



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ERISLÉIA DAS NEVES MEIRELES

**INFLUÊNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Piper divaricatum* DA
REGIÃO AMAZÔNICA NO CONTROLE DO *Fusarium solani* f. sp. *piperis*
CAUSADOR DA FUSARIOSE EM PIMENTA DO REINO.**

Belém/PA
2014

ERISLÉIA DAS NEVES MEIRELES

**INFLUÊNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Piper divaricatum* DA
REGIÃO AMAZÔNICA NO CONTROLE DO *Fusarium solani* f. sp. *piperis*
CAUSADOR DA FUSARIOSE EM PIMENTA DO REINO.**

Exame de defesa de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,
como requisito final para a obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia, sob a orientação da
Profª Drª Joyce Kelly do Rosário da Silva.

Belém/PA
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Meireles, Erisléia das Neves, 1990-

Influência dos metabólitos secundários de *piper divaricatum* da região amazônica no controle do *fusarium solani* f. sp. *piperis* causador da fusariose em pimenta do reino / Erisléia das Neves Meireles. - 2014.

Orientadora: Joyce Kelly do Rosário da Silva;

Coorientadora: Alessandra de Rezende Ramos.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2014.

1. Pimenta do reino _ Doenças e pragas. 2. Fungos patogêncos. I. Título.

CDD 23. ed. 583.25

ERISLÉIA DAS NEVES MEIRELES

**INFLUÊNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Piper divaricatum* DA
REGIÃO AMAZÔNICA NO CONTROLE DO *Fusarium solani* f. sp. *piperis*
CAUSADOR DA FUSARIOSE EM PIMENTA DO REINO.**

Exame de defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, sob a orientação da Profª Drª Joyce Kelly do Rosário da Silva.

Data de aprovação: ____/____/____

Conceito: _____

Banca Examinadora:

Joyce Kelly do Rosário da Silva
Doutora em Química
Universidade Federal do Pará (UFPA) -Orientadora

Alessandra de Rezende Ramos
Doutora em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA) -Coorientadora

Christelle Anne Nicole Paule Herman
Doutora em Ciência da Engenharia
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Luciana Pereira Xavier
Doutora em Bioquímica Agrícola
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Oriel Filgueira de Lemos
Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proporcionar o dom da sabedoria.

Aos meus pais **Leonilda e Erasmo** por me apoiarem em todos os momentos da minha vida, aos meus irmãos e familiares pela dedicação e confiança.

Agradeço especialmente a professora Dra. **Joyce Kelly da Silva** por sua orientação, dedicação, paciência, ensinamentos e amizade nestes anos de convivência;

A professora Dra. **Alessandra de Rezende Ramos**, pela co-orientação, amizade, e disponibilidade de infra-estrutura do laboratório de Biologia da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA).

Ao professor Dr. **José Guilherme Maia** pelo auxílio financeiro do projeto “Avaliação Botânica, Química e Biológica de Plantas Aromáticas da Amazônia Oriental” e pela disponibilidade de infra-estrutura do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON);

Aos professores Dra. **Cibelle Moraes** (UNIFESSPA), Dr. **Massuo Kato** (USP), **Luciana Xavier** (UFPA), por toda colaboração no decorrer do experimento.

A pesquisadora Dra. **Ilmarina Menezes** (EMBRAPA-Amazônia Oriental) pela sua disponibilidade em doar o material botânico.

Aos produtores de pimenta do reino do reino do Município de Baião (PA), por disponibilizarem mudas de *P. nigrum* para os experimentos.

A **Gina Calzavara**, coordenadora do Espaço ITEC Cidadão/ UFPA pela liberação de uma área no bosque Camilo Viana para realização dos experimentos *in vivo*;

Aos professores da banca examinadora pelas contribuições para a melhoria do trabalho;

A **Ferdinando Nascimento, Rafaela Oliveira, Mário Carneiro, Célia Costa (in memorian) e Sueli Bastos** pelo apoio técnico na rotina dos laboratórios de físico-química (FEA/UFPA), de Engenharia de Produtos Naturais (FEQ/UFPA) e Microbiologia (FEA/UFPA); e pela agradável convivência no ambiente de trabalho.

Aos demais colaboradores do grupo de pesquisa: Dra **Eloísa Andrade** e aos alunos de Pós-Graduação e bolsistas de iniciação científica: **Nathalie Turiel, Bruno Silva, Nayla Nunes, Jéssica Santana, Carol Anjos, Lucas Melo**.

As alunas de iniciação científica do Laboratório de Biologia (UNIFESSPA): **Silvânia, Claudiene, Jéssica, Seli e Teresinha**, pelo apoio no laboratório.

A **Shirley da Luz**, pela parceria de anos e fiel ajuda nas etapas experimentais de execução deste trabalho. Além disso, por sua amizade, dedicação e confiança;

Ao apoio financeiro da CAPES pela bolsa de mestrado concedida;

A **EMBRAPA**- Amazônia Oriental pela parceria nas pesquisas.

De uma maneira geral, a todas as pessoas que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Esforça-te, e tem bom ânimo; não te atemorizes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está contigo, por onde quer que andares.

Josué 1. 9

RESUMO

A cultura de pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) é uma das principais atividades agrícolas no estado do Pará e sofre sérios danos ocasionados pela fusariose, doença restrita ao Brasil. O presente trabalho avaliou a atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais de espécies de *Piper* ricos em fenilpropanóides frente a *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, agente causal da fusariose. A inibição do crescimento micelial pelo método de difusão em Agar na concentração de 5 mg.mL⁻¹ foi considerada: baixa para *P. aduncum* (20,3%) e *P. krukoffii* (31,4%); moderada para *P. callosum* (55,7%) e *P. marginatum* (70,3%) e alta para *P. divaricatum* (93,3%). Os componentes majoritários identificados por CG-EM foram: dilapiol (92,0%), safrol (78,0%), metileugenol (75,2%) e eugenol (7,9%), apiol (80,0%), Z-isoosmorizol (44,0%) e E-anetol (22,0%), respectivamente. O óleo de *P. divaricatum* e seus compostos majoritários apresentaram valores CIM de 0,75 mg.mL⁻¹. A avaliação dos efeitos combinados do eugenol e metileugenol apontou o eugenol como principal responsável pela atividade.

Palavras-chave: Óleos Essenciais. Fenilpropanóides. Eugenol. Metileugenol. Atividade Antifúngica.

ABSTRACT

The culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) is one of the main agricultural activities in Pará State and it suffers serious damages caused by fusariosis, disease restrict in Brazil. This paper evaluated the antifungal activity *in vitro* of essential oils of species of *Piper* rich in phenylpropanoid before the *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, which causes the fusariosis. The inhibition of mycelial growth by the method of agar dissemination in concentration of 5 mg.mL⁻¹ was considered: decrease to *P. aduncum* (20.3%) and *P. Krukoffii* (31.4%); moderated to *P. callosum* (55.7%) and *P. marginatum* (70.3%) and high to *P. divaricatum* (93.3%). The major components identified by CG-EM were dilapiol (92.0%), safrole (78.0%), methyleugenol (75.2%) and eugenol (7.9%), apiol (80.0%), Z-isoosmorizol (44.0%) and E-anethole (22.0%), respectively. The oil of *P. divaricatum* and its major compounds present CIM values of 0.75 mg.mL⁻¹. The evaluation of the effects combined of eugenol and methyl eugenol pointed eugenol as the main responsible by the activity.

Keywords: Essential oils, phenylpropanoid family, eugenol, methyleugenol, antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

Fotografia 1 -	<i>Piper nigrum</i> em fase de frutificação (<i>P. nigrum</i> L.).....	19
Figura 1 -	Dados da produção agrícola de pimenta do reino no Brasil obtida no último decênio de 2003 – 2012.....	20
Figura 2 -	Dados da produção de pimenta do reino segundo o levantamento sistemático da produção agrícola para o ano de 2012. (A) Produção nacional por região; (B) Produção por estado.....	20
Figura 3 -	Pimenta do reino (<i>P. nigrum</i>) em estágio avançado da fusariose. (A) Necrose das folhas (B) Sintoma de podridão do colo.....	22
Figura 4 -	Espécies de <i>Piper</i> com ocorrência na Amazônia ricas em fenilpropanóides: (A) <i>P. aduncum</i> , (B) <i>P. callosum</i> , (C) <i>P. divaricatum</i> , (D) <i>P. krukoffii</i> , (E) <i>P. marginatum</i>	24
Figura 5 -	Estruturas dos componentes majoritários das espécies de : (1) <i>P. aduncum</i> , (2) <i>P. callosum</i> , (3) <i>P. divaricatum</i> , (4) <i>P. krukoffii</i> , (5) <i>P. marginatum</i>	25
Figura 6 -	Cinética de inibição do crescimento micelial de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> em meio BDA com adição de (5 mg.mL ⁻¹) de óleos essenciais de <i>Piper</i> spp.....	29
Figura 7 -	Efeito inibitório dos óleos essenciais de <i>Piper</i> spp na concentração de 5 mg.mL ⁻¹ sobre o crescimento micelial de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> após sete dias de cultivo em meio BDA; barras verticais indicam o desvio padrão (n = 4); a,b,c Amostras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).....	30
Figura 8 -	Efeito inibitório do óleo essencial de <i>P. divaricatum</i> e seus componentes majoritários nas concentrações de 0,25 a 5,0 mg.mL ⁻¹ sobre o crescimento micelial de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> (média ± desvio padrão, n = 3).....	32
Figura 9 -	Efeito combinado dos compostos majoritários (eugenol: metileugenol) do óleo essencial de <i>P. divaricatum</i> na concentração de 0,75 mg.mL ⁻¹ sobre o crescimento micelial de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> . a,b amostras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de <i>P. divaricatum</i>	28
Tabela 2 - Valores de CI ₅₀ para as amostras de <i>P. divaricatum</i>	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata-dextrose-ágar
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CG-DIC	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50 %
E	Eugenol
JA	Ácido jasmônico
LEPRON	Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais
ME	Metileugenol
Pad	<i>Piper aduncum</i>
Pcal	<i>Piper callosum</i>
Pdiv	<i>Piper divaricatum</i>
Pkru	<i>Piper krukoffii</i>
Pmar	<i>Piper marginatum</i>
PDI	<i>Piper divaricatum</i> infectada
PDNI	<i>Piper divaricatum</i> não infectada
PNI	<i>Piper nigrum</i> infectada
PNNI	<i>Piper nigrum</i> não infectada
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.1.1	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	Piperaceae	18
3.2	A Espécie <i>Piper nigrum</i> L.	18
3.3	Fusariose	21
3.4	Potencial antifúngico de óleos essenciais de espécies de <i>Piper</i>	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Obtenção das amostras de óleos essenciais	26
4.2	Obtenção do isolado e cultivo de <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	26
4.3	Determinação da atividade fungicida dos óleos essenciais	27
4.3.1	Avaliação Sobre o Crescimento Micelial	27
4.3.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória e CI ₅₀	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Composição química dos óleos essenciais	28
5.2	Avaliação sobre o crescimento micelial	29
5.3	Determinação da concentração mínima inibitória e ci₅₀	31
5.4	Avaliação dos efeitos combinados dos componentes majoritários do óleo de <i>P. divaricatum</i>	33
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO I

Atividade Fungicida *in vitro* dos Óleos Essenciais de *Piper*

1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por fungos de solo constituem um vasto complexo etiológico e são responsáveis pelas maiores perdas de produtividade em culturas economicamente importantes (CARDOSO, 1991). No geral, as podridões radiculares são consideradas doenças de difícil controle, onde métodos drásticos são aplicados, como a esterilização do solo, que limita-se a pequenas áreas e provoca sérios danos ambientais. Nas áreas extensivas, a melhor medida ecologicamente sustentável é a rotação de culturas, alternativa dispendiosa quando se lida com fungos que possuem habilidade de competição saprofítica, ou que formam estruturas de resistência (REIS et al, 2004).

O Estado do Pará é o principal produtor nacional da pimenta do reino (*Piper nigrum* L.) e sua produção é comprometida pela fusariose, doença causada pelo fitopatógeno *F. solani* f. sp. *piperis* (teleomorfo *Nectria hematococca* Berk), restrito ao Brasil. A enfermidade causa a redução do período útil de exploração dos pimentais para apenas quatro anos, e perda de 10% nas áreas cultivadas, correspondendo a um prejuízo de 5 milhões de dólares/ano (CARNAÚBA et al, 2006; MAPA, 2007). As primeiras tentativas para o controle da fusariose visaram à obtenção de genótipos resistentes por hibridação interespecífica (ALBUQUERQUE, LIBONATI, 1964; POLTRONIERE et al, 1999). Além disso, a aplicação de materiais orgânicos no solo, como a pré-incubação da casca do caranguejo e botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) proporcionaram o aumento da sobrevivência e controle da fusariose por 90 dias (ONIKI et al, 2003; BENCHIMOL et al, 2006). Outra medida estudada foi o controle biológico da fusariose utilizando fungos micorrízicos arbusculares (CHU et al, 1997). Diferentes níveis de tolerância foram observados em espécies de *Piper* nativas da Amazônia, após inoculação do fungo, indicando o potencial destas espécies no combate a fusariose (ALBUQUERQUE et al, 2001).

Neste sentido, é relevante o estudo de espécies que produzem metabólitos secundários, como os óleos essenciais com atividade antifúngica, pois é um produto natural e uma alternativa viável contra a fusariose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- a) Estudar um mecanismo de controle do fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em pimenta do reino, por meio da atividade antifúngica dos metabólitos secundários de *Piper divaricatum*.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de espécies de *Piper* ricos em fenilpropanóides frente a *F. solani* f. sp. *piperis*;
- b) Identificar uma espécie de *Piper* nativa da Amazônia potencialmente resistente a fusariose.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Piperaceae

A família Piperaceae pertence a ordem Piperales, classificada como angiosperma basal (JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004). É composta por quatro gêneros: *Zippelia*, *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* e inclui aproximadamente 4.000 espécies e tem larga distribuição em regiões tropicais e temperadas, geralmente com indivíduos de portes do tipo arbustos, subarbustos, arvoretas ou árvores com altura de 1 - 10 m (JARAMILLO; MANOS; ZIMMER, 2004).

As espécies apresentam folhas alternadas, com formas e tamanhos variáveis, espigas opostas às folhas, pedunculadas; flores aperiantadas, densamente congestas ou laxas, drupas de forma variável, com pericarpo pouco espesso (GUIMARAES; MONTEIRO, 2005). Embora seja fácil de reconhecer por uma combinação de caracteres vegetativos e reprodutivos, as suas flores aparentemente detêm diferenças que dificultam a classificação infragenérica das espécies (JARAMILLO; MANOS, 2001).

A Amazônia abriga um grande número de espécies de *Piper* que apresentam como característica um bom rendimento em óleo essencial (MAIA; ANDRADE, 2009). Os metabólitos presentes podem ser utilizados como matéria-prima na indústria de química fina e podem ser aplicados como perfumes, fragrâncias e cosméticos, ou na indústria de medicamentos (MAIA; ANDRADE, 2009). O óleo de *P. hispidinervum* rico em safrol (70 - 95%), utilizado na indústria de perfumes e fragrâncias como fixador, é agente sinérgico e um ótimo inseticida natural (MAIA et al, 1987). O óleo de *P. aduncum* é rico em dilapiol (31,5- 97,3%) considerado um produto natural com atividade fungicida e inseticida (MAIA et al., 1998).

3.2 A Espécie *Piper nigrum* L.

Piper nigrum L. (pimenteira-do-reino) é uma espécie trepadeira que cresce aderida a tutores de madeira ou troncos de árvores e produz frutos do tipo baga em inflorescências formadas nos ramos plagiotrópicos (Fotografia 1) (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005). A exploração da cultura é milenar, tendo seu início na

Índia, quando o comércio era feito entre Oriente Médio e Europa. Os frutos e demais tecidos deste vegetal possuem piperina, um alcalóide responsável pelo sabor picante, o que torna esta planta apreciada e largamente utilizada na culinária em vários países do mundo (GAIA et al, 2007). No Brasil, o cultivo comercial foi introduzido por imigrantes japoneses no município de Tomé-Açu, a partir do ano de 1933 (FARIA FILHO, 2002).

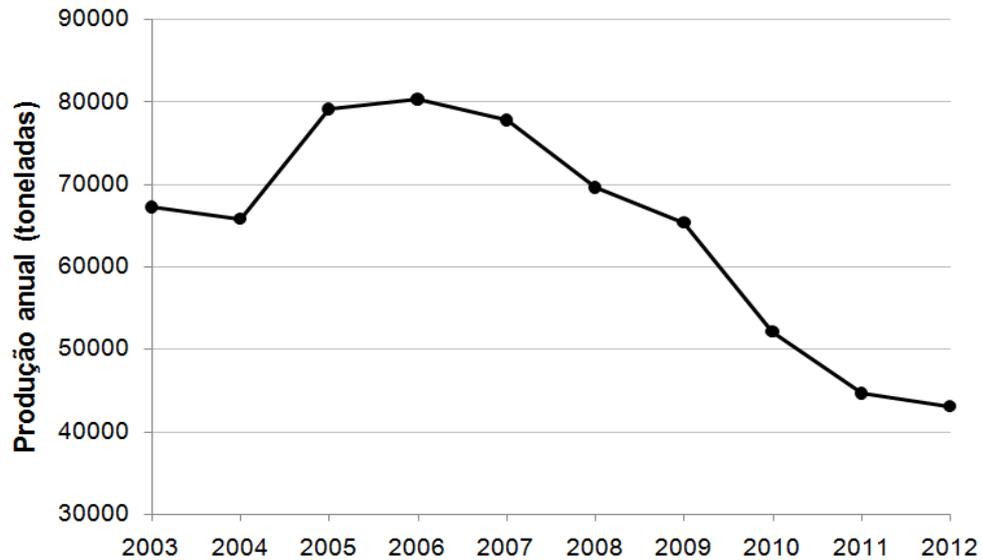
Fotografia 1 – *Piper nigrum* em fase de frutificação (*P. nigrum* L.).



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

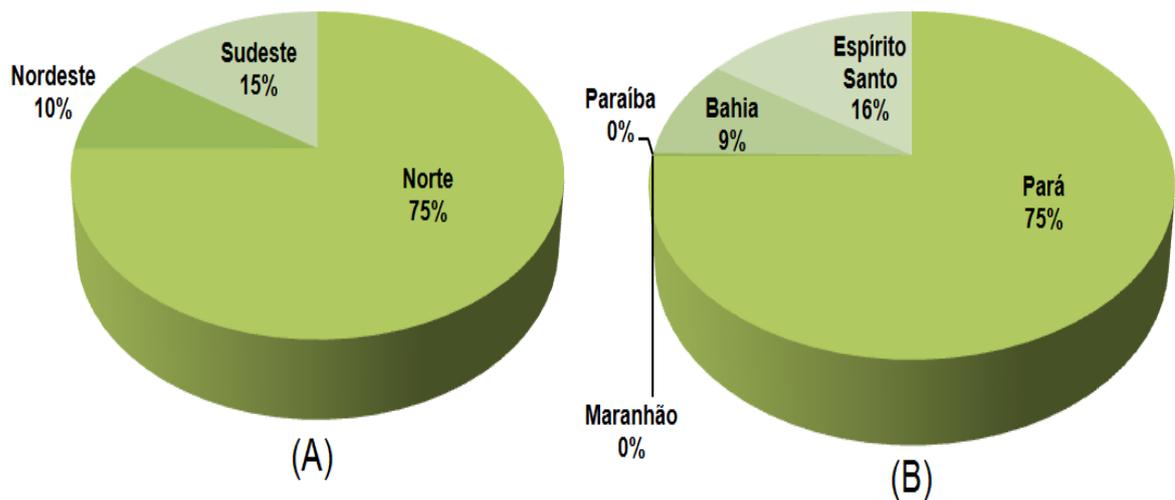
O Estado do Pará detém a maior produção nacional, sendo esta cultura de grande importância na economia regional (ENCONTRO..., 2010). Segundo os dados do levantamento sistemático da produção agrícola no ano de 2012, a safra nacional foi de aproximadamente 43.000 toneladas (t), com cerca de 75% desta produzida apenas no estado do Pará (Figura 2). Para o último decênio (2003 – 2012) nota-se um pico na produção nos anos de 2005, 2006 e 2007 com média de 80.000 toneladas/ano. O declínio da produção ocorreu principalmente a partir de 2010, com média de 46.600 toneladas/ano, o que corresponde uma queda superior a 40% (Figura 1).

Figura 1 – Dados da produção agrícola de pimenta-do-reino no Brasil obtida no último decênio de 2003 – 2012.



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013.

Figura 2 – Dados da produção de pimenta do reino segundo o levantamento sistemático da produção agrícola para o ano de 2012. (A) Produção nacional por região; (B) Produção por estado.



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013.

Um dos principais fatores para o comprometimento da cultura é a incidência da fusariose, doença restrita ao Brasil que influencia de forma significativa a longevidade das plantas e reduz o ciclo produtivo (BARBOSA, 2002).

3.3 Fusariose

Espécies do gênero *Fusarium* habitam naturalmente os solos e sobrevivem tanto na planta quanto na matéria orgânica, como saprófita, ocasionando doenças em plantas hospedeiras (SINGHA et al, 2011). Tipos diferentes de espécies de *Fusarium* provocam estragos em diferentes culturas, como a do abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*), banana (*Musa* spp), maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), causada por *F. subglutinans*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* e *F. solani*, respectivamente. A doença destrói o sistema radicular, o que provoca sérios prejuízos econômicos (CHU et al, 2006; MATOS et al, 2009; SWARUPA; RAVISHANKAR; REKHA, 2013; FISCHER et al, 2010).

A pimenteira do reino é muito suscetível a fusariose, causada pelo *F. solani* f. sp. *piperis*. A infecção nas pimenteirinhas-do-reino geralmente tem início nas plantas com mais de dois anos de idade, pelas raízes mais jovens e raízes secundárias, provocando como primeiro sintoma o amarelamento das folhas e com o avanço da doença aparece a clorose das folhas (Figura 3a). A medida que o fungo cresce nos tecidos causa obstrução dos vasos condutores e escurecimento das raízes e da base do caule (Figura 3b). A infecção radicular ocorre durante o período chuvoso, o que favorece a multiplicação do patógeno e o avanço da colonização nos tecidos das raízes em uma mesma planta, bem como a disseminação entre plantas vizinhas (TREMACOLDI, 2010). Os sintomas característicos são exibidos durante a estação seca, como a podridão das raízes, amarelecimento das folhas e morte da planta (DUARTE; ALBUQUERQUE, 2005; TREMACOLDI, 2010; CHU et al, 2006).

Figura 3 – Pimenta do reino (*P. nigrum*) em estágio avançado da fusariose. (A) Necrose das folhas (B) Sintoma de podridão do colo.



(A)

(B)

Fonte: Tremacoldi, 2010

O controle da fusariose torna-se muito difícil devido a capacidade de disseminação pelo vento, água da chuva e contato de raízes das plantas infectadas com outras sadias (FILGUEIRAS et al, 2001). Várias medidas alternativas para combater a fusariose foram avaliadas, dentre estas, a estratégia de introduzir materiais orgânicos como aditivo no solo de mudas infectadas por *F. solani* f. sp. *piperis*.

A pré-incubação da casca de caranguejo (*Ucides cordatus*) no solo (1,0% m/m) antes do transplântio aumentou em 20% a sobrevivência da pimenteira-do-reino (BENCHIMOL; SUTTON; DIAS-FILHO, 2006). A adição de 10g/L das folhas do nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) no solo e 100g de botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) em 30 a 100L de solo controlaram os sintomas da fusariose por 90 dias (ONIKI et al, 2003; TREMACOLDI, 2011) e acredita-se que a sua atividade fungicida pode estar relacionada com seus metabólitos secundários.

3.4 Potencial antifúngico de óleos essenciais de espécies de *Piper*

Os óleos essenciais são frações voláteis naturais, extraídas de plantas aromáticas e evaporam à temperatura ambiente (SANTOS et al, 2004). Sua função *in natura* está associada à atração de insetos para fins de polinização, ou então na repulsão de herbívoros como arma de defesa (LIMA; OLIVEIRA, 2003). A

composição química de óleos essenciais geralmente é formada por terpenos, fenilpropanóides, aldeídos, cetonas, lignanas e neolignanas (PARMAR et al, 1997). Algumas destas moléculas são tóxicas e atuam auxiliando nos mecanismos de defesa das plantas (ALMEIDA et al, 2007; MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003).

Espécies do gênero *Piper* são excelentes produtoras de óleos essenciais com propriedades antimicrobiana, antioxidante e antiinflamatórias (ALMEIDA et al, 2007). O potencial antifúngico dos óleos ricos em fenilpropanóides das espécies de *Piper* da região Amazônica (Figura 4) foi previamente relatado na literatura.

Piper aduncum, conhecida popularmente como “pimenta-de-macaco” ou “aperta-ruão” (ALMEIDA et al, 2009) possui atividade analgésica, fungicida, bactericida, insecticida, larvicida e moluscida (SOUSA et al, 2008). O componente majoritário do óleo essencial é o dilapiol que pode variar de 31,5 a 91,1 % (MAIA et al, 1998).

Piper callosum é distribuída nos estados do Pará e Amazonas e conhecida como “elixir paregórico” (VIEIRA, 1991), cujo óleo essencial é comumente rico em safrol (43,7 – 74,2%), um precursor do piperonal e o ácido piperonílico utilizados na indústria farmacêutica, no comércio de perfumes e cosméticos (ANDRADE; GUIMARÃES; MAIA, 2009; MAIA et al, 2000; MAIA et al, 1987).

Piper divaricatum é distribuído nos estados do Amazonas, Pernambuco, Bahia, Pará, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (GUIMARÃES; MONTEIRO, 2006). A raiz é aromática, de sabor forte, semelhante ao gengibre (PISSINATE, 2006) e os principais componentes do óleo essencial são metileugenol e eugenol (SILVA et al, 2010).

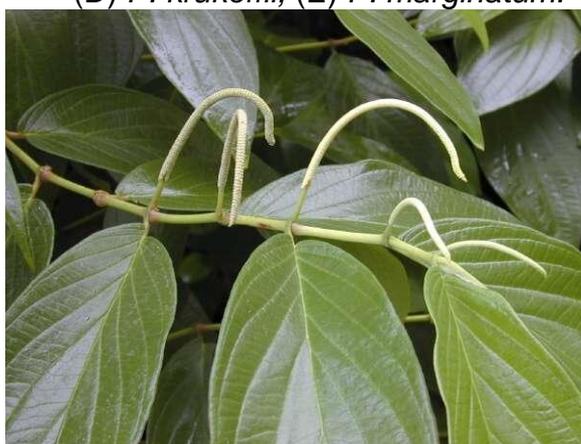
Piper marginatum é conhecida como “caapeba cheirosa” ou “malvarisco” (D’ANGELO et al, 1997). O óleo essencial apresenta polimorfismo intra-específico com composição marcada pela presença de sesquiterpenos e fenilpropanóides (ANDRADE; GUIMARÃES; MAIA, 2009). Na Amazônia, o tipo químico mais comum é rico em fenilpropanóide 3,4-metilenodioxipropiofenona (14,5 a 40,2%) (ANDRADE et al, 2008; RAMOS et al, 1986).

Piper krukoffii é conhecida por pimenta-longa. Existem poucos relatos na literatura da caracterização química da espécie. Foram identificados dois tipos químicos para seu óleo essencial, um dominado por apiol (40,0 - 80,0%) e outro por

miristicina (40,3%) e apiol (25,4%) em menor concentração (ANDRADE; GUIMARÃES; MAIA, 2009; SILVA, 2010).

A estrutura química dos compostos majoritários das espécies descritas acima está representada na Figura 5.

Figura 4 – Espécies de *Piper* com ocorrência na Amazônia ricas em fenilpropanóides: (A) *P. aduncum*, (B) *P. callosum*, (C) *P. divaricatum*, (D) *P. krukoffii*, (E) *P. marginatum*.



(A)



(B)



(C)



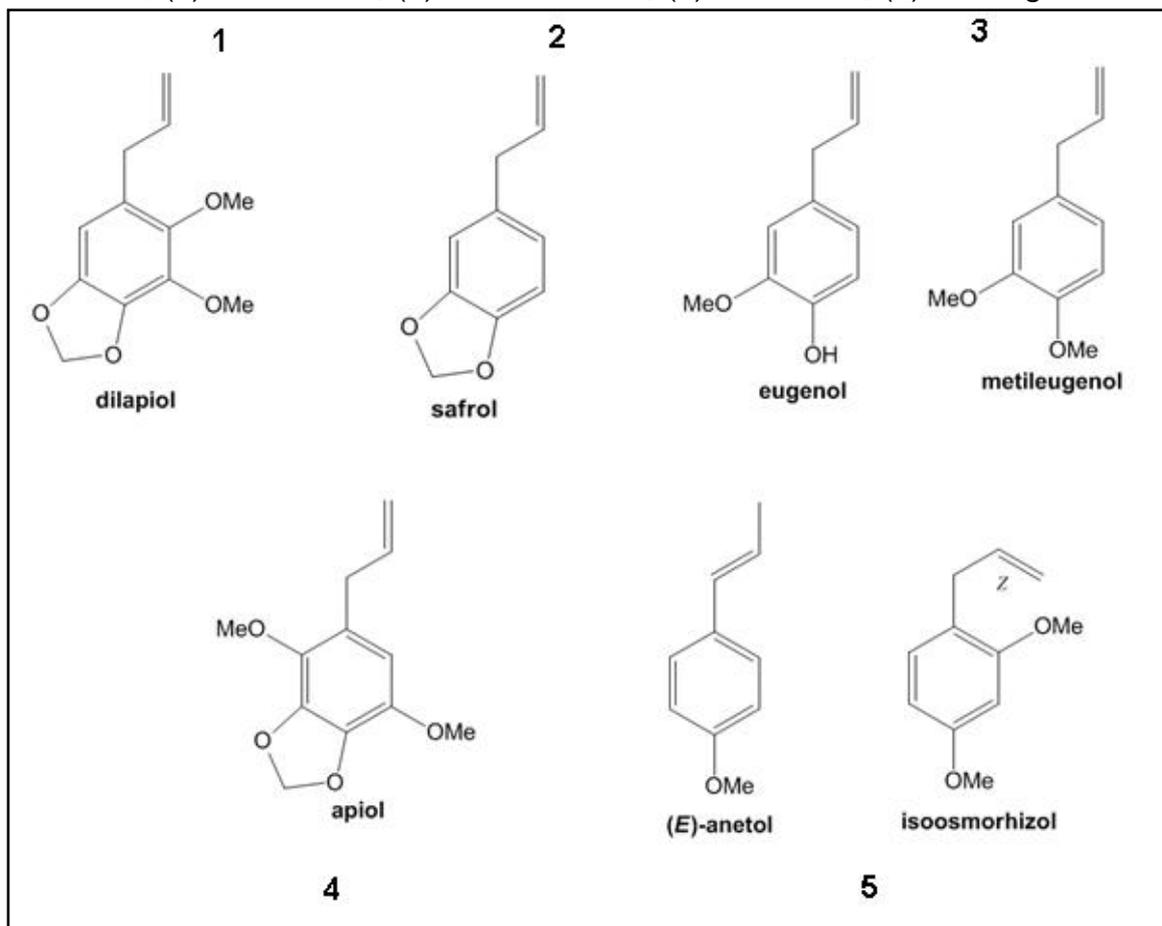
(D)



(E)

Fonte: Grupo de Plantas Aromáticas e Oleaginosas, 2014.

Figura 5 – Estruturas dos componentes majoritários das espécies de : (1) *P. aduncum*, (2) *P. callosum*, (3) *P. divaricatum*, (4) *P. krukoffii*, (5) *P. marginatum*.



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

A eficácia dos óleos essenciais das espécies citadas foi demonstrada frente a vários fitopatógenos em testes *in vitro* e *in vivo*. O óleo essencial de *P. aduncum* na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inibiu 100% do crescimento micelial e germinação dos conídios de *Colletotrichum musae*, causador da antracnose na banana (BASTOS, ALBUQUERQUE, 2004). O óleo de *P. callosum* foi ativo no controle do fitopatógeno *Phytophthora capsici* (SILVA; BASTOS, 2007). Os óleos de *P. aduncum*, *P. callosum*, *P. divaricatum* e *P. marginatum* inibiram o crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa em cacauzeiros (SILVA; BASTOS, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), com os testes *in vitro* dos óleos essenciais de *Piper aduncum*, *P. callosum*, *P. divaricatum*, *P. krukoffii* e *P. marginatum* da Região Amazônica, frente ao fitopatógeno *F. solani* f. sp. *piperis*, para selecionar a espécie que melhor apresentar atividade antifúngica.

4.1 Obtenção das amostras de óleos essenciais

Inicialmente, foram selecionadas espécies de *Piper* nativas da região Amazônica produtoras de óleos ricos em fenilpropanóides. Os óleos provenientes das folhas e ramos finos de espécies de *Piper* foram cedidos pelo grupo de pesquisa de “Plantas Aromáticas e Oleaginosas da Amazônia” da Universidade Federal do Pará (UFPA). Esses óleos foram extraídos por hidrodestilação com extrator de Clevenger (3h), armazenados a temperatura de 5°C e caracterizados quimicamente por CG-DIC e CG-EM (ADAMS, 2007; NIST, 1998). Os óleos essenciais ricos em fenilpropanóides selecionados, foram provenientes de coletas realizadas em diferentes cidades do estado do Pará: *P. aduncum* (Belém), *P. callosum* (Marituba), *P. divaricatum* (Breves), *P. krukoffii* (Carajás) e *P. marginatum* (Salvaterra) (SILVA, 2010; ANDRADE, GUIMARAES, MAIA, 2009).

4.2 Obtenção do isolado e cultivo de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*

Os isolados de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* foram obtidos a partir de planta com sintomas da fusariose após vinte dias da inoculação. Foram cortados pequenos pedaços do caule, próximo ao local com sintomas. Os pedaços foram higienizados com álcool, água esterilizada e hipoclorito de sódio 10% por um minuto e colocados em contato com meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a 27°C. Após dez dias de incubação foi possível o isolamento do fungo. Para cada experimento, o fungo foi repicado em placas de Petri e utilizado nos ensaios com cerca de 15 dias de crescimento.

4.3 Determinação da atividade fungicida dos óleos essenciais

4.3.1 Avaliação Sobre o Crescimento Micelial

A atividade antifúngica foi avaliada pelo método da diluição em ágar (TAIRA et al, 1994). Os óleos foram incorporados em meio BDA fundente para se obter a concentração de 5 mg.mL⁻¹. Discos de micélio do fitopatógeno (9 mm) foram transferidos para o centro das placas de *Petri* (60 x 15 mm). As placas foram incubadas à temperatura de 27°C em incubadora Demanda Bioquímica De Oxigênio (B.O.D.). Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Placas sem as amostras dos óleos essenciais foram usadas como controle. O crescimento micelial foi monitorado por sete dias e o índice antifúngico, calculado de acordo com a equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \left[1 - \frac{\text{\textcircled{O}} \text{ crescimento do tratamento (mm)}}{\text{\textcircled{O}} \text{ crescimento do controle (mm)}} \right] 100$$

4.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória e CI₅₀

A amostra que apresentou maior inibição na concentração de 5 mg.mL⁻¹ foi incorporada em meio BDA nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 mg.mL⁻¹. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração capaz de causar 100% de inibição. Os valores de CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento micelial do fungo) foram monitorados por sete dias e calculados por análise de próbitos e regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química dos óleos essenciais

Altas concentrações de derivados fenilpropanóides são encontradas em óleos essenciais de espécies de *Piper* de ocorrência na Amazônia brasileira. Desta forma, foram selecionados óleos com esta característica identificada previamente. O dilapiol (91,4%) foi dominante no óleo essencial de *P. aduncum*; no óleo de *P. callosum* foi identificado safrol (78,0%) e metileugenol (8,7%); apiol (80%) foi majoritário no óleo de *P. krukoffii* e *Z*- isoosmorhizol (44,0%) e *E*-anetol (22,0%) no óleo de *P. marginatum* (ANDRADE; GUIMARÃES; MAIA, 2009; SILVA et al, 2011; SILVA, 2010; ANDRADE; SILVA; MAIA, 2007). Apenas a espécie *P. divaricatum* foi coletada novamente e os componentes identificados no óleo essencial foram metileugenol (75,2%) e eugenol (7,9%). A composição química total identificada encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de *P. divaricatum*.

Componente	IR^a	IR^b	Óleo^c (%)
α- pineno	942	932	2,1
β- pineno	988	974	3,2
limoneno	1036	1024	1,1
<i>E</i> -β-ocimeno	1052	1044	0,8
borneol	1178	1165	0,1
eugenol	1361	1356	7,9
β-elemeno	1395	1389	0,1
metileugenol	1419	1403	75,2
β-metileugenol	1427	1417	1,9
β-gurguneno	1438	1431	0,3
α-humuleno	1462	1452	0,1
<i>trans</i> - muurola-4(14),5-dieno	1487	1493	1,4
eugenol acetato	1524	1521	3,8
elemicina	1553	1555	0,3
<i>E</i> -nerolidol	1568	1561	0,1
óxido de cariofileno	1586	1582	0,1
Monoterpenos hidrocarbonetos			6,3
Monoterpenos oxigenados			0,1

Sesquiterpenos hidrocarbonetos	3,8
Sesquiterpenos oxigenados	0,2
Fenilpropanóides	87,2
Total identificado	98,5

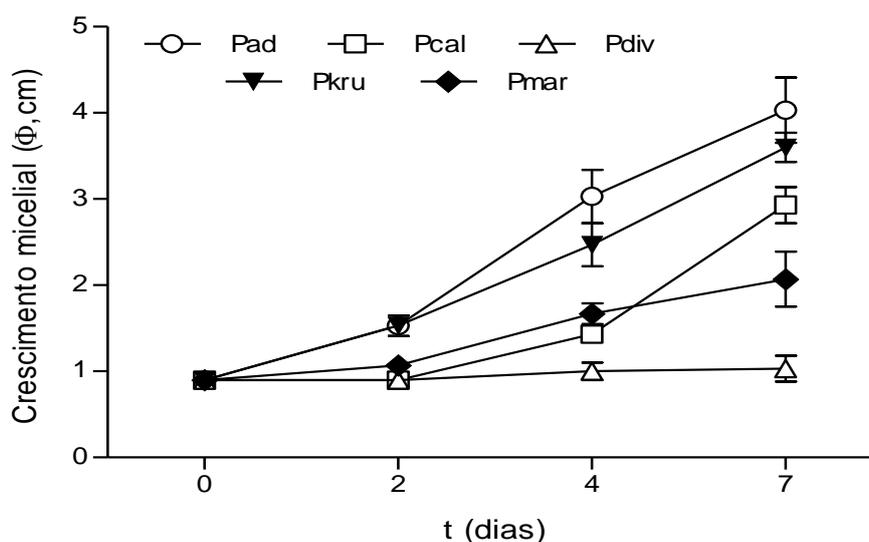
Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

^aÍndice de retenção calculado utilizando a série homóloga de n-alcenos; ^b Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007); ^c porcentagem dos compostos obtidas pela integração da área no detector de ionização de chamas.

5.2 Avaliação sobre o crescimento micelial

A atividade antifúngica de óleos essenciais e seus componentes pode ser atribuída a suas propriedades hidrofóbicas, as quais determinam a habilidade para penetrar na membrana plasmática e induzir mudanças nas propriedades físico-químicas da parede celular, membrana celular e organelas (KNOBLOCH et al,1987; RASOOLI; OWLIA, 2005). O crescimento micelial foi monitorado por sete dias e foram observados os efeitos dos óleos essenciais quando incorporados ao meio BDA (Figura 6). Apenas o óleo de *P. divaricatum* (**Pdiv**), manteve eficiência antifúngica de 100% no decorrer do experimento. Os óleos de *P. callosum* (**Pcal**) e *P. marginatum* (**Pmar**) alcançaram cerca de 80% de inibição no quarto dia, porém não a mantiveram constante.

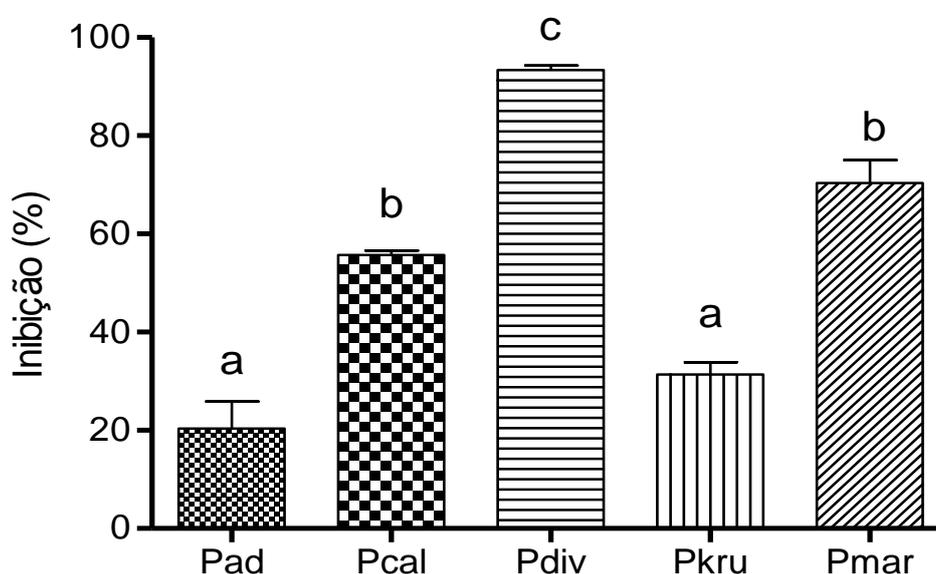
Figura 6 – Cinética de inibição do crescimento micelial de *F. solani* f. sp. *piperis* em meio BDA com adição de (5 mg.mL^{-1}) de óleos essenciais de *Piper* spp.



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial após 7 dias foi calculada e os resultados mostraram baixa atividade, não diferindo estatisticamente do controle ($p > 0,05$) para os óleos de *P. aduncum* ($20,3 \pm 9,6\%$) e *P. krukoffii* ($31,4 \pm 4,4\%$); atividade moderada para *P. callosum* ($55,7 \pm 1,6\%$) e *P. marginatum* ($70,3 \pm 8,2\%$) e alta atividade para o óleo de *P. divaricatum* ($93,3 \pm 1,7\%$) (Figura 7).

Figura 7 – Efeito inibitório dos óleos essenciais de *Piper* spp na concentração de 5 mg.mL^{-1} sobre o crescimento micelial de *F. solani* f. sp. *piperis* após sete dias de cultivo em meio BDA; barras verticais indicam o desvio padrão ($n = 4$); ^{a,b,c} Amostras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

A atividade fungicida de óleos essenciais de espécies de *Piper* foi previamente reportada. O óleo de *P. aduncum* inibiu a antracnose na banana (*Musa* spp.), causada por *Colletotrichum musae* (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004). Além disso, mostrou atividade contra *Magnaporthe grisea* e *Pythium ultimum*, que causam danos em vários grãos e vegetais (GUERRINI et al, 2009). O principal componente, o dilapiol foi efetivo no controle de *Moniliophthora perniciosa*, causador da “vassoura de bruxa” no cacau (ALMEIDA et al, 2009). Embora o óleo de *P. aduncum* não tenha demonstrado atividade contra *F. solani* f. sp. *piperis*, estudos anteriores com resíduos foliares incorporados em solo infestado com o fitopatógeno mostraram uma redução na mortalidade e prolongamento da sobrevivência de mudas de pimenta do reino (BASTOS, 2011).

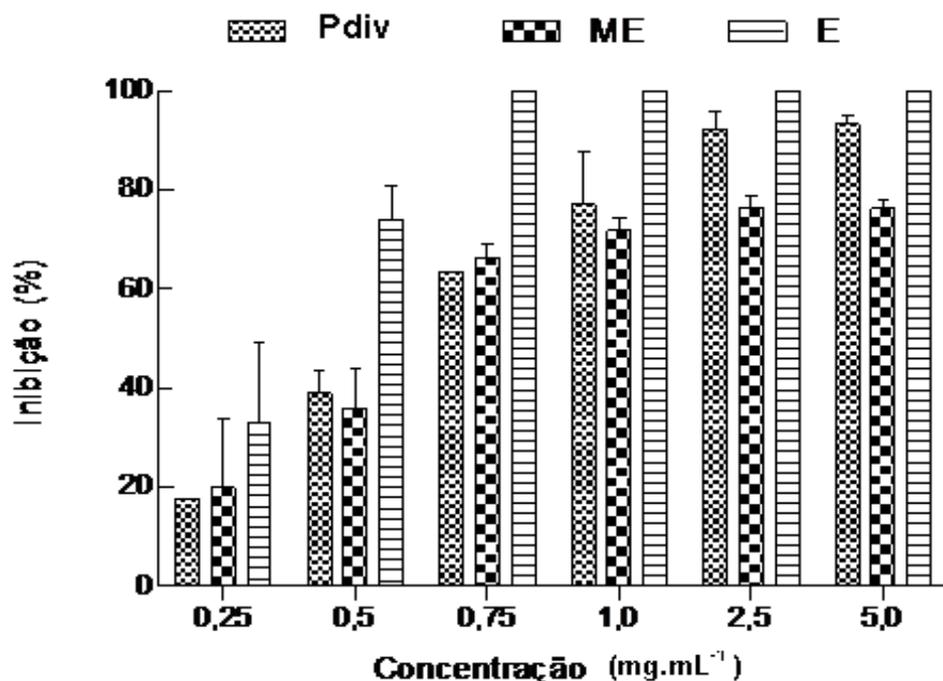
A atividade fungicida pode ser observada para óleos essenciais ricos em apiol. O óleo de *P. krukoffii*, com uma concentração de apiol de 25,4%, apresentou atividade fungicida equivalente ao miconazol frente a *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (SILVA et al, 2011). O óleo *P. holtonii* C. DC com uma quantidade ainda maior de apiol (64,2%) apresentou inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* e *Botryodiplodia theobromae*, importantes patógenos pós-colheita de frutas (PINEDA et al, 2012). Apesar do alto teor de apiol (80,0%) o óleo essencial de *P. krukoffii* não demonstrou eficácia na inibição do crescimento de *F. solani* f. sp. *piperis*.

O óleo de *P. divaricatum* em altas concentrações mostrou inibição da germinação de basidiósporos *M. perniciosus* (SILVA; BASTOS, 2007). Por outro lado, a atividade antifúngica foi equivalente ao miconazol quando avaliado frente a *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* pelo método de bioautografia direta (SILVA et al, 2010).

5.3 Determinação da concentração mínima inibitória e ci_{50}

Devido à atividade antifúngica significativa de *P. divaricatum*, foram determinados os valores de CI_{50} para o óleo essencial de *Piper divaricatum* (**Pdiv**) e seus principais componentes eugenol (**E**) e metileugenol (**ME**). As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,25 a 5 mg.mL⁻¹ contra *F. solani* f. sp. *piperis*. O índice antifúngico variou de 18,0 – 92,0% para o óleo essencial e para o metileugenol foi de 32,3 – 79,0%. O eugenol inibiu totalmente o crescimento do fungo em várias concentrações e o valor observado para concentração inibitória mínima (CIM) foi de 0,75 mg.mL⁻¹ (Figura 8).

Figura 8 – Efeito inibitório do óleo essencial de *P. divaricatum* e seus componentes majoritários nas concentrações de 0,25 a 5,0 mg.mL⁻¹ sobre o crescimento micelial de *F. solani* f. sp. *piperis*. (média ± desvio padrão, n = 3).



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Os valores de CI₅₀ calculados por análise de próbitos e regressão não linear encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de CI₅₀ para as amostras de *P. divaricatum*.

Amostra	CI ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
Óleo essencial	0,698
Metileugenol	0,510
Eugenol	0,480

Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Embora o metileugenol tenha exibido atividade contra crescimento de vários microorganismos, poucos trabalhos têm considerado as propriedades inibitórias do metileugenol contra fitopatógenos (MEEPAGALA; STURTZ; WEDGE, 2002; PAULI; KNOBLOCH et al, 1987; KIVANÇ; AKGUL, 1988). Estudos demonstram sua atividade frente a *Alternaria humicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora cactorum*, com a melhor atividade contra *P. cactorum*

promovendo danos estruturais nas hifas (YANG et al, 2010). No entanto, não apresentou nenhuma atividade contra isolado de *F. solani* (DAN et al, 2010).

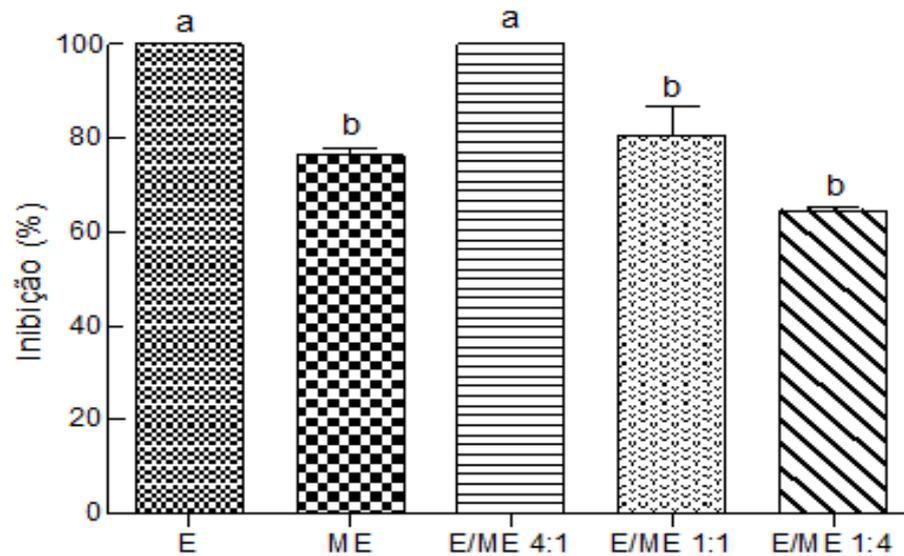
O eugenol apresentou atividade fungicida contra *F. verticillioides*, agente patogênico que infecta sementes de milho (MENNITI; GREGORI; NERI, 2010). Os fungos *Lenzites betulina* e *Laetiporus sulphureus* responsáveis pelo apodrecimento da madeira mostraram forte suscetibilidade ao eugenol com 100% de inibição (YEN; CHANG, 2008). No entanto, os fitopatógenos *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Botrytis cinerea* mostraram-se resistentes pelo método de bioautografia direta (MEEPAGALA; STURTZ; WEDGE, 2002).

5.4 Avaliação dos efeitos combinados dos componentes majoritários do óleo de *P. divaricatum*

O efeito da combinação entre metileugenol (**ME**) e eugenol (**E**) foi observado e caracterizado como efeito sinérgico, aditivo ou antagonista contra *F. solani* f. sp *piperis* (BENZ, 1971). A interação foi avaliada comparando o efeito na concentração de 0,75 mg.mL⁻¹, na qual o eugenol apresentou inibição máxima. As combinações de metileugenol/eugenol foram nas proporções de 4:1, 1:1 e 1:4, com a inibição do crescimento micelial avaliada por sete dias de cultivo (Figura 9).

O metileugenol e eugenol isolados provocaram inibição de 76,3% e 100%, respectivamente. Nas combinações de **E/ME** 4:1 o efeito observado foi aditivo em relação ao metileugenol, pois a inibição aumentou significativamente de 76,3% para 100%; no entanto, quando a proporção de eugenol diminuiu para **E/ME** 1: 1 observou-se apenas um discreto aumento na inibição de 76,3% para 80,0%. Quando a concentração de eugenol é menor que a de metileugenol (**E/ME** 1:4) nota-se uma diminuição na inibição para 64,6%, equivalente ao efeito inibitório do óleo puro (63,4%) na mesma concentração. Desta forma podemos inferir que para uma inibição de 100% se faz necessário que a proporção de eugenol no óleo seja aproximadamente de 80,0% para ser eficiente na concentração de 0,75 mg.mL⁻¹.

Figura 9 – Efeito combinado dos compostos majoritários (eugenol: metileugenol) do óleo essencial de *P. divaricatum* na concentração de $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ sobre o crescimento micelial de *F. solani* f. sp. *piperis*. ^{a,b} amostras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

A padronização do óleo como bioativo se torna relevante, uma vez que sua composição química apresenta variações sazonais. O monitoramento durante os meses de maio a outubro mostrou variação de 16,9 – 93,2% para metileugenol e de 46,1 – 1,8% para o eugenol (ANDRADE; GUIMARÃES; MAIA, 2009b).

6 CONCLUSÃO

A triagem da atividade antifúngica *in vitro* de óleos essenciais de espécies de *Piper* ricos em fenilpropanóides conduziu a descoberta de uma espécie resistente a fusariose. A resistência à fusariose apresentada por *Piper divaricatum* pode estar relacionada com a produção de seus metabólitos secundários, com destaque para eugenol, metileugenol, que em combinação demonstraram efeito satisfatório frente a *F.solani* f. sp. *piperis*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALBUQUERQUE, M. de; LIBONATI, V. F. **IPEAN 25 Anos de pesquisas na Amazônia**: histórico, organização e pesquisas. Belém: IPEAN, 1964.

ALBUQUERQUE, F.C; DUARTE, M.L.R.; BENCHIMOL, R.L.; ENDO, T. Resistência de piperáceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp.piperis. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 3, p. 341-348, 2001.

ALMEIDA, José Gustavo L. de et al. Composição química dos óleos essenciais de *Piper divaricatum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2007. p. 304. Disponível em: <<https://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1317-1.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

ALMEIDA, R. R. P. et al. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiole rich essential oil. **Chemistry e Biodiversity**, Zürich, v. 6, n. 9, p. 1427-1434, Sept. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19774604>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

ANDRADE, Eloisa Helena A. et al. Variability in Essential Oil Composition of *Piper marginatum* Sensus Lato. **Chemistry e Biodiversity**, Suíça, p. 197-208, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18205123>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. **Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia**. Belém: Faculdade de Engenharia Química/UFPA, 2009.

ANDRADE, Eloísa Helena A.; SILVA, Joyce Kelly R. da; MAIA, José Guilherme S. Estudo sazonal e circadiano do óleo essencial de *Piper divaricatum* G. Meyer. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2007. p. 193-194. Disponível em: <<https://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/indiceautor.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

ANDRADE, Aretusa E. et al. In vivo proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiology Letters**, Estados Unidos, v. 281, n. 2, p. 167–174, Apr. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2008.01090.x/pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

BARBOSA, F. B. da C. Biotecnologia molecular e novo padrão de financiamento: Possibilidades para pesquisa da fusariose da pimenta-do-reino. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, DF, v. 19, n. 3, p. 429-449, set./dez. 2002.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, n. 5, p. 555-557, set./out. 2004. Disponível: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v29n5/21869.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

BASTOS, C. N. **Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.) e seus produtos: perspectivas de utilização no controle de pragas e doença de plantas**. Belém: Ceplac/Suepa, 2011.

BENCHIMOL, R. L.; SUTTON, J. C.; DIAS-FILHO, M. B. Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, n. 2, p. 180-184, mar./abr. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v31n2/30012.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2014.

BENZ, G. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: BURGESS, H. D.; HUSSEY, N. W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. Londres: Academic Press, 1971. p. 327-356.

CARDOSO, J. E. Controle de patógenos de solo na cultura do feijão. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS DO FEIJOEIRO, 2., 1991. **Anais...**, Campinas, 1991. p. 45-50.

CARNAÚBA, J. P. et al. Ocorrência de *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em *Piper nigrum* no estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 96-97, jan./mar. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v33n1/17.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2014.

CHU, E. Y. et al. Avaliação da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares sobre a incidência da fusariose da pimenta-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, n. 2, p. 205-208, jun. 1997. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98386/1/205.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2014.

CHU, E. Y. et al. **Pimenta-do-reino**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2006. (Coleção Plantar; Série vermelha fruteiras).

DAN, Y. et al. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *Mandshuricum* against five phytopathogens. **Crop Protection**, v. 29, p. 295-299, 2010.

SILVA, J. K. R. da. **Estudo químico e das propriedades biológicas dos óleos essenciais e extratos de espécies de *Piper* da Amazônia Oriental**. 2010. 220 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

D'ANGELO, L. C. A. et al. Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. a folk medicinal plant used as an analgesic, anti-inflammatory and hemostatic. **Phytomedicine**, Estados Unidos, v. 4, n. 1, p. 33-40, mar. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23195243>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

DUARTE, M. de L. R.; ALBUQUERQUE, F. C. de. **Sistema de produção da pimenta-do-reino, importância econômica.** Belém: EMBRAPA, 2005.

ENCONTRO, debates, desafios de setor da Pimenta-do-reino. Belém: Agro Indústria Fatura, 2010. Disponível em: <<https://agrofrtura.wordpress.com/2010/11/02/encontro-debate-desafios-do-setor-de-pimenta-do-reino/>>. Acesso: 2 nov. 2012.

FARIA FILHO, A. F. **Pimenta do reino – uma das mais importantes especiarias do mundo.** Belém, 2002.

FILGUEIRAS, Gisalda Carvalho et al. **Fontes de crescimento da produção de pimenta-do-reino no Estado do Pará no período de 1979 a 2001.** 2001. Disponível em: <<http://ainfo.Cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82554/1/01O001.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

FISCHER, Ivan Herman et al. Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 223-227, Apr./Jun. 2010. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/3445/3445>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

GAIA, José M. D. et al. Caracterização de acessos de pimenta-do-reino com base em sistemas enzimáticos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 25 n. 3, p. 333-342, jul./set. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v25n3/a04v25n3.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2014.

GRUPO de pesquisa. **Grupo de plantas aromáticas e Oleaginosas da Amazônia.** Belém: UFPA, 2014.

GUERRINI, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz e Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 39-48, jan. 2009.

GUIMARÃES, E. F.; MONTEIRO, D. Piperaceae na reserva biológica de Poço das Antas, Silva Jardim. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 57, n. 3, p. 567-587, 2006. Disponível em: <http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig57_3/12Piperacea e.pdf>. Acesso em: 10 maio 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 1-86, abr. 2013.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 88, n. 4, p. 706-716, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11302858>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

JARAMILLO, M. Alejandra; MANOS, Paul S.; ZIMMER, Elizabeth A. Phylogenetic relationships of the perianthless Piperales: reconstructing the evolution of floral development. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 165, n. 3, p. 403-416. 2004. Disponível em: <http://www.academia.edu/1935071/Phylogenetic_relationships_of_the_perianthless_Piperales_reconstructing_the_evolution_of_floral_development>. Acesso em: 15 jun. 2014.

KIVANÇ, M.; AKGUL, A. **Mayaların Gelismesi Uzerine Baharatların Etkisi**. Gıda, 1988.

KNOBLOCH, E. et al. **Mode of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests**, 1987.

LIMA, I. L. de; OLIVEIRA, C. L. F. de. Aspectos gerais do uso de óleos essenciais de eucalipto. **Revista Eletrônica de Engenharia Florestal**, São Paulo, v. 1, n. 1, fev. 2003. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/aquivos_destaque/uFOv5F4CiM2WGrt_2013-4-24-14-22-20.pdf>. Acesso em: 10 maio 2014.

MAIA, José Guilherme S. et al. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 200-204, 1987.

MAIA, José Guilherme S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, Estados Unidos, v. 13, p. 269-272, jul./ago. 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/%28SICI%291099-1026%281998070%2913:4%3C269::AID-FFJ744%3E3.0.CO;2-A/abstract>>. Acesso em: 17 jun. 2014.

MAIA, José Guilherme S. et al. Essential oils from *Conochea scoparioides* (Cham. & Schtdl.) Benth. **Flavour and Fragrance Journal**, Estados Unidos, v. 15, p. 413-414, nov./dez. 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1099-1026%28200011/12%2915:6%3C413::AID-FFJ931%3E3.0.CO;2-H/abstract>>. Acesso em: 17 jun. 2014.

MAIA, José Guilherme S.; ANDRADE, Eloísa Helena A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300006>. Acesso em: 18 jun. 2014.

MATOS, Aristoteles Pires de et al. **Monitoramento da fusariose em plantios de Abacaxi “Pérola” conduzidos em sistema de produção integrada no estado do Tocantins**. Tocantins: EMBRAPA, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37052/1/id27265pdf2443.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2014.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Brazil country paper presented on the 35th Session of the International Pepper Community**. Ministry of Agriculture, 2007.

MEDEIROS, R. B.; FERREIRA, M.; DIANESE, J. C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003.

MEEPAGALA, Kumudini M.; STURTZ, George; WEDGE, David E. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Alemanha, v. 50, n. 24, p. 6989–6992, 2002.

MENNITI, A. M.; GREGORI, R.; NERI, F. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonis in production in stored maize kernels. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 304-309, jan. 2010.
NIST (National Institute of Standards and Technology). **Mass Spectral Library**. The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, 1998.

ONIKI, M. et al. Método para controle da doença fusariose na pimenta-do-reino utilizando cravo-da-índia. In: SEMINÁRIO TÉCNICO BRASIL-JAPÃO: PROJETO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO PARA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL NA AMAZÔNIA ORIENTAL, 180., 2003, Belém. **Anais...** Belém: EMBRAPA, 2003.

PARMAR, Virinder S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, Washington, v. 46, n. 4, p. 597-673, out. 1997.

PAULI, A.; KNOBLOCH, K. Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, Berlim, v. 185, n. 1, p. 10-13, jul. 1987.

PINEDA, R.M., VIZCAÍNO, S.P., GARCÍA, C.M.P., GIL, J.H.G., DURANGO, D.L.R. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* Kunth and *Piper holtonii* C. DC. Against Phytopathogenic Fungi. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 72, n. 4, p. 507-515, Oct./Dec. 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/pdf/chiljar/v72n4/at08.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2013.

PISSINATE, K. **Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos.** 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós- Graduação em Química Orgânica, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

POLTRONIERI, Marh Costa; LEMOS, Orlei Filgueira de; ALBUQUERQUE, Fernando Carneiro de. Pimenta-do-Reino (*Piper nigrum* L.). In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Programa de melhoramento genético e de adaptação de espécies vegetais para a Amazônia Oriental**. Belém: EMBRAPA, 1999. (Coleção Documentos, 16). p. 127-137.

RAMOS, L. S. et al. Essential oil of *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 49, n. 4, p. 712-713, Jul./ Aug. 1986. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50046a033>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, v. 66, n. 24, p. 2851-2856, Dec. 2005.

REIS, E. M. et al. Manejo das podridões radiculares em soja. In: REIS, E. M. (Ed.). **Doenças na Cultura da Soja**. Porto Alegre: Aldeia Norte, 2004. (Série Técnica).

SANTOS, A. S. et al. **Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004. Comunicado técnico.

SILVA, Danielle Mariana M. H.; BASTOS, Cleber N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 2, p. 143-145, mar./abr. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v32n2/08.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

SILVA, J. K. R. da et al. Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 3, p. 477-480, mar. 2010.

SILVA, J. K. R. et al. Antioxidant Capacity and Larvicidal and Antifungal Activities of Essential Oils and Extracts from *Piper krukoffii*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 9, p. 1361-1366, set. 2011.

SINGHA, I. M. et al. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: a preliminary study. **World J Microbiol Biotechnol**, Índia, v. 27, p. 2583–2589, Apr. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-011-0730-6#page-1>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

SOUSA, Pergentino J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 217-221, abr./jun. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n2/13.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

SWARUPA, V.; RAVISHANKAR, K. V.; REKHA, A. Characterization of tolerance to *Fusarium oxysporum* f.sp., *cubense* infection in banana using suppression subtractive hybridization and gene expression analysis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Michigan, v. 83, p. 1-7, jul. 2013.

TAIRA, Shigehiko et al. Synthesis and fungicidal activity of new 1,3,2-oxazaphospholidine2-sulfides. **Journal of Pesticide Science**, Japan, v. 19, n. 4, p. 299-304, Oct./Dec. 1994.

TREMACOLDI, Célia Regina. **Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no estado do Pará e recomendações de controle**. Belém: EMBRAPA, 2010. (Série Documentos, 367). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31741/1/Doc-367.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

TREMACOLDI, C. R. **Tecnologia para o controle da podridão de raízes em mudas de pimenteira-do-reino**. Belém: EMBRAPA, 2011. (Comunicado Técnico, 226). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37518/1/ORIENTAL-ComTec226.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

VIEIRA, L. S. **Manual de medicina popular**: a fitoterapia da Amazônia. Belém: FCAP, 1991.

YANG, Nian-Wan et al. Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. **Crop Protection**, Washington, v. 29, n. 10, p. 1200-1207, out. 2010.

YEN, T. B; CHANG, S. T. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, India, v. 99, n. 1, p. 232-236, jan. 2008.

CAPÍTULO II

Atividade Antifúngica *in vivo* de *P. divaricatum* Frente ao Patógeno *Fusarium solani* f.
sp. *piperis*

RESUMO

O óleo essencial de *P. divaricatum* apresentou elevada atividade antifúngica *in vitro* frente ao patógeno fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose em Pimenta-do-reino. Por este motivo, mudas de *P. divaricatum* com seis meses de idade foram inoculadas com o patógeno para avaliação da resistência *in vivo*. A produção dos metabólitos secundários em resposta a infecção foi monitorada nos 7^o, 21^o, 30^o e 45^o Dia Após a Infecção (DAI) e foi observado um aumento nos níveis de fenilpropanóides e diminuição de sesquiterpenos nas plantas infectadas, com exceção do 30^o DAI. Além disso, ocorreu um aumento contínuo na atividade da Lipoxigenase (LOX), enzima envolvida nos mecanismos de defesa. Por outro lado, a síntese de compostos fenólicos e o perfil químico qualitativo dos extratos analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrômetro de Massa (HPLC-MS) não sofreu alterações relacionadas com a infecção. A espécie demonstrou resistência a fusariose durante 65 dias, quando comparada com *P. nigrum* cv. bragantina (usada como controle positivo). A caracterização do gene que converte eugenol em metileugenol em *P. divaricatum* e os resultados preliminares sugerem que a reação é catalisada por uma isoforma da O-metiltransferase. A caracterização deste gene auxiliará na compreensão dos mecanismos de resistência de *P. divaricatum* durante a infecção *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Palavras-chave: Mecanismo de resistência. Fenilpropanóides. Lipoxigenase. O-metiltransferase.

ABSTRACT

The essential oil of *P. divaricatum* presented high antifungal activity *in vitro* before the pathogenetic phytophathogen *Fusarium solani* f. sp. *piperis* that causes fusariosis in black pepper. For this reason, seedlings of *P. divaricatum* with six months of age were inoculated with the pathogen for evaluation of resistance *in vivo*. The production of secondary metabolites in response to infection was monitored during the 7th, 21st, 30th and 45th days after the infection (DAI) and it was observed an increase in the levels of phenylpropanoid and decrease of sesquiterpenos in the infected plants, with exception of 30th DAI. Besides, there was a continuous increase in the activity of lipoxygenase (LOX), enzyme part of defense mechanism. On the other hand, the synthesis of phenolic compounds and the qualitative chemical compound of extracts analysed by HPLC-MS did not suffer alterations related to infection. The species showed resistance to fusariosis during 65 days, when compared with *P. nigrum* cv. *bragantina* (used as positive control). The characterization of the gene, which converts eugenol in methyl eugenol in *P. divaricatum* and the first results, suggest that the reaction is catalysed by an isoform of O-methyltransferase. The characterization of this gene will help to understand the mechanisms of resistance of *P. divaricatum* during the infection *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Keywords: Resistance mechanism, phenylpropanoid family, lipoxygenase, O-methyl transferase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Via do ácido chiquímico em plantas para a biossíntese dos fenilpropanóides.....	12
Figura 2 -	Cascata da reação de defesa de plantas a partir da Via das Lipoxigenases.....	15
Fotografia 1 -	Mudas de <i>P. divaricatum</i> com seis meses idade.....	17
Fotografia 2 -	Infecção de <i>P. divaricatum</i> com conídios de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> : (A) Retirada das mudas do saco de polipropileno; (B) Lavagem das raízes; (C) Escovação das raízes para obtenção dos microferimentos; (D) Imersão das raízes na suspensão de conídios; (E) Replântio das mudas.....	18
Fotografia 3 -	Comparação da sintomatologia da fusariose entre <i>P. divaricatum</i> (PD) e <i>P. nigrum</i> (PN) no período de 3 a 65 DAÍ....	24
Figura 3 -	Variação dos teores de fenilpropanóides e sesquiterpenos identificados nas folhas de <i>P. divaricatum</i> infectadas e não-infectadas com <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> nos estágios de 7 – 45 dias.....	26
Figura 4 -	Variação dos teores de sesquiterpenos oxigenados e sesquiterpenos hidrocarbonetos identificados nas folhas de <i>P. nigrum</i> cv. <i>bragantina</i> infectadas e não-infectadas com <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> nos estágios de 7 – 45 dias.....	27
Figura 5 -	Variação na atividade enzimática das LOX em mudas de <i>P. divaricatum</i> infectadas e não infectadas por um período de 7 – 45 DAI com <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	30
Figura 6 -	Produção de compostos fenólicos por plantas de <i>P. divaricatum</i> infectadas e não infectadas por <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> por um período de 7- 45 dias. a,b,c,d amostras não apresentam diferença estatística significativa pelo teste t student ($p < 0,05$).....	31
Figura 7 -	Cromatogramas dos extratos AcOEt das folhas de <i>P. divaricatum</i> obtidos por HPLC-UV (280 nm) nos diferentes estágios de infecção por <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	33
Figura 8 -	(A) Qualidade de DNA extraído de <i>P. divaricatum</i> , 1. 50 ng/μL e 2. 150 ng/μL, M = marcador (B) DNA de <i>Ocimum basilicum</i> (Ob) de 200 ng/μL no volume de 5 μL.....	34
Figura 9 -	(A) Amplificações obtidas com DNA de <i>O. basilicum</i> . M= Marcador, Pd1 = PCR de DNA de <i>P. divaricatum</i> com 150 ng/μL, Pd2= PCR de DNA de <i>P. divaricatum</i> com 50 ng/μL Ob1= PCR com DNA <i>Ocimum basilicum</i> com 150 ng/μL Ob2= PCR com DNA <i>Ocimum basilicum</i> com 50 ng/μL.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos de plantas de <i>P. divaricatum</i> e <i>P. nigrum</i> com e sem infecção com <i>Fusarium solani</i>	19
Tabela 2 - Conjunto de <i>primers</i> utilizados na PCR para isolamento do gene Eugenol O-metiltransferase	22
Tabela 3 - Variação na produção de compostos voláteis por mudas de <i>P. divaricatum</i> infectadas e não infectadas por <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> no período de 7 – 45 DAI.....	28
Tabela 4 - Variação na produção de compostos voláteis por mudas de <i>P. nigrum</i> cv. bragantina infectadas e por <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> no período de 7 – 45 DAÍ.....	29
Tabela 5 - Diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de MgCl ₂ testadas na PCR para <i>P. divaricatum</i> e manjerição.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	Ácido Gálico Equivalente
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
CG-DIC	Cromatografia Gasosa Acoplada a Detector de Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
DAI	Dia Após a Infecção
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FT	Fenólicos Totais
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrômetro de Massa
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Ultravioleta-Visível
HR	Reação de Hipersensibilidade
LEPRON	Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais
LOX	Lipoxigenase
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
PAL	Fenilalanina amônio-liase
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PD	<i>P. divaricatum</i>
PN	<i>P. nigrum</i>
SAR	Reação Sistêmica Adquirida
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo geral	10
2.1.1	Objetivos específicos	10
3	REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1	Metabolismo secundário e atividade fungicida	11
3.2	Mecanismo de resistência	13
3.2.1	Reação de Hipersensibilidade (HR)	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Avaliação da resistência de espécies de <i>Piper</i> frente a <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	17
4.1.1	Seleção, Coleta e Cultivo das Espécies	17
4.1.2	Preparo da Suspensão Inoculante e Infecção com o Patógeno	18
4.1.3	Recuperação de <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i> das Plantas Infectadas	19
4.2	Monitoramento da produção de metabólitos secundários em resposta à inoculação com <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	19
4.2.1	Obtenção dos Extratos	19
4.2.2	Determinação da Concentração de Fenólicos Totais (FT)	20
4.2.3	Obtenção dos Óleos Essenciais	20
4.2.4	Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais	20
4.2.5	Determinação da Atividade de Lipoxigenase	21
4.3	Extração de DNA de <i>P. divaricatum</i>	21
4.3.1	Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) Para Obtenção do Gene Eugenol O-Metiltransferase	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1	Avaliação da resistência e produção de metabólitos de <i>P. divaricatum</i> desafiada com <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	23
5.2	Produção dos metabólitos secundários durante o desenvolvimento da fusariose	25
5.2.1	Comparação entre os Compostos Voláteis Produzidos por <i>P. divaricatum</i> e <i>P. nigrum</i> cv. bragantina Durante a Infecção com <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	25
5.2.2	Comparação da Atividade Enzimática da LOX Entre Plantas de <i>P. divaricatum</i> Infectadas e Não Infectadas por <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	30
5.2.3	Produção dos Compostos Fenólicos e Perfil Químicos dos Extratos das Folhas de <i>P. divaricatum</i> Durante a Infecção com <i>F. solani</i> f. sp. <i>piperis</i>	31

5.2.4	Isolamento do Gene Eugenol O-metiltransferase em <i>P. divaricatum</i>	33
6	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Uma alternativa promissora para o controle da doença fusariose é a busca por produtos naturais. Diante desta perspectiva se faz necessário o conhecimento do potencial fungicida dos metabólitos secundários, produzidos por espécies de *Piper* nativas da região Amazônica, bem como o entendimento dos mecanismos de produção de moléculas bioativas durante a interação planta-patógeno nas espécies tolerantes.

A compreensão dos mecanismos de defesa relacionados com a resistência induzida durante o ataque de fitopatógenos é relevante para a diminuição do uso de fungicidas químicos. No entanto, um grande número de trabalhos sobre interação planta-patógeno apresenta apenas informações sobre o metabolismo primário (NASCIMENTO et al, 2009; ANDRADE et al, 2008; CHIVASA et al, 2006). Estudos do metabolismo secundário durante a infecção demonstram a presença de fenilpropanóides, flavonóides e seus derivados, na indução da resistência à infecção, como observado em frutos cítricos desafiados com *Penicillium digitatum* (BALLESTER; LAFUENTE; GONZÁLEZ-CANDELAS, 2013).

Por este motivo, *Piper divaricatum*, produtora de óleo essencial rica em fenilpropanóide, foi identificada como a espécie que apresentou melhor atividade fungicida *in vitro* frente a *F. solani*, devido a isso foi utilizada no estudo de seus mecanismos de resistência *in vivo*. Os perfis metabólicos e a caracterização de genes de resistências de Piperáceas tolerantes a fusariose pode contribuir para descoberta de novas espécies com potencial econômico para o desenvolvimento de produtos fungicidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- a) Investigar os metabólitos secundários de *P. divaricatum* envolvidos no mecanismo de defesa à *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

2.1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a resistência *in vivo* da espécie de *Piper* que melhor demonstrar atividade antifúngica, nos ensaios com óleos essenciais *in vitro*;
- b) Monitorar a produção dos metabólitos secundários produzidos em diferentes estágios após a infecção com *F. solani* f. sp. *piperis*;
- c) Acompanhar a produção da enzima lipoxigenase de *P. divaricatum* após a inoculação com *F. solani* f. sp. *piperis*;
- d) Isolar e caracterizar o gene da enzima Eugenol O-Metiltransferase que converte eugenol em metileugenol na espécie *P. divaricatum*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

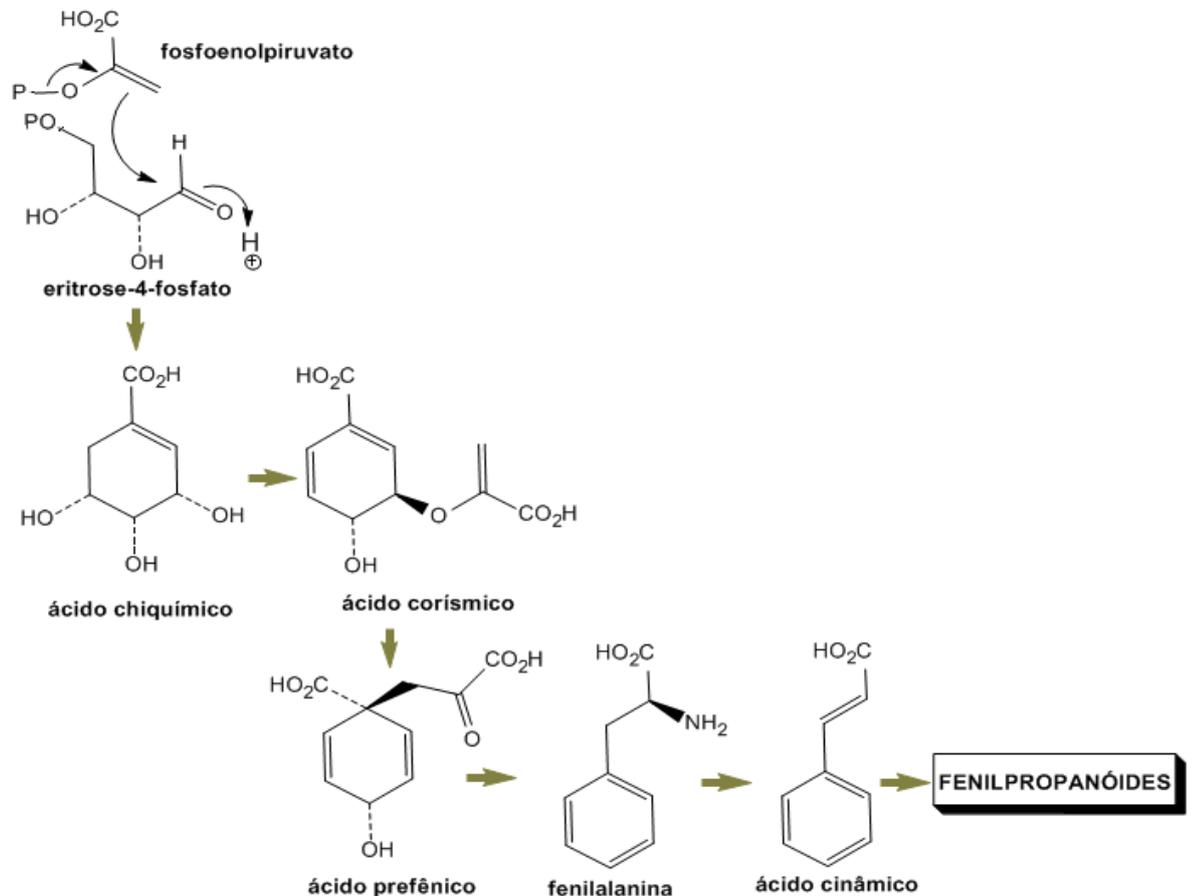
3.1 Metabolismo secundário e atividade fungicida

O metabolismo é um conjunto de reações bioquímicas que ocorrem no interior das células e pode ser dividido em primário e secundário. O metabolismo primário é essencial para o crescimento e desenvolvimento do vegetal, como a fotossíntese e a respiração. Por outro lado, o metabolismo secundário origina compostos não necessários a todas as plantas, mas desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. As três principais classes são: os compostos fenólicos, terpenos e alcalóides (PERES, 2004).

A produção dos compostos fenólicos nas plantas se dá pela via do ácido chiquímico (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006) (Figura 1). O ácido chiquímico é formado pela condensação do fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato, ambos metabólitos da glicose. Posteriormente, o ácido chiquímico une-se com outra molécula de fosfoenolpiruvato para formar o ácido corísmico, que dá origem primeiramente ao grupo dos compostos fenólicos, os fenilpropanóides (PERES, 2004). A via do ácido chiquímico é presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. A principal enzima envolvida é a fenilalanina amônio liase (PAL) que atua pela retirada de um grupo amino da fenilalanina para formar o ácido cinâmico, o principal precursor dos fenilpropanóides, com a formação de flavonóides, cumarinas e ligninas (STANGARLIN et al, 2010).

Um grande grupo de angiospermas sintetiza fenilpropanóides, que são facilmente volatilizados, e alguns tóxicos para insetos e microorganismos (PERES, 2004). Os fenilpropanóides são armazenados em diversos órgãos vegetais atuando na defesa contra herbívoros, parasitas e fungos ou outras agressões externas. Além disso, são sintetizados por flores para atração de insetos polinizadores, como as antocianinas (PERES, 2004).

Figura 1 – Via do ácido chiquímico em plantas para a biossíntese dos fenilpropanóides.



Fonte: Peres, 2004

A resistência de plantas à diferentes patógenos pode estar relacionada com a produção de metabólitos secundários e primários que atuam como antimicrobianos naturais (LEMOS et al, 1990). Entre os metabólitos secundários relacionados à resistência estão os compostos da classe dos fenilpropanóides, que são sintetizados a partir da via do chiquimato (Figura 1), tais como o eugenol e o metileugenol (TAN et al, 2011).

A enzima Eugenol O-metiltransferase catalisa a conversão do eugenol para o metileugenol (GANG et al, 2001). O eugenol geralmente é encontrado em folhas e frutos dos vegetais e compreende atividade antifúngica. Está observado nas espécies como o cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), o manjeriço (*Ocimum basilicum*), encontrado como composto majoritário em seus óleos essenciais (AFFONSO et al, 2012; RENU et al, 2014).

O metileugenol derivado do eugenol é constituinte de folhas, caule e pode aumentar ou reduzir sua produção quando é danificada por um herbívoro, mas se

estiver em alta concentração na planta pode deter o patógeno (TAN et al, 2011). Possui atividade antibacteriana, antioxidante e antifúngica que proporciona a resistência das espécies de *Pelargonium odoratissimum* (Malva-de-cheiro) e de *P. divaricatum* (ANDRADE et al, 2008; SILVA et al, 2010). O eugenol e o metileugenol são importantes intermediários na produção de numerosos grupos de produtos naturais encontrados na natureza (COSTA, 2000).

O metabolismo dos fenilpropanóides nas angiospermas está associado à regulação do crescimento, à resistência a doenças e radiação ultravioleta, e à síntese de componentes da parede celular vegetal. A produção e o acúmulo destes compostos ocorrem rapidamente em células vizinhas ao local de infecção, tornando-as especialmente resistentes, devido à alta toxicidade a patógenos (MARGIS-PINHEIRO et al, 1999).

3.2 Mecanismo de resistência

As plantas possuem mecanismos de resistência contra patógenos que consistem de defesas pré-formadas e induzidas. Os mecanismos de defesa pré-formados não são especializados para um patógeno específico, e podem ser de dois tipos: estrutural ou bioquímico. A cutícula, rica em cutina e substâncias cerosas, é o principal mecanismo de defesa estrutural; já os mecanismos bioquímicos compreendem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, tais como: compostos fenólicos, saponinas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos (OSBOURN, 1996; DANGL; JONES, 2001; MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003). O mecanismo de resistência induzido é desencadeado após o início das atividades do patógeno na superfície do hospedeiro, com a ativação de moléculas envolvidas em resposta de defesa, como a reação de hipersensibilidade (STANGARLIN et al, 2011).

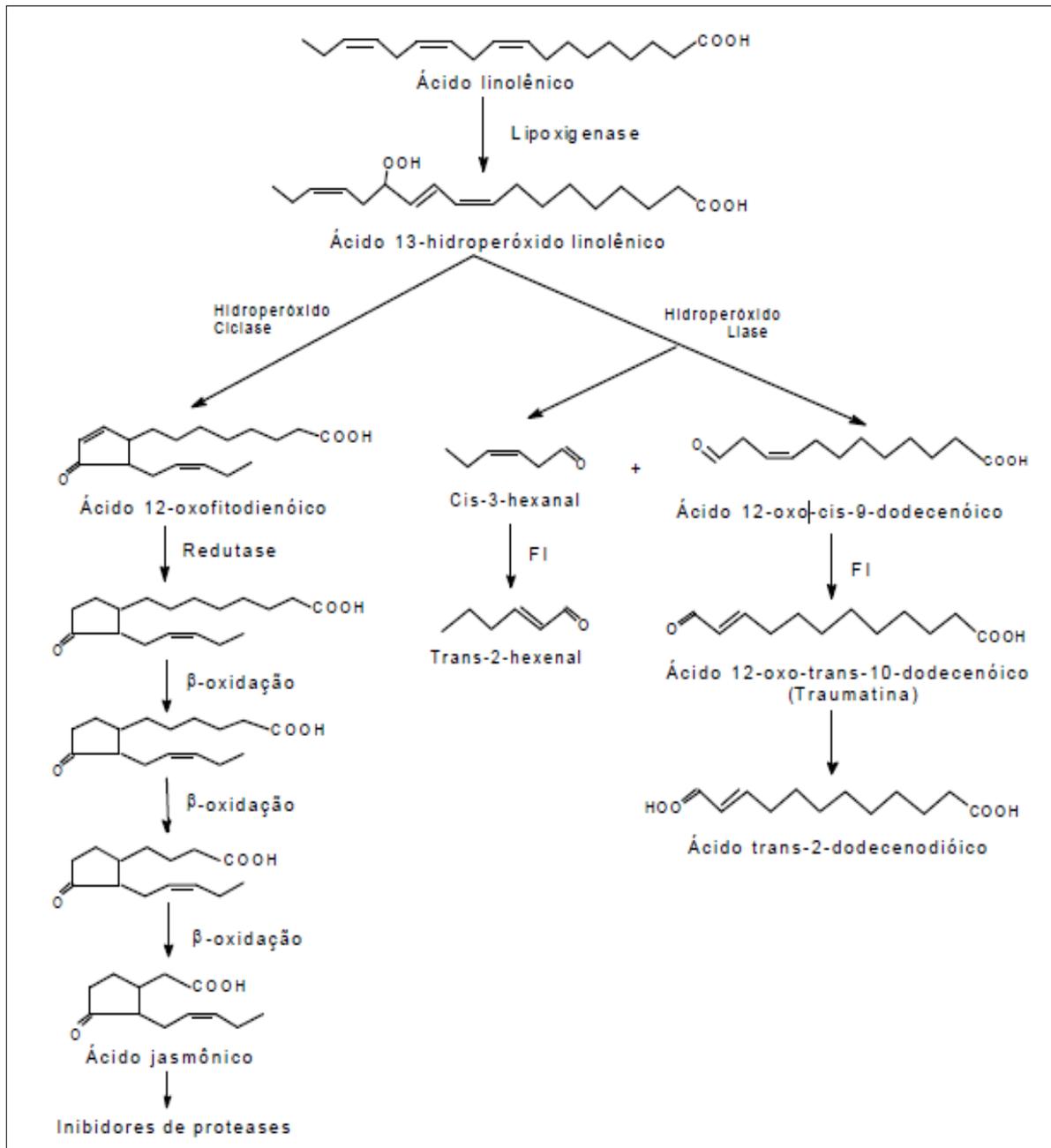
3.2.1 Reação de Hipersensibilidade (HR)

Durante as interações planta-patógeno várias reações acontecem simultaneamente, e apesar da planta possuir defesas estruturais e bioquímicas constitutivas, muitas vezes o patógeno pode conseguir transpor estas defesas e colonizar o tecido, dando início à doença. Ao mesmo tempo, moléculas produzidas pelo patógeno (p.ex. proteínas, glicoproteínas, oligossacarídeos e ácidos graxos) ou oriundas da própria planta, após o contato com o invasor (p.ex. fragmentos da parede celular danificada durante a invasão do patógeno) vão sendo liberadas e reconhecidas pela planta atacada (MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003). Estas moléculas, chamadas de *elicitores*, são responsáveis pela ativação de uma rede integrada de sinalização que culmina com a expressão de genes relacionados à defesa (NÜRNBERGER, 1999; MEDEIROS; FERREIRA; DIANESE, 2003; VERONESE et al, 2003). Esta cadeia de eventos, que inicia com o reconhecimento dos elicitores por receptores específicos da hospedeira e finaliza com a ativação de genes de resistência é chamada de defesa induzida.

Todo este processo de sinalização é coordenado de modo que a resposta de defesa atue tanto espacialmente como temporalmente durante a infecção, ou seja, *a priori* na **Reação de Hipersensibilidade (HR)**, e *a posteriori*, na **Reação Sistêmica Adquirida (SAR)**, resultando na rápida contenção do patógeno. Na HR, está envolvida uma enzima, que também atua no mecanismo de resistência chamada de lipoxigenase.

As Lipoxigenases são enzimas que catalisam a adição do oxigênio molecular em ácidos graxos poliinsaturados que contém uma mistura cis-cis, 1-4 pentadieno, com formação de derivados de hidroperóxido de ácidos graxos insaturados (Figura 2) (SIEDOW, 1991). As lipoxigenases possuem diferentes funções de acordo com desenvolvimento da planta: nas sementes estão relacionadas com a defesa contra patógenos; na germinação são produzidas para a mobilização de lipídeos; no crescimento do vegetal ajuda no amadurecimento dos frutos, fornecimento de nitrogênio; no ataque de herbívoros está envolvida na sinalização e na defesa; e com o ataque de patógenos atua na sinalização, na ação antimicrobiana, na oxidação de lipídeos e na HR (PORTA; SOSA, 2002).

Figura 2 – Cascata da reação de defesa de plantas a partir da Via das Lipoxigenases.



Fonte: Porta; Sosa, 2002.

As lipoxigenases desencadeiam uma cascata de compostos em resposta à defesa, como o ácido jasmônico, da via dos fenilpropanóides, que é sinalizado por plantas em proteção ao ataque de patógenos (SILVA et al, 2001). A rota biossintética dos fenilpropanóides é conhecida por exercer um importante papel de resistência ao ataque de patógenos (DIXON et al, 2002) e vários aminoácidos e metabólitos secundários tem sido relatados como desempenhando um importante papel na indução da Resistência Sistêmica (KURTH et al, 2014).

Patógenos ativam durante a infecção a via dos fenilpropanóides, desencadeando a produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, e precursores de ligninas e suberinas para reforçar a parede celular (PARKER et al, 2009). O acúmulo de compostos fenólicos é desencadeado pelo aumento da atividade enzimática da PAL, entre outras, que induz uma mudança na via de produção de sacarose para síntese de moléculas de defesa e reparo (LANDOLT et al, 1997). A PAL é uma enzima que localiza-se no ponto de intercessão entre o metabolismo primário e secundário, além de ser peça chave na regulação do influxo de fenilalanina na célula para a biossíntese de compostos fenólicos (PÉREZ-BUENO et al, 2014). Molécula de baixa massa molecular, como os fenilpropanóides, é formada na fase inicial de resposta à infecção, seguido por rápida polimerização e depósito de ligninas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

As alterações na produção destes compostos fenólicos estão sendo avaliadas, durante as interações planta-patógeno, com objetivo de investigar respostas no mecanismo de defesa das plantas (PURWAR et al, 2013; KURTH et al, 2014; PÉREZ-BUENO et al, 2014; VAGANAN et al, 2014)

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará (LEPRON-UFGPA), com os testes *in vivo* em *P. divaricatum* inoculada com *F. solani* f. sp. *piperis* e não infectada (controle), para identificar os metabólitos secundários envolvidos no mecanismo de defesa frente a infecção.

4.1 Avaliação da resistência de espécies de *Piper* frente a *F. solani* f. sp. *piperis*.

4.1.1 Seleção, Coleta e Cultivo das Espécies

Para os testes antifúngicos *in vivo* foi selecionada a espécie cujo óleo essencial apresentou maior atividade *in vitro*. A espécie *P. divaricatum* foi coletada no município de Breves/Pará (PA) em julho de 2012. Estacas contendo dois nós foram propagadas em saco de propileno e adubo comercial. O desenvolvimento das mudas foi monitorado por seis meses, tempo necessário para o desenvolvimento das raízes. Para o grupo controle suscetível a fusariose foram utilizadas mudas de *P. nigrum* cultivar Bragantina, com 10 meses de idade. O experimento foi conduzido na área reservada no Bosque Camilo Viana/ UFGPA (Fotografia 1).

Fotografia 1 – Mudanças de *P. divaricatum* com seis meses idade.



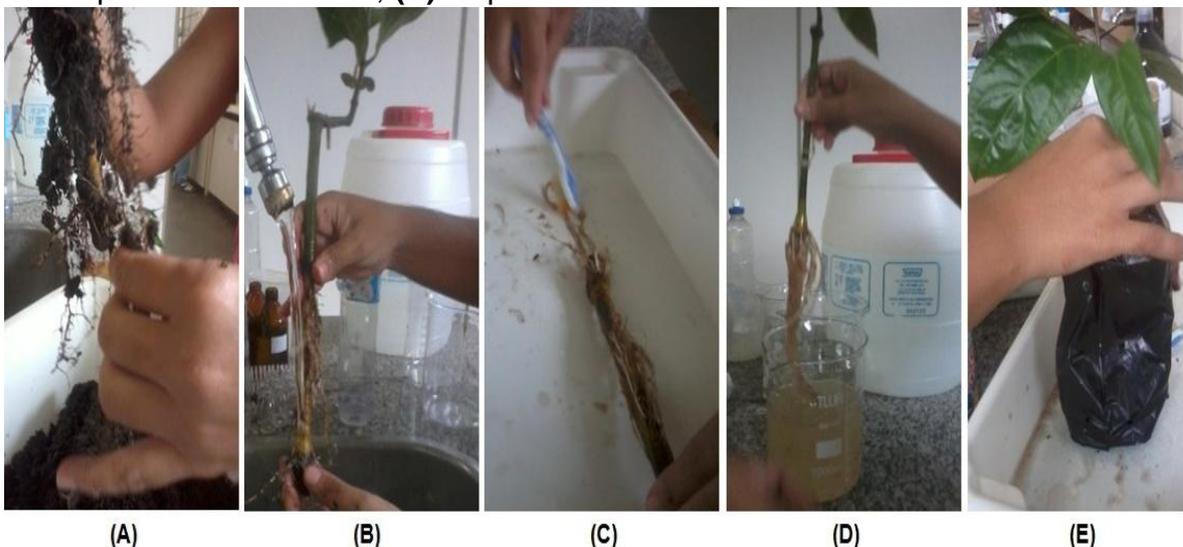
Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

4.1.2 Preparo da Suspensão Inoculante e Infecção com o Patógeno

Para o preparo da solução foram utilizadas oito placas de *Petri* de 90 X 15 mm com *F. solani* f. sp. *piperis* em meio Batata-dextrose-Ágar (BDA). Foi acrescentado em cada placa um volume de 10 mL de água destilada estéril, e o micélio contendo macro e microconídios foi retirado com o auxílio de uma espátula estéril. A concentração de $2,1 \times 10^6$ esporos. mL⁻¹ na suspensão foi calculada utilizando câmara de Neubauer.

As mudas de *P. divaricatum* (18 mudas) e *P. nigrum* (10 mudas) foram removidas dos sacos plásticos e suas raízes lavadas em água corrente para retirada do excesso de solo (Fotografia 2a-b). Microferimentos foram feitos nas raízes com uma pequena escova para facilitar a penetração dos esporos (Fotografia 2c). Os indivíduos inoculados tiveram suas raízes imersas na suspensão de conídios por 5 min. Para os indivíduos não-infectados, as raízes foram imersas em água estéril (testemunha). As mudas foram replantadas nos sacos (Fotografia 2e) e dispostas em bancadas separadas em casa de vegetação durante 45 dias com irrigação de 2 vezes ao dia. O monitoramento dos metabólitos secundários produzidos e as observações dos sintomas da fusariose foram realizadas nos intervalos de 7, 21, 30 e 45 dias após a inoculação com *F. solani* f. sp. *piperis*.

Fotografia 2 – Infecção de *P. divaricatum* com conídios de *F. solani* f. sp. *piperis*: **(A)** Retirada das mudas do saco de polipropileno; **(B)** Lavagem das raízes; **(C)** Escovação das raízes para obtenção dos microferimentos; **(D)** Imersão das raízes na suspensão de conídios; **(E)** Replante das mudas.



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

As amostras do experimento foram divididas em quatro grupos e codificadas de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1 – Grupos de plantas de *P. divaricatum* e *P. nigrum* com e sem infecção com *Fusarium solani*.

Espécie	Grupo	Grupo	Código	Números de indivíduos
<i>P. divaricatum</i>	Não infectada	Controle	PDNI	9
<i>P. divaricatum</i>	Infectada	Grupo infectado	PDI	9
<i>P. nigrum</i>	Não infectada	Testemunha do controle positivo	PNNI	5
<i>P. nigrum</i>	Infectada	Controle positivo da fusariose	PNI	5

Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

4.1.3 Recuperação de *F. solani* f. sp. *piperis* das Plantas Infectadas

As raízes de *P. divaricatum* infectadas foram coletadas após 65 dias para avaliar a colonização do tecido radicular pelo fitopatógeno. O re-isolamento do fungo foi realizado de acordo com o item 4.2.

4.2 Monitoramento da produção de metabólitos secundários em resposta à inoculação com *F. solani* f. sp. *piperis*

4.2.1 Obtenção dos Extratos

As folhas de *P. divaricatum* das plantas infectadas e não-infectadas foram coletadas de maneira aleatória nos tempos de coleta de 7°, 21°, 30°, 45° DAI. O material vegetal fresco (1,0 g) foi previamente cortado com uma tesoura e colocado em tubos de ensaio, e foram acrescentados 20 mL de etanol / água 7:3. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a temperatura de 60°C por 30 min. A extração foi realizada em triplicata, totalizando 60 mL de cada extrato, armazenados em frascos âmbar e refrigerados a 4°C. Outra parte de cada material (1,0 g) foi extraída com 50 mL de acetato de etila por 96h. A cada 48h foi realizada uma extração por ultrassom com duração de 10 min.

4.2.2 Determinação da Concentração de Fenólicos Totais (FT)

A concentração de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin Ciocalteu (SOUSA et al, 2007). Primeiramente, os extratos foram diluídos na proporção de 1:1 em água e uma alíquota de 500 μL retirada para reagir com 250 μL de Folin-Ciocalteu 1N e 1250 μL de carbonato de sódio (75 g.L^{-1}). Após 30 minutos de incubação em ambiente escuro, a absorbância foi lida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro de UV-Visível. Para quantificação dos compostos fenólicos, foi preparada uma curva de calibração. Os resultados foram expressos em miligramas de Ácido Gálico Equivalente (AGE)/ g de matéria fresca.

4.2.3 Obtenção dos Óleos Essenciais

O óleo essencial das folhas frescas de *P. divaricatum* e *P. nigrum* (usada como controle positivo do experimento) foram extraídos com n-pentano por microextração e destilação simultânea. No extrator Likens-Nickerson, foram conectados dois balões de fundo redondo; o primeiro continha o material botânico (3,0 g) e 100 mL de água destilada e o segundo 3 mL de n-pentano. Cada balão foi aquecido até ebulição com controle da temperatura da água de condensação (10 °C). Após 2 h de extração, obteve-se as frações orgânicas e aquosa.

4.2.4 Análise da Composição Química dos Óleos Essenciais

Uma alíquota de 1 μL da fração aquosa resultante da microextração e destilação simultânea foi analisada nos sistemas de CG-DIC e CG-EM. A análise quantitativa da composição química do material foi analisada por CG-DIC, equipamento FOCUS (Thermoelectron) equipado com coluna capilar DB-5 (30m x 0,25 mm x 0,25 μm), nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,2mL/min), injeção splitless (splitflow 20:1) temperaturas do injetor e detector 250°C e aquecimento da coluna de 60 a 240°C (variação de 3°C/min). A análise qualitativa foi feita nas mesmas condições por CG-EM, equipamento DSQ II, gás de arraste: Hélio, fonte de íons: 70 eV (impacto eletrônico), temperatura da fonte de íons e da linha de transferência de 200°C.

4.2.5 Determinação da Atividade de Lipoxigenase

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada de acordo com o método de Axelrod et al (1981), determinando-se o aumento da absorvância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado. O substrato foi preparado a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99% (SIGMA), como se segue: a um erlenmeyer envolvido por papel-alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de Tween 20 (SIGMA). Em seguida, homogeneizou-se a solução com auxílio de uma pipeta automática para evitar a formação de bolhas. O clareamento da solução foi feito adicionando-se gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 N. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, envolvido por papel-alumínio, e o volume foi aferido. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada em tubos de plástico de 1 mL, envolvidos em papel-alumínio e armazenados a -20 °C. As atividades de lipoxigenases foram avaliadas em uma solução de 5 µL do extrato bruto foliar e 50 µL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1950 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. A absorvância da mistura de reação foi determinada a 234 nm, por um período de 2,5 minutos; condições válidas também para o branco, que consistiu da mesma quantidade de substrato e tampão. As velocidades iniciais, determinadas pela medida de absorção a 234 nm em função do tempo, foram obtidas utilizando-se o produto formado.

4.3 Extração de DNA de *P. divaricatum*

Folhas de *P. divaricatum* foram coletadas, na Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA e utilizadas para a extração do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) genômico. Cinquenta miligramas de tecido foram utilizados para extração dos ácidos nucleicos, e o protocolo seguiu as especificações recomendadas no Kit NORGEN Biotek. O ácido desoxirribonucleico (DNA) de folhas de manjerição (*Ocimum* sp.), adquiridas no município de Belém, também foi extraído utilizando o mesmo kit.

4.3.1 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) Para Obtenção do Gene Eugenol O-Metiltransferase

As reações de polimerase em cadeia (PCR) para obtenção do gene Eugenol O-Metiltransferase em *P. divaricatum* foram preparadas utilizando volumes totais de 20, 25 e 50 µL, constituídas de Tampão 10x, 1µL de cada de *primer*, *foward* e *reverse*, na concentração de 10 pmoles, 1 µL de Taq polimerase, 1 µL de DNTP 10mM, cerca de 100ng de DNA, e água para completar o volume total da reação. As concentrações de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) variaram para favorecer as condições da PCR.

O termociclador foi programado para as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação inicial à 95°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 1 min de desnaturação à 95°C, 1 min de anelamento e 2 min de extensão à 72°C, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos obtidos na PCR foram visualizados em géis de agarose 0,8 % com auxílio de sistema de captura de imagem L-PIX-HE LOCCUS Biotecnologia.

As reações de PCR com DNA de manjeriço também seguiram as mesmas condições estabelecidas para *P. divaricatum*. Os *primers* utilizados (Tabela 2) foram sintetizados a partir da sequência de DNA de manjeriço (*O. basilicum*), depositado no NCBI com o código (AF435008) (RENU et al, 2014).

Tabela 2 – Conjunto de *primers* utilizados na PCR para isolamento do gene Eugenol O-metiltransferase

<i>Primers</i> utilizados	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')
EUG 1F	TCGTTTTGGATCCCCTTTTC
EUG 1R	GTCGTTATGGGAGGGAAGGT
EUG 2F	AATCCATCCCCATCAACAAA
EUG 2R	TTGACCTCCCACATGTTGTG
EUG 3R	ATGAGCCAAGCAAGGGTAGA

Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

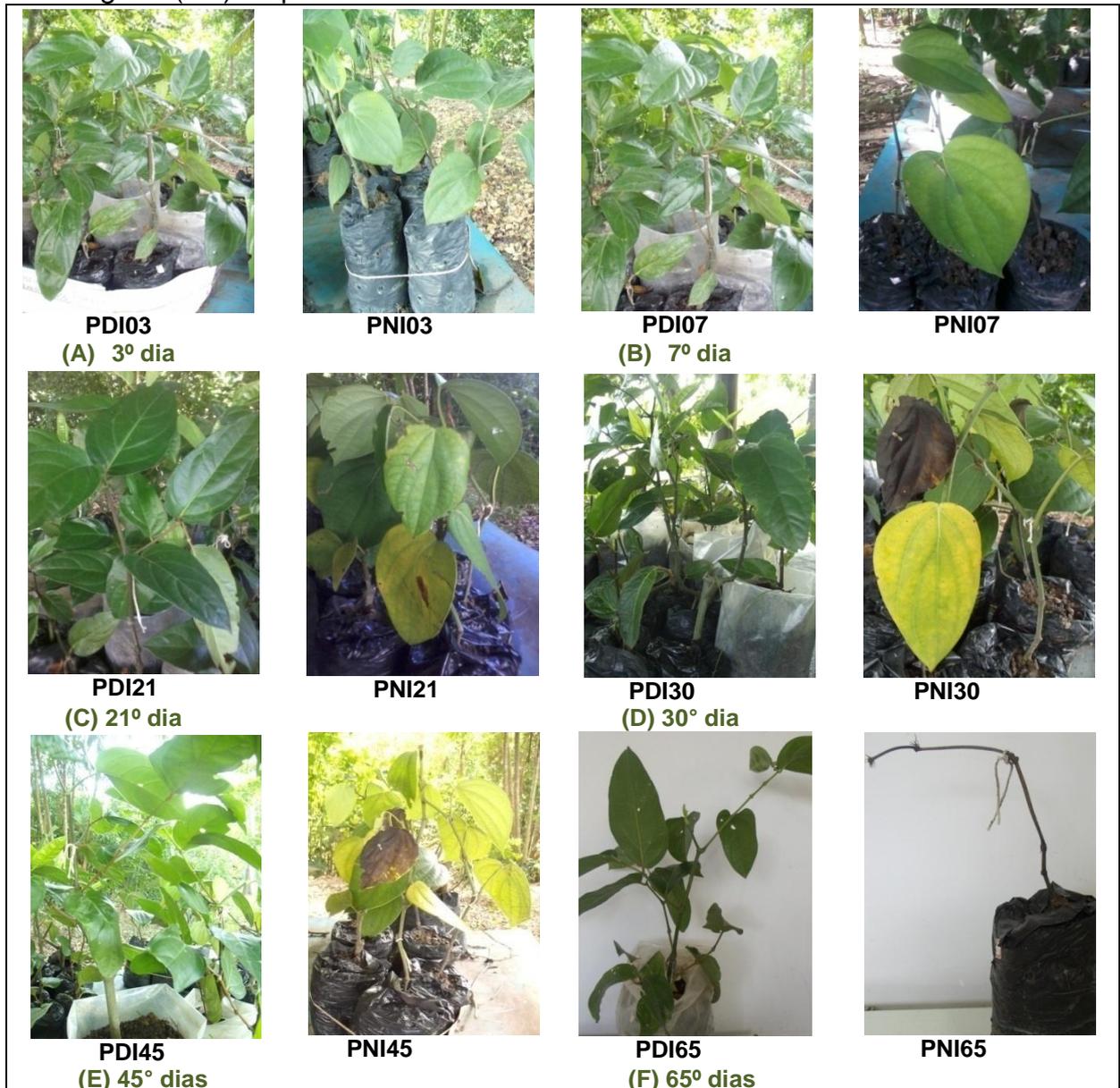
5.1 Avaliação da resistência e produção de metabólitos de *P. divaricatum* desafiada com *F. solani* f. sp. *piperis*

A resistência de *P. divaricatum* foi comparada em relação a *P. nigrum* e os sintomas da fusariose foram monitorados durante 45 dias após a infecção (DAI) das espécies com conídios de *F. solani* f. sp. *piperis*. Patógenos que causam murchas, como o *F. solani* f. sp. *piperis* possuem um ciclo de vida hemibiotrófico, ou seja, se hospedam inicialmente em tecido vivo e em uma fase posterior, em tecido morto. Após a colonização do tecido radicular, o fungo inicia a disseminação para o sistema vascular. Com a morte da planta, o fungo sobrevive saprofiticamente nos tecidos infectados, enquanto não ocorre a colonização por outros microorganismos mais competitivos. Após a completa degradação do tecido, ocorre a liberação para o solo dos propágulos de resistência, que se formam no hospedeiro e permanecem como unidades infecciosas durante vários anos (MICHEREFF; DOMINGOS; ANDRADE, 2005).

O experimento em casa de vegetação foi acompanhado com registro dos sintomas observados visualmente (Fotografia 3a-f). Os primeiros sinais de amarelecimento das folhas de *P. nigrum* (controle positivo da doença) foram observados a partir do 21º DAI. No 30º DAI foi observada a necrose de algumas folhas em *P. nigrum* com avanço até o 45º DAI. A progressão dos sintomas como o secamento total dos ramos e necrose das plantas ocorreu no 65º DAI.

Durante o acompanhamento do experimento não foi observado qualquer sintoma de murcha ou secamento de ramos em *P. divaricatum*. As plantas se mostraram saudáveis durante todo período, e alguns indivíduos iniciaram o período reprodutivo, com floração e frutificação.

Fotografia 3 – Comparação da sintomatologia da fusariose entre *P. divaricatum* (PD) e *P. nigrum* (PN) no período de 3 a 65 DAÍ.



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Ressalta-se que a inoculação ocorreu nas raízes, e durante o desenvolvimento do fungo há liberação de toxinas nos tecidos do hospedeiro, que por sua vez induzem a produção de moléculas na tentativa de inibir esta invasão. Este processo ocorre no interior do sistema vascular, ocasionando a obstrução dos vasos que não conseguem transportar água e nutrientes (FREIRE, BRIDGE, 1985; WHEELER; RUSH, 2001). A murcha da parte aérea foi observada 21 dias após a infecção, posteriormente a necrose do tecido radicular.

Patógenos geralmente acessam o interior das plantas penetrando os tecidos foliares / radiculares íntegros ou ferimentos e aberturas naturais, como os estômatos

das folhas (ZHANG, LUBBERSTEDT, XU, 2013). Em resposta à invasão, uma rede de defesas é ativada para deter a proliferação do patógeno e sinalizar a outras partes da planta, preparando-as contra novas infecções (DANGL, HORVATH, STASKAWICZ, 2013).

A infecção por fungos resulta em mudanças fisiológicas da planta hospedeira e em perturbações mecânicas e bioquímicas. A penetração intercelular dos tecidos provoca efeitos diretos sobre as lamelas, seguida de invasão das células vegetais, membranas e organelas, aumento da fuga de nutrientes e morte da célula hospedeira, que tornam visíveis os sintomas da doença (ELAD, 1997).

As reações observadas nas interações planta x patógeno podem ser classificadas como compatíveis (patógeno virulento x hospedeiro suscetível) e incompatíveis (patógeno avirulento x hospedeiro resistente) (RESENDE, SALGADO, CHAVES, 2003). No patossistema *P. divaricatum* x *F. solani* f. sp. *piperis* pode-se sugerir uma interação incompatível, na qual não houve o aparecimento de sinais da doença.

Uma vez que as mudas de *P. divaricatum* não apresentaram sintomas, o fungo foi recuperado de suas raízes e cultivado em meio BDA. Deste modo foi comprovado que o patógeno esteve em contato com o hospedeiro durante o período do experimento.

5.2 Produção dos metabólitos secundários durante o desenvolvimento da fusariose

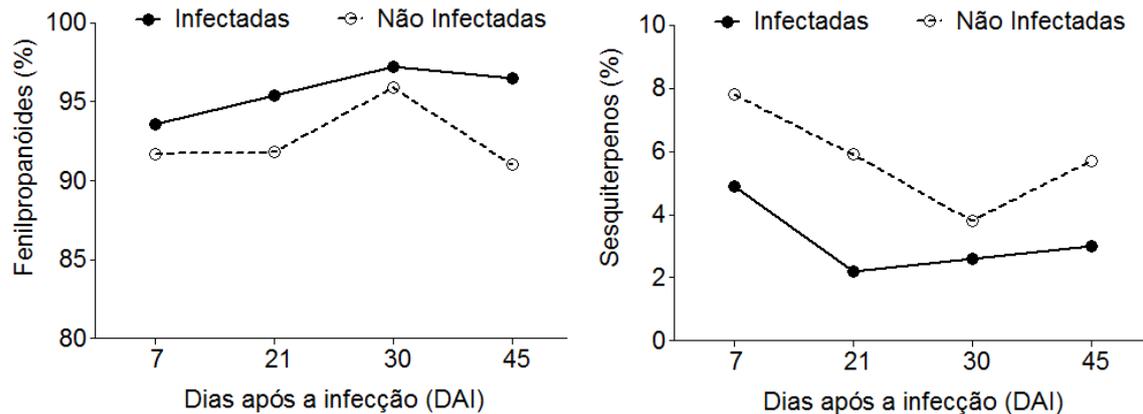
5.2.1 Comparação entre os Compostos Voláteis Produzidos por *P. divaricatum* e *P. nigrum* cv. bragantina Durante a Infecção com *F. solani* f. sp. *piperis*

As plantas produzem para sua auto-proteção, compostos voláteis nos tecidos vegetais em resposta a danos e ao ataque de herbívoros, patógenos, nematóides, etc (DICK; VAN LOON, 2000). A composição química das misturas de voláteis emitidos de plantas e sua intensidade pode carregar informações sobre a fisiologia das plantas e as tensões que foram submetidos (DUDAREVA et al, 2007).

Fenilpropanóides foram identificados em altas quantidades em *P. divaricatum*, seguidos de sesquiterpenos e monoterpenos em menores concentrações. De acordo com a Figura 3, podemos observar que o teor de fenilpropanóides foi maior em plantas infectadas, com maiores diferenças

observadas no 21^o e 45^o DAI. Por outro lado, houve uma diminuição na concentração dos sesquiterpenos em plantas infectadas principalmente no 7^o, 21^o e 45^o DAI.

Figura 3 – Variação dos teores de fenilpropanóides e sesquiterpenos identificados nas folhas de *P. divaricatum* infectadas e não-infectadas com *F. solani* f. sp. *piperis* nos estágios de 7 – 45 dias.



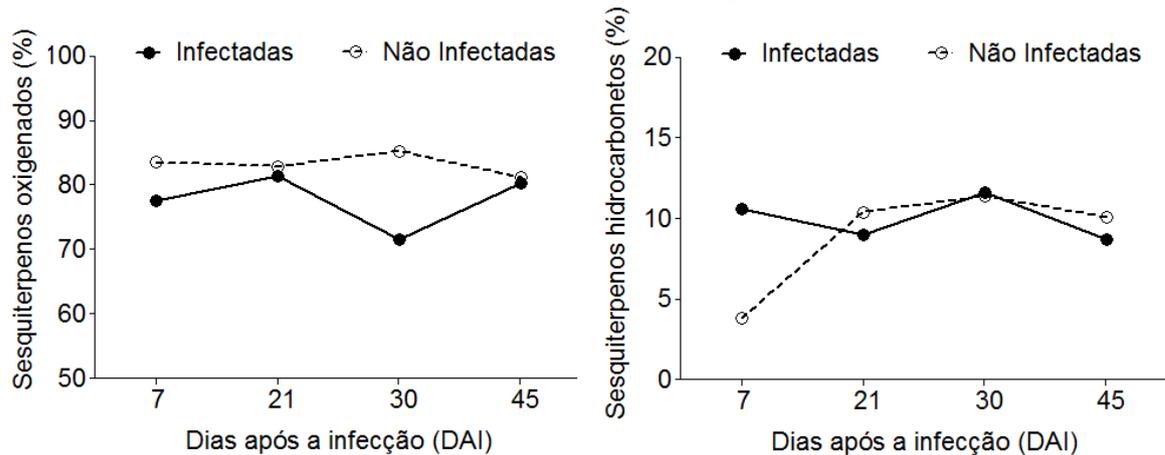
.Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

No 7^o DAI as plantas infectadas (PDI7) e não-infectadas (PDNI7) não apresentaram diferenças nos compostos majoritários: metileugenol (91,0% / 88,6%) e β -elemeno (2,9%/ 2,7%). No 21^o DAI, estágio onde os primeiros sintomas da fusariose se manifestam em *P. nigrum* cv. bragantina, a amostra PDI21 produziu uma maior quantidade de metileugenol em relação a PDNI21 (88,3%/ 81,5%) e o segundo composto majoritário em ambas foi o eugenol acetato (6,1%/ 10,7%). No 30^o DAI houve uma inversão na variação dos compostos majoritários. A amostra PDI30 produziu menos metileugenol (85,7%) e mais eugenol acetato (10,7%) em relação a PDNI30. Ao término do monitoramento, no estágio de 45DAI foi observada a maior diferença na produção de metileugenol entre plantas infectadas (**PDI45**, 95,3%) e não-infectadas e (**PDNI45**, 80,6%) (Tabela 3).

A espécie *P. nigrum* foi usada no experimento como controle positivo da fusariose e suas alterações no metabolismo secundário foram avaliadas da mesma forma que para *P. divaricatum*. Sesquiterpenos oxigenados foram predominantes nos óleos essenciais (cerca de 80%), seguidos de sesquiterpenos hidrocarbonetos em menores proporções (Figura 4). A produção de sesquiterpenos oxigenados não diferenciou entre plantas de *P. nigrum* infectadas e não infectadas no 7^o, 21^o e 45^o DAI. No entanto, foi observada uma drástica diferença no 30^oDAI com uma

diminuição no teor das plantas infectadas (PNI30), o que pode estar associado ao avanço dos sintomas da fusariose neste estágio. Para os sesquiterpenos hidrocarbonetos foi notada uma maior diferença na produção no 7ºDAI.

Figura 4 – Variação dos teores de sesquiterpenos oxigenados e sesquiterpenos hidrocarbonetos identificados nas folhas de *P. nigrum* cv. bragantina infectadas e não-infectadas com *F. solani* f. sp. *piperis* nos estágios de 7 – 45 dias.



.Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Os compostos majoritários identificados de *P. nigrum* cv. bragantina foram o elemol, α -bisabolol e β -eudesmol (Tabela 4). No estágio de 7º DAI, a produção de elemol foi maior em PNB17 em relação a PNBNI7 (19,0% / 27,3%) e os teores de α -bisabolol semelhantes (51,4% / 53,9%). No 21º DAI, onde os primeiros sintomas da fusariose são observados, a produção de elemol continuou a diminuir em PNB121 (15,3%/ 28,4%) e a diferença entre os níveis de α -bisabolol foi elevada (64,3% / 51,4%). Com a progressão da fusariose, observamos no 30ºDAI uma queda drástica na produção de elemol para PNB130 (0,7% / 32,9%) e o aparecimento de β -eudesmol (10,7%), ausente em PNBNI30; os teores de α -bisabolol continuaram praticamente inalterados (60,1%/ 49,8%). No 45ºDAI, os teores de elemol, β -eudesmol e α -bisabolol em PNB145 não diferiram significativamente em relação a PNBNI45 (3,4%, 14,9%, 60,7% / 9,2%, 12,2%, 54,6%).

Tabela 3 – Variação na produção de compostos voláteis por mudas de *P. divaricatum* infectadas e não infectadas por *F. solani* f. sp. *piperis* no período de 7 – 45 DAI.

IR	Componente	PDI7	PNI7	PDI21	PDNI21	PDI30	PDNI30	PDI45	PDNI45
932	α - pineno	0,1			0,1				
988	myrceno	0,1			0,1				
1032	β -Z-ocimeno	0,1		0,2	0,2	0,1			
1044	β -E-ocimeno	1,1	0,3	2,0	1,3			0,5	
1356	eugenol	2,1	2,2	0,8	0,7	0,6		0,1	1,2
1389	β -elemeno	2,9	2,7	1,4	3,2	1,5	1,0	1,3	2,4
1403	metileugenol	91,0	88,6	88,3	81,5	85,7	93,3	95,3	80,6
1417	β -cariofileno	1,0	1,9	0,4	1,5	0,6	0,8	0,7	1,3
1430	β -copaeno		0,3		0,2	0,1	0,1	0,1	
1452	α -humuleno		0,2		0,1	0,4	0,1	0,1	0,1
1484	germacreno D	0,7	2,2	0,4	0,7		1,5	0,7	1,7
1500	biciclogermacreno	0,1	0,2		0,1		0,2	0,1	0,2
1508	germacreno A	0,2	0,3		0,1		0,1		
1521	eugenol acetato	0,4	0,7	6,1	9,4	10,7	2,3	1,0	9,1
1555	elemicina	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1
	Monoterpenos hidrocarbonetos	1,4	0,3	2,2	1,7	0,1	0,0	0,5	1,4
	Sesquiterpenos hidrocarbonetos	4,9	7,8	2,2	5,9	2,6	3,8	3,0	5,7
	Fenilpropanóides	93,6	91,7	95,4	91,8	97,2	95,9	96,5	91,0
	Total identificado	99,9	99,7	99,8	99,2	99,8	99,5	99,9	96,7

Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Tabela 4 – Variação na produção de compostos voláteis por mudas de *P. nigrum* cv. bragantina infectadas e por *F. solani* f. sp. *piperis* no período de 7 – 45 DAÍ.

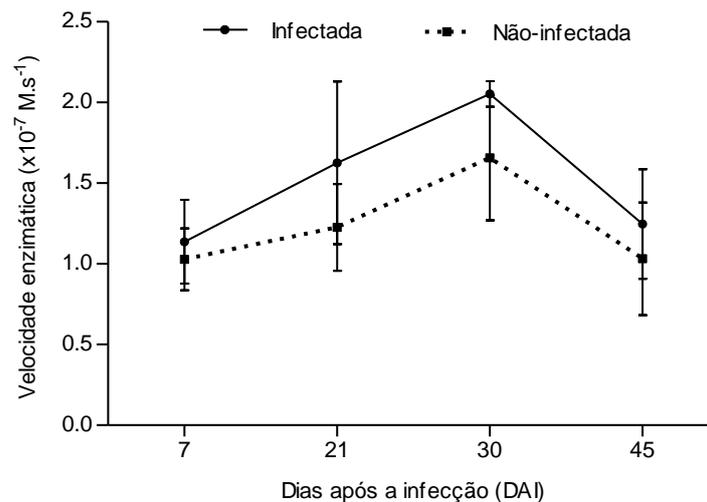
	IR	PNBI7	PNBNI7	PNBI21	PNBFI21	PNBI30	PNBNI30	PNBI45	PNBNI45
<i>E</i> -β-ocimeno	1044	1,2							0,5
linalool	1095	0,5	0,7	0,4	0,3			0,3	0,1
pregeijereno	1285	0,3	0,5		0,3			0,2	0,2
2-undecanona	1293	0,1						0,1	0,1
δ- elemeno	1335		0,1		0,1				0,1
α- ilangeno	1373	0,1							0,1
β-bourboneno	1387	0,1							
β-elemeno	1389	0,2	0,1						0,1
β-cariofileno	1417	1,0	0,4	0,7	0,9	0,9	0,9	0,6	0,8
γ-elemeno	1434	0,1	0,1						0,1
geranil acetona	1453	0,1	0,1					0,1	
<i>E</i> - β-farneseno	1454	0,7	0,3	0,7	0,7			0,7	0,5
germacreno D	1484	4,2	1,4	3,4	4,3	2,2	6,9	2,5	4,1
β-selineno	1489	0,1	0,1			0,5		0,2	0,2
α- zingibereno	1493	0,2	0,1		0,2	0,9		0,9	0,7
α- muuroleno	1500	0,1				0,4		0,2	0,1
β-bisaboleno	1505	3,6	1,1	4,2	4,2	6,0	3,6	3,0	2,8
β- sesquiandreno	1521	0,1				0,7		0,6	0,5
γ-bisaboleno	1529	0,1	0,1						
elemol	1548	19,0	27,3	15,3	28,4	0,7	32,9	3,4	9,2
germacreno B	1559	0,3			0,3			0,1	0,1
<i>E</i> -nerolidol	1561	1,8	1,7	1,7	1,2		1,1	1,2	1,0
Óxido de cariofileno	1582	0,2	0,2						0,1
longiborneol	1599	0,1	0,1					0,1	0,1
β-eudesmol	1649	0,3	0,3		0,3	10,7		14,9	12,2
α- bisabolol	1685	51,4	53,9	64,3	51,4	60,1	49,8	60,7	54,6
2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> - farnesol	1698	1,6			0,5				1,5
2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> - farnesol	1722	3,2			1,1		1,5		2,5
Monoterpenos hidrocarbonetos		1,5	0,5		0,3			0,2	0,7
Monoterpenos oxigenados		0,6	0,8	0,4	0,3			0,4	0,1
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		10,6	3,8	9,0	10,4	11,6	11,4	8,7	10,1
Sesquiterpenos oxigenados		77,6	83,5	81,3	82,9	71,5	85,3	80,3	81,2
Outros		0,1						0,1	0,1
Total identificado		90,7	88,61	90,7	94,2	83,1	96,7	89,8	92,3

Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

5.2.2 Comparação da Atividade Enzimática da LOX Entre Plantas de *P. divaricatum* Infectadas e Não Infectadas por *F. solani* f. sp. *piperis*

Os mecanismos de defesa de plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário. Por esta razão, foram avaliadas as mudanças na atividade da enzima lipoxigenase no período de 7 a 45 DAI. A Figura 5 mostra que a partir do 7º DAI obteve-se um aumento na atividade enzimática e com 30º DAI aconteceu um decréscimo na produção da enzima LOX por plantas infectadas e não infectadas.

Figura 5 – Variação na atividade enzimática das LOX em mudas de *P. divaricatum* infectadas e não infectadas por um período de 7 – 45 DAI com *F. solani* f. sp. *piperis*.



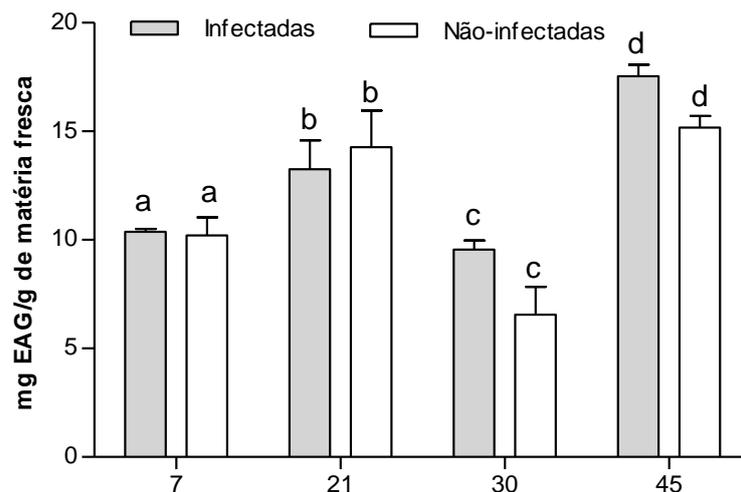
Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Os sinais mais comuns de compostos voláteis envolvidos para a defesa direta e indireta de plantas, incluem os metabólitos da via das lipoxigenases (LOX), a rota do ácido chiquímico e a produção de terpenos (PICHESKY, GERSHENZON, 2002). Os resultados encontrados correlacionam com os níveis de fenilpropanóides identificados em maior quantidade em plantas de *P. divaricatum* infectadas.

5.2.3 Produção dos Compostos Fenólicos e Perfil Químicos dos Extratos das Folhas de *P. divaricatum* Durante a Infecção com *F. solani* f. sp. *piperis*

O índice de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin Ciocalteu para os extratos aquosos e o perfil químico obtido para os extratos acetato de etila analisados por Cromatografia Líquida de Alta Pressão com Ultravioleta-Visível (HPLC-UV). Os teores de fenólicos totais variaram de 10 a 18 mg EAG/g de matéria fresca e não foram notadas diferenças significativas entre plantas infectadas e não-infectadas (Figura 6)

Figura 6 – Produção de compostos fenólicos por plantas de *P. divaricatum* infectadas e não infectadas por *F. solani* f. sp. *piperis* por um período de 7- 45 dias. ^{a,b,c,d} amostras não apresentam diferença estatística significativa pelo teste *t student* ($p < 0,05$).



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

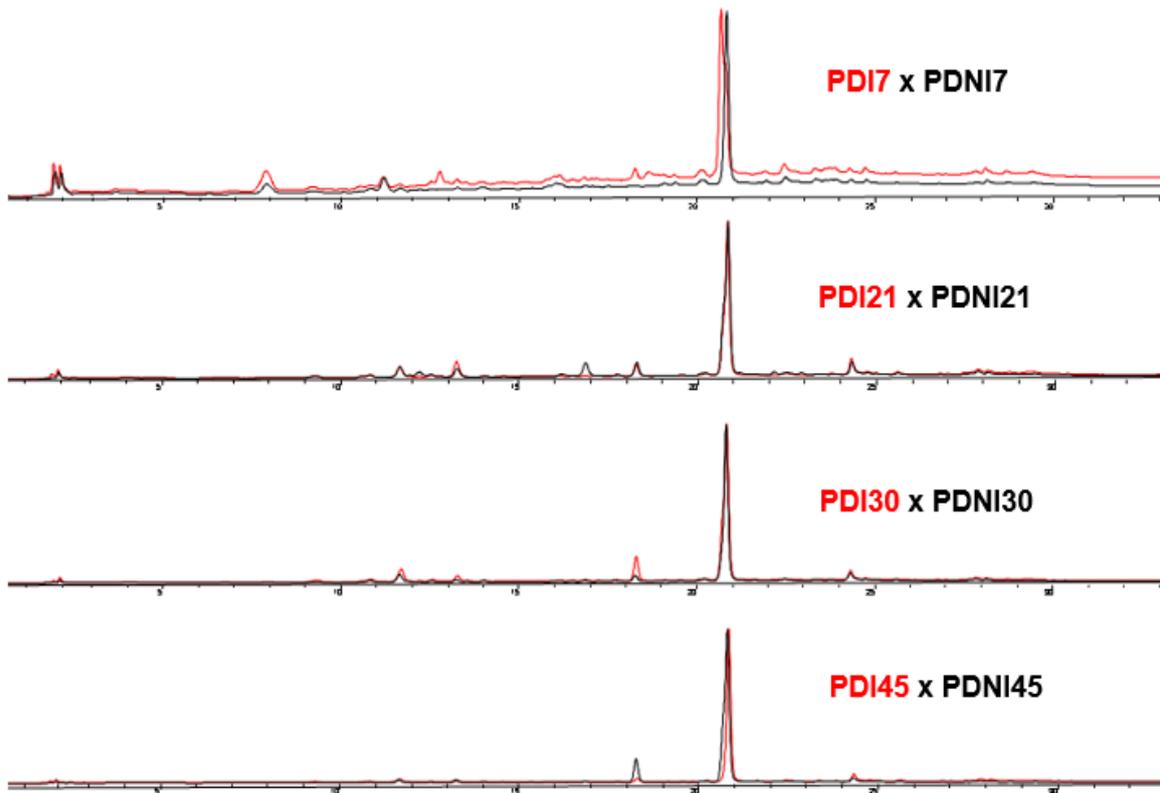
O perfil químico dos extratos AcOEt das plantas infectadas e não infectadas apresentou diferença qualitativa apenas no 7º DAI. Apesar do estresse causado pelo patógeno podemos observar que os compostos fixos do metabolismo secundário de *P. divaricatum* não foram sensíveis à infecção como no óleo essencial, rico em fenilpropanóides (Figura 7).

O estresse causado pelo ataque de patógenos eleva o nível de ácido jasmônico e seus derivados, e induz a expressão de genes específicos responsáveis pelo combate ao estresse (FONSECA et al, 2009; SANTINO et al, 2013). O ácido jasmônico e o metil jasmonato regulam positivamente a biossíntese dos

fenilpropanóides, por induzir o acúmulo da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), que catalisa a desaminação da amônia a cinamato, e aumenta a expressão da 4-coumaratoCoA ligase, que participa do passo final da via geral dos fenilpropanóides (ELLARD-IVEY, DOUGLAS, 1996; ALON et al, 2013). Nas interações planta x patógeno, observa-se um aumento na expressão de PAL em variedades resistentes quando comparadas às suscetíveis (PURWAR et al, 2013; VAGANAN et al, 2014). Não foram encontradas correlações entre os teores de compostos fenólicos presentes nos óleos e nos extratos, uma vez que o método de Folin ciocalteu é realizado em ambiente aquoso.

A produção de fenilpropanóides durante a infecção dos frutos *Citrus sinensis* var. navelina com *Penicillium digitatum* foi avaliada no perfil de metabólitos do flavedo (parte colorida externa da casca) e albedo (parte branca interna). Os resultados mostraram que a expressão de 10 genes relacionados a síntese de fenilpropanóides ocorreu 48h após a inoculação, quando os sintomas de apodrecimento começaram a aparecer e se mantiveram constante após 72h. Os resultados sugerem que flavonas, flavanonas, flavonas polimetoxiladas são induzidas nos frutos cítricos, em resposta à infecção por *P. digitatum* (BALLESTER, LAFUENTE, GONZÁLEZ-CANDELAS, 2013). A contribuição de vários componentes bioquímicos para diferentes estágios de interações planta-patógeno tem sido apoiada por ferramentas genéticas disponíveis para organismos modelo (CHEYNIER et al, 2013).

Figura 7 – Cromatogramas dos extratos AcOEt das folhas de *P. divaricatum* obtidos por HPLC-UV (280 nm) nos diferentes estágios de infecção por *F. solani* f. sp. *piperis*.

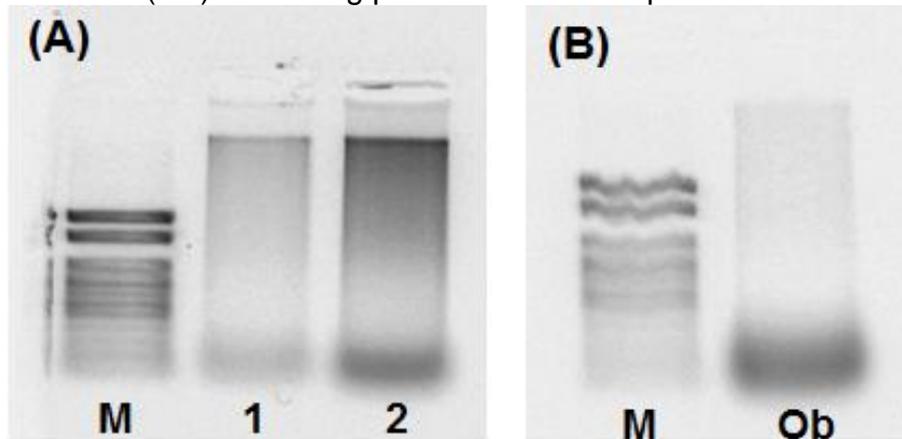


Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

5.2.4 Isolamento do Gene Eugenol O-metiltransferase em *P. divaricatum*

A extração do DNA de *P. divaricatum* com o Kit utilizado foi satisfatória, conforme mostrado no gel de agarose 0,8% (Figura 8). Os rastros observados durante a corrida representam impurezas que podem estar associadas à presença de polifenóis ou polissacarídeos e dependem do tecido utilizado para extração. A extração de DNA de baixa qualidade, pouca quantidade, ou ainda muito concentrado pode dificultar seu uso para estudos moleculares (BRITO et al, 2012).

Figura 8 – (A) Qualidade de DNA extraído de *P. divaricatum*, 1. 50 ng/μL e 2. 150 ng/μL, M = marcador (B) DNA de *Ocimum basilicum* (Ob) de 200 ng/μL no volume de 5 μL.



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

As condições da PCR para amplificação do gene Eugenol O-metiltransferase em *P. divaricatum* foram ajustadas para obtenção dos fragmentos desejados. Os diferentes conjuntos de *primers* testados foram baseados na sequência consenso do gene de manjeriço variando as concentrações de MgCl₂ (1,5 a 5 mM) e as temperaturas de anelamento (45 a 55°C). As condições de análise para as diferentes corridas encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de MgCl₂ testadas na PCR para *P. divaricatum* e manjeriço.

Espécie	Primers	T (°C)	MgCl ₂ (mM)	Ciclos	Volume (μL)	Fragmento esperado (PB)
<i>Piper divaricatum</i>	1F/ 1R	45 - 53	2,5 – 5,0	30	50	500
	1F/2R	45 - 53	2,5 – 5,0	30	50	329
	1F/ 3R	45 - 53	2,5 – 5,0	30	50	140
	2F/ 1R	53	2,5 – 3,0	30	50	682
	2F/2R	45 - 55	1,5 – 5,0	30 – 35	20 – 50	512
<i>Ocimum basilicum</i>	2F/1R	53	2,0	30	50	682
	2F/2R	53	2,0	35	50	512

Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Apesar dos ajustes nas condições, a amplificação de nenhum fragmento foi obtida. As condições de PCR para o DNA de manjeriço foram baseadas no descrito por RENU et al (2014) e os fragmentos obtidos apresentaram os tamanhos esperados, demonstrando que não havia problemas de validade ou contaminação com os reagentes que constituíram a PCR (Figura 9)

Figura 9 – (A) Amplificações obtidas com DNA de *O. basilicum*. **M**= Marcador, **Pd1** = PCR de DNA de *P. divaricatum* com 150 ng/μL, **Pd2**= PCR de DNA de *P. divaricatum* com 50 ng/μL **Ob1**= PCR com DNA *Ocimum basilicum* com 150 ng/μL **Ob2**= PCR com DNA *Ocimum basilicum* com 50 ng/μL



Fonte: A autora da pesquisa, 2014.

Os reagentes e as condições da PCR são o ponto chave em estudos moleculares de amplificação de genes alvo. O cloreto de magnésio funciona como co-fator da enzima DNA polimerase, podendo afetar as temperaturas de desnaturação das fitas de DNA e o anelamento dos *primers* (OLIVEIRA, 2007). Altas concentrações deste reagente podem auxiliar o anelamento de *primers* pouco específicos. Desta maneira, nas condições de PCR testadas para *P. divaricatum*, foram utilizadas concentrações crescentes de $MgCl_2$, associados a baixas temperaturas de anelamento para promover um melhor anelamento dos *primers*, que eram baseados na sequência de um gene de outra espécie. Outro fator que deve ser mencionado é a presença de impurezas no DNA extraído de *P. divaricatum*, que pode interferir na desnaturação da dupla-fita. Os polifenóis inibem enzimas, pois modificam complexos com íons metálicos, por meio de sua capacidade de formar agregados com proteínas, levando a inativação da enzima (HASLAM, 1996).

Vale ressaltar que as seqüências de genes envolvidos em passos finais da via metabólica de fenilpropanóides não estão disponíveis em bancos de dados. O gene Eugenol O-metiltransferase foi isolado das espécies *Ocimum tenuiflorum*, *O. basilicum* e *Rosa chinensis*. O gênero *Ocimum* dispõe de um maior número de isoformas e foi escolhido para confecção dos *primers*. O gene Eugenol O-metiltransferase pode apresentar outras isoformas, fato atestado na espécie

Ocimum tenuiflorum, da qual foram isolados oito biotipos (RENU et al, 2014). A característica de variabilidade pode estar presente no genoma de *P. divaricatum*, o que pode explicar a ausência de amplificações, até nas condições mais favoráveis que foram submetidos o DNA para a PCR.

6 CONCLUSÕES

A espécie *P. divaricatum* inoculada com o fitopatógeno *F. solani* f. sp. *piperis* para o monitoramento da produção dos metabólitos secundários durante a infecção, foi verificado um aumento na produção de fenilpropanóides e das lipoxigenases.

Primers de manjeriço não devem ser usados para isolamento do gene Eugenol O-metiltransferase, pois utilizando esses *primers*, os resultados não foram satisfatórios, provavelmente pela variabilidade genômica de *P. divaricatum*. A caracterização da expressão gênica durante a infecção com *F. solani* f. sp. *piperis* em *P. divaricatum* poderá utilizar genes iniciais da rota dos fenilpropanóides, como da enzima PAL existente em banco de genes.

Os resultados obtidos indicam a utilização de *P. divaricatum* como fonte de genes de resistência em programas de melhoramento genético para obtenção de cultivares de *P. nigrum* resistentes a fusariose.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, R. da S. et al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Rev. Virtual Quim.**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/254/234>>. Acesso em: 20 mar. 2012.
- ALON, M. et al. Activation of the Phenylpropanoid Pathway in *Nicotiana tabacum* Improves the Performance of the Whitefly *Bemisia tabaci* via Reduced Jasmonate Signaling. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. 1-10, out. 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0007661&representation=PDF>>. Acesso em: 22 abr. 2014.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Variability in Essential Oil Composition of *Piper marginatum* Sensu Lato. **Chem Biodivers.**, Suíça, v. 5, n. 1, p. 197-208, jan. 2008. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1612-1880/homepage/Contact.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1612-1880/homepage/Contact.html)>. Acesso em: 20 mar. 2012.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. N. M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods Enzymology**, Nova York, v. 71, p. 441-451, 1981.
- BALLESTER, A. R.; LAFUENTE, M. T.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L. Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part II: gene expression and metabolite accumulation in the response of fruits to *Penicillium digitatum* infection. **Food chem**, Estados Unidos, v. 136, n. 1, p. 285-291, 2013.
- BRITO, M. V. de et al. Avaliação de métodos de extração de dna genômico em *Ocimum basilicum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém. **Anais...** Belém: EMBRAPA, 2012. p. 1-4. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77670/1/549.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013.
- CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, United States, v. 72, p. 1-20, nov. 2013.
- CHIVASA, S. et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. **J. Exp. Bot**, Londres, v. 57, n. 7, p. 1553–1562, mar. 2006. Disponível em: <<http://jxb.oxfordjournals.org/content/57/7/1553.full>>. Acesso em: 15 set. 2013.
- COSTA, C. M. G. R. et al. Efeito inibitório do óleo essencial de manjeriço sobre o crescimento *in vitro* de *Erwinia carotovora*. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 35-38, set. 2009. Disponível em: <http://www.emepa.org.br/revista/volumes/tca_v3_n3_set/tca07_manjericao.pdf>. Acesso em: 15 set. 2013.
- DANGL, J. L., JONES, J. D. Plant pathogens and integrates defense responses to infection. **Nature**, Londres, v. 14, n. 411, p. 826-833, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459065>>. Acesso em: 15 set. 2013.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. **Science**, New York, v. 341, n. 6147, p. 746-751, Aug. 2013.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Netherlands, v. 97, n. 3, p. 237–249, Dec. 2000.

DIXON, R. A. et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. **Mol. Plant. Pathol.**, United States, v. 1, n. 3, p. 371-390, Sep. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569344>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

DUDAREVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Florida, v. 25, n. 5, p. 417–440, Jan. 2007.

ELAD, Y. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. **Biological Reviews**, Malden. v. 72, n. 3, p. 381-422, Aug. 1997.

ELLARD-IVEY, M.; DOUGLAS, C. J. Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in Parsley and transgenic Tobacco. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 112, n. 1, p. 183-192, Sep. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC157937/pdf/1120183.pdf>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

FREIRE, F. C. O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 10, n. 3, p. 577-596, 1985.

FONSECA, S.; CHICO, J. M.; SOLANO, R. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. **Current Opinion in Plant Biology**, United States, v. 12, n. 5, p. 539–547, Oct. 2009.

GANG, D. R. et al. Characterization of Phenylpropene O-Methyltransferases from Sweet Basil: Facile Change of Substrate Specificity and Convergent Evolution within a Plant O-Methyltransferase Family. **Plant Cell**, Estados Unidos, v. 14, n. 2, p. 505–519, Feb., 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC152928/>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tanins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Washington v. 59, n. 2, p. 205-215, Feb. 1996.

KURTH, F. et al. *Streptomyces*-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defence, photosynthesis and secondary metabolism pathways. **Mol Planta Microbe Interact**, Estados Unidos, v. 27, n. 9, p. 891-900, Sep. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24779643>>. Acesso em: 18 abr. 2013.

LANDOLT, W. et al. Effect of fertilization on ozone-induced changes in the metabolism of birch (*Betula pendula*) leaves. **New Phytologist**, Lancaster, v. 137, n. 3, p. 389-397, Nov. 1997.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V. M. T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects.

Phytochemistry: Advances in Research, India, v. 2, p. 23-67, 2006. Disponível em: <http://trnres.com/ebook/uploads/imperato/T_1231133597Imperato-2.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2013.

LEMOS, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants.

Phytotherapy Research, Estados Unidos, v. 4, p. 82-84, 1990.

MARGIS-PINHEIRO, M. et al. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência-Hoje**, v. 25, p. 231-244, 1999.

MEDEIROS, R. B.; FERREIRA, M.; DIANESE, J. C. **Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2003.

MICHEREFF, S. J.; DOMINGOS, E. G. T.; ANDRADE, M. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Livro; UFRPE, 2005.

NASCIMENTO, S. B. et al. Identifying Sequences Potentially Related to Resistance Response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by Suppression Subtractive Hybridization. **Pept Protein Lett.**, Estados Unidos, v. 16, n. 12, p 1429-34, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20001904>>. Acesso em: 20 fev. 2013.

NICHOLSON, R. L; HAMMERSCHMI, T. R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, Estados Unidos, v. 30, p. 369-389, 1992.

NÜRNBERGER, T. Signal perception in plant pathogen defense. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Europa, v. 55, n. 2, p. 167-182, Feb. 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs000180050283>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

OLIVEIRA, R. dos R. **Padronização e comparação de técnicas de reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção do metapneumovírus humano em secreções respiratórias**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

OSBOURN, A. E. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. **The Plant Cell**, Estados Unidos, v. 8, n. 10, p. 1821-1831, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC161317/>>. Acesso em: 28 jan. 2013.

PARKER, D. et al. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of 3 host plant species by *Magnaporthe grisea*. **The Plant Journal**, Malden, v. 59, n. 5, p. 723-737, Sep. 2009.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/UFPR, 2004.

PÉREZ-BUENO, M. L. et al. Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*. **Physiol Planta**, Estados Unidos, v. 153, n. 1, p. 161-174, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24871330>>. Acesso em: 10 out. 2013.

PICHERSKY, E; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. **Curent Opinion in Plant Biology**, United States, v. 5, n. 3, p. 237–243, Jun. 2002.

PORTA, H; SOSA, M. R. Plant Lipoxigenases: physiological and Molecular Features. **Plant Physiol**, Estados Unidos, v. 130, n. 1, p. 15-21, Sep. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12226483>>. Acesso em: 10 out. 2013

PURWAR, S. et al. Expression and *in silico* characterization of Phenylalanine ammonium lyase against karnal bunt (*Tilletia indica*) in wheat (*Triticum aestivum*). **Bioinformation**, Estados Unidos, v. 9, n. 20, p. 1013-1018, Dec. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24497728>>. Acesso em: 16 mar. 2013.

RESENDE, M. L. V. et al. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v28n2/a01v28n2.pdf>>. Acesso em> 13 mar. 2013.

RENU, I. K. et al. Characterization and functional analysis of eugenol O-methyltransferase gene reveal metabolite shifts, chemotype specific differential expression and developmental regulation in *Ocimum tenuiflorum* L. **Mol Biol Rep**, Europa, v. 41, n. 3, p. 1857-1870, Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2442085>>. Acesso em: 16 mar. 2013.

SANTINO, A. et al. Jasmonate signaling in plant development and defense response to multiple (a)biotic stresses. **Plant Cell Reports**, United States, v. 32, n. 7, p. 1085-1098, Jun. 2013.

SIEDOW, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual Review of Plant Physiology an Plant Molecular Biology**, Estados Unidos, v. 42, p. 145-188, June, 1991. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.42.060191.001045?journalCode=arplant.2>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

SILVA, J. K. R. da et al. Essential oil composition, antioxidant capacity and antifungal activity of *Piper divaricatum*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 5, n. 3, p. 477-480, 2010.

SILVA, M. D. et al. Caracterização da via das lipoxigenases em plantas de soja resistentes e susceptíveis a *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis*, agente causal do cancro-da-haste. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 316- 328, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-31312001000300007&script=sci_abstract&tIng=pt>. Acesso em: 28 mar. 2014.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2010.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, mar./abr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0100-40422007000200021&script=sci_arttext>. Acesso em: 30 nov. 2013.

TAN, K. H; NISHIDA, R. Methyleugenol: Its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. **J Insect Sci.**, Londres, p. 12:56, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22963669>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

VAGANAN, M. M. et al. Phenylpropanoid enzymes, phenolic polymers and metabolites as chemical defenses to infection of *Pratylenchus coffeae* in roots of resistant and susceptible bananas (*Musa* spp.). **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 52, n. 3, p. 252-260, Mar. 2014.

VERONESE, P. et al. In defense against pathogens: both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant Physiol**, Estados Unidos, v. 131, p.1580-1590, 2003. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/131/4/1580>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

WHEELER, T.; RUSH, C. M. Soil inhabitant. In: MALOY, O. C.; MURRAY, T. D. (Ed.). **Encyclopedia of Plant Pathology**. New York: JohnWiley & Sons, 2001. p. 933-934.

ZHANG, Y.; LUBBERSTEDT, T.; XU, M. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. **Journal of Genetics and Genomics**, Beijing, v. 40, n. 1, p. 23-35, Jan. 2013.