadiana tendo um aumento de concentração na manhã do segundo dia de amostragem (fig. 4.42.).



**Figura 4.42.** Variação diária das porcentagens médias com as respectivas barras de erro da substância X na planta 4.

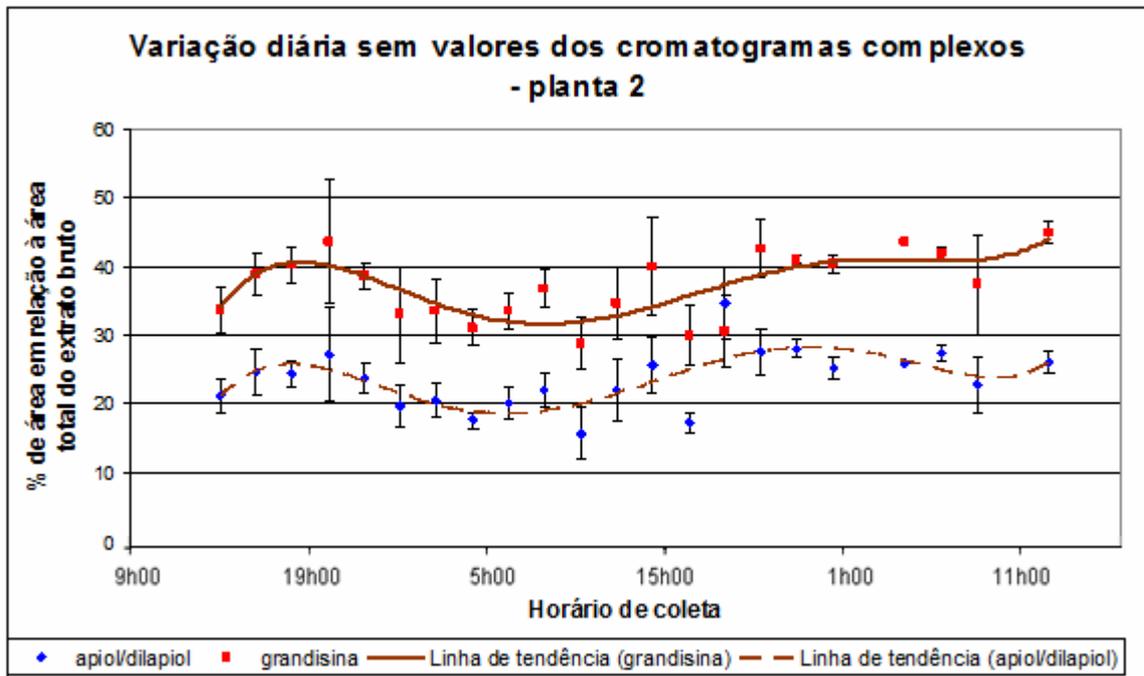
Avaliou-se também o tipo de alteração que poderia ocorrer nos gráficos de variação temporal se fossem excluídos os dados dos cromatogramas de perfil mais complexo, ponderando que o aumento de teor de outros metabólitos no extrato bruto deve-se a fatores bióticos e abióticos não diretamente relacionados a mudanças temporais, conforme considerações apresentadas no início dessa seção.

A figura 4.43. apresenta a variação temporal das porcentagens de área média dos metabólitos apiol/dilapiol e grandisina na planta 2 calculados com todos os dados coletados e suas respectivas linhas de tendência (função polinomial de sexto grau), conforme já foi apresentado anteriormente.



**Figura 4.43.** Variação diária das porcentagens de área média calculadas com todos os valores experimentais na planta 2.

A figura 4.44. mostra a variação temporal na planta 2 desconsiderando os dados dos cromatogramas que foram classificados como de perfil mais complexo.



**Figura 4.44.** Variação diária das porcentagens de área média calculadas desconsiderando os valores oriundos dos cromatogramas de perfil metabólico mais complexo na planta 2.

Como foram retirados aproximadamente 20% dos valores, alguns pontos não sofreram alterações. Naqueles cuja média foi alterada, o desvio padrão diminuiu, como se observa no ponto referente ao horário de coleta do meio dia do segundo dia. As oscilações, contudo, não sofreram mudanças que alterassem os momentos de máximo e de mínimo dos teores de metabólitos, como mostram as linhas de tendência. Observa-se apenas uma diminuição da amplitude naquele gráfico em que se retiraram os dados dos cromatogramas mais complexos. Os gráficos de oscilação temporal das plantas 3 e 4 também não variaram de modo significativo. Apesar de o estudo interfolhas mostrar que o teor de metabólitos nesses tecidos de perfil cromatográfico mais complexo ser significativamente menor, esse conjunto de folhas não se mostrou estatisticamente relevante para provocar alterações importantes.

A tabela 4.12. resume os horários de máximos e mínimos das plantas 2, 3 e 4 para os dois metabólitos.

**Tabela 4.12.** Horários de máxima e de mínima concentração dos metabólitos apiol/dilapiol e grandisina no extrato bruto para as plantas 2, 3 e 4.

	<b>Planta 2</b>	<b>Planta 3</b>	<b>Planta 4</b>
Horário de teor máximo de apiol/dilapiol	20h00	Não apresentou variação circadiana	05h00
Horário de teor mínimo de apiol/dilapiol	08h00		17h00
Horário de teor máximo de grandisina	20h00	20h00	22h00
Horário de teor mínimo de grandisina	08h00	08h00	10h00

Nessa população, as oscilações nas quantidades relativas dos metabólitos não são muito evidentes apresentando-se com baixa amplitude, sendo esta da mesma ordem de grandeza dos desvios padrão. O metabólito grandisina atinge picos de máxima concentração no início da noite, e picos de mínima concentração no início da manhã. Já o apiol/dilapiol não apresenta alteração temporal uniforme entre os indivíduos, sendo que há indícios de variação circadiana entre duas plantas que ocorre com fase inversa.

Apesar de se constatar a ocorrência de variações circadianas em *Piper solmsianum*, há necessidade de se realizar experiências em livre-curso (acompanhamento temporal em situações de claro ou escuro constantes) para verificar se essas oscilações são reguladas por relógio biológico.

Verificou-se a ocorrência de um pico no início do cromatograma, região de maior polaridade, cuja porcentagem de área em relação à área total do extrato bruto sofreu grandes oscilações ao longo dos dois dias de medida. O(s) composto(s) responsáveis por essa variação, que não foi(ram) identificado(s), não variou(am) de modo periódico, mas ocorreu(am) nas três plantas de modo similar atingindo máximo valor na manhã do segundo dia de análise. Há um pico com mesmo tempo de

retenção no cromatograma das raízes de *P. solmsianum*, contudo há necessidade de posterior confirmação se se trata da(s) mesma(s) substância(s).

Provavelmente um fator exógeno de ocorrência pontual seja o responsável por essa alteração, e que não está relacionada a questões individuais, como ataque de patógenos, mas fatores que afetam igualmente uma população, como alterações climáticas. A única mudança no tempo foi um período de chuva no início da noite do primeiro dia, e que continuou até a última coleta. Existem estudos que verificaram a relação entre ocorrência de chuvas e alterações quantitativas em metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Todavia o aumento no teor desse(s) composto(s) ocorreu horas depois do início da chuva, e diminuiu mesmo com a continuidade dessa fragilizando essa hipótese. Estudos posteriores necessitariam ser executados para examinar a(s) provável(is) causa(s) desse aumento.

#### 4.7. Variação sazonal

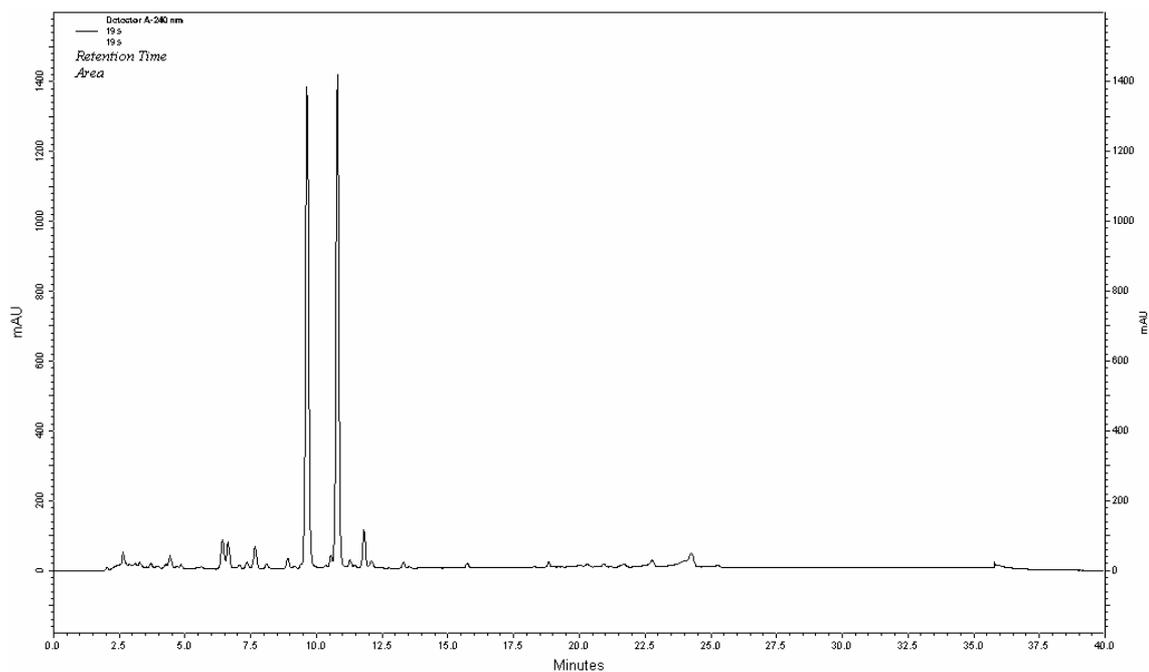
As coletas foram feitas em dias não chuvosos durante o ano de 2007, e a temperatura do ar atingiu valores entre 16°C e 25°C (tab. 4.13.).

**Tabela 4.13.** Temperatura do ar durante as coletas para estudo sazonal.

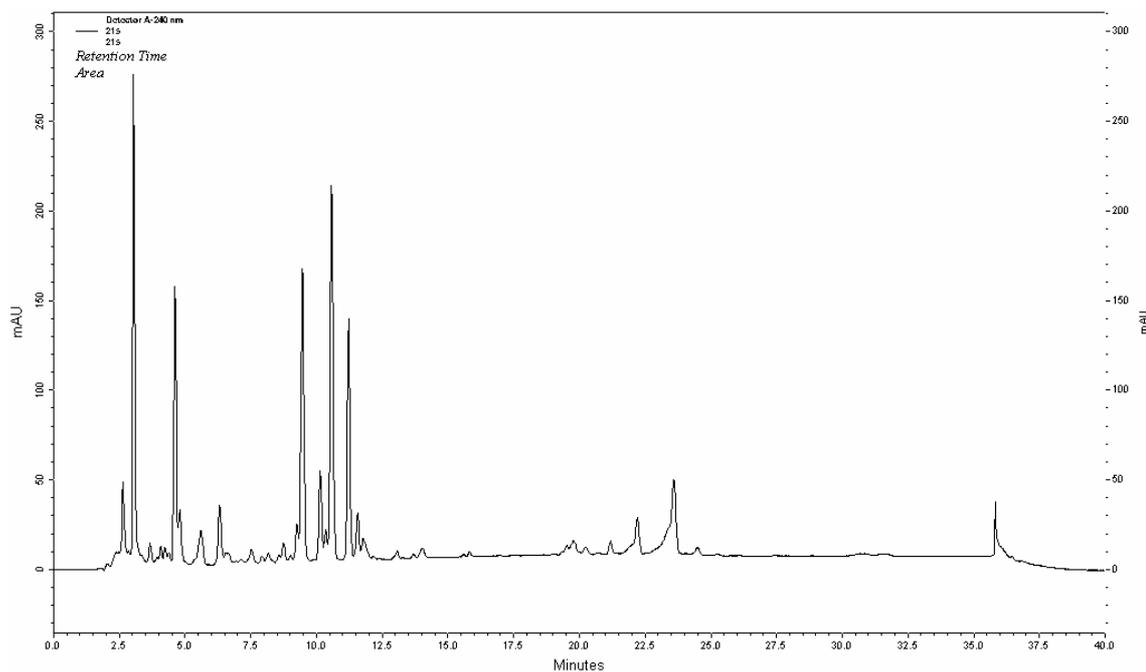
Data de coleta	12 de janeiro	09 de fevereiro	09 de março	06 de abril	11 de maio	08 de junho	13 de julho	10 de agosto	14 de setembro	05 de outubro	09 de novembro	07 de dezembro
Temperatura do ar (°C)	22	20	21	19	25	22	19	22	20	16	23	19

Em quase todos os cromatogramas obtidos nesse estudo há a presença dos metabólitos apiol/dilapiol e grandisina como picos majoritários na qual a soma das porcentagens de área desses compostos é maior do que 50% da área total do extrato bruto. Esse perfil metabólico já foi observado nos estudos de variação diária e interfolhas, e que foi chamado de simples, segundo considerações feitas nas seções 4.4., 4.5. e 4.6.

Nesse estudo sazonal, os cromatogramas classificados como tendo perfil mais complexo perfazem apenas 5% do total, enquanto que nos estudos anteriores esse tipo de perfil compôs até 20% do total. A figura 4.45. apresenta um exemplo de cromatograma com perfil mais simples, e a figura 4.46. apresenta um exemplo de perfil mais complexo.



**Figura 4.45.** Cromatograma da amostra número 19 e que apresenta perfil mais simples.



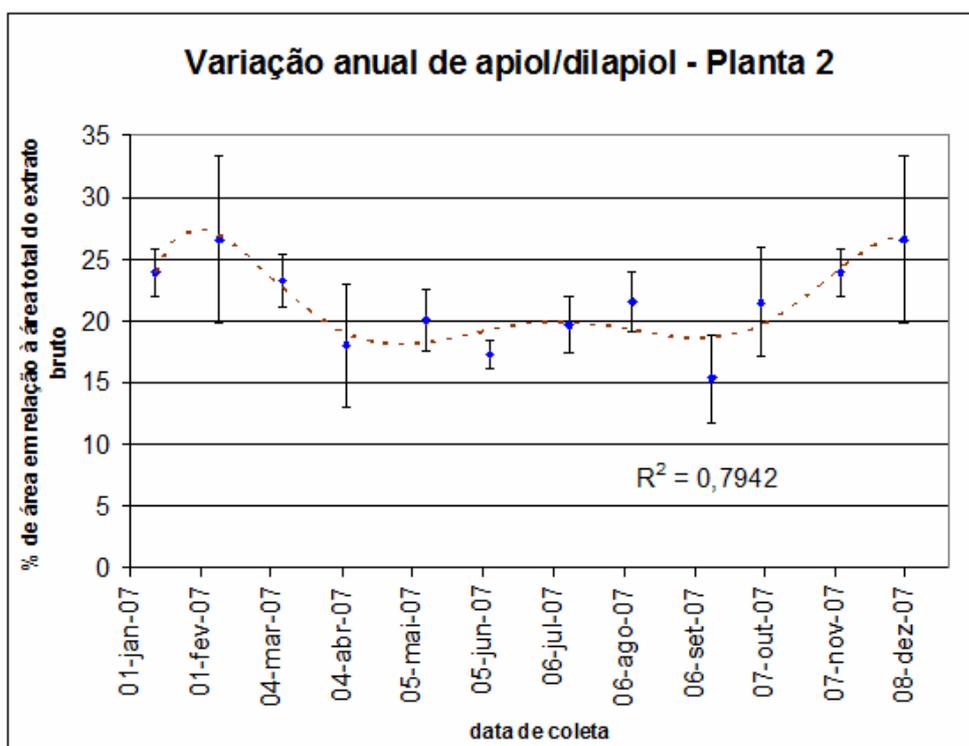
**Figura 4.46.** Cromatograma da amostra número 21 e que apresenta perfil mais complexo.

Considerando que tecidos com maior teor de outros metabólitos podem indicar resposta da planta ao ataque de patógenos, essa diferença de incidência pode ser atribuída ao maior ou menor cuidado com que as folhas foram escolhidas.

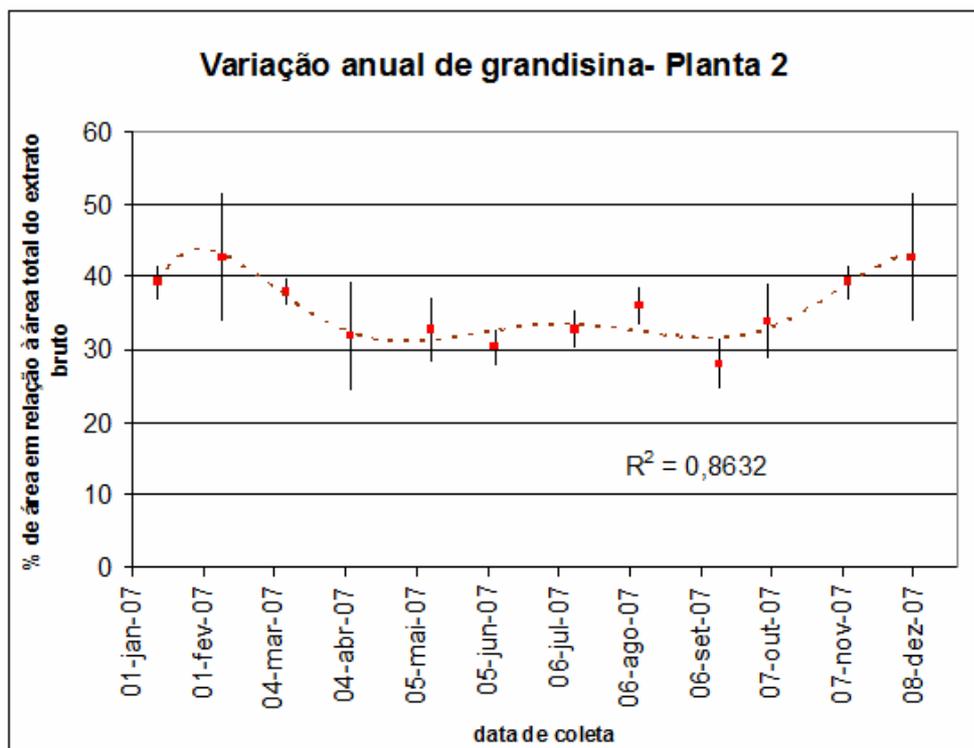
Nos estudos diários muitas coletas foram feitas em condições adversas, como chuva e escuridão, portanto a seleção dos tecidos não foi muito criteriosa. Mesmo folhas com algum sinal de predação ou manchadas foram selecionadas. No estudo sazonal as amostragens sempre foram feitas em condições de maior claridade e tempo seco havendo mais rigor na seleção das amostras, portanto, indícios de ataque por insetos ou presença de patógenos orientavam a não coleta do tecido.

O apêndice III reúne os dados desse estudo: data e hora da coleta, largura e comprimento da folha, massa fresca e porcentagem de área de apiol/dilapiol e grandisina em relação à área total do extrato bruto. Não foi avaliada a substância X, cujo pico apresenta tempo de retenção médio de 3,13 minutos, porque não houve aumento médio significativo na porcentagem de área desse(s) composto(s) em nenhum dos três espécimes como ocorreu durante o segundo estudo de variação diária, apresentada na seção anterior.

As figuras 4.47. e 4.48. apresentam a variação anual média das porcentagens das áreas de apiol/dilapiol e da grandisina na planta 2. A amplitude das variações não é acentuada, e os maiores teores dos metabólitos estão no início e no final do ano, correspondente ao verão, e os menores valores se situam no meio do ano entre os meses de maio e setembro. Em todos os gráficos, as linhas de tendência que apresentaram os melhores ajustes (maiores valores de  $R^2$ ) também foram geradas a partir de funções polinomiais de sexto grau.



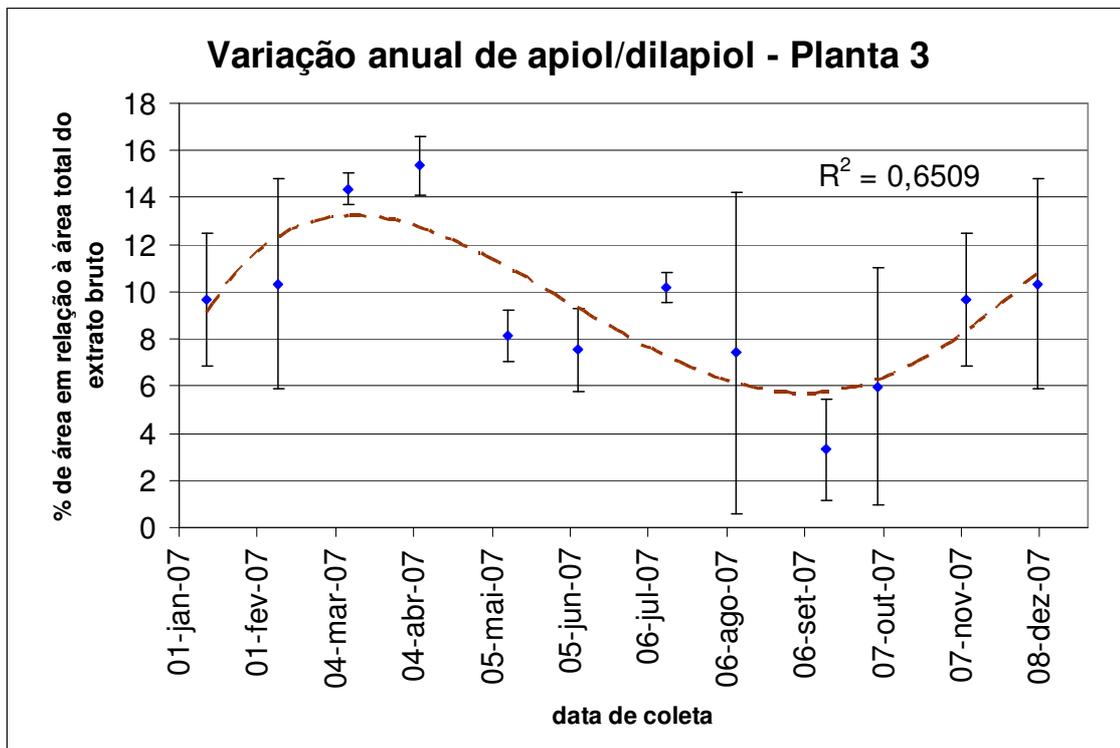
**Figura 4.47.** Variação anual das porcentagens médias com barras de erro e linha de tendência (em marrom) para o apiol/dilapiol na planta 2.



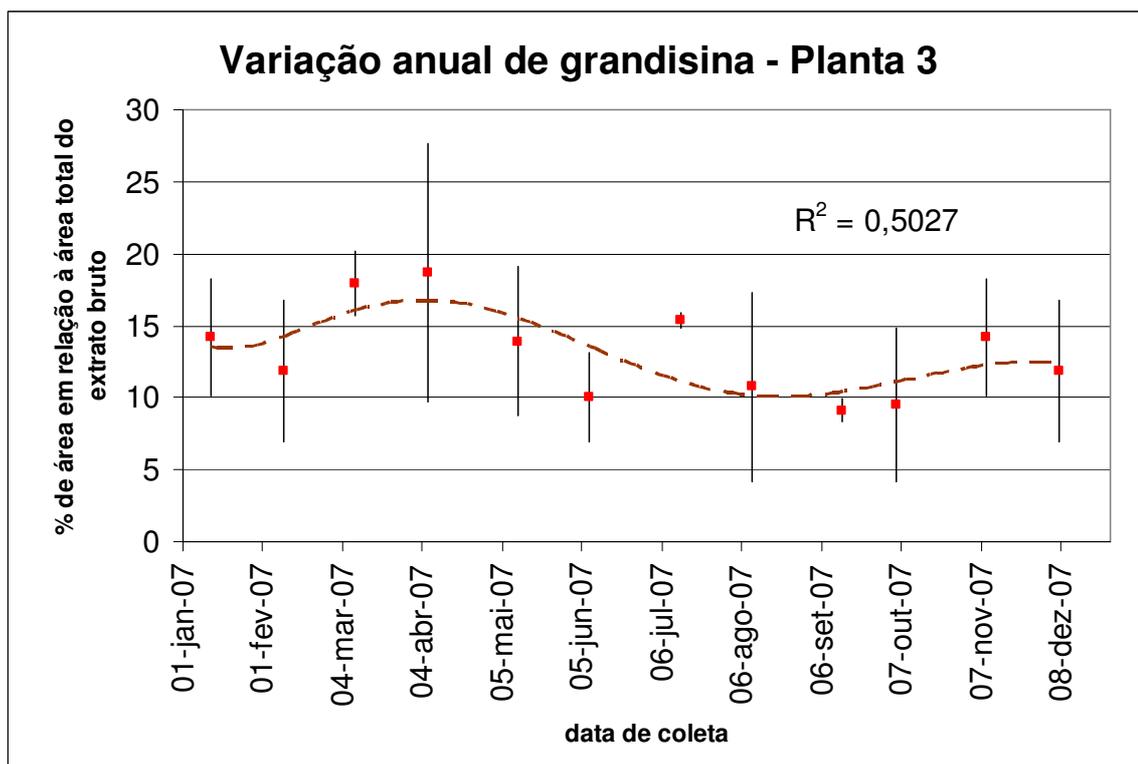
**Figura 4.48.** Variação anual das porcentagens médias com barras de erro e linha de tendência (em marrom) para a grandisina na planta 2.

As figuras 4.49. e 4.50. apresentam as variações anuais dos metabólitos apiol/dilapiol e grandisina na planta 3. Nos dois gráficos há pontos em que os desvios padrão são muito grandes apresentando a mesma magnitude que a intensidade da oscilação temporal, e um padrão sazonal não é claramente evidente. As oscilações dos metabólitos apresentam a mesma fase, mas a amplitude no apiol/dilapiol é maior do que a da grandisina.

As linhas de tendência mostram um decréscimo médio dos teores tanto de grandisina quanto de apiol/dilapiol no início da primavera (meses de setembro e outubro), e máxima concentração no início do outono (meses de março e abril).



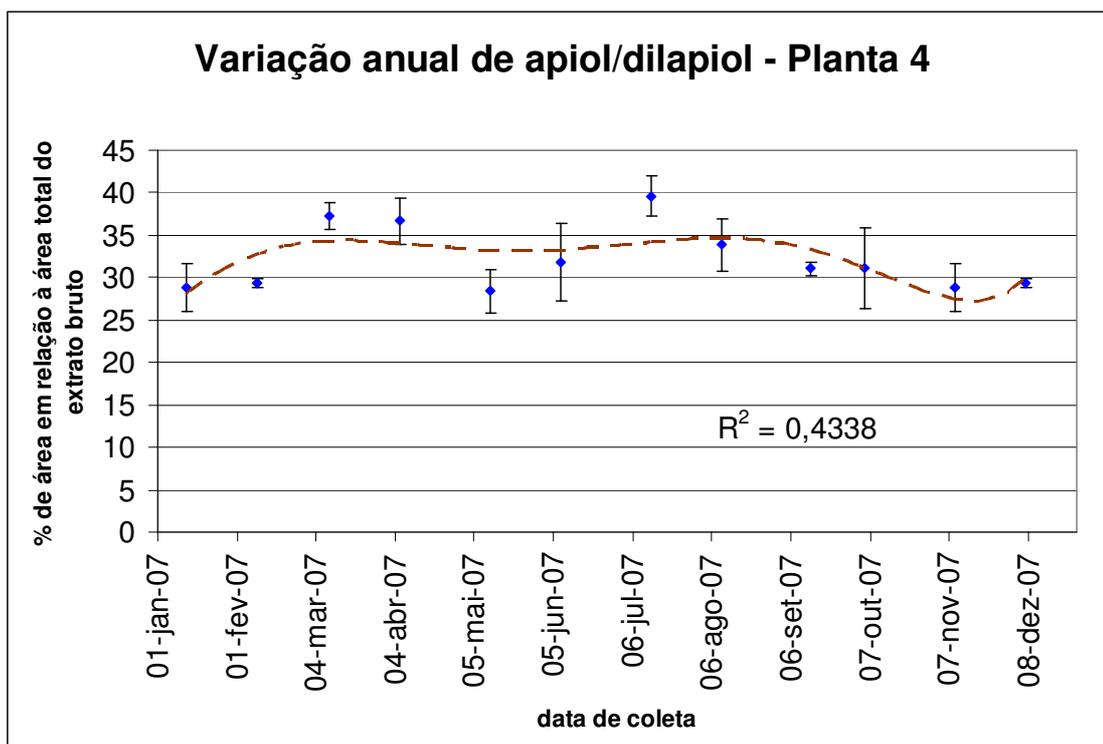
**Figura 4.49.** Variação anual das porcentagens médias com barras de erro e linha de tendência (em marrom) para o apiol/dilapiol na planta 3.



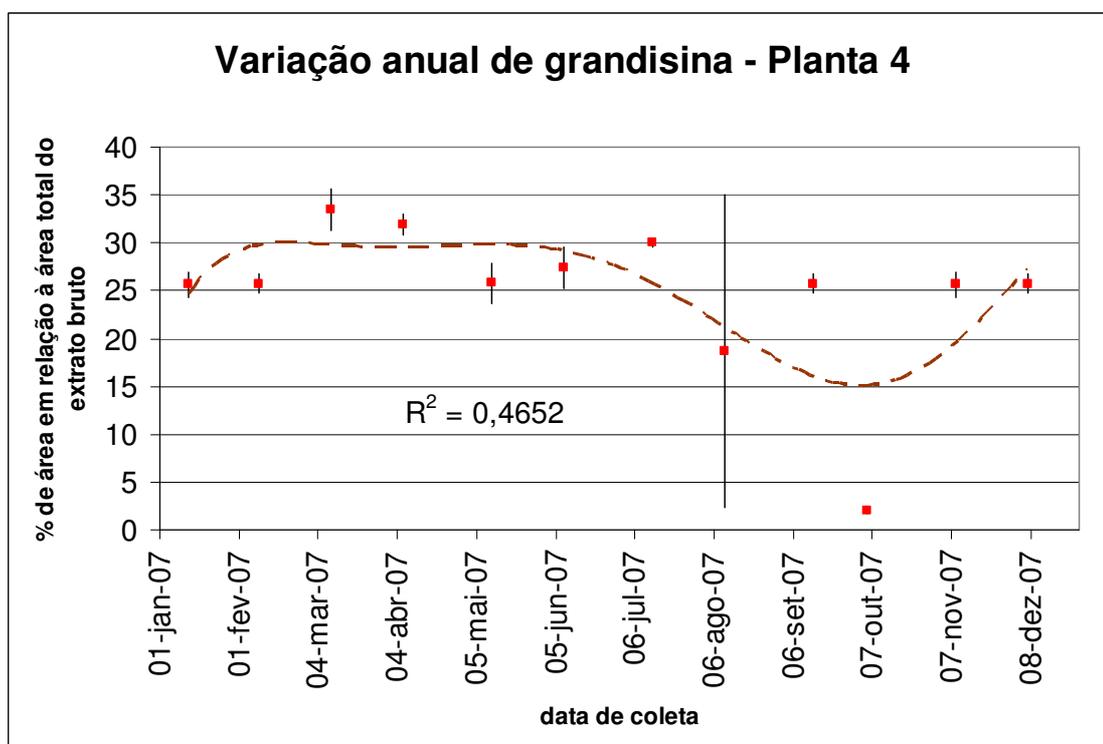
**Figura 4.50.** Variação anual das porcentagens médias com barras de erro e linha de tendência (em marrom) para a grandisina na planta 3.

Na planta 4 os desvios padrão são em geral baixos. Para o metabólito apiol/dilapiol, a linha de tendência não apresenta oscilação significativa, sendo praticamente constante ao longo de todo o ano. O metabólito grandisina também apresentou oscilação pouco expressiva. Há um decréscimo da linha de tendência no mês de outubro, pois o ponto correspondente apresenta valor médio de área muito inferior aos outros. Essa abrupta diminuição pode não ser representativa, visto que os pontos adjacentes apresentam valores muito maiores.

Esse espécime, ao contrário dos outros dois, não apresentou indícios evidentes de variação sazonal. As médias dos metabólitos mantiveram-se praticamente constante ao longo do ano, e como os desvios padrão são baixos, pode-se considerar esse comportamento consistente entre os tecidos amostrados.



**Figura 4.51.** Variação anual das porcentagens médias com barras de erro e linha de tendência (em marrom) para o apiol/dilapiol na planta 4.



**Figura 4.52.** Variação anual das porcentagens médias com barras de erro e linha de tendência (em marrom) para a grandisina na planta 4.

A tabela 4.14. resume os dados apresentados.

**Tabela 4.14.** Épocas do ano de máxima e de mínima concentração dos metabólitos apiol/dilapiol e grandisina no extrato bruto para as plantas 2, 3 e 4.

	Planta 2	Planta 3	Planta 4
Época com teor mínimo de apiol/dilapiol	maio até setembro	agosto setembro	não foi verificada variação anual
Época com teor máximo de apiol/dilapiol	dezembro até fevereiro	março abril	
Época com teor mínimo de grandisina	maio até setembro	agosto setembro	
Época com teor máximo de grandisina	dezembro até fevereiro	março abril	

Porque os três indivíduos apresentam comportamento anual muito distinto, não deve haver correlação importante entre a temperatura do ar e o teor de metabólito apiol/dilapiol e grandisina nas folhas.

Como não foram feitas coletas durante dois anos seguidos, já que a amostragem foi restrita ao ano de 2007, não há possibilidade de se verificar se esses comportamentos são periódicos ou pontuais. Assim, mesmo com as oscilações temporais verificadas nas plantas 2 e 3, a falta dessa continuidade no estudo não permite afirmar se são ou não variações sazonais, ou seja, fenômenos cíclicos (Eriksson e Millar, 2003).

## **5. CONCLUSÕES**

As variações intraespecíficas e temporais (diária e anual) das concentrações relativas dos metabólitos secundários de média polaridade na espécie *Piper solmsianum* foram estudadas a partir da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto de tecidos como folhas, caules e inflorescências em indivíduos selvagens coletados em diferentes populações - análise de variação intraespecífica, ou em uma mesma população natural da Reserva Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira (RCUASO) - análise de variação temporal.

### **5.1. - Metodologia**

A metodologia cromatográfica adotada baseada em CLAE se mostrou reprodutível em termos das relações entre as áreas dos picos cromatográficos e o tempo de retenção, sendo que esses parâmetros foram avaliados com a injeção de uma mistura padrão de grandisina e licarina B intercaladas com as amostras durante as seqüências de análise.

A definição dos protocolos de extração para os estudos de variação temporal indicou alterações nas quantidades relativas dos metabólitos secundários. No primeiro estudo de variação diária a retirada de água dos tecidos frescos foi feita com liofilização, e no segundo estudo e no estudo sazonal, usando uma mistura metanol:água e posterior partição com diclorometano. Nos estudos de variação intraespecífica, os extratos brutos foram obtidos em extrator do tipo Soxhlet.

### **5.2. - Variação Intraespecífica**

Indivíduos coletados em diferentes populações de *P. solmsianum* apresentaram variações quantitativas significativas entre os sete metabólitos

principais (apiol, dilapiol, miristicina, elemicina, isoelemicina, grandisina e lignana 7). Nenhum dos compostos foi detectado em todos os indivíduos, mesmo comparando-se dois indivíduos coletados em uma mesma população. Todos os cromatogramas eram dominados por um, dois ou três picos que compunham mais da metade da área total, e que podiam ser descritos como um perfil cromatográfico simples. Alguns indivíduos apresentaram quantidades significativas de metabólitos secundários não identificados. Comparando-se os tecidos folha e caule da mesma planta, o grau de similaridade é bem maior.

### **5.3. - Variação diária e sazonal**

Quatro espécimes pertencentes a uma única população de plantas selvagens presente na RCUASO foram escolhidos para os estudos de variação diária e sazonal. O conjunto de cromatogramas obtidos para as folhas desses indivíduos pode ser dividido em dois tipos. No primeiro tipo, mais comum, o perfil cromatográfico exibe dois picos majoritários, de apiol/dilapiol e grandisina, cujas áreas somadas perfazem mais da metade da área total do cromatograma. No segundo grupo, de ocorrência mais restrita, o perfil cromatográfico é mais complexo sobressaindo-se vários picos. Considerando-se que casos desse tipo apareceram nos quatro indivíduos indistintamente, e em momentos esparsos do dia, tais variações foram atribuídas a fatores abióticos e bióticos, como reação do tecido à predação.

No primeiro estudo de variação diária foram coletadas de cada planta uma folha, um trecho de caule e uma inflorescência em cada horário. Mas a amostragem foi estatisticamente insuficiente revelando a necessidade de uma nova coleta em triplicata. Desse primeiro estudo houve indícios de que as plantas não apresentavam

comportamento homogêneo, com oscilações temporais entre tecidos de um mesmo indivíduo, ou entre indivíduos, muito distintas em termos de amplitude ou fase.

O segundo estudo de variação diária reforçou os indícios dessa não homogeneidade de comportamento. As diferenças foram grandes para o metabólito apiol/dilapiol, sendo que um dos espécimes teve máximo de concentração por volta das oito horas da noite e mínimo por volta das oito horas da manhã, no outro indivíduo a concentração máxima ocorreu por volta das cinco horas da manhã e o teor mínimo ocorreu por volta das cinco horas da tarde, e no terceiro indivíduo não havia sinais claros de periodicidade na variação temporal. Para o metabólito grandisina constatou-se maior semelhança sendo que nas três plantas a oscilação diária possuía perfil de variação diária com o teor máximo ocorrendo no início da noite, e o mínimo ocorrendo no início da manhã. Como não foram feitos estudos em condições de livre curso, não é possível afirmar se essas oscilações diárias são reguladas por relógio biológico.

Por volta da manhã do segundo dia de coleta do segundo estudo diária, houve um grande aumento e posterior decréscimo na concentração relativa de um composto cujo pico cromatográfico apresentou tempo de retenção baixo, e que não correspondia a nenhum dos sete metabólitos secundários usados como padrão (apiol, dilapiol, elemicina, isoelemicina, miristicina, grandisina e ligana 7). Sem indícios de ser uma variação com padrão periódico, este aumento súbito ocorreu nas três plantas e praticamente no mesmo momento. Essa mudança poderia ser explicada pela ocorrência de períodos de chuva no momento da coleta, mas os fatores responsáveis não foram devidamente investigados.

Os estudos de variação anual acentuaram essa percepção de não similaridade entre os indivíduos. Em um dos indivíduos não se observou oscilação significativa nas concentrações dos metabólitos secundários apiol/dilapiol e

grandisina, e no outro a amplitude não foi expressiva. Nas duas plantas que mostraram algum tipo de variação anual, os teores dos metabólitos secundários era menor no meio do ano (inverno) e maior no início/fim do ano (verão). Como as coletas foram feitas apenas no decorrer de um ano, não foi possível verificar se essas oscilações são periódicas, ou seja, possuem caráter sazonal.

De forma geral, constatou-se grandes alterações qualitativas e quantitativas nos metabólitos secundários de *P. solmsianum*. Assim, interferências externas podem alterar o perfil cromatográfico de um tecido em determinado momento de modo a mascarar as variações circadianas e sazonais controladas por relógio biológico e justificando a ausência de periodicidade nas variações temporais dos metabólitos secundários em alguns indivíduos. Contudo esses estudos permitiram verificar que mesmo alguns espécimes selvagens e, portanto, sujeito a fatores não controlados, possuem oscilações circadianas patentes bastante evidentes, e eventualmente controladas pelo relógio endógeno. Ou seja, em uma mesma população, cada indivíduo pode responder de modo muito distinto e de forma particular às pressões ambientais.

## **6. REFERÊNCIAS**

- Agerbirk, N.; Olsen, C. E.; Nielsen, J. K. 2001. Seasonal variation in leaf glucosinolates and insect resistance in two types of *Barbarea vulgaris* ssp. *arcuata*. *Phytochemistry*. 58: 91-100.
- Andrade, E. H.; Zoghbi, M. G.; Santos, A. S.; Maia, J. G. 1998. Essential oil of *Piper gauchaudianum* Kunth and *P. regnellii* (Miq.) C. D. C. *Journal of Essential Oil Research*. 10: 465-467.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG II). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141: 399-436.
- Araújo-Jr, J. X.; Cunha, E. V. L.; Chaves, M. C. O.; Gray, A. I. 1997. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 44: 559.
- Atkinson, P. e Blakeman, J. P. 1982. Seasonal occurrence of an antimicrobial flavanone, Sakuranetin associated with glands on leaves of *Ribes nigrum*. *New Phytologist*. 92: 63-74.
- Bednarek, P.; Scheneider, B.; Svatos, A.; Oldham, N. J.; Hahlbrock, K. 2005. Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenilpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Physiology Preview*. 10.1104/pp. 104.057794.
- Bennett, R. N. e Wallsgrave R. M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 127: 617-633.
- Berenbaum, M. R. 1983. Effects of tannins on growth and digestion in two species of papilionids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 34: 245-250.
- Berenbaum, M. R. 1995. The chemistry of defense: theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 2-8.

- Bergstrom, G.; Birgersson, G.; Groth, I.; Nilsson L. A. 1992. Floral fragrance disparity between three taxa of lady's slipper *Cypripedium calceolus* (orchidaceae). *Phytochemistry*. 31: 2315-2319.
- Berkov, S.; Sidjimova, B.; Evstatieva, L.; Popov S. 2004. Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*. 65: 579-586.
- Blumenthal, M.; Sing, N. Y. 1997. Pharmacology of kava and its constituents. *HerbalGram*. 39: 50-56.
- Boege, K. e Dirzo, R. 2005. Intraspecific variation in growth, defense and herbivory in *Dalium guianense* (Caesalpiniaceae) mediated by edaphic heterogeneity. *Plant Ecology*. 175: 59-69.
- Bohatch Junior, M. S.; Silva, R. Z.; Esmerino, L. A.; Volpato, A. M. M. 2007. Estudos preliminares do tratamento de infecção urinária utilizando extratos vegetais de *Piper solmsianum* e *Equisetum arvense*. Comunicação oral. VII Encontro de Pós-graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa (VII EPUEPG)
- Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S; Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161: 839-851.
- Bryant, J. P.; Chapin III, F. S.; Klein, D. R. 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*. 40: 357-368.
- Cabral, M. M. O.; Alencar, J. A.; Guimarães, A. E.; Kato, M. J. 2008. Larvicidal activity of grandisin from *Piper solmsianum* C.DC against *Aedes aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. (no prelo)
- Campos, M. P.; Cechinel Filho, V.; Silva, R. Z.; Yunes, R. A.; Monache, F. D.; Cruz, A. B. 2007. Antibacterial activity of extract, fractions and four compounds extracted from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). *Zeitschrift für Naturforschung - A Journal of Biosciences*. 62c: 173-178

- Castells, E.; Roumet, C.; Peñuelas, J.; Roy, J. 2002. Intraspecific variability of phenolic concentrations and their responses to elevated CO<sub>2</sub> in two Mediterranean perennial grasses. *Environmental and Experimental Botany*. 47: 205-216.
- Chapin III, F. S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 11: 233-260.
- Coley, P. D.; Bryant, J. P.; Chapin, F. S. 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*. 230: 895-899.
- Covelo, F. e Gallardo, A. 2004. Green and senescent leaf phenolics showed spatial autocorrelation in a *Quercus robur* population in northwestern Spain. *Plant and Soil*. 259: 267-276.
- Covelo, F.; Gallardo, A. 2001. Temporal variation in total leaf phenolics concentration of *Quercus robur* in forested and harvested stands in northwestern Spain. *Canadian Journal of Botany*. 79: 1262-1269.
- Cronin, G. e Lodge, D. M. 2003. Effects of light and nutrient availability on the growth, allocation, carbon/nitrogen balance, phenolic chemistry, and resistance to herbivory of two freshwater macrophytes. *Oecologia*. 137: 32-41.
- Curado, M. A.; Oliveira, C. B. A.; Jesus, J. G.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Ferri, P. H. 2006 Environmental factors influence on chemical polymorphism of essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*. 67: 2363-2369.
- De Candolle, C. 1866. *Piperaceae*. In: *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetali*, 16 (1), 245-571.
- Demain, A. L. e Fang, A. 2000. The natural functions of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 69: 1-39.
- Dietz, K. J. 1989. Leaf and chloroplast development in relation to nutrient availability. *Journal of Plant Physiology*. 134: 544-550.

- Dötterl, S.; Wolfe, L. M.; Jürgens, A. 2005. Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. *Phytochemistry*. 66: 203-213.
- Eriksson, M. E. e Millar, A. J. 2003. The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world. *Plant Physiology*. 132: 732-738.
- Estiarte, M.; Filella, I.; Serra, J.; Peñuelas, J. 1994. Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Oecologia*. 99: 387-391.
- Estiarte, M.; Peñuelas, J.; Kimball, B. A.; Hendrix, D. L.; Pinter Jr., P. J.; Wall, G. W.; LaMorte, R. L.; Hunsaker, D. J. 1999. Free-air CO<sub>2</sub> enrichment of wheat: leaf flavonoid concentration throughout the growth cycle. *Physiologia Plantarum*. 105: 423-437.
- Faini, F.; Labbé, C.; Coll, J. 1999. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27: 673-679.
- Feibert, E. B. e Langenheim, J. H. 1988. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorfii*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochemistry*. 27: 2527-2532.
- Felippe, L. G.; Baldoqui, D. C.; Kato, M. J.; Bolzani, V. S.; Guimarães, E. F.; Cicarelli, R. M. B.; Furlan, M. 2008. Tetrahydropuran lignans from *Peperomia blanda*. *Phytochemistry*. 69: 445-450.
- Figueiredo, R. C.; Gregório, Z. M. O.; Albuquerque, S.; Souza, A. M. 2005. Effects of grandisin on hematopoiesis in mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41: 85.
- Fox, L. R. 1981. Defense and dynamics in plant-herbivore systems. *American Zoologist*. 21: 853-864.
- Gerhold, H. e Plank, G. H. 1970. Monoterpene variations in vapors from white pines and hybrids. *Phytochemistry*. 9: 1393-1398.

- Gershenzon, J. e Mabry, T. J. 1984. Sesquiterpene lactones from a texas population of *Helianthus maximiliani*. *Phytochemistry*. 23: 1959-1966.
- Gobbo-Neto, L. e Lopes, N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 30: 374-381.
- Gottlieb, O. R. 1990. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry*. 29:1715-1724.
- Gottlieb, O. R.; Borin, M. R. B. B.; Brito, N. R. 2002. Integration of ethnobotany and phytochemistry dream or reality? *Phytochemistry*. 60: 145-152.
- Greger, H.; Pacher, T.; Vajrodaya, S.; Bacher, M.; Hofer, O. 2000. Intraspecific variation of sulfur-containing bisamides from *Aglaia leptantha*. *Journal of Natural Products*. 63: 616-620.
- Hadacek, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assesment and future pespectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21: 273-322.
- Harborne, J. B. 1988. Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Progress in Clinical and Biological Research*. 280:17-27.
- Harborne, J. B. 1993. Advances in Chemical Ecology. *Natural Products Reports*. 10: 327-348.
- Harmer, S. L.; Hogenesch, J. B.; Straume, M.; Chang, H.; Han, B.; Zhu, T.; Wang, X.; Kreps, J. A; Kay, S. A. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*. 290: 2110-2113.
- Hermes, D. A. e Mattson, W. J. 1992 The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*. 67: 283-335.
- Herms, D. A. 2002. Effects of fertilization on insect resistance of woody ornamental plants: reassessing an entrenched paradigm. *Environmental Entomology*. 31: 923-933.

- Heupel, R. C. 1985. Varietal similarities and differences in the polycyclic isopentenoid composition of sorghum. *Phytochemistry*. 24: 2929-2937.
- Høgedal, B. D. e Mølgaard, P. 2000. HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 28: 949-962.
- Holloway, D. e Scheinmann, F. 1974. Two lignans from *Litsea grandis* and *L. gracilipes*. *Phytochemistry*. 13: 1233-1236.
- Horner, J. D.; Cates, R. G.; Gosz, J. R. 1993. Effects of resource manipulation on the correlation between total phenolics and astringency in Douglas-fir. *Journal of Chemical Ecology*. 19: 1429-1437.
- Hunter, M. D.; Malcolm, S. B.; Hartley, S. E. 1996. Population-level variation in plant secondary chemistry, and the population biology of herbivores. *Chemoecology*. 7: 45-56.
- Iason, G. R.; Lennon, J. J.; Pakeman, R. J.; Thoss, V.; Beaton J. K.; Sim, D. A.; Elston, D. A. 2005. Does chemical composition of individual Scots pine trees determine the biodiversity of their associated ground vegetation? *Ecology Letters*. 8: 364-371.
- Ishida, N.; Kaneko, M.; Allada, R. 1999. Biological clocks. *Proceedings of National Academy of Science of United States of America*. 96: 8819-8820.
- Izhaki, I.; Tsahar, E.; Paluy, I.; Friedman, J. 2002. Within population variation and interrelationships between morphology, nutritional content, and secondary compounds of *Rhamnus alaternus* fruits. *New Phytologist*, 156: 217-224.
- Jaramillo, M. A. e Manos, P. S. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*. 88: 706-716.
- Joly, A.B. 1985. Introdução à Taxonomia Vegetal, Ed. Nacional, São Paulo.

- Jones, C. G. e Firn, R. D. 1991. On the Evolution of Plant Secondary Chemical Diversity [and Discussion]. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 333: 273-280.
- Kaplan, M. A. C.; Figueiredo, M. R.; Gottlieb, O. R. 1983. Variation in cyanogenesis in plants with season and insect pressure. *Biochemical Systematics and Ecology*. 11: 367-370.
- Kato, M. J.; Furlan, M. 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry*. 4: 529-538.
- King, D. J.; Gleadow, R. M.; Woodrow, I. E. 2004. Terpene deployment in *Eucalyptus polybractea*; relationships with leaf structure, environmental stresses, and growth. *Functional Plant Biology*. 31: 451-460.
- Kliebenstein, D. J. 2004. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinged glasses. *Plant, Cell and Environment*. 27: 675-684.
- Koricheva, J.; Larsson, S. Haukioja, E; Keinanen, M. 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. *Oikos*. 83: 212-226.
- Kraus, T. E. C.; Zasoski, R. J.; Dahlgren, R. A. 2004. Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil*. 262: 95-109.
- Kuroyanagi, M.; Yoshida, K.; Yamamoto, A.; Miwa, M. 2000. Bicyclo[3.2.1]octane and 6-Oxabicyclo[3.2.2]nonane type neolignans from *Magnolia denudata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 48: 832-837.
- Kutchan, T. M. 2001. Ecological arsenal and development dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*. 125: 58-60.

- Laitinen, M. L.; Julkunen-Tiitto, R.; Yamaji, K.; Heinonen, J.; Rousi, M. 2004. Variation in birch bark secondary chemistry between and within clones: implications for herbivory by hares. *Oikos*. 104: 316-324.
- Laitinen, M.; Julkunen-Tiitto, R.; Rousi, M. 2000. Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *Journal of Chemical Ecology*. 26: 1609-1622.
- Lavola, A.; Julkunen-Tiitto, R.; de la Rosa, T. M.; Lehto, T.; Aphalo, P. J. 2000. Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO<sub>2</sub> exposure. *Physiologia Plantarum*. 109: 260-267.
- Lawler, I. R.; Foley, W. J.; Eschler B. M. 2000. Foliar concentration of a single toxin creates habitat patchiness for a marsupial folivore. *Ecology*. 81: 1327-1338.
- Levin, D. A., e York, B. M. 1978. The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. *Biochemical Systematics and Ecology*. 6:61-76.
- Lincoln, D. E.; Langenheim, J.H. 1978. Effect of light and temperature on monoterpenoid yield and composition in *Satureja douglasii*. *Biochemistry Systematic Ecology*. 21:21-32.
- Lindroth, R. L.; Roth, S.; Nordheim, E. V. 2001. Genotypic variation in response of quaking aspen (*Populus tremuloides*) to atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment. *Oecologia*. 126: 371-379.
- Loivamäki, M.; Louis, S.; Cinege, G.; Zimmer, I.; Fischbach, R. J.; Schnitzler, J. 2007. Circadian rhythms of isoprene biosynthesis in Grey Poplar leaves. *Plant Physiology*. 143: 540-551.
- Loomis, W. E. 1932. Growth-differentiation balance vs. carbohydrate-nitrogen ratio. *Proceedings of American Society of Horticulture Science*. 29: 240-245.

- Lopes, N. P.; Blumenthal, E. E. A.; Cavaleiro, A. J.; Kato, M. J.; Yoshida, M. 1996. Lignans,  $\gamma$ -lactones and propiophenones of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*. 43: 1089-1092.
- Lopes, N. P.; Chicaro, P.; Albuquerque, S.; Kato, M. J.; Yoshida, M. 1998. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica*. 64: 667-669.
- Lorio, P. 1986. Growth-differentiation balance: a basis for understanding southern pine beetle-tree interactions. *Forest Ecology and Management*. 14: 259-273.
- Lower, S. S.; Orians, C. M. 2003. Soil nutrients and water availability interact to influence willow growth and chemistry but not leaf beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 107: 69-85.
- Luxmoore, R. 1991. A source-sink framework for coupling water, carbon, and nutrient dynamics of vegetation. *Tree Physiology*. 9:267-280.
- MacElroy, J. S.; Kopsell, D. A.; Sorochan, J. C.; Sams, C. E. 2006. Response of creeping bentgrass carotenoid composition to high and low irradiance. *Crop Science*. 46: 2606-2612.
- Magalhães, M. N. e Lima, A. M. P. Noções de Probabilidade e Estatística; 6ª edição rev.; São Paulo; EDUSP; 2005; p. 141-143.
- Mao, J.; Burt, A. J.; Ramputh, A.; Simmonds, J.; Cass, L.; Hubbard, K.; Arnason, S. M. 2007. Diverted secondary metabolism improved resistance to european corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in maize (*Zea mays*) transformed with wheat oxalate oxidase. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 55: 2582-2589.
- Martins, R. C. C.; Lago, J. H. G.; Albuquerque S.; Kato, M. J. 2003. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*. 64: 667-670.

- Martins, R. C. C.; Latorre, L. R.; Sartorelli, P.; Kato, M. J. 2000. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry*. 55: 843-846.
- McClung, C. R.; Salomé, P. A.; Michael, T. P. 2002. The *Arabidopsis* circadian system. In: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- McKey, D. 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *American Naturalist*. 108: 305-320.
- Mersey, B. G.; Cutler, A. J. 1986. Differential distribution of specific indole alkaloids in leaves of *Catharanthus roseus*. *Canadian journal of botany*. 64:1039-1045.
- Millar, A. J. 2004. Input signals to the plant circadian clock. *Journal of Experimental Botany*. 55: 277-283.
- Miller, J. S. e Feeny, P. 1983. Effects of benzylisoquinoline alkaloids on the larvae of polyphagous Lepidoptera. *Oecologia*. 58: 332-339.
- Morandim, A. A.; Bergamo, D. C. B.; Kato, M. J.; Cavaleiro, A. J.; Bolzani, V. S.; Furlan, M. 2005. Circadian rhythm of anti-fungal prenylated chromene in leaves of *Piper aduncum*. *Phytochemical Analysis*. 16:282-286.
- Moreira, D.; Kaplan, M. A. C.; Guimarães, E. F., 1995. Constituintes químicos de *Piper solmsianum* C. DC. (*Piperaceae*). *Revista Brasileira de Farmácia*. 76: 106-109.
- Ndamba, J.; Lemmich, E.; Molgaard P. 1994. Investigation of the diurnal, ontogenic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. *Phytochemistry*. 35: 95-99.
- Orians, C. M.; Lower, S.; Fritz, R. S.; Roche, B. M. 2003. The effects of plant genetic variation and soil nutrients on secondary chemistry and growth in a shrubby willow, *Salix sericea*: patterns and constraints on the evolution of resistance traits. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31: 233-247.

- Orians, C. M.; Roche, B. M.; Fritz, R. S. 1996. The genetic basis for variation in the concentration of phenolic glycosides in *Salix sericea*: an analysis of heritability. *Biochemical Systematics and Ecology*. 24: 719-724.
- Pais, M. P. e Varanda, E. M. 2003. Variation in plant defenses of *Didymopanax vinosum* (Cham. & Schltdl.) Seem. (Apiaceae) across a vegetation gradient in brazilian cerrado. *Acta Botanica Brasilica*. 17: 395-403.
- Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S. Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*. 46: 597-673.
- Pasqualini, V.; Robles, C.; Garzino, S.; Greff, S.; Bousquet-Melou, A.; Bonin, G. 2003. Phenolic compounds content in *Pinus halepensis* Mill. needles: a bioindicator of air pollution. *Chemosphere*. 52: 239-248.
- Pedras, M. S. C.; Okanga, F. I.; Zaharia, I. L.; Khan, A. Q. 2000. Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and transformation. *Phytochemistry*. 53: 161-176.
- Peñuelas, J. e Estiarte, M. 1998. Can elevated CO<sub>2</sub> affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trends in Ecology and Evolution*. 13: 20-24.
- Pichersky, E. e Gang, D. R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*. 5: 439-445.
- Pisani, J. M. e Diste, R. A. 1998. Inter- and intraspecific variations in production of spines and phenols in *Prosopis caldenia* and *Prosopis flexuosa*. *Journal of Chemical Ecology*. 24: 23-36.

- Reilly-Wapstra, J. M. O.; Potts, B. M.; McArthur C.; Davies, N. W. 2005. Effects of nutrient variability on the genetic-based resistance of *Eucalyptus globules* to a mammalian herbivore on plant defensive chemistry. *Oecologia*. 142: 597-605.
- Roca-Perez, L.; Boluda, R.; Gavidea, I.; Pérez-Bermúdez, P. 2004. Seasonal cardenolide production and Dop5 $\beta$ r gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*. 65: 1869-1878.
- Rolly, B.; Jay, M.; Bajon, R. 1988. Flavonoid patterns in the *Koeleria cristata* species complex. *Phytochemistry*. 27: 2657-2661.
- Salminen, J.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. 2001. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry*. 57: 15-22.
- Salomé, P. A. e McClung, C. R. 2004. The *Arabidopsis thaliana* Clock. *Journal of Biological Rhythms*. 19: 425-435.
- Salomé, P. A. e McClung, C. R. 2005. What makes the *Arabidopsis* clock tick on time? A review on entrainment. *Plant, Cell and Environment*. 28: 21-38.
- Santos, M. D. e Blatt, C. T. T. 1998. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*. 21: 135-140.
- Schwob, I.; Bessiere, J.; Masotti, V.; Viano, J. 2004. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32: 735-745.
- Shonle, I. e Bergelson, J. 1999. Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution*. 54: 778-788.
- Skaltsa, H.; Mavrommati, A.; Constantinidis, T. 2001. A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys* subsect. Swainsonianae (Labiatae). *Phytochemistry*. 57: 235-244.

- Smith, R. M. e Martim-Smith, M. 1978. Hydrocarbons in leaf waxes of *Saccharum* and related genera. *Phytochemistry*. 17: 1293-1296.
- Spring, O. 1991. Sesquiterpene lactones from *Helianthus tuberosus*. *Phytochemistry*. 30: 519-522.
- Stavoroulakis, G.; Adediran, K. A.; Nikoloudi, A.; Petrakis, C.; Kalaitzaki, A.; Michelakis, S. 2001. Rotenone: efficiency against olive fly (*Bactrocera oleae*) and residual activity in olive oil. *Biological Agriculture and Horticulture*. 19: 207-217.
- Steppuhn, A.; Gase, K.; Krock, B.; Halitscke, R.; Baldwin, I. T. 2004. Nicotine's defensive function in nature. *PLoS Biol* 2. 2: e217.
- Sweeney, B. M. 1963. Biological clocks in plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 14: 411-440.
- Taylor, R. B.; Lindquist, N.; Kubanek, J.; Hay, M. E. 2003. Intraespecific variation in palatability and defensive chemistry of brown seaweeds: effects on herbivore fitness. *Oecologia*. 136: 412-423.
- Theis, N; Ler dau, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Science*. 164 (3<sup>o</sup> suplemento): S93-S102.
- Thompson, J. D.; Chalchat, J.; Michet, A.; Linhart, Y. B.; Ehlers, B. 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*. 29: 859-880.
- Tsahar, E.; Friedman, J.; Izhari, I. 2002. Impact on fruit removal and seed predation of a secondary metabolite, emodin, in *Rhamnus alaternus* fruit pulp. *Oikos*. 99: 290-299.
- Verpoorte, R. 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*. 3: 232-238.

- Viegas Júnior, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*. 26: 390-400.
- Wainwright, M.; Amaral, L. 2005. Review: the phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. *Tropical Medicine and International Health*. 10: 501-511.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of American Chemical Society*. 93: 2325-2327.
- Waring, R. H. e Pitman, G. B. 1985. Modifying lodgepole pine stands to change susceptibility to mountain pine beetle attack. *Ecology*. 66: 889-897.
- Webb, A. A. R. 2003. The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytologist*. 160: 281-303.
- Wilkins, R.; Spoerke, J. M.; Stamp, N. E. 1996. Differential responses of growth and two soluble phenolics of tomato to resource availability. *Ecology*. 77: 247-258.
- Wilt, F. M.; Miller, G. C. 1992. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentration in persistent leaves of Wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *Wyomingensis*: Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 20: 53-67.
- Wink, M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 75: 225-233.
- Wink, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 64: 3-19.

- Zhang, H.; Tamez, P.; Hoang, V. D.; Tan, G. T.; Hung, N. V.; Xuan, L. T.; Huong, L. M.; Cuong, N. M.; Thao, D. T.; Soejarto; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M. 2001. Antimalarial Compounds from *Rhaphidophora decursiva*. *Journal of Natural Products*. 64: 772-777.
- Zidorn, C.; Stoppner, H. 2001. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). *Taxon*. 50: 115-133.

## **7. APÊNDICES**

## Apêndice I - Primeiro Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta	Tecido	Massa fresca (g)	Massa após liofilização (g)	Apiol/dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)	
1	25/03/2005	16h00	1	folha	3,41	0,8148	4,092	16,945	
2			1	caule	0,69	0,1065	5,964	14,890	
3			1	infloresc.	amostra não coletada				
4			2	folha	1,78	0,2749	13,718	45,538	
5			2	caule	0,73	0,0758	10,838	20,917	
6			2	infloresc.	1,67	0,3998	13,859	6,868	
7			3	folha	4,36	1,1739	11,082	47,535	
8			3	caule	0,75	0,0224	3,182	11,011	
9			3	infloresc.	0,73	0,1273	25,907	46,466	
10	25/03/2005	18h00	1	folha	1,37	0,2445	5,723	20,677	
11			1	caule	0,99	0,0357	2,623	4,309	
12			1	infloresc.	0,63	0,1417	14,532	7,062	
13			2	folha	2,67	1,0400	11,231	46,062	
14			2	caule	0,61	0,0767	4,572	10,745	
15			2	infloresc.	1,77	0,4714	13,542	6,160	
16			3	folha	1,46	0,2900	12,606	55,533	
17			3	caule	0,31	0,0489	13,844	42,876	
18			3	infloresc.	0,88	0,1692	21,237	50,368	
19	25/03/2005	20h00	1	folha	1,30	0,0120	0,351	0,539	
20			1	caule	0,60	0,0876	2,455	5,120	
21			1	infloresc.	0,42	0,0813	23,306	12,648	
22			2	folha	0,97	0,1776	12,914	46,452	
23			2	caule	0,97	0,1336	14,010	26,513	
24			2	infloresc.	1,54	0,3705	14,542	7,741	
25			3	folha	2,49	2,0018	8,294	31,446	
26			3	caule	0,48	0,0775	11,750	33,897	
27			3	infloresc.	0,51	0,0936	14,542	7,741	
28	25/03/2005	22h00	1	folha	1,56	0,3153	1,146	5,116	
29			1	caule	0,73	0,1349	3,735	8,997	
30			1	infloresc.	0,49	0,1185	30,681	16,649	
31			2	folha	1,50	0,2920	9,320	39,089	
32			2	caule	0,41	0,0515	9,094	18,064	
33			2	infloresc.	1,56	0,4061	10,981	5,325	
34			3	folha	2,69	0,5575	12,439	54,957	
35			3	caule	0,56	0,0922	12,127	36,336	
36			3	infloresc.	0,30	0,0573	10,815	19,128	

## Apêndice I - Primeiro Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta	Tecido	Massa fresca (g)	Massa após liofilização (g)	Apiol/dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)	
37	26/03/2005	0h00	1	folha	1,09	0,2125	1,262	6,422	
38			1	caule	1,76	0,1798	8,816	11,906	
39			1	infloresc.	0,24	0,0438	32,703	20,389	
40			2	folha	3,79	0,6649	9,579	43,510	
41			2	caule	2,82	0,3593	13,683	29,627	
42			2	infloresc.	1,23	0,3703	14,857	6,528	
43			3	folha	1,28	0,2341	8,577	35,778	
44			3	caule	0,75	0,1222	3,319	10,247	
45			3	infloresc.	0,29	0,0560	0,119	31,957	
46	26/03/2005	2h00	1	folha	2,19	0,4437	6,237	27,128	
47			1	caule	1,44	0,6608	11,119	22,271	
48			1	infloresc.	0,32	0,0595	43,248	21,537	
49			2	folha	3,58	0,6576	11,849	54,037	
50			2	caule	2,38	0,2912	12,362	30,882	
51			2	infloresc.	1,12	0,3126	15,029	6,468	
52			3	folha	1,27	0,2416	4,435	15,031	
53			3	caule	0,59	0,0829	1,302	5,736	
54			3	infloresc.	0,73	0,1535	10,640	5,176	
55	26/03/2005	4h00	1	folha	1,87	0,3186	3,808	15,677	
56			1	caule	0,93	0,1344	11,100	31,381	
57			1	infloresc.	amostra não coletada				
58			2	folha	1,16	0,2017	10,007	48,304	
59			2	caule	0,71	0,1008	10,851	29,216	
60			2	infloresc.	amostra não coletada				
61			3	folha	1,34	0,2835	8,975	39,367	
62			3	caule	0,51	0,0892	12,797	38,820	
63			3	infloresc.	0,62	0,1895	19,518	40,901	
64	26/03/2005	6h00	1	folha	2,41	0,5089	3,895	15,459	
65			1	caule	0,63	0,1169	3,214	9,620	
66			1	infloresc.	0,58	0,1414	32,001	18,644	
67			2	folha	2,16	0,5997	10,723	50,137	
68			2	caule	1,21	0,1857	16,113	34,614	
69			2	infloresc.	0,95	0,2821	14,125	7,902	
70			3	folha	2,69	0,5744	7,295	30,693	
71			3	caule	1,51	0,3100	16,701	39,626	
72			3	infloresc.	amostra não coletada				

## Apêndice I - Primeiro Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta	Tecido	Massa fresca (g)	Massa após liofilização (g)	Apiol/dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)
73	26/03/2005	8h00	1	folha	1,23	0,2418	5,812	26,931
74			1	caule	0,61	0,1129	5,281	13,312
75			1	infloresc.	0,27	0,0612	32,196	19,714
76			2	folha	2,22	0,4656	8,144	45,514
77			2	caule	1,46	0,2154	14,486	33,597
78			2	infloresc.	0,64	0,2057	13,068	5,748
79			3	folha	1,92	0,4432	5,258	19,317
80			3	caule	1,26	0,2227	2,910	10,666
81			3	infloresc.	0,33	0,0599	24,063	54,275
82	26/03/2005	10h00	1	folha	1,85	NM	7,684	32,944
83			1	caule	2,02	0,4630	12,478	26,760
84			1	infloresc.	0,26	0,0388	31,445	19,547
85			2	folha	2,34	NM	12,741	50,391
86			2	caule	1,35	NM	17,124	39,602
87			2	infloresc.	0,96	0,3078	13,410	4,990
88			3	folha	0,94	0,1667	5,633	14,600
89			3	caule	2,00	0,3771	6,546	17,388
90			3	infloresc.	0,64	0,1081	24,143	55,573
91	26/03/2005	12h00	1	folha	1,62	0,3296	6,559	22,203
92			1	caule	1,21	0,2838	10,629	24,882
93			1	infloresc.	0,77	0,1885	32,435	17,577
94			2	folha	2,73	0,6020	11,842	49,129
95			2	caule	0,82	0,1338	16,945	31,451
96			2	infloresc.	1,11	0,3453	14,414	5,965
97			3	folha	1,36	0,2145	4,524	16,592
98			3	caule	0,69	0,1172	5,826	18,802
99			3	infloresc.	0,63	0,0967	22,062	51,245

NM = não medido

## Apêndice II - Segundo Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta e tecido	Comprimento da folha (cm)	Largura da folha (cm)	Massa fresca (g)	Substância X (% de área em relação à área total)	Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)
1	6/4/2007	14h00	6a	12,0	6,5	0,97	3,52	20,57	33,70
2			6b	18,5	12,5	3,04	4,11	24,02	36,95
3			6c	10,5	7,0	1,08	3,51	19,14	30,31
4			7a	13,5	6,8	1,05	3,58	12,55	15,53
5			7b	11,0	5,0	0,61	5,00	8,24	11,26
6			7c	14,0	7,5	1,25	3,20	26,04	40,69
7			9a	11,0	6,5	0,99	1,99	38,25	32,97
8			9b	11,0	5,5	0,74	2,49	36,75	34,11
9			9c	14,5	8,5	1,61	3,32	36,68	33,26
10	6/4/2007	16h00	6a	14,0	8,5	1,63	3,34	27,15	40,40
11			6b	13,0	6,8	1,10	8,30	20,79	35,35
12			6c	10,5	6,5	0,88	8,45	25,83	40,75
13			7a	12,5	6,2	1,06	6,15	28,68	47,44
14			7b	13,0	7,0	1,25	3,65	31,71	48,80
15			7c	13,5	7,5	1,39	3,48	31,65	46,80
16			9a	10,5	5,5	0,69	13,35	38,77	31,43
17			9b	14,0	8,0	1,71	2,33	30,07	24,76
18			9c	12,5	7,0	1,12	3,11	38,85	34,31
19	6/4/2007	18h00	6a	9,0	7,3	1,08	1,77	25,35	40,03
20			6b	12,5	7,3	1,41	3,18	22,18	37,56
21			6c	11,5	7,0	1,12	1,60	25,63	42,63
22			7a	15,5	8,8	1,72	2,91	6,94	9,72
23			7b	12,5	7,6	1,36	2,38	10,02	17,09
24			7c	12,0	6,7	1,08	6,88	12,69	16,63
25			9a	13,0	5,7	0,92	7,75	32,55	27,08
26			9b	13,0	7,0	1,17	7,49	27,15	24,64
27			9c	9,0	4,0	0,47	5,28	28,59	26,84
28	6/4/2007	20h00	6a	11,0	5,3	0,78	4,45	19,53	33,91
29			6b	12,5	7,0	1,17	3,18	33,05	51,68
30			6c	12,7	6,6	1,16	3,06	28,74	45,13
31			7a	13,0	6,0	0,96	3,31	10,94	12,61
32			7b	10,5	5,0	0,60	3,44	14,86	16,89
33			7c	10,5	5,0	0,57	46,80	5,83	6,89
34			9a	13,5	6,5	1,22	23,28	29,45	25,16
35			9b	10,0	4,8	0,59	28,71	30,49	27,11
36			9c	12,5	7,0	1,28	26,34	30,09	26,51

## Apêndice II - Segundo Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta e tecido	Comprimento da folha (cm)	Largura da folha (cm)	Massa fresca (g)	Substância X (% de área em relação à área total)	Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)
37	6/4/2007	22h00	6a	10,0	4,7	0,60	9,52	21,26	37,73
38			6b	12,0	6,5	1,17	4,96	24,51	37,43
39			6c	16,0	10,0	2,23	6,06	25,63	40,97
40			7a	11,0	6,4	0,87	14,52	14,57	16,84
41			7b	14,0	7,4	1,19	9,59	14,03	17,05
42			7c	11,0	5,6	0,69	13,37	15,40	20,90
43			9a	14,0	7,2	1,32	4,50	36,92	33,12
44			9b	12,0	7,0	1,22	5,17	37,33	36,75
45			9c	10,0	5,0	0,65	6,49	39,88	32,64
46	7/4/2007	00h00	6a	8,5	6,2	0,86	6,92	18,81	30,82
47			6b	11,5	6,8	1,09	7,68	13,11	25,87
48			6c	13,5	7,5	1,28	6,71	23,23	40,80
49			7a	13,5	7,2	1,19	6,69	14,62	15,70
50			7b	12,2	6,0	0,94	5,02	17,11	27,38
51			7c	9,7	4,8	0,53	6,63	15,25	20,51
52			9a	11,5	6,7	1,10	5,14	34,48	33,79
53			9b	10,0	5,4	0,76	3,02	37,87	31,57
54			9c	13,0	6,8	1,13	3,71	39,99	32,42
55	7/4/2007	02h00	6a	11,5	5,5	0,85	2,75	19,72	30,54
56			6b	12,0	7,3	1,11	4,28	18,29	30,90
57			6c	15,2	7,2	1,51	7,09	23,28	38,83
58			7a	11,5	4,7	0,63	9,86	9,10	20,04
59			7b	14,5	6,5	1,29	6,82	8,77	12,90
60			7c	13,0	6,4	1,08	3,77	7,04	2,44
61			9a	12,7	6,4	1,06	3,71	31,96	28,82
62			9b	11,0	5,2	0,73	4,52	28,17	25,24
63			9c	9,5	4,7	0,64	3,52	26,95	24,93
64	7/4/2007	04h00	6a	11,5	7,4	1,21	5,22	16,52	28,25
65			6b	13,0	7,6	1,25	2,91	17,49	31,39
66			6c	11,2	6,3	0,93	5,24	18,86	33,49
67			7a	12,6	6,4	1,02	11,95	5,62	6,97
68			7b	12,0	6,2	0,91	8,64	8,92	13,24
69			7c	11,2	5,6	0,72	8,14	8,53	10,50
70			9a	13,5	7,0	1,31	2,83	37,94	25,48
71			9b	10,5	5,8	0,89	8,54	37,19	29,71
72			9c	13,0	6,6	1,18	6,82	32,20	28,64

## Apêndice II - Segundo Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta e tecido	Comprimento da folha (cm)	Largura da folha (cm)	Massa fresca (g)	Substância X (% de área em relação à área total)	Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)
73	7/4/2007	06h00	6a	11,0	6,0	0,88	11,00	18,32	30,35
74			6b	12,0	6,8	1,25	18,27	22,69	34,52
75			6c	12,5	7,8	1,34	8,29	19,23	35,47
76			7a	11,7	5,4	0,71	8,53	10,86	15,32
77			7b	11,0	4,8	NM	7,23	10,64	16,34
78			7c	13,0	7,8	1,29	7,87	9,64	15,39
79			9a	15,5	6,5	1,46	6,43	40,74	30,88
80			9b	12,0	7,0	1,20	3,85	37,78	30,69
81			9c	11,5	5,0	0,77	7,33	42,58	30,16
82	7/4/2007	08h00	6a	14,0	8,0	1,50	5,17	23,50	39,11
83			6b	11,0	6,5	1,12	5,29	23,47	37,36
84			6c	10,5	5,6	0,78	5,33	19,15	33,77
85			7a	13,5	7,4	1,31	10,03	12,45	18,89
86			7b	12,0	5,8	0,84	7,72	15,48	18,37
87			7c	10,5	4,8	0,61	7,46	17,81	22,14
88			9a	13,2	8,4	1,63	4,57	34,49	30,27
89			9b	11,0	7,0	1,21	4,48	31,45	24,99
90			9c	9,0	5,0	0,75	4,04	37,68	31,99
91	7/4/2007	10h00	6a	12,3	6,3	0,98	21,30	17,72	31,96
92			6b	12,2	6,0	0,96	23,34	11,40	24,63
93			6c	10,5	4,7	0,70	19,25	17,82	29,34
94			7a	10,0	5,2	NM	35,92	2,27	8,86
95			7b	13,2	5,6	0,86	38,54	5,99	10,24
96			7c	12,0	5,4	0,76	50,51	5,89	8,74
97			9a	15,0	7,6	1,43	19,87	31,36	27,13
98			9b	14,4	8,1	1,56	16,66	31,16	26,49
99			9c	12,2	6,6	1,04	13,60	32,66	25,22
100	7/4/2007	12h00	6a	11,0	5,1	0,77	28,31	16,87	28,53
101			6b	13,0	8,2	1,51	22,91	25,34	38,37
102			6c	12,8	8,0	1,42	21,30	23,59	36,97
103			7a	11,0	5,5	0,75	40,89	9,54	12,15
104			7b	13,0	5,5	0,82	39,45	12,00	13,51
105			7c	14,0	7,3	1,32	22,80	14,69	19,33
106			9a	15,0	8,0	1,70	20,12	32,20	26,12
107			9b	12,0	6,5	1,14	3,08	41,27	34,62
108			9c	12,0	5,4	0,86	3,45	41,57	34,41

NM = valor não medido

## Apêndice II - Segundo Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta e tecido	Comprimento da folha (cm)	Largura da folha (cm)	Massa fresca (g)	Substância X (% de área em relação à área total)	Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)
109	7/4/2007	14h00	6a	10,0	5,0	0,65	4,53	26,81	42,65
110			6b	14,0	8,0	1,59	2,61	29,04	45,37
111			6c	11,4	6,2	1,00	20,78	21,05	31,84
112			7	*	*	2,71	38,34	12,58	12,69
115			9a	11,6	6,2	0,94	25,03	31,95	25,86
116			9b	12,5	7,4	1,38	32,74	30,10	23,13
117			9c	11,0	5,5	0,88	21,22	36,88	28,42
118	7/4/2007	16h00	6a	10,8	5,2	0,71	34,19	18,04	29,49
119			6b	9,0	5,2	0,64	35,64	15,63	25,90
120			6c	12,5	6,2	0,97	22,31	18,39	34,57
121			7a	16,0	9,3	1,95	34,88	13,82	16,78
122			7b	9,5	4,5	0,51	42,95	9,40	13,39
123			7c	13,0	6,5	1,03	63,26	7,70	9,13
124			9a	12,5	6,2	1,04	31,63	32,50	23,53
125	9b	15,0	9,2	1,78	22,30	33,78	27,32		
126	9c	11,0	6,4	0,69	35,93	30,84	21,43		
127	7/4/2007	18h00	6a	10,7	5,5	0,88	23,18	32,78	31,16
128			6b	9,5	4,6	0,54	33,75	30,28	25,00
129			6c	12,6	6,6	1,19	1,43	40,57	35,27
130			7a	11,0	5,4	0,74	3,05	14,28	18,06
131			7b	12,6	7,0	1,16	1,06	15,89	20,04
132			7c	11,0	5,0	0,61	4,30	14,48	18,98
133			9a	9,5	4,8	0,60	2,26	26,12	44,56
134	9b	10,5	5,0	1,02	1,79	28,88	45,58		
135	9c	11,0	6,4	0,96	1,71	27,37	45,46		
136	7/4/2007	20h00	6a	8,5	5,2	0,63	2,84	26,33	44,53
137			6b	11,0	6,6	0,90	2,08	24,98	37,82
138			6c	12,5	8,3	1,63	1,86	31,52	45,34
139			7a	13,0	7,2	1,52	1,68	29,94	46,54
140			7b	9,5	4,6	0,62	2,29	30,43	50,13
141			7c	13,0	6,4	1,27	4,65	25,99	43,58
142			9a	10,0	5,0	0,68	4,72	44,94	34,78
143	9b	12,0	6,0	1,08	2,46	41,11	34,88		
144	9c	11,0	6,0	0,98	1,50	41,30	37,37		

\* = durante o transporte, as três folhas se quebraram e se misturaram. Foram tratadas como uma única amostra.

## Apêndice II - Segundo Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta e tecido	Comprimento da folha (cm)	Largura da folha (cm)	Massa fresca (g)	Substância X (% de área em relação à área total)	Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)
145	7/4/2007	22h00	6a	15,5	9,6	2,32	3,50	29,57	41,11
146			6b	11,5	6,7	1,00	3,39	27,74	40,33
147			6c	12,0	7,0	1,17	2,79	26,91	41,51
148			7a	10,0	5,2	0,78	6,93	18,71	32,48
149			7b	11,0	5,2	0,77	5,74	10,08	13,42
150			7c	12,0	7,4	1,51	3,96	18,04	31,01
151			9a	12,2	6,2	0,99	2,66	35,34	31,89
152			9b	13,5	7,3	1,50	3,65	36,28	34,07
153			9c	10,5	6,8	1,09	2,92	37,91	31,38
154			8/4/2007	00h00	6a	13,5	8,2	1,90	2,23
155	6b	12,6			6,7	1,26	3,59	23,40	40,08
156	6c	10,0			6,2	0,88	3,22	26,66	41,66
157	7a	8,5			3,5	0,34	20,69	10,82	13,56
158	7b	11,5			7,0	1,01	4,34	24,65	46,66
159	7c	13,0			7,7	1,39	3,48	29,82	46,91
160	9a	13,0			7,4	1,35	3,73	35,79	30,44
161	9b	13,4			7,5	1,33	3,38	35,95	33,25
162	9c	9,5			4,7	0,61	5,00	35,81	31,18
172	8/4/2007	04h00			6a	10,7	6,2	1,19	3,26
173			6b	10,0	4,9	0,60	7,17	21,41	37,40
174			6c	10,0	5,6	0,83	8,91	22,84	34,80
175			7a	11,5	5,6	0,88	6,78	28,76	44,40
176			7b	15,0	6,6	1,14	7,22	28,65	45,63
177			7c	12,0	6,2	1,12	5,40	25,04	39,77
178			9a	13,0	6,7	1,23	4,29	38,19	32,94
179			9b	9,5	4,7	0,60	7,84	36,09	25,73
180			9c	12,5	6,6	1,23	4,02	37,26	33,70
181			8/4/2007	06h00	6a	14,0	7,6	1,50	8,70
182	6b	13,5			7,3	1,32	8,73	27,41	41,94
183	6c	11,5			5,6	0,97	0,82	28,54	42,80
184	7a	13,5			7,4	1,44	1,69	30,23	48,24
185	7b	12,6			6,3	1,09	2,03	28,64	44,89
186	7c	13,5			7,4	NM	2,89	31,35	48,40
187	9a	13,5			6,7	11,60	2,13	40,59	35,12
188	9b	8,6			4,0	0,43	3,45	37,82	33,15
189	9c	12,3			7,0	1,27	2,60	41,06	33,45

NM = não medido

## Apêndice II - Segundo Estudo de Variação Diária

Número da Amostra	Dia da coleta	Hora da coleta	Planta e tecido	Comprimento da folha (cm)	Largura da folha (cm)	Massa fresca (g)	Substância X (% de área em relação à área total)	Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)	Grandisina (% de área em relação à área total)
190	8/4/2007	08h00	6a	11,0	6,6	1,13	1,74	25,71	42,45
191			6b	10,0	4,9	0,59	3,59	19,99	32,17
192			6c	13,5	6,5	1,48	4,64	1,40	1,40
193			7a	15,0	9,0	2,03	1,77	30,79	43,86
194			7b	11,4	5,6	0,70	3,45	16,03	19,02
195			7c	13,0	6,0	0,86	2,53	18,43	21,94
196			9a	9,3	5,6	0,74	1,28	35,85	34,51
197			9b	14,5	8,7	NM	1,49	35,85	36,08
198			9c	12,7	6,2	1,02	2,27	36,61	32,62
208			8/4/2007	12h00	6a	14,0	8,0	1,61	1,70
209	6b	13,0			6,7	1,15	3,25	24,76	43,74
210	6c	NM			NM	NM	10,79	25,65	41,62
211	7a	12,2			5,4	0,85	18,66	12,71	16,23
212	7b	10,2			5,2	0,63	17,46	13,95	17,69
213	7c	15,5			8,2	NM	16,04	12,75	14,66
214	9a	11,7			8,7	1,66	6,37	35,74	29,46
215	9b	14,0			7,7	1,47	8,08	37,64	30,93
216	9c	14,2			9,6	2,18	5,63	37,82	31,35

NM = não medido

## Apêndice III - Variação Sazonal

<b>Número da Amostra</b>	<b>Dia da coleta</b>	<b>Planta e tecido</b>	<b>Comprimento da folha (cm)</b>	<b>Largura da folha (cm)</b>	<b>Massa fresca (g)</b>	<b>Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)</b>	<b>Grandisina (% de área em relação à área total)</b>
1	12/01/2007	6a	8,5	5,2	0,63	24,84	39,23
2		6b	9,0	5,2	0,64	21,74	36,81
3		6c	10,0	5,6	0,83	25,12	41,78
4		7a	8,5	3,5	0,34	6,80	9,53
5		7b	9,5	4,5	0,51	9,82	16,75
6		7c	9,7	4,8	0,53	12,44	16,30
7		9a	9,3	5,6	0,74	31,90	26,54
8		9b	8,6	4,0	0,43	26,61	24,15
9		9c	9,0	4,0	0,47	28,02	26,30
10	09/02/2007	6a	8,5	6,2	0,86	19,14	33,23
11		6b	9,5	4,6	0,54	32,39	50,65
12		6c	10,0	6,2	0,88	28,17	44,23
13		7a	10,0	5,2	0,85	10,72	12,36
14		7b	9,5	4,6	0,62	14,56	16,55
15		7c	10,5	4,8	0,61	5,71	6,75
16		9a	9,5	4,8	0,60	28,86	24,66
17		9b	9,5	4,7	0,60	29,88	26,57
18		9c	9,0	5,0	0,75	29,49	25,98
19	09/03/2007	6a	9,0	7,3	1,08	20,83	36,98
20		6b	10,0	4,9	0,60	24,02	36,68
21		6c	10,5	4,7	0,70	24,85	40,15
22		7a	10,0	5,2	0,78	14,28	16,50
23		7b	10,2	5,2	0,63	13,75	16,71
24		7c	10,5	4,8	0,61	15,09	20,48
25		9a	10,0	5,0	0,68	36,18	32,46
26		9b	10,0	4,8	0,59	36,58	36,02
27		9c	9,5	4,7	0,64	39,08	31,99
28	06/04/2007	6a	12,0	6,5	0,97	18,43	30,20
29		6b	18,5	12,5	3,04	12,85	25,35
30		6c	10,5	7,0	1,08	22,77	39,98
31		7a	13,5	6,8	1,05	14,33	9,04
32		7b	11,0	5,0	0,61	16,77	26,83
33		7c	14,0	7,5	1,25	14,98	20,10
34		9a	11,0	6,5	0,99	33,79	33,11
35		9b	11,0	5,5	0,74	37,11	30,94
36		9c	14,5	8,5	1,61	39,19	31,77

## Apêndice III - Variação Sazonal

<b>Número da Amostra</b>	<b>Dia da coleta</b>	<b>Planta e tecido</b>	<b>Comprimento da folha (cm)</b>	<b>Largura da folha (cm)</b>	<b>Massa fresca (g)</b>	<b>Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)</b>	<b>Grandisina (% de área em relação à área total)</b>
37	11/05/2007	6a	10,0	5,0	0,65	19,33	29,93
38		6b	10,0	4,9	0,59	17,92	30,28
39		6c	12,0	7,0	1,22	22,81	38,05
40		7a	11,0	5,5	0,75	8,92	19,64
41		7b	11,0	4,8	NM	8,59	12,64
42		7c	11,0	5,0	0,61	6,90	9,51
43		9a	11,5	6,7	1,10	31,32	28,24
44		9b	10,5	5,0	1,02	27,61	24,74
45		9c	10,0	5,0	0,65	26,41	24,43
46	08/06/2007	6a	10,7	5,5	0,88	16,19	27,69
47		6b	11,0	6,5	1,12	17,14	30,76
48		6c	10,5	7,0	1,08	18,48	32,82
49		7a	12,0	5,4	0,86	5,51	6,83
50		7b	11,0	5,0	0,61	8,74	12,98
51		7c	11,0	5,6	0,69	8,36	10,29
52		9a	11,6	6,2	0,94	27,38	24,97
53		9b	10,5	5,8	0,89	36,45	29,12
54		9c	10,5	6,8	1,09	31,56	28,07
55	13/07/2007	6a	10,7	6,2	1,19	17,95	29,74
56		6b	11,0	6,6	0,90	22,24	33,83
57		6c	11,2	6,3	0,93	18,85	34,76
58		7a	11,0	6,4	0,87	10,64	15,01
59		7b	13,0	6,7	1,23	10,43	16,01
60		7c	11,2	5,6	0,72	9,45	15,08
61		9a	11,7	8,7	1,66	39,93	30,26
62		9b	11,0	5,2	0,73	37,02	30,08
63		9c	11,0	5,5	0,88	41,73	29,56
64	10/08/2007	6a	10,8	5,2	0,71	23,03	38,33
65		6b	11,5	6,7	1,00	23,00	36,61
66		6c	11,4	6,2	1,00	18,77	33,09
67		7a	11,5	4,7	0,63	2,42	5,15
68		7b	11,0	5,2	0,77	15,17	18,00
69		7c	13,0	6,0	0,86	4,62	9,09
70		9a	12,2	6,2	0,99	33,80	0,17
71		9b	11,0	5,5	0,74	30,82	24,49
72		9c	11,0	6,0	0,98	36,93	31,35

NM = não medido

## Apêndice III - Variação Sazonal

<b>Número da Amostra</b>	<b>Dia da coleta</b>	<b>Planta e tecido</b>	<b>Comprimento da folha (cm)</b>	<b>Largura da folha (cm)</b>	<b>Massa fresca (g)</b>	<b>Apiol/ Dilapiol (% de área em relação à área total)</b>	<b>Grandisina (% de área em relação à área total)</b>
73	14/09/2007	6a	11,0	5,1	0,77	17,37	31,32
74		6b	11,5	6,8	1,09	11,17	24,14
75		6c	11,5	5,6	0,97	17,46	28,75
76		7a	11,5	5,6	0,88	2,22	8,68
77		7b	11,4	5,6	0,70	1,93	10,04
78		7c	12,0	5,4	0,76	5,77	8,57
79		9a	13,0	6,0	0,96	30,73	26,59
80		9b	11,0	7,0	1,21	30,54	25,96
81		9c	11,0	6,4	0,69	32,01	24,72
82		05/10/2007	6a	11,0	5,3	0,78	16,53
83	6b		12,0	6,5	1,17	24,83	37,60
84	6c		11,5	7,0	1,12	23,12	36,23
85	7a		11,7	5,4	0,71	2,67	11,91
86	7b		11,5	7,0	1,01	11,76	13,24
87	7c		12,0	6,2	1,12	3,50	3,40
88	9a		12,5	6,2	1,04	25,60	1,72
89	9b		12,5	7,8	1,34	33,93	2,31
90	9c		11,0	6,4	0,96	33,72	2,21
91	09/11/2007		6a	11,0	6,0	0,88	24,84
92		6b	12,0	6,8	1,25	21,74	36,81
93		6c	12,0	7,0	1,17	25,12	41,78
94		7a	12,2	5,4	0,85	6,80	9,53
95		7b	12,0	5,8	0,84	9,82	16,75
96		7c	12,0	6,7	1,08	12,44	16,30
97		9a	12,7	6,4	1,06	31,90	26,54
98		9b	12,0	6,0	1,08	26,61	24,15
99		9c	12,2	6,0	0,96	28,02	26,30
100		07/12/2007	6a	11,0	6,6	1,13	19,14
101	6b		12,0	7,3	1,11	32,39	50,65
102	6c		12,5	6,2	0,97	28,17	44,23
103	7a		12,6	6,4	1,02	10,72	12,36
104	7b		12,0	7,4	1,51	14,56	16,55
105	7c		12,0	6,2	0,91	5,71	6,75
106	9a		13,0	5,7	0,92	28,86	24,66
107	9b		12,0	6,5	1,14	29,88	26,57
108	9c		11,5	5,0	0,77	29,49	25,98

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)