

UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU – FURB  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS – CCEN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

**Aplicação da Técnica de Extração em Fase Sólida – SPE e Cromatografia Gasosa  
para a Extração e Caracterização dos Constituintes Majoritários do Óleo  
Essencial de *Peperomia emarginella* (Sw.) C. DC.**

**JUSSARA LEANDRO GONÇALVES PEREIRA**

**BLUMENAU-SC**

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**JUSSARA LEANDRO GONÇALVES PEREIRA**

**Aplicação da Técnica de Extração em Fase Sólida – SPE e Cromatografia Gasosa  
para a Extração e Caracterização dos Constituintes Majoritários do Óleo  
Essencial de *Peperomia emarginella* (Sw.) C. DC.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Regional de Blumenau, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Professor Dr. Ricardo Andrade Rebelo - Orientador

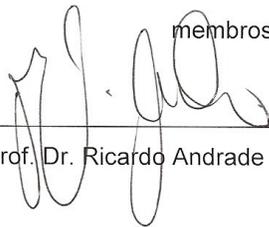
**BLUMENAU - SC  
2007**

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA - SPE E  
CROMATOGRAFIA GASOSA PARA A EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS  
CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *PEPEROMIA*  
*EMARGINELLA* (SW.) C.DC.

Por

JUSSARA LEANDRO GONÇALVES PEREIRA

Esta dissertação foi julgada e aprovada em  
sua forma final pelo orientador e demais  
membros da banca examinadora.



---

Presidente: Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo - Orientador – FURB



---

Profa. Dra. Angela Malheiros – UNIVALI



---

Prof. Dr. Marcos Rivail da Silva – FURB



---

Prof. Dr. Edésio Luiz Simionatto – FURB

Blumenau, 21 de setembro de 2007

**“Dedico este trabalho aos meus pais”**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que é o criador de toda a humanidade;

Ao meu Marido e ao meu filho pelo companheirismo, apoio em todas as etapas deste trabalho;

Aos meus pais e familiares pelo incentivo, pela amizade na realização deste sonho;

Ao orientador Prof. Ricardo Andrade Rebelo pela dedicação na realização deste trabalho;

Ao Alberto Wisniewski Júnior, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau - IPTB da FURB pela análise de cromatografia gasosa com coluna quiral;

Às Irmãs da Congregação Catequista Franciscana de Rodeio, por disponibilizarem o material vegetal estudado;

À Professora Rosete Pescador pelo auxílio na preparação das exsiccatas;

Às Professoras Iêda Maria Begnini e Flávia Aparecida Fernandes da Rosa, e à química Giovana Aparecida Vieira da Universidade Regional de Blumenau pelas análises de infravermelho;

Ao Joni Júlio Evaristo do Departamento de Química, pela paciência às inúmeras solicitações de material;

Aos Colegas de laboratório Melissa, Rafael, Priscila, Ruari, Grazi, Ranieri e todos aqueles que deram incentivos e apoio nos dias mais difíceis.

**Muito Obrigada a todos!**

**"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las".**

(Aristóteles)

## RESUMO

A Mata Atlântica possui uma grande diversidade vegetal, com inúmeros representantes produtores de óleo essencial. Dada as possíveis aplicações dos óleos essenciais na indústria de cosméticos, alimentos, medicamentos e vestuário, este tema se reveste de grande importância pelo potencial socioeconômico a ele associado. Os estudos anteriormente realizados com a espécie epífita *Peperomia emarginella*, revelaram em sua constituição majoritária o limoneno e decanal, substâncias responsáveis pelo característico odor cítrico. Também mostrou ser necessário o desenvolvimento de um processo alternativo à hidrodestilação, para a extração e isolamento dos seus constituintes majoritários. Para viabilizar a investigação da relação entre forófitos e produção de óleo essencial com base no limoneno e decanal, inicialmente avaliou-se a composição química quando proveniente de partes distintas da planta. Folhas e caule foram separadamente submetidos a hidrodestilação e os óleos obtidos analisados por espectroscopia no I.V. Confirmou-se a presença do limoneno e decanal empregando C.G. pelo enriquecimento de amostras do óleo essencial com os respectivos compostos de procedência comercial. Na extração do óleo essencial do material vegetal fresco foi utilizado metanol, para a posterior extração dos analitos (limoneno e decanal) da fração hidro-metanólica, sua pré-concentração e purificação, empregou-se a extração em fase sólida, utilizando cartuchos de sílica modificada com grupo octadecil (C-18). Inicialmente, para a determinação do melhor eluente para a SPE, foram realizados experimentos com uma mistura padrão de limoneno, decanal e 1-bromo-octano comerciais, este último a ser empregado como padrão interno. Dentre os eluentes testados, o melhor resultado esteve associado ao uso de metanol – diclorometano – hexanos:diclorometano / 4:1, nesta ordem, tendo-se obtido os seguintes percentuais de recuperação: decanal, 85%; limoneno, 97% e 1-bromo-octano, 101%. A quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama – FID, empregando curvas analíticas para o decanal, limoneno e padrão interno. A aplicação deste procedimento ao material vegetal de *P. emarginella* (2,0 g) conduziu ao isolamento de 0,38 mg de decanal e 0,20 mg de limoneno, 0,58 mg no total. Este valor é aproximadamente 2,3 vezes inferior ao valor obtido para o óleo essencial obtido por hidrodestilação e separado por método convencional que foi de 1,36 mg de limoneno e decanal.

Palavras-chave: *Peperomia emarginella*, SPE, CG,  $\beta$ -ciclodextrina, (-)-limoneno, decanal.

## ABSTRACT

The Atlantic Rainforest comprises a large vegetal diversity with several representatives as essential oil producers. Due to the many technological applications of essential oils in the cosmetic, food, textile and pharmaceutical industries, this topic incorporates great social and economical importance. Previous study related to the epiphyte *Peperomia emarginella* showed its essential oil to contain mainly limonene and decanal, responsible for the pleasant and characteristic citric odor. However it was not determined which stereoisomer of limonene was present, neither the spectroscopic feature of the total oil under infrared (IR) analysis. Furthermore, it became clear the necessity of developing an alternative technique for the isolation and characterization of the major constituents using small amount of plant material (<5,0 g) which would allow to investigate the relationship between phorophytes associated to this specie and the production of limonene and decanal. For the complementary characterization of the essential oil different parts of the plant were hidrodistilled and subsequently analyzed by means of IR. The IR analysis showed no significant differences between the oil isolated from leaves and stems. The bands frequency and intensity were very similar especially in the range of 3200  $\text{cm}^{-1}$  and 1300  $\text{cm}^{-1}$ . The following axial deformation absorptions can be associated to the major constituents: C=O of aliphatic aldehyde; 1730  $\text{cm}^{-1}$ ; C-H of aldehyde, 2720  $\text{cm}^{-1}$ ; =C-H in 3080  $\text{cm}^{-1}$  e C=C in 1650  $\text{cm}^{-1}$ . The presence of limonene and decanal was also confirmed by gas chromatography using commercial standards. The co-injection technique was applied for this purpose, confirming these two compounds in the essential oil of *P. emarginella*. To determine the stereoisomer of limonene present in the oil it was used CG with a chiral column based on  $\beta$ -cyclodextrine (BETA DEX<sup>TM</sup>). The analysis was carried out comparing the retention time of limonene from the oil sample and those of enantiomerically pure (-)- and (+)-limonene. In the investigation of a methodology to isolate and quantitatively analyze limonene and decanal from small amount of plant material, methanol was used as the extracting solvent, solid phase extraction (SPE), using the adsorbent silane C18, as the method of choice to pre-concentrate, purify and elute the analites, and CG for their quantification using analytical curves. Initially, experiments were conducted to determine the appropriate eluent for SPE. Based on the recovery of the analites and 1-bromooctane as internal standard, the most efficient elution was obtained when methanol, followed by dichloromethane and hexanes:dichloromethane (4:1) were used, giving recovery levels of 85% (decanal), 97% (limonene) and 101% (1-bromooctane). The application of this methodology to fresh leaves of *P. emarginella* (2,0 g) allowed the isolation of 0,38 mg of decanal and 0,20 mg of limonene. The total value (0,58 mg) was about twofold smaller than the amount isolated by hidrodistillation followed by conventional isolation.

Key-words: *Peperomia emarginella*, SPE, CG,  $\beta$ -cyclodextrine; (-)-limonene, decanal.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Rendimento de óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> proveniente de diferentes forófitos, material vegetal e estações do ano.....	45
<b>Tabela 2</b>	– Porcentagem de recuperação dos analitos após SPE utilizando diferentes eluentes.....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Enantiômeros do limoneno	20
<b>Figura 2</b>	– Produtos de oxidação do limoneno	21
<b>Figura 3</b>	– Produtos de oxidação do limoneno – epoxidação	21
<b>Figura 4</b>	– Decanal	21
<b>Figura 5</b>	– Ácido decanóico, produto de oxidação do decanal	22
<b>Figura 6</b>	– Arilpropanóides encontrados em diferentes óleos essenciais	22
<b>Figura 7</b>	– (a) Extrator Clevenger; (b) Extrator Clevenger modificado por Gotlieb e Magalhães	25
<b>Figura 8</b>	– Cartucho para extração em fase sólida	27
<b>Figura 9</b>	– Etapas envolvidas na técnica de extração em fase sólida	28
<b>Figura 10</b>	– Representação da $\beta$ -ciclodextrina, fase estacionária quiral presente em colunas para cromatografia gasosa	32
<b>Figura 11</b>	– Material vegetal da espécie <i>Peperomia emarginella</i> apresentando folhas, infrutescências e caule	36
<b>Figura 12</b>	– (a, b) Exemplar de <i>Peperomia emarginella</i> associada ao forófito <i>Teobroma speciosa</i> (Cacau) localizado no jardim do Convento das Irmãs Catequistas de Rodeio-SC	36
<b>Figura 13</b>	– Sistema de hidrodestilação empregado na extração do óleo essencial de <i>P. emarginella</i> . Em destaque o aparelho Clevenger modificado	40
<b>Figura 14</b>	– Espectro no infravermelho do óleo essencial puro extraído das folhas de <i>Peperomia emarginella</i> coletadas no dia 27/05/2004 na cidade de Rodeio/SC	47
<b>Figura 15</b>	– Espectro no infravermelho do óleo essencial puro extraído do caule de <i>Peperomia emarginella</i> coletado no dia 27/05/2004 na cidade de Rodeio/SC	48
<b>Figura 16</b>	– Cromatograma do óleo essencial da espécie <i>Peperomia</i> <i>emarginella</i> . Destaque para os sinais de limoneno (TR= 9,37	49

	min) e decanal (TR= 14,62 min)	
<b>Figura 17</b>	– Cromatograma do óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> co-injetando o padrão limoneno. Destaque para o sinal com TR ~ 10 min (limoneno)	49
<b>Figura 18</b>	– Cromatograma do óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> co-injetando o padrão decanal. Destaque para o sinal com TR ~15 min (decanal)	50
<b>Figura 19</b>	– Cromatograma da mistura dos padrões comerciais de (+)-limoneno e (-)-limoneno. Análise por CG empregando coluna quiral de $\beta$ -ciclodextrina	50
<b>Figura 20</b>	– Cromatograma do óleo essencial de <i>Peperomia emarginella</i> apresentando limoneno como um dos principais constituintes. Análise por CG utilizando coluna quiral de $\beta$ -ciclodextrina	51
<b>Figura 21</b>	– Sobreposição dos cromatogramas da amostra do óleo essencial de <i>Peperomia emarginella</i> e da mistura de padrões dos enantiômeros do limoneno	51
<b>Figura 22</b>	– Cromatograma do óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> extraído com metanol à temperatura ambiente e posteriormente pré-concentrado, purificado e eluído em cartucho contendo silano C18	54

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	– Curva analítica do limoneno por CG	42
<b>Gráfico 2</b>	– Curva analítica do 1-bromo-octano por CG	42
<b>Gráfico 3</b>	– Curva analítica do decanal por CG	43

## LISTA DE SIGLAS E GLOSSÁRIO

CG – Cromatografia Gasosa

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Epífita – espécie vegetal não enraizada no solo, vivendo acima do chão em ramos e galhos de outras plantas

IV – Espectroscopia no Infravermelho

Forófito – planta que serve de sustentação à epífita

SPE – Extração em Fase Sólida

USDA – United States Department of Agriculture

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1 Óleos essenciais .....	18
2.1.1 Composição química dos óleos essenciais.....	19
2.1.2 Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários.....	22
2.1.3 Propriedades dos óleos essenciais .....	23
2.2 Métodos de extração dos óleos essenciais.....	25
2.2.1 Hidrodestilação.....	25
2.2.2 Extração com solvente orgânico.....	26
2.2.3 Extração em fase sólida (SPE).....	26
2.3 Técnicas analíticas para a caracterização química de óleo essencial .....	29
2.3.1 Métodos cromatográficos.....	29
2.3.2 Espectroscopia de infravermelho.....	32
2.4 Família Piperaceae .....	32
2.4.1 Gênero <i>Peperomia</i> .....	33
2.4.2 <i>Peperomia emarginella</i> .....	35
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1 Solventes e adsorvente.....	38
4.2 Equipamentos.....	38
4.3 Material vegetal – Coletas.....	38
4.4 Métodos de extração do óleo essencial.....	39
4.4.1 Hidrodestilação.....	39
4.4.2 Extração do óleo essencial com solvente.....	40
4.4.2.1 Extração em fase sólida – SPE.....	41
4.4.2.2 Curva de calibração dos analitos e padrão interno.....	41

4.5 Análise do óleo essencial por IV.....	43
4.6 Caracterização do limoneno e decanal por CG (co-injeção).....	43
4.7 Caracterização do enantiômero do limoneno por CG-coluna quiral.....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
5.1 Caracterização química do óleo essencial por IV.....	45
5.2 Caracterização do óleo essencial por cromatografia gasosa utilizando o método da co-injeção com padrões comerciais de limoneno e decanal.....	47
5.3 Identificação do estereoisômero do limoneno pela técnica de cromatografia gasosa empregando coluna quiral de ciclodextrina.....	49
5.4 Estabelecimento de um método analítico para a extração, pré-concentração e purificação dos analitos majoritários limoneno e decanal.....	51
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6.1 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país privilegiado em termos de biodiversidade vegetal, com mais de 55.000 mil espécies catalogadas distribuídas em diferentes ecossistemas (DIAS, 1996).

Entre as florestas tropicais úmidas se encontra a Mata Atlântica, hoje ocupando uma área de 102.000 km<sup>2</sup>, 1,2% do território brasileiro, e que está presente em 17 estados ao longo da costa atlântica. Este bioma compreende um conjunto de formações florestais e ecossistemas associados que incluem a Floresta Ombrófila Densa, a Floresta Ombrófila Mista, a Floresta Ombrófila Aberta, a Floresta Estacional Semidecidual, a Floresta Estacional Decidual, os manguezais, as restingas, os campos de altitude, e os brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste. (SCHÄFFER; PROCHNOW, 2002).

Em Santa Catarina, a cobertura vegetal está subdividida em Floresta Ombrófila Densa, com seus ecossistemas associados, manguezais e restingas, Ombrófila Mista e Estacional Semidecidual, respondendo por aproximadamente 1.662.000 ha. (SCHÄFFER; PROCHNOW, 2002).

A Mata Atlântica abriga mais de 20 mil espécies de plantas, das quais 50% são endêmicas, ou seja, espécies que não existem em nenhum outro lugar do mundo. É a floresta mais rica do mundo em árvores por unidade de área, com 454 espécies/ha no sul da Bahia (SCHÄFFER; PROCHNOW, 2002, p. 12).

O binômio Biodiversidade-Quimiodiversidade encontra-se devidamente representado na área de abrangência da Mata Atlântica, onde podemos associar às diferentes espécies vegetais e grande variedade de substâncias químicas.

Dentre as fontes de matéria-prima podemos destacar os óleos essenciais, utilizados por sua propriedade medicinal e como ingredientes de produtos alimentícios, bebidas, sabões, fragrâncias, perfumes, cremes, xaropes e também como solventes. Seus constituintes majoritários quando isolados, servem como intermediários de síntese para formação de novos compostos de maior valor agregado.

De acordo com SILVA (2003, p.22) “com o advento da química moderna e da industrialização, os princípios ativos das plantas foram isolados, refinados e até sintetizados objetivando uma maior eficácia do produto concentrado frente à vultosa demanda da população em crescimento geométrico”.

No Brasil, a falta de investimentos em tecnologia com o propósito de agregar valor aos óleos, faz com que sejam vendidos como matéria prima bruta a baixo custo para os países mais desenvolvidos que incrementam e desenvolvem produtos comerciais de alto valor agregado.

Embora tenhamos um considerável conhecimento sobre a descrição vegetal da Mata Atlântica, é comparativamente modesto o conhecimento fitoquímico e das propriedades, sendo fragmentado e escasso. Desta forma, a realização de pesquisas é de grande importância para o desenvolvimento do nosso país, a qual possa despertar interesse científico e tecnológico, com reflexos sobre a economia brasileira.

A Mata Atlântica concentra também um dos maiores números de epífitas já catalogadas pela ciência, dentre estas, espécies que ainda não foram descritas, destacando-se raríssimas orquídeas, bromélias, pteridófitas, piperácias, cactáceas, entre outras. É uma das regiões com maior índice de endemismos do mundo.

Em regiões tropicais e subtropicais do mundo encontra-se a família Piperaceae que compreende cinco gêneros englobando centenas de espécies (SANTOS et al., 2001). Segundo Yuncker (1972, 1973 e 1974), em Santa Catarina e no Brasil predominam os gêneros *Piper* e *Peperomia*.

Muito são os representantes da família Piperaceae produtores de componentes voláteis, apresentando propriedade biológica diversificada e elevado potencial tecnológico.

O tema deste trabalho está relacionado à espécie *Peperomia emarginella* (Sw.) C. DC. de ocorrência na Mata Atlântica no Vale do Itajaí, Santa Catarina. Esta espécie chama atenção pelo fato de produzir óleo essencial com odor cítrico pronunciado mesmo em baixas concentrações. Embora a composição química do seu óleo essencial tenha sido descrita na literatura por Aguiar (2002), onde limoneno e decanal foram identificados como os constituintes predominantes, o seu uso potencial como aromatizante e/ou fragrância natural, nos estimulou a estudos complementares de caracterização e de análise química de material vegetal de diferentes procedências.

A procedência refere-se não somente ao local de coleta, mas também, por tratar-se de planta epífita, ao forófito a que está associada, podendo influenciar na produção de metabólitos secundários. Ao considerarmos a possibilidade de propagação desta espécie em grande escala, torna-se imperativo determinar qual o melhor suporte de associação. Quando também consideramos o baixo rendimento na produção de óleo essencial ( $\leq 0,12\%$ ) (AGUIAR, 2002; ABREU et al., 2005), para fins analíticos há a necessidade do desenvolvimento de um método de extração alternativo à hidrodestilação, pois esta requer quantidades expressivas de material vegetal (multigramas), nem sempre disponível. Assim sendo, decidiu-se pela investigação da técnica de extração dos componentes voláteis com solvente orgânico, e de purificação e pré-concentração por extração em fase sólida (SPE).

A caracterização química do óleo limitou-se a estabelecer o enantiômero do limoneno presente no óleo essencial e o seu perfil espectroscópico na região do infravermelho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A importância dos produtos naturais na terapêutica é reconhecida desde tempos imemoriais. O conhecimento de plantas alucinógenas pelos ameríndios que as empregavam em seus ritos pagãos, bem como das propriedades afrodisíacas de diversas poções preparadas a partir de distintas espécies vegetais acompanha o homem há muitos milênios. (BARREIRO, FRAGA, 2001).

A utilização de produtos naturais vem crescendo a cada ano, além da fitoterapia bastante empregada, as indústrias de cosméticos e alimentos, vem utilizando óleos essenciais para aprimorar o produto comercializado a fim de aumentar a taxa de crescimento anual de comércio.

Segundo Cunico et al. (2003) a busca e a intensificação do uso de plantas medicinais pela população mundial têm levado o mercado de fitoterápicos, nutracêuticos e alimentos funcionais a um crescimento surpreendente o qual tem despertado grande interesse na investigação fitoquímica e no desenvolvimento de novos métodos de extração que apresentem perspectivas para a obtenção de extratos vegetais de modo prático, rápido, eficiente e com baixo custo ambiental e econômico, além de preservar as características naturais das substâncias presentes nos mesmos.

O consumo dos produtos aromáticos é universal e a intensidade de seu uso pode servir de aferição do grau de desenvolvimento de um povo. Seu comércio envolve interesse dos produtores, das indústrias de transformação e seus consumidores, de perspectivas econômicas consideráveis (PINTO, 1993).

### 2.1 Óleos essenciais

A denominação "óleo essencial" define um grupo de substâncias naturais de variável poder aromatizante, de composição mais ou menos complexa, que faz parte do organismo de diversas espécies vegetativas e de algumas espécies animais, das quais são extraídos segundos processamentos específicos para cada caso (ZAMBONI, 1983 p.107).

No Oriente, vários anos antes de Cristo, a exploração de óleos essenciais teve início, tendo bases de produção na antiga Pérsia, Índia e Egito. Surgiram no decorrer do tempo, destilarias de óleos essenciais pelo mundo afora, mas somente com o

advento da química fina a atividade tomou impulso, permitindo a manipulação de produtos com várias aplicações científicas (CHAVES, 1994).

A procura por óleos essenciais está aumentando. As aplicações são muito vastas, seja nos medicamentos, nos alimentos e em produtos de perfumaria e limpeza.

Nos óleos essenciais, as misturas complexas são constituídas por numerosos compostos, em alguns casos eles podem superar a uma centena de componentes distribuídos em quantidades variáveis, onde afetam diretamente a qualidade do óleo a ser comercializado. A maneira pela qual o óleo é extraído das plantas, também pode afetar a qualidade e a quantidade do material.

Uma das características marcantes do óleo essencial é a volatilidade de seus constituintes. Eles são obtidos geralmente, por processo de arraste do material vegetal com vapor de água, apresentam caráter lipofílico e comumente odor agradável (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993).

Uma das características das plantas produtoras de óleos essenciais ou aromáticas é a de serem de fácil cultivo. No entanto, requerem cuidados especiais na extração de seu óleo essencial (ZAMBONI, 1983).

### **2.1.1 Composição química dos óleos essenciais**

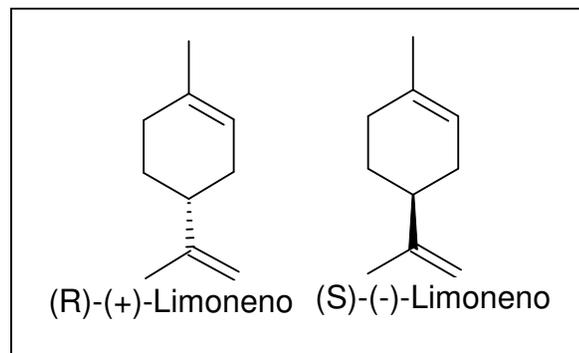
Os óleos essenciais são produtos vegetais contendo muitos componentes como hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois e outras funções orgânicas. De acordo com Araújo (1999, p. 87) os hidrocarbonetos mais freqüentemente encontrados pertencem ao grupo dos terpenos, predominando os mono e sesquiterpenos.

Os terpenos, como o hidrocarboneto limoneno, são encontrados em diferentes espécies vegetais, enquanto que aldeídos aromáticos e fenóis, são os principais constituintes em outras plantas, sendo também responsáveis pelo odor específico dos óleos. O aroma característico do óleo de cravo, por exemplo, é devido principalmente ao eugenol. Entretanto, o aroma completo de uma especiaria geralmente depende da mistura de diversas substâncias, não sendo produzido por um simples componente (ARAÚJO, 1995, p.88).

Segundo ZAMBONI (1983) os constituintes mais comuns dos óleos essenciais são os hidrocarbonetos compostos apenas de átomos de carbono e hidrogênio, mas eles não são necessariamente os mais valiosos, pois estão sujeitos à oxidação e baixam a solubilidade dos óleos em álcool. Poucas vezes os óleos possuem um

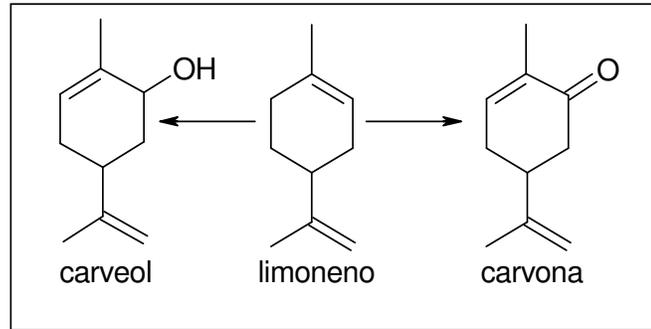
componente decididamente dominante como nos casos do citronelal, no óleo essencial de *Eucalyptos citriodora*, do linalol no óleo de pau rosa ou ainda o eugenol no óleo de cravo da Índia (MAGALHÃES, 1986).

Na extração dos óleos essenciais dos citrinos, o componente principal é o limoneno. O limoneno (**Figura 1**) é um hidrocarboneto quiral, apresentando um carbono assimétrico, existindo, portanto, sob duas formas enantioméricas nomeadas (+)limoneno e (-)-limoneno. A forma dextrógira está associada ao odor característico da laranja, enquanto que a levógira ao do limão. O óleo essencial recém extraído das cascas da laranja (*Citrus sinensis L.*) contém 95-98% do monoterpene (-)-limoneno com uma mistura de outros terpenos (entre eles mircenos,  $\alpha$ -pineno, alguns aldeídos monoterpênicos) e aldeídos alifáticos (decanal, octanal, etc.) (BRUNETON, 1993).



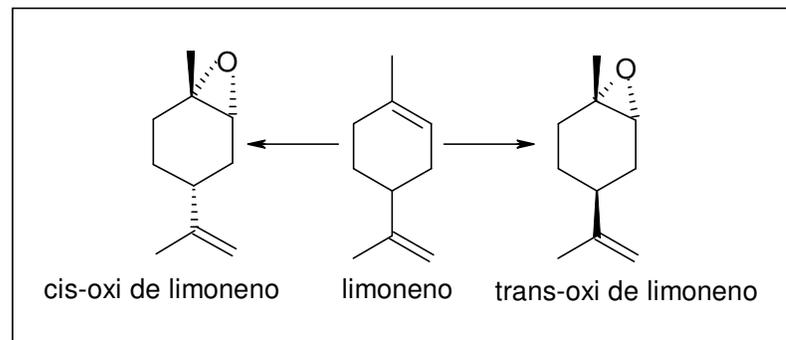
**Figura 1** – Enantiômeros do limoneno

De acordo com ARAÚJO (1999), o limoneno é muito sensível à oxidação. Esta tendência à oxidação é devida às insaturações, sensíveis a presença de calor, luz e oxigênio. Por exemplo, os produtos de oxidação de maior contribuição para a formação de aromas indesejáveis no óleo de limão são carveol e carvona (**Figura 2**) (AGUIAR, 2002).



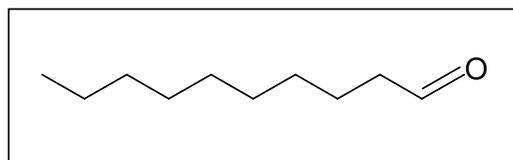
**Figura 2** – Produtos de oxidação do limoneno

No trabalho realizado por Aguiar (2002) houve a formação de óxidos de limoneno proveniente do óleo essencial extraído da espécie *Peperomia emarginella* coletada na cidade de Rodeio-SC (**Figura 3**).

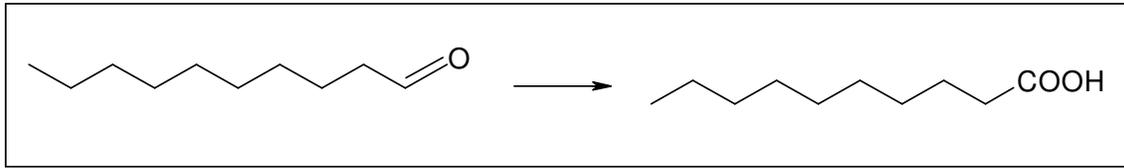


**Figura 3** – Produtos de oxidação do limoneno – epoxidação

Um outro componente encontrado em alguns óleos essenciais é o decanal (**Figura 4**). O decanal também se oxida formando ácido decanóico (**Figura 5**). Segundo Aguiar (2002) esta tendência à oxidação também foi evidenciada no óleo essencial de *Peperomia emarginella*.

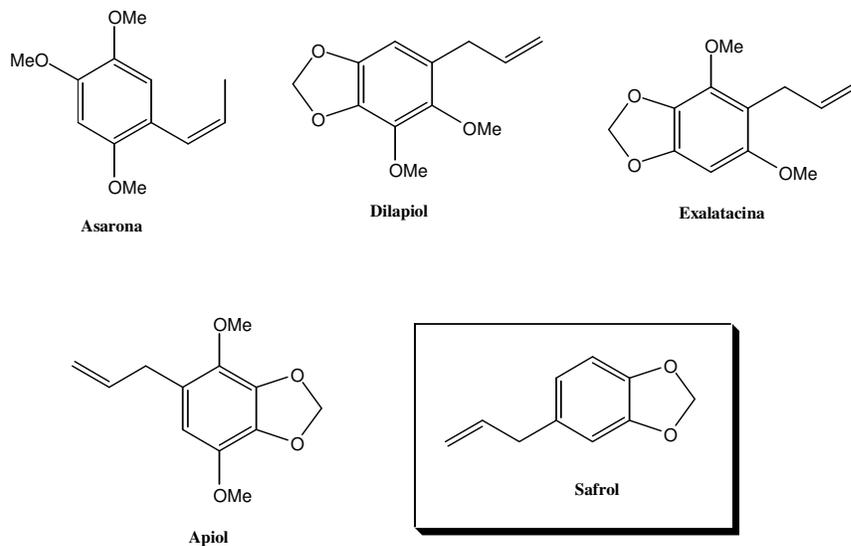


**Figura 4** – Decanal



**Figura 5** – Ácido decanóico, produto de oxidação do decanal

A segunda classe de compostos de maior ocorrência nos óleos essenciais é a dos arilpropanóides. Na **figura 6** temos alguns dos seus representantes que se caracterizam estruturalmente pela presença de um anel benzênico oxigenado e uma cadeia lateral alifática, comumente com 3 carbonos. O safrol merece destaque por ocorrer em várias espécies de piperácias, encontrando importante aplicação no setor industrial (ABREU et al., 2002; CECHINEL et al., 2005).



**Figura 6** – Arilpropanóides encontrados em diferentes óleos essenciais

### 2.1.2 Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários

A variação genética em populações naturais de plantas e animais é a razão da sua resistência perante as pressões do ambiente, sendo a matéria-prima da seleção natural. As plantas que ocorrem ao longo de um gradiente ambiental, por exemplo, variam também quanto à constituição genética e atividade fisiológica, condicionadas

pelo processo de seleção natural; embora pertencendo à mesma espécie, podem responder de modo muito diferente a dado grau de tensão ambiental. A diversidade genética envolve, portanto, o metabolismo dos organismos e seus produtos.

Existem alguns fatores que podem influenciar na composição química de um vegetal como: luminosidade, umidade, radiação solar, vento, temperatura, estação do ano em que a planta foi coletada, altitude, ritmo circadiano, poluição atmosférica, entre outros. (NETO; LOPES, 2007)

Variação de mais de 80% na concentração do eugenol foi detectada no óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), o qual atinge um máximo em torno do meio-dia (98%), contra apenas 11% às 17 horas.

A influência do índice pluviométrico sobre alguns componentes de óleos essenciais foi observada na espécie *Santolina rosmarinifolia*, onde uma relação positiva foi associada aos níveis de precipitação. Entretanto, efeitos negativos foram também observados.

As folhas da hortelã (*Mentha piperita*) mantidas sob condições de dia longo contém mentol, mentona e somente traços de mentofurano, enquanto as plantas desenvolvidas sob condições de dia curto apresentam o mentofurano como constituinte majoritário do óleo essencial. (NETO; LOPES, 2007)

### 2.1.3 Propriedades dos óleos essenciais

Alguns exemplos foram selecionados para exemplificar a diversidade de propriedades associadas aos óleos essenciais e, por conseguinte, o seu potencial tecnológico.

Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -elemeno, trans- $\alpha$ -bergamoteno, e biciclogermacreno, juntamente com o álcool sesquiterpênico espatulenol, foram identificados como os principais constituintes do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. da Tanzânia, que apresentou potente atividade antifúngica contra *Mucor sp.* e *Fusarium moniliforme* (MALELE et al., 2003).

Propriedade antifúngica foi também investigada em várias espécies de plantas medicinais aromáticas de ocorrência na república Democrática do Congo (*Eucalyptus spp.*, *Aframomum stipulatum* Sch., *Cymbopogon citratus* Staph., *Monodora myristica*

Dunal e *Ocimum spp.*). Óleos provenientes de folhas e semente foram testados contra várias agentes etiológicos de infecções humanas, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*. Todos os óleos apresentaram atividade antifúngica em diferentes níveis. Destaque para o óleo das folhas de *E. tereticornis* Sm. e das sementes de *M. myristica* que apresentaram atividade inibitória contra todos os microorganismos. Outro importante achado foi o aumento da atividade antifúngica pela combinação de óleos essenciais. Aumento em aproximadamente 60% da atividade foi observado para as combinações *E. tereticornis*-*E. citriodora* e *E. tereticornis*-*E. globulus*. (CIMANGA et al, 2002)

Atividade antibacteriana contra os microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* foi determinada para o óleo essencial de *Achillea crithmifolia* W. et K. e *Achillea nobilis* L. de origem Sérvia. Monoterpenos oxigenados foram identificados como os principais constituintes para ambas as espécies (STOJANOVIC et al., 2003).

Óleos de *Tessaria absinthioides*, *Aloysia gratissima*, *Heterotheca latifolia*, *Lippia juneliana*, *Lippia integrifolia* e *Lippia turbinata* apresentaram diferentes níveis de atividade *in vitro* contra *Ascosphaera apis*, causador de micose em larvas de *Apis mellifera* L., interferindo no seu crescimento (DELLACASA et al., 2003).

Atividade acaricida foi associada ao óleo essencial de *Heterotheca latifolia* contra *Varroa jacobsoni*, agente parasitário que causa grande preocupação entre os apicultores, atacando tanto abelhas adultas como em estágio de polpa. A atividade do óleo foi 2,3 vezes superior ao controle, tendo demonstrado baixa toxicidade contra abelhas adultas (RUFFINENGO et al., 2002).

Diferentes extratos do fruto de *Maclura pomifera* apresentaram propriedade repelente contra baratas (German cockroaches), sendo que o material proveniente da hidrodestilação de frutos com e sem cascas foi o mais ativo, alcançando níveis de repelência de aproximadamente 57% (PETERSON et al., 2002).

Atividade antiplasmodial *in vitro* contra *P. falciparum* (cepas nigeriana e FcB1) foi associada ao óleo essencial obtido dos tubérculos de *Cochlospermum planchonii* e *C. tinctorium*. Entretanto, considerável citotoxicidade em células K562 compromete o seu uso interno (VICAL et al., 2001).

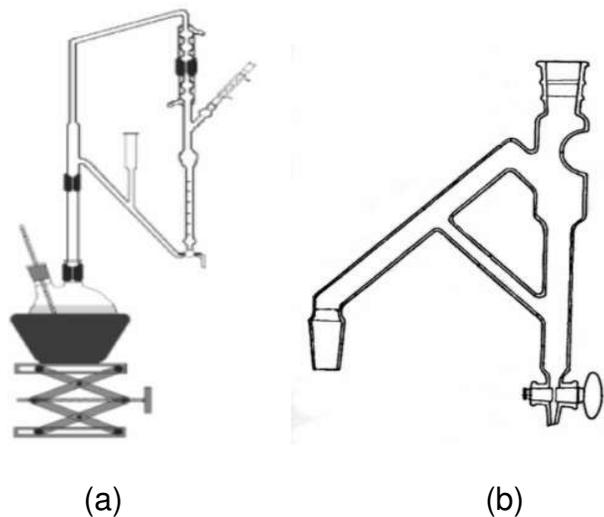
Adicionalmente temos na literatura inúmeros exemplos que bem ilustram o potencial terapêutico dos óleos essenciais, citando-se as propriedades: antiinflamatória, antioxidante, antiviral e antitumoral (LAWRENCE, 2005).

## 2.2 Métodos de extração dos óleos essenciais

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo (SIMÕES, 1999). Os principais métodos de extração utilizados são: enfloração, hidrodestilação, extração com solventes orgânicos, prensagem, extração por CO<sub>2</sub> supercrítico.

### 2.2.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação é feita com a utilização de aparelho Clevenger, modificado ou não, (**Figura 7**), que é conectado a um balão de fundo redondo contendo o material vegetal e água destilada. Uma fonte de aquecimento promove a evaporação das substâncias voláteis contidas no material vegetal (CALDERI, 2002; GOTLIEB e MAGALHÃES, 1960; CLEVINGER, 1928).



**Figura 7** – (a) Extrator Clevenger; (b) Extrator Clevenger modificado por Gotlieb e Magalhães

A porção superior do Clevenger está conectada a um condensador com alta capacidade de refrigeração que poderá por sua vez estar adaptado a um dispositivo para entrada de gás inerte quando há a possibilidade de oxidação da amostra. O óleo essencial condensado fica retido no reservatório graduado e preenchido com água. Depois de realizada a extração, o óleo essencial, juntamente com sua água aromática é removido do aparelho através da saída inferior e coletado em proveta. No aparelho Clevenger modificado a escala permite medir o volume de óleos mais e menos densos que a água. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com sulfato de sódio anidro. Quando o volume de óleo obtido é inferior a 1 mL, este pode ser isolado com o uso de solvente orgânico, comumente hexano ou éter etílico bidestilado, sendo empregado sulfato de sódio anidro para a remoção de água residual. Posteriormente faz-se filtração gravimétrica e concentração da amostra em evaporador rotatório com temperatura em aproximadamente 40°C, até a obtenção do óleo puro. Esse método é utilizado preferencialmente na extração de óleos de plantas frescas. (SIMÕES, 1999).

### **2.2.2 Extração com solvente orgânico**

Os óleos essenciais são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares (éter ou diclorometano) que, entretanto extraem outros compostos lipofílicos além dos óleos essenciais (CHAAR, 2000). Por isso, os produtos obtidos assim raramente possuem valor comercial (SIMÕES, 1999).

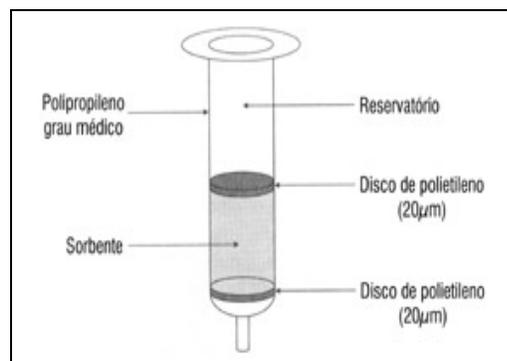
A escolha de solventes de baixa polaridade obtém-se compostos mais lipofílicos, de outras formas com solventes alcoólicos obtém-se um amplo espectro de material polar e apolar (HOSTETTMANN, 2003).

### **2.2.3 Extração em fase sólida (SPE)**

A aceitação rápida e cada vez mais abrangente da extração em fase sólida, para o tratamento de amostras, reside no fato de que esta técnica permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e pré-purificação (RADLER; NUNES, 2003).

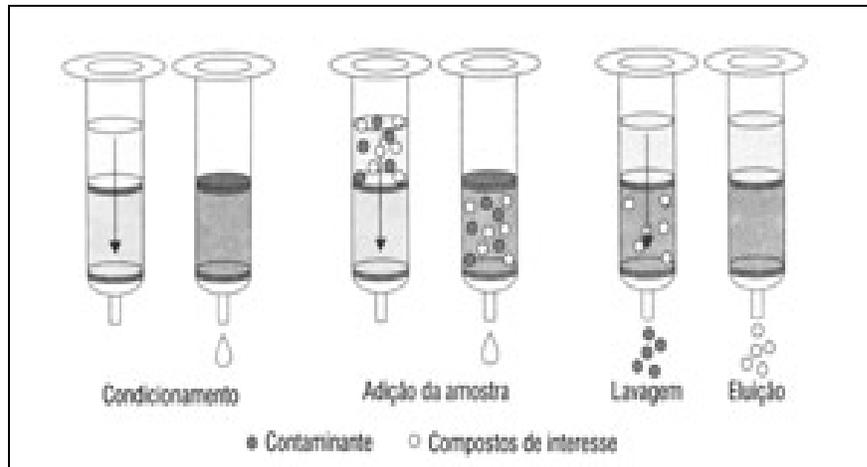
A extração em fase sólida é usualmente empregada para isolar um ou mais analitos presentes em uma matriz complexa após passarem por um cartucho contendo sorvente. Nesta técnica os analitos de interesse são removidos com a utilização de solventes orgânicos seletivos. Atualmente a SPE possui vários tipos de sorventes, a escolha do material de recheio depende dos analitos de interesse. Para analitos que são solúveis em solventes orgânicos polares, de elevada ou média polaridade, a fase sólida escolhida será do tipo fase normal - NP (do inglês *normal phase*) podendo-se usar Sílica gel, Florisil, Alumina. No caso de amostras orgânicas solúveis em solvente apolares, uma fase sólida menos polar é a primeira providência, neste caso se utiliza sílica modificada com radicais Octadecil (C-18), Octil (C-8), Ciclohexil, Fenil. O solvente de eluição escolhido será mais polar do que a fase sólida, e por ser o inverso da fase normal, o modo de separação tem sido denominado fase reversa - RP (do inglês *reversed phase*) (LANÇAS, 2004).

O exemplo da **figura 8** ilustra um cartucho para extração em fase sólida, enquanto a **figura 9** mostra as principais etapas envolvidas na SPE quando o objetivo é isolar um composto (ou uma classe) presente em uma amostra complexa (LANÇAS, 2004).



**Figura 8** – Cartucho para extração em fase sólida

Fonte: LANÇAS, 2004



**Figura 9** – Etapas envolvidas na técnica de extração em fase sólida

Fonte: LANÇAS, 2004

A técnica de **SPE** tornou-se popular na química de produtos naturais para o isolamento de metabólitos secundários, dentre os exemplos temos que componentes voláteis e semi-voláteis das folhas de *Salvia officinalis* foram isolados de amostras obtidas pela técnica de infusão. Octadecil silano foi empregado como fase estacionária, sendo que o seu condicionamento foi realizado com diclorometano, metanol e finalmente com água destilada. A eluição dos compostos retidos foi conduzida com diclorometano. Ficou evidente neste trabalho que a técnica de infusão levou a perda de constituintes voláteis (monoterpenos), comprovado pela análise do material obtido alternativamente por hidrodestilação. Adicionalmente os constituintes da água de infusão foram submetidos a extração com diclorometano e hexano, ficando demonstrada a superioridade da técnica SPE sobre a extração líquido-líquido (RADULESCU; CHILIMENT; OPREA, 2004).

Rodrigues et al. (2004) desenvolveram uma metodologia baseada na extração em fase sólida utilizando C-18 que permitiu avaliar o perfil cromatográfico e a identificação por HPLC dos principais metabólitos encontrados nas cascas de *Hancornia speciosa Apocynaceae*. A identificação dos constituintes foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e co-eluição de padrões autênticos. O método proposto permitiu a remoção dos interferentes, facilitando a identificação dos constituintes presentes nas cascas de *Hancornia speciosa*.

A análise de precursores de aromas (por exemplo, terpênicos e fenólicos sob a forma de glicosídeos) foi conduzida empregando na etapa de extração a técnica de SPE. Esta conferiu reprodutibilidade ao processo e foi especialmente eficiente na extração seletiva de precursores menos polares (IBARZ et al., 2006).

Para o tratamento de colônias de abelhas produtoras de mel infectadas pelo ácaro *Varroa jacobsoni* considera-se o emprego de certos fungos (controle biológico), de óleos essenciais e de produtos naturais tais como o timol, linalol e cânfora. Entretanto, este tratamento não deve interferir na qualidade do mel produzido, que indesejadamente poderá apresentar as substâncias acaricidas empregadas. Objetivando detectar resíduos de óleos essenciais em mel após diferentes tratamentos anti-*Varroa*, a SPE associada à cromatografia gasosa foi utilizada com sucesso na determinação de timol, cânfora, mentol e eucaliptol. O adsorvente de escolha foi o silano C-18 e acetona empregada como eluente (ADAMCZYK et al., 2005).

## **2.3 Técnicas analíticas para a caracterização química de óleo essencial**

A composição dos óleos essenciais pode ser determinada por métodos cromatográficos e métodos espectroscópios. Devido ao grande número de substâncias comumente presentes nos óleos essenciais, sua análise pode ser de difícil execução, especialmente quando se faz necessário identificar constituintes minoritários. Tais constituintes muitas vezes são os responsáveis pelas propriedades investigadas.

### **2.3.1 Métodos cromatográficos**

Existem vários métodos cromatográficos para separação e identificação dos constituintes presentes em uma amostra, cromatografia em papel (CP), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) entre outras técnicas cromatográficas.

A cromatografia gasosa é um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases imiscíveis: a fase estacionária (sólido ou líquido) e a fase móvel que é um gás (hélio, hidrogênio ou

nitrogênio). É um dos métodos mais eficazes para efetuar separação, identificação, qualificação e quantificação de espécies químicas.

Na cromatografia gasosa a amostra é injetada em escala de microlitro com o auxílio de uma microseringa. Estes volumes que se introduzem na coluna variam entre 0,1 e 3,0 microlitros, conforme as dimensões da coluna e a sensibilidade do detector. Deve-se ter muito cuidado para injeção da amostra, principalmente para a análise quantitativa, pois é difícil introduzir volumes exatos e com tamanha reprodutibilidade.

A amostra inserida no injetor aquecido é imediatamente vaporizada, entrando em contato com o gás carreador. Parte da mistura, amostra e gás carreador, são transferidos para a coluna. Os componentes vaporizados saem da coluna na ordem inversa de sua afinidade pela fase estacionária, os componentes com grande afinidade pela fase estacionária são os últimos a deixar a coluna. Ao serem eluídos, os componentes passam pelo detector, sendo registrados em gráficos (ARAUJO, 1999).

As colunas para cromatografia gás-líquido podem dividir-se em dois tipos: capilares e empacotadas. As colunas empacotadas são formadas por um tubo de vidro, ou de metal (aço, cobre ou alumínio). O vidro empregado para esta finalidade apresenta superfície rugosa para permitir maior aderência da fase estacionária (GONÇALVES, 2001). O último avanço na tecnologia de colunas são as colunas de sílica fundida, mais conhecida como colunas capilares, em razão de seu diâmetro, estas colunas têm minimizado a adsorção e a decomposição em sua superfície, o que possibilita a cromatografia de muitas substâncias sem a necessidade de derivatização. A derivatização consiste na transformação da amostra a ser analisada em derivados mais voláteis e estáveis mediante reações químicas altamente quimiosseletivas, tais como, siliilação, acetilação e metilação (ARAUJO, 1999).

Os detectores devem responder rapidamente aos constituintes da amostra e com boa reprodutibilidade. O tempo de resposta é muito importante, pois, a substância passa no detector durante um intervalo de tempo muito curto (GONÇALVES, 2001). Os detectores mais utilizados são de Condutividade Térmica (CT), Ionização de Chama (IC) e Captura de Elétrons (CE).

As temperaturas do injetor, detector e coluna necessitam ser controladas durante o processo da análise. O injetor deve ser aquecido de tal maneira a permitir total vaporização da amostra. O controle de temperatura da coluna deve ser rigoroso e

reprodutível para que não haja alterações nos tempos de retenção durante as análises. A influência da temperatura no detector irá depender do detector utilizado. Basicamente, a temperatura deve ser suficientemente alta, para não condensar a amostra, ficando comumente 30°C acima da temperatura do injetor (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

A cromatografia gasosa atualmente é uma das técnicas de análise de maior uso, utilizado em indústrias químicas e farmacêuticas, análise de alimentos, na medicina, na pesquisa e outras. A identificação dos componentes individuais pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões. Este tempo de retenção relativo é conhecido por Índice de Retenção (IR).

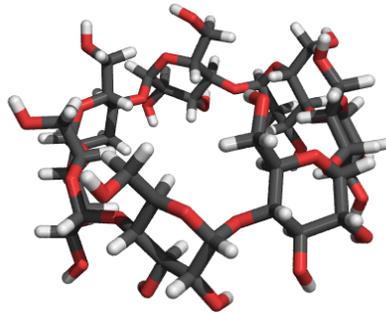
Para se ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, são recomendáveis analisar um óleo volátil também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Atualmente a espectrometria de massa (EM) está bastante difundida, sendo uma técnica analítica por meio da qual a substância a ser analisada, é fragmentada e seus íons catiônicos volatilizados submetidos a um forte campo magnético. Os íons são separados de acordo com a sua massa, ou mais precisamente, massa/carga. Os íons de diferentes massas detectados darão origem ao espectro de massas que consiste de um conjunto de linhas verticais de intensidade variável. O espectro de massas geralmente indica a massa molecular e um padrão de fragmentação obtido que pode ser comparado com aqueles constantes de bibliotecas de espectros de massas (SIMÕES, 1999).

A cromatografia gasosa empregando coluna quiral é um método bastante eficiente para identificar uma estrutura quiral. Existem muitos compostos quirais, a maioria das moléculas presentes na estrutura dos organismos vivos são quirais, incluindo o DNA, anticorpos, enzimas. O limoneno presente em inúmeros óleos essenciais é uma molécula quiral, ocorrendo sob duas formas enantioméricas. A cromatografia gasosa empregando coluna capilar convencional não permite diferenciar os seus enantiômeros. Utilizando colunas contendo fase estacionária quiral, tal como ciclodextrina, é possível separar enantiômeros e caracterizá-los (SIMÕES, 1999).

Na **Figura 10** temos a representação estrutural da  $\beta$ -ciclodextrina, constituída de 7 (sete) unidades de  $\alpha$ -D-glicose interligadas da tal forma a originar um ciclo, cujo

interior apresenta caráter lipofílico. Esta molécula pode atuar como um ligante, formando complexos de inclusão cuja estabilidade dependerá da estrutura tridimensional da molécula inclusa.



**Figura 10** – Representação da  $\beta$ -ciclodextrina, fase estacionária quiral presente em colunas para cromatografia gasosa

### 2.3.2 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) é a medição do comprimento de onda e intensidade da absorção de luz infravermelha de uma amostra.

Esta radiação corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O espectro infravermelho oferece uma considerável quantidade de dados estruturais. A presença de certas bandas característica de grupos funcionais permite as informações estruturais úteis para a identificação das substâncias. Cada grupo funcional absorve em frequência característica de radiação no IV (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

A manipulação das amostras pode ser realizada nos estados: gasoso, líquido ou sólido. Para as amostras que são líquidas no caso de óleos essenciais, são geralmente analisadas de forma pura ou em soluções. Nestes casos, a amostra é colocada entre discos de cloreto de sódio ou cloreto de potássio ou ainda brometo de cério, formando um filme delgado que será submetido à radiação IV.

## 2.4 Família Piperaceae

A família Piperaceae pertence à superordem Nymphaeiflorae, ordem Piperales, reunindo 5 gêneros e 1400 espécies (JOLY, 1977), embora números superiores sejam apresentados por Luttge (1989) que cita somente para o gênero *Peperomia* 3100 espécies. Em geral, são plantas herbáceas ou arbustivas, com folhas inteiras, inflorescências espiciformes de flores hermafroditas e muito reduzidas (RORIG; POSER, 1991).

O termo piperácia é latino, proveniente do grego *peperi*, que por sua vez, origina-se do árabe *babary* (pimenta do reino) (REITZ, 1978).

Uma das mais numerosas famílias das dicotiledônias, representada nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, possui em Santa Catarina representantes dos cinco gêneros: *Peperomia*, *Pothomorphe*, *Sarcorrhachis*, *Piper* e *Ottonia* (REITZ, 1978).

As classes de compostos mais características das piperácias são amidas insaturadas, ligninas, óleos voláteis e outros produtos derivados do ácido cinâmico (RORIG, 1991).

#### **2.4.1 Gênero *Peperomia***

Os gêneros *Piper* e *Peperomia* apresentam o maior número de espécies da família Piperaceae (700 e 600, respectivamente) (SANTOS et al., 2001).

A respeito do gênero *Piper* inúmeros trabalhos foram publicados, sendo que a sua fitoquímica está devidamente descrita nos artigos de revisão de Parmar et al. 1998. Comparativamente, o número de trabalhos relacionados ao gênero *Peperomia* é bastante reduzido, contando-se menos de uma dezena as publicações relacionadas a óleos essenciais (VELOZO et al., 2006)

Muitos representantes deste gênero são tipicamente plantas epífitas, ou seja, não são enraizadas no solo, vivendo acima do chão em ramos e galhos de outras plantas que são chamadas de forófitos. Epífitas obtém água das chuvas, da umidade do ar e minerais orgânicos que acumulam na superfície da planta sobre a qual ela esta crescendo. Semelhante às outras plantas, as epífitas produzem seu próprio alimento através da fotossíntese (KINDERSLEY, 1992).

Os trabalhos a seguir referem-se à fitoquímica do gênero *Peperomia* e tratam exclusivamente do isolamento, caracterização e propriedades de óleos essenciais. Estudos realizados por Zoghbi et al. (2005) permitiram determinar a composição química de duas espécies epífitas crescendo em diferentes forófitos no estado do Pará, estando os forófitos associados a 19 espécies de briófitas. Os compostos predominantes no óleo volátil da *Peperomia circinnata*, popularmente chamada de carrapatinho-da-mangueira, foram mirceno (12,2 – 31,2%) e  $\beta$ -felandreno (17,5 – 25,4%). Os principais constituintes encontrados no óleo volátil de *Peperomia rotundifolia*, vulgarmente conhecida por carrapatinho-da-laranjeira, foram limoneno (28,7 – 35,0%) e decanal (22,8 – 44,4%). Neste trabalho ficou evidenciada a preferência das espécies por certos forófitos, sendo o resultado mais marcante a observação de que apenas duas espécies de briófitas estavam associadas a ambas às espécies de *Peperomia*.

A *Peperomia pellucida* (L.) Kunth, conhecida como erva jaboti, é descrita como diurético, anti-pruriginoso, emoliente e usado no combate à tosse e inflamação da garganta. Um exemplo da espécie *Peperomia pellucida* crescendo nas Filipinas apresentou atividade antibacteriana contra a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (SILVA et al., 1999). Considera-se ainda como remédio contra arteriosclerose das coronárias, o que serviria para prevenir infarto do miocárdio. É indicada também contra afecções bucais (LORENZI; MATOS, 2002). A análise do óleo essencial de material coletado na cidade de Belém – Pará, revelou a presença dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos E-cariofileno e biciclogermacreno, do hidrocarboneto sesquiterpênico oxigenado óxido de cariofileno e do arilpropanóide dilapiol (SILVA et al., 2006).

Moreira et al. (1999) realizaram estudos com quatro espécies de *Peperomia* coletadas no estado do Rio de Janeiro. A extração do óleo essencial por hidrodestilação das partes aéreas e sua caracterização por CG e CG-EM conduziu à identificação dos principais constituintes como sendo:  $\alpha$ -eudesmol para *P. obtusifolia* (cultivada); kongol para *P. alata*; dilapiol, apiol e um composto de massa molecular igual a 218 e índice de retenção de 1730, compreendendo 63,3% da mistura para *P. scandens*; carotol, 5-hidroxi-3,4-metilenodioxililbenzeno e dilapiol para *P. pellucida*.

As composições dos voláteis das espécies de *Peperomia* estudadas mostraram ser os sesquiterpenos a fração principal, 51,24% em *P. blanda* e 65,89% em *P. rupestris* var. *rupestris*. Monoterpenos também foram identificados em pequenas quantidades, *P. blanda* - 3,20% e *P. rupestris* - 8,51% (SANTOS et al., 2001).

Folhas frescas e previamente desidratadas de *P. serpens* (Sw.) Loud. foram submetidas à hidrodestilação fornecendo rendimentos de óleo essencial de 0,2 e 2,8%, respectivamente. A composição química foi semelhante, exceto pelos três constituintes voláteis ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e  $\beta$ -felandreno) ausentes no material vegetal desidratado. E-nerolidol e acetato de (Z)-nerolidol foram os principais, ocorrendo respectivamente nas seguintes concentrações: 31,3 e 42,9% (folhas frescas) e 29,1 e 36,6% (folhas desidratadas) (SILVA et al., 2006).

#### **2.4.2 *Peperomia emarginella***

A espécie *Peperomia emarginella* C. DC. (**Figuras 11 e 12**) é uma planta epífita, constituída de folhas pequenas medindo de dois a cinco milímetros. Não é citada por Reitz (1984) na Flora Ilustrada Catarinense, porém é citado na USDA (United States Department of Agriculture) do Serviço de Recursos de Conservação Natural. É conhecida vulgarmente por Guadeloupe peperomia. Encontrou-se apenas uma referência a esta espécie no trabalho realizado por Aguiar (2002), posteriormente publicado na forma de artigo científico (ABREU et al., 2005), que estabeleceram o perfil químico, qualitativo e quantitativo do óleo essencial das espécies *Piper cernuum* Vell e *Peperomia emarginella* de ocorrência no Vale do Itajaí, Santa Catarina. No óleo essencial da espécie *P. emarginella*, destacaram-se como principais constituintes o limoneno e decanal, além de inúmeros constituintes minoritários, tais como:  $\alpha$ -tujeno, cânfora,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno, D-germacreno, espatulenol, entre outros. Esta espécie também apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria *Staphilococcus aureus*.



**Figura 11** – Material vegetal da espécie *Peperomia emarginella* apresentando folhas, infrutescências e caule.



(a)



(b)

**Figura 12** – (a, b) Exemplar de *Peperomia emarginella* associada ao forófito *Teobroma speciosa* (Cacauí) localizado no jardim do Convento das Irmãs Catequistas de Rodeio-SC

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Caracterizar o óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* (Sw.) C. DC. e estabelecer um método alternativo à hidrodestilação para a extração dos seus constituintes voláteis majoritários.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial de *Peperomia emarginella* por hidrodestilação do material vegetal total e separadamente das folhas e caule;
- Caracterizar por espectroscopia no IV os óleos essenciais obtidos;
- Caracterizar o óleo essencial por cromatografia gasosa utilizando o método da co-injeção com padrões comerciais de limoneno e decanal;
- Identificar o estereoisômero do limoneno presente no óleo essencial pela técnica de cromatografia gasosa empregando coluna quiral;
- Empregar a técnica de extração em fase sólida para a pré-concentração e purificação dos analitos voláteis limoneno e decanal provenientes das folhas de *P. emarginella*;
- Quantificar os analitos por cromatografia gasosa.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Solventes e adsorvente

Foram utilizados padrões analíticos limoneno, decanal e 1-bromooctano de procedência Aldrich para a construção das curvas de calibração e para o desenvolvimento do método de extração em fase sólida.

Utilizou-se éter dietílico no processo da hidrodestilação na etapa de separação do óleo essencial do hidrolato. Neste caso, o solvente foi submetido à destilação simples e pressão normal para purificação.

Como solvente no procedimento da SPE empregou-se metanol, diclorometano, hexano todos purificados previamente por destilados simples a pressão normal.

Na SPE foram empregados cartuchos comerciais contendo 500 mg do sorbente octadecil silano (C-18).

### 4.2 Equipamentos

Balança analítica, modelo Shimadzu Ay 220 foi utilizada na determinação das massas do material vegetal, do óleo essencial e dos padrões analíticos.

As análises por espectrometria no infravermelho foram conduzidas em equipamento Shimadzu modelo IR Prestige-21.

Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu modelo GC – 14 B, sendo as condições de análise descritas no item métodos.

### 4.3 Material vegetal – Coletas

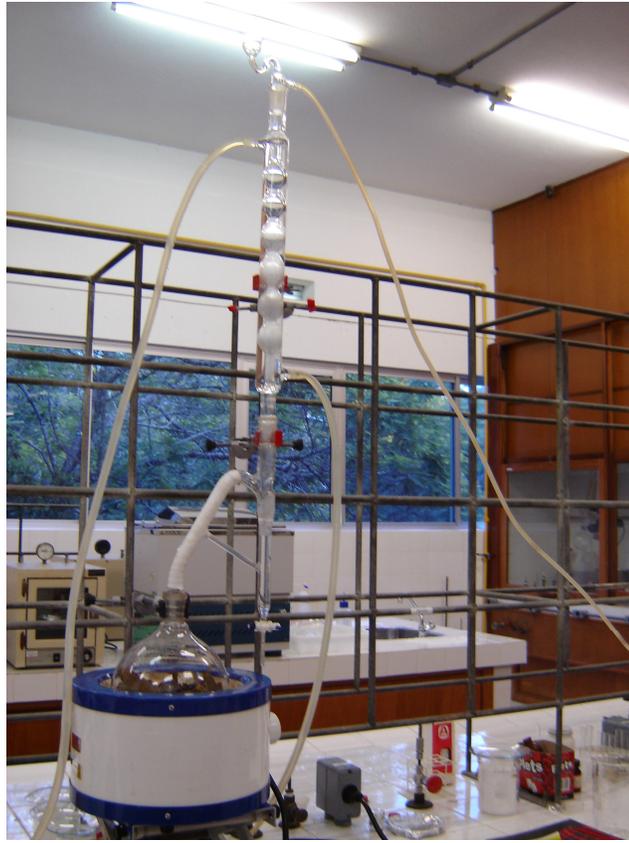
Coletou-se a espécie *Peperomia emarginella*, provenientes de um forófito da espécie *Teobroma speciosa* na congregação das Irmãs Catequistas Franciscanas, localizada na Rua Barão do Rio Branco, 1486, cidade de Rodeio, Santa Catarina, nas datas de 27/05/04, 09/01/06, 13/03/06. No bairro Garibaldi município de Jaraguá do Sul,

Santa Catarina foram realizadas coletas de *Peperomia emarginella*. Esta foi retirada de forófitos do gênero *Citrus spp.*, nas datas de 18/10/04 e 19/04/05.

#### **4.4 Métodos de extração do óleo essencial**

##### **4.4.1 Hidrodestilação**

O material vegetal foi inicialmente limpo pela remoção de matéria orgânica aderida ao caule e mantido em refrigerador até o momento do seu uso. O material vegetal fresco foi empregado nas hidrodestilações. Na primeira extração foram separadas as folhas dos caules, nas demais extrações empregou-se material total. A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação no Laboratório de Pesquisas T-313 do Departamento de Química da FURB. Amostras da planta foram transferidas para um balão de destilação, que foi acoplado a um aparelho Clevenger modificado, e este, a um condensador (**Figura 13**). O sistema foi mantido em atmosfera inerte de nitrogênio. Após 3 horas de destilação foram recolhidos o hidrolato e o óleo essencial e transferidos para um funil de separação. O óleo foi extraído com duas porções de 5 mL de éter dietílico destilado. A fase etérea foi combinada e seca com sulfato de magnésio anidro. A mistura após filtração gravimétrica foi concentrada em evaporador rotatório. A massa do óleo extraído foi determinada em balança analítica para cálculo do rendimento, sendo armazenado sob refrigeração em recipiente de vidro âmbar e sob atmosfera de nitrogênio para posterior análise.



**Figura 13** – Sistema de hidrodestilação empregado na extração do óleo essencial de *P. emarginella*. Em destaque o aparelho Clevenger modificado

#### 4.4.2 Extração do óleo essencial com solvente

Dois gramas (2,0 g) de folhas frescas de *P. emarginella* foram colocados em um frasco de fundo redondo de 10 mL. Em seguida foi adicionado ao frasco 5 mL de metanol destilado, que permaneceu em contato com o material vegetal por 1 (uma) hora à temperatura ambiente. Esporadicamente a mistura era manualmente agitada. O solvente extrator foi então transferido para um erlenmeyer e o processo repetido mais duas vezes. À solução metanólica (15 mL) foi finalmente adicionado 1 mL de solução metanólica de 1-bromooctano (padrão interno) e 8 mL de água destilada. Esta solução foi então submetida à técnica da extração em fase sólida.

#### 4.4.2.1 Extração em fase sólida – SPE

Para estabelecer o procedimento mais adequado para a realização da SPE com o extrato hidro-metanólico de *P. emarginella*, foram utilizadas concentrações conhecidas dos padrões analíticos limoneno, decanal e 1-bromooctano, investigando-se diferentes condições de eluição e avaliando-se a eficiência dos eluentes pela determinação das concentrações por CG dos analitos recuperados.

A SPE foi conduzida em 4 (quatro) etapas: 1. condicionamento do cartucho; 2. introdução da amostra; 3. secagem do cartucho; 4. eluição dos analitos de interesse com o eluente adequado.

O condicionamento foi realizado com metanol seguido de água destilada. Posteriormente fez-se a adição da solução padrão dos analitos. O cartucho foi parcialmente seco com nitrogênio, procedendo-se a eluição com os seguintes eluentes: A – 2 mL de diclorometano, 3 mL de hexanos:diclorometano (2:1); B – 2mL de diclorometano, 3 mL de hexanos:diclorometano (3:1); C. 2mL de diclorometano, 3 mL de hexanos: diclorometano (4:1). Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.4.2.2 Curva de calibração dos analitos e padrão interno

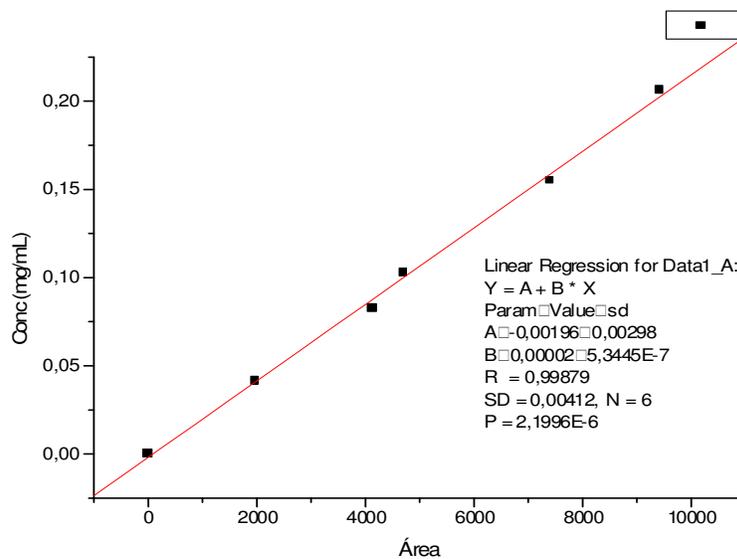
Na preparação das soluções para construção das curvas de calibração, adotou-se o seguinte procedimento:

1. Preparou-se a solução mãe (SM) de cada um dos analitos dissolvendo em hexanos 0,1026 g de limoneno; 0,1032 g de decanal e 0,1046 g de 1-bromo-octano. Os analitos foram pesados diretamente em balões volumétricos de 100 mL previamente calibrados;
2. A partir da SM de cada analito foram preparadas diferentes diluições. Utilizando pipetador automático foram retirados da SM os seguintes volumes: 0,4 mL, 0,8 mL, 1,0 mL, 1,5 mL e 2,0 mL, sendo transferidos para balões volumétricos de 10 mL, cujo volume foi completado com hexanos. As concentrações do limoneno em mg/mL para construção da curva analítica foram: 0,0413; 0,0824; 0,1028; 0,1551; 0,2063. Para o decanal: 0,0458; 0,0829; 0,1034; 0,1560; 0,2075; e finalmente para o 1-bromo-octano: 0,0421;

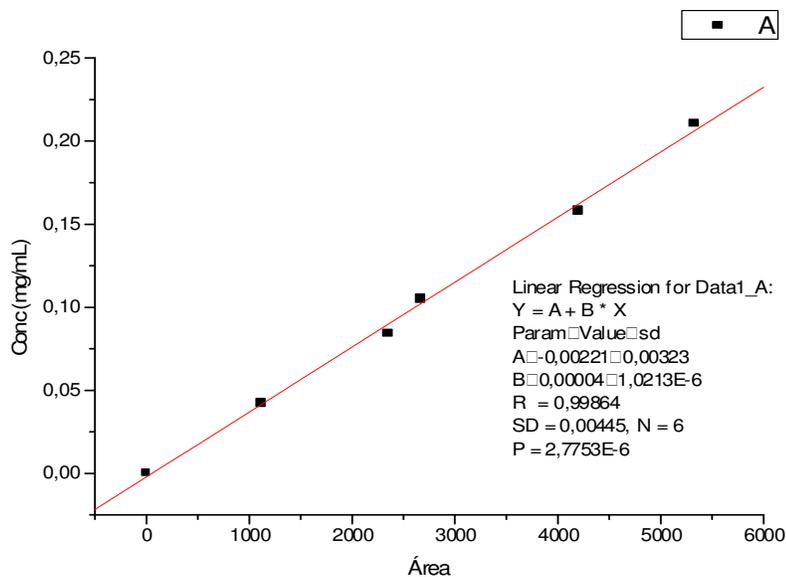
0,0840; 0,1048; 0,1581; 0,2104;

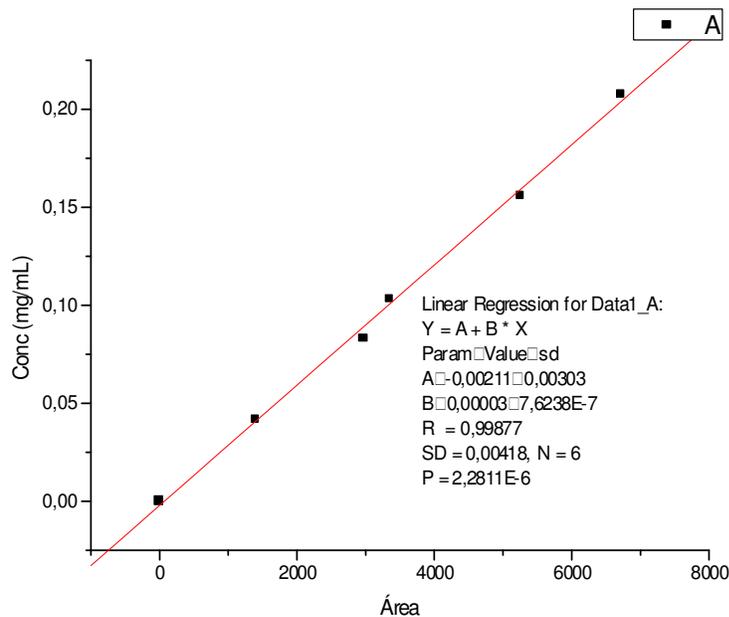
- As curvas de calibração para cada um dos analitos foram construídas relacionando-se área do pico correspondente *versus* concentração (**Gráficos 1-3**). Foram empregadas as médias das áreas obtidas nos ensaios em triplicatas (ver **ANEXO**);
- A cromatografia gasosa foi realizada sob as condições de análise descritas no item **4.6** (p. 38). Volume de 1  $\mu\text{L}$  foi empregado em todas as injeções.

**Gráfico 1 – Curva analítica do limoneno por CG**



**Gráfico 2 – Curva analítica do 1-bromooctano por CG**



**Gráfico 3 - Curva analítica do decanal por CG**

#### 4.5 Análise do óleo essencial por IV

Amostras puras do óleo essencial de *P. emarginella* foram submetidas à análise na forma de filme entre discos de cloreto de potássio. Analisaram-se os óleos provenientes da parte aérea (folhas, caule e infrutescência) e separadamente das folhas e caule.

#### 4.6 Caracterização do limoneno e decanal por CG (co-injeção)

Amostras de óleo essencial enriquecidas separadamente com padrões comerciais de limoneno e decanal foram analisadas por cromatografia gasosa nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida (Simplicity-1/Supelco) com 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m. Hélio foi empregado como gás de arraste com vazão de 1 mL/min, estando o injetor a 250°C e o detector a 280°C. A injeção da amostra de 0,2  $\mu$ L foi conduzida no modo split/1:50, empregando a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60°C durante 4 min, seguido de aquecimento a uma taxa de 5°C/min até 140°C, permanecendo nesta temperatura por 2 min, seguido de aquecimento à uma

taxa de 10°C/min até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 2 min, totalizando 35 min de análise.

#### **4.7 Caracterização do enantiômero do limoneo por CG-coluna quiral**

Amostra do óleo essencial e dos enantiômeros comerciais do limoneno foram analisadas por cromatografia gasosa nas seguintes condições: coluna capilar BETA DEX™ 120 com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Nitrogênio foi o gás de arraste a uma pressão de 60 kPa, estando o injetor a 250°C e o detector de ionização de chama a 280°C. Empregou-se a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 80°C durante 5 min, seguido de aquecimento à uma taxa de 3°C/min até 200°C, totalizando 29 minutos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela 1** temos os rendimentos de extração do óleo essencial de *P. emarginella* em relação ao material vegetal fresco. Dois locais de coleta foram considerados, municípios de Rodeio e Jaraguá do Sul, em Santa Catarina. O material vegetal coletado em Rodeio foi separado em duas porções, caule e folhas. Embora a massa do caule tenha sido muito inferior a das folhas, o rendimento de óleo foi semelhante. Conforme pode ser observado na **Figura 11**, página 36, o caule contribui de forma modesta com a massa total do material vegetal. Os rendimentos dos óleos essenciais não parecem ter sido afetados pelo local de coleta, embora tenham sido extraídos de material vegetal de forófitos distintos e coletados em épocas distintas. Neste trabalho não nos preocupamos com possíveis briófitas associadas à espécie em estudo.

**TABELA 1** – Rendimento de óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* proveniente de diferentes forófitos, material vegetal e estações do ano.

Localidade/Material Vegetal	Estação/ano	Rendimento (%)
Rodeio/ folha	Inverno/ 2004	0,10
Rodeio/ caule	Inverno/ 2004	0,12
Jaraguá do Sul/ folha, infrutescência e caule	Primavera/2004	0.12

Fonte: Dados da Pesquisa

### 5.1 Caracterização química do óleo essencial por IV

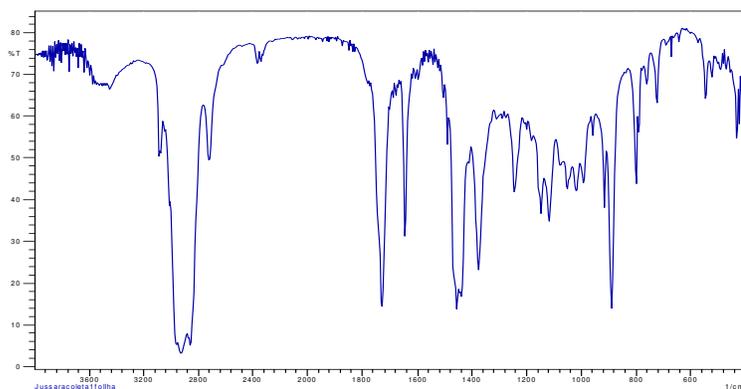
O óleo essencial total da *Peperomia emarginella* foi caracterizado por espectroscopia no Infravermelho como técnica auxiliar de caracterização. A

espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de *níveis vibracionais*). A espectroscopia no infravermelho é largamente usada tanto na indústria quanto na pesquisa científica pois ela é uma técnica rápida e confiável para medidas e controle de qualidade de produtos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

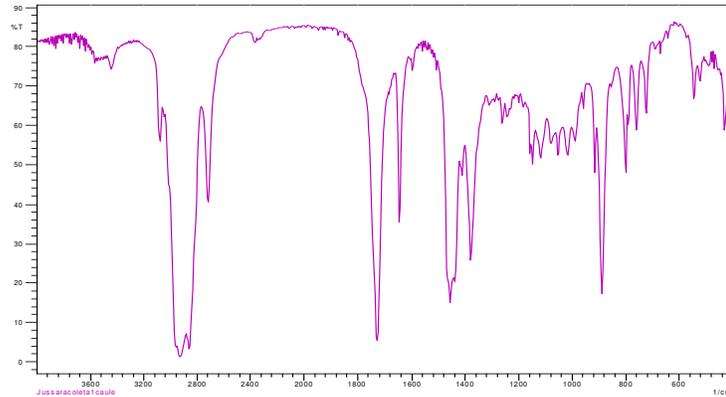
Pela simplicidade e rapidez de execução, a espectroscopia no IV torna-se importante ferramenta de pré-análise, indicando se determinados constituintes majoritários estão presentes na amostra, ou ainda, por análise comparativa, a similaridade química entre amostras.

Foram identificadas as seguintes deformações que podem ser associadas aos constituintes majoritários decanal e limoneno: deformação axial de C=O de aldeído alifático,  $1730\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de C-H de aldeído,  $2720\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de C=C do limoneno,  $1650\text{ cm}^{-1}$ ; deformação axial de =C-H do limoneno,  $3080\text{ cm}^{-1}$ ; deformação angular C-H,  $1450$ ,  $1375$  e  $890\text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

De acordo com o infravermelho, a composição química do óleo da folha (**Figura 14**) assemelha-se à do caule (**Figura 15**). Podemos destacar como principais diferenças a banda de absorção em aproximadamente  $1250\text{ cm}^{-1}$ , mais intensa no espectro das folhas, e em aproximadamente  $760\text{ cm}^{-1}$ , mais intensa no espectro do caule.



**Figura 14** – Espectro no infravermelho do óleo essencial puro extraído das folhas de *Peperomia emarginella* coletadas no dia 27/05/2004 na cidade de Rodeio/SC



**Figura 15** – Espectro no infravermelho do óleo essencial puro extraído do caule de *Peperomia emarginella* coletado no dia 27/05/2004 na cidade de Rodeio/SC

## 5.2 Caracterização do óleo essencial por cromatografia gasosa utilizando o método da co-injeção com padrões comerciais de limoneno e decanal

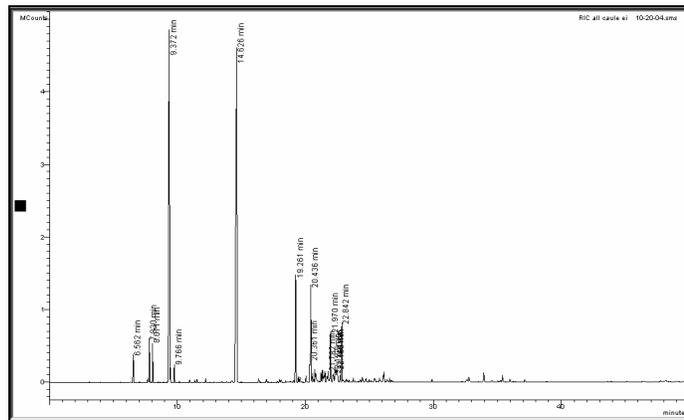
De acordo com o trabalho realizado por Aguiar et al. (2002) os constituintes limoneno e decanal estão presentes no óleo essencial da *Peperomia emarginella*. A técnica de caracterização empregada foi a espectrometria de massas, complementada pelo índice de retenção.

Embora esteja bastante popularizada, a espectrometria de massas requer um equipamento de custo comparativo elevado e de profissional especializado para a sua execução. Quadro mais favorável encontramos na cromatografia gasosa, tanto no que se refere ao equipamento e instalações, quanto ao pessoal técnico.

O procedimento da co-injeção, mediante o qual se enriquece a amostra a ser analisada com um padrão de procedência confiável, é de simples execução e apresenta resultado positivo para o padrão empregado se um dos sinais da amostra sofrer aumento de área, destacando-se dos demais sinais.

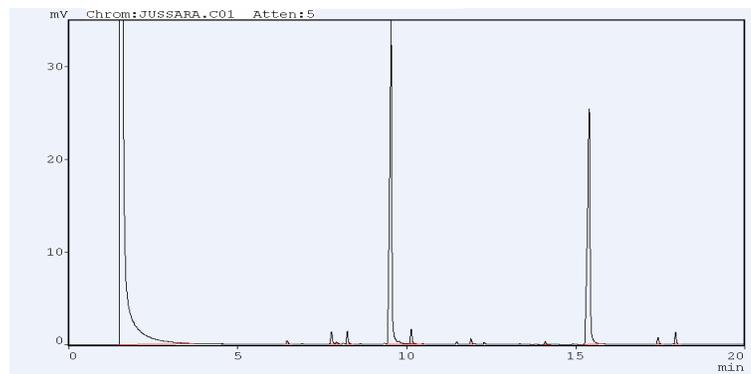
Neste trabalho, soluções distintas de decanal e de limoneno de concentração semelhante a do óleo essencial de *P. emarginella* foram preparadas e separadamente combinadas com a do óleo essencial. Posteriormente foram submetidas à análise por CG, verificando se houve aumento da área do sinal correspondente ao limoneno e decanal, neste caso indicando a co-eluição dos constituintes majoritários e os correspondentes padrões comerciais, ou o surgimento de um novo sinal.

Na **Figura 16** temos o cromatograma do óleo essencial sem qualquer adição de padrões. O limoneno, com tempo de retenção (TR) de 9,37 min., contribui com 30,9% da amostra. O decanal com TR de 14,62 min responde por 36,9% da amostra, sem aplicação de fator de correção. Têm-se uma relação limoneno:decanal de 1:1,2.



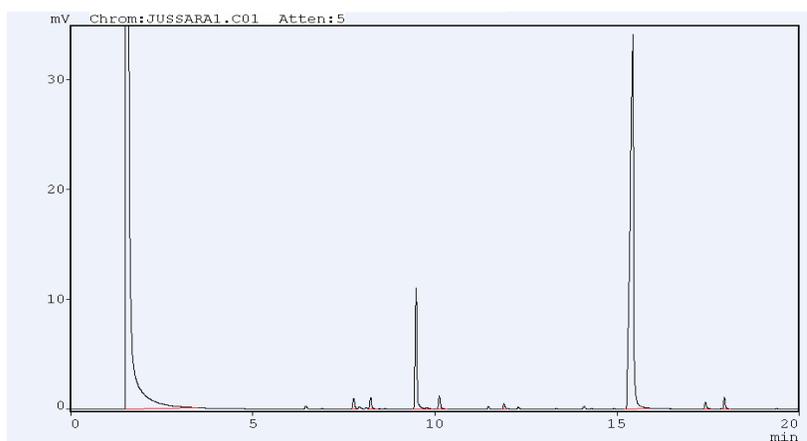
**Figura 16** – Cromatograma do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella*. Destaque para os sinais de limoneno (TR= 9,37 min) e decanal (TR= 14,62 min)

Na **Figura 17** observa-se o cromatograma da co-injeção do óleo essencial e padrão limoneno. Nele vemos uma inversão nas concentrações relativas dos dois constituintes, agora com o limoneno sendo o pico principal, confirmando a presença deste monoterpene no óleo essencial da espécie *P. emarginella*.



**Figura 17** – Cromatograma do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* co-injetando o padrão limoneno. Destaque para o sinal com TR ~ 10 min (limoneno)

Por sua vez, quando da co-injeção óleo essencial e padrão decanal o cromatograma obtido foi o da **Figura 18**. Nele vemos a intensificação do sinal em aproximadamente 15 minutos confirmando a presença do decanal.



**Figura 18** – Cromatograma do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* co-injetando o padrão decanal. Destaque para o sinal com TR ~15 min (decanal)

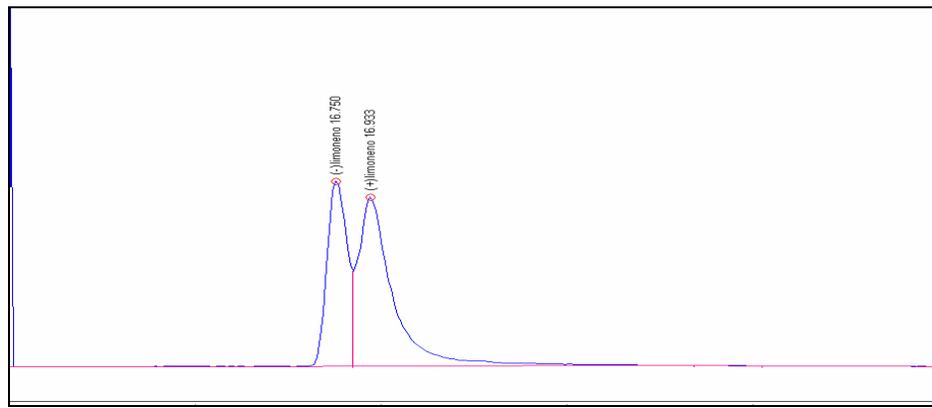
### 5.3 Identificação do estereoisômero do limoneno pela técnica de cromatografia gasosa empregando coluna quiral de ciclodextrina

O óleo essencial das partes aéreas de *Peperomia emarginella* apresenta como um dos principais constituintes o limoneno. Este pode apresentar-se sob duas formas configuracionais, (-)-limoneno e (+)-limoneno (ver **Figura 1**, página 9). O limoneno, juntamente com o decanal, é o responsável pelo odor cítrico associado ao óleo, conferindo-lhe importante propriedade organoléptica. Devido as diferentes sensações olfativas que estão associadas a esses isômeros e pela preferência das espécies vegetais em produzir majoritariamente uma das formas, torna-se importante determinar o estereoisômero presente no óleo, cuja informação poderá ser também considerada para a detecção de adulterações.

A identificação do enantiômero presente no óleo essencial de *Peperomia emarginella* por cromatografia gasosa requer a utilização de uma coluna quiral, tendo-se empregado a  $\beta$ -ciclodextrina (BETA DEX<sup>TM</sup> 120) como fase estacionária. A análise foi conduzida comparando-se o tempo de retenção do limoneno presente no óleo e

seus enantiômeros puros de procedência comercial. Os cromatogramas a seguir mostram um comparativo do padrão limoneno com a amostra do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* (**Figuras 19, 20 e 21**).

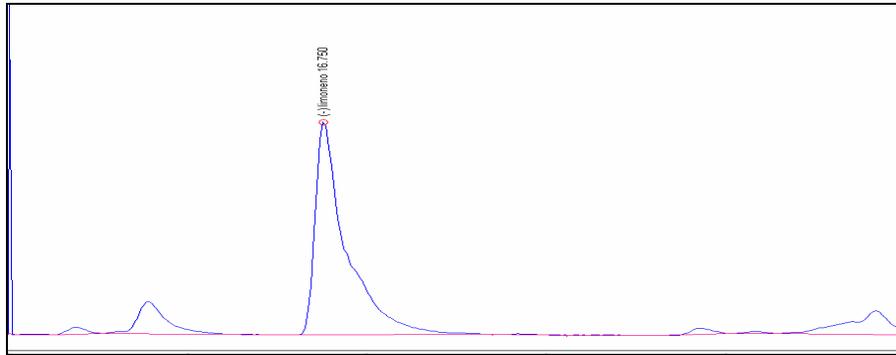
O cromatograma da mistura de limoneno indica um TR para o (-)-limoneno de 16,750 min e para o seu isômero (+)-limoneno de 16,933 min (**Figura 19**). Os tempos de retenção foram bastante próximos, mas suficientemente distintos para que gerassem sinais com resolução adequada.



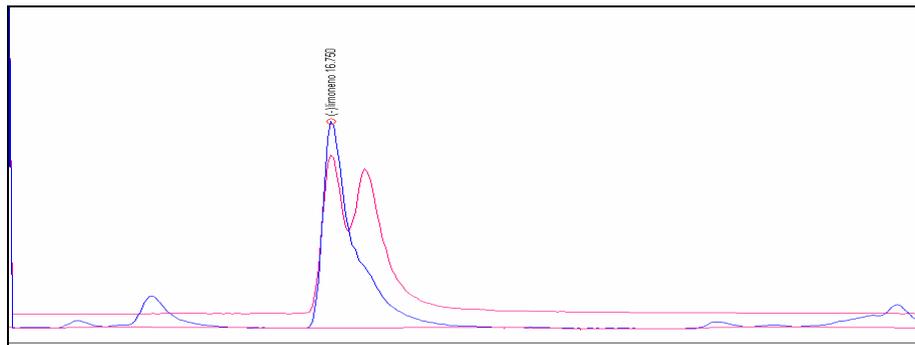
**Figura 19** – Cromatograma da mistura dos padrões comerciais de (+)-limoneno e (-)-limoneno. Análise por CG empregando coluna quiral de  $\beta$ -ciclodextrina

O cromatograma do óleo essencial de *P. emarginella* nas mesmas condições de análise da mistura de limonenos apresentou um sinal em 16,750 min, coincidindo com o RT do (-)-limoneno. A sobreposição dos cromatogramas, **Figuras 19 e 20**, conduziu à **Figura 21**, demonstrando de forma inequívoca tratar-se do (-)-limoneno.

Observamos no cromatograma do óleo (**Figura 20**) uma pequena elevação à direita do pico principal, o que pode ser indicativo da presença de pequena quantidade do isômero dextrógiro. Wisniewski e colaboradores (2007) determinaram que o (+)-limoneno é o principal constituinte do óleo essencial das cascas de *Capsicodendron dinisii* Schwancke (Canellaceae), com o (-)-limoneno respondendo por apenas 6% da mistura de enantiômeros.



**Figura 20** – Cromatograma do óleo essencial de *Peperomia emarginella* apresentando limoneno como um dos principais constituintes. Análise por CG utilizando coluna quiral de  $\beta$ -ciclodextrina



**Figura 21** – Sobreposição dos cromatogramas da amostra do óleo essencial de *Peperomia emarginella* e da mistura de padrões dos enantiômeros do limoneno

#### 5.4 Estabelecimento de um método analítico para a extração, pré-concentração e purificação dos analitos majoritários limoneno e decanal

A investigação da viabilidade de utilizar a SPE para o isolamento dos constituintes majoritários do óleo essencial de *Peperomia emarginella* e posterior quantificação por cromatografia gasosa teve início com a obtenção das curvas analíticas do limoneno, decanal e do padrão interno 1-bromooctano. As concentrações selecionadas na construção destas curvas consideraram o isolamento dos analitos empregando quantidades diminutas de material vegetal (até 5 g) e também o rendimento de óleo e as concentrações de limoneno e decanal presentes no material submetido à hidrodestilação.

Na construção das curvas analíticas 6 (seis) pontos foram empregados para cada analito, sendo cada ponto a média de 3 (três) leituras no cromatógrafo a gás, totalizando 18 injeções de 1 µL por curva. Os gráficos obtidos forneceram para os 3 analitos coeficientes de linearidade (R) 0,998. O número de concentrações utilizadas e a linearidade observada em todas as 3 (três) curvas atendem às exigências de validação de métodos cromatográficos. (RIBANI et al., 2004)

Os experimentos foram conduzidos objetivando estabelecer as condições ideais de SPE, ou seja, pré-concentração e eluição. Para tanto, padrões de limoneno, decanal e 1-bromooctano foram submetidos à SPE, determinando-se posteriormente por cromatografia gasosa o nível de recuperação. O 1-bromooctano foi selecionado como padrão interno por apresentar solubilidade semelhante aos analitos em questão e índice de retenção intermediário.

A escolha do adsorvente silane C18 deveu-se ao uso difundido deste material em estudos relacionados a metabólitos secundários e exemplificados na parte introdutório deste trabalho.

O condicionamento do cartucho e a introdução da mistura contendo os 3 (três) compostos em concentração conhecida, seguiu procedimento comumente adotado para esta técnica. Para a eluição investigou-se 3 (três) misturas, estando os resultados reunidos na **Tabela 2**. Em todas as condições de eluição, após o uso de diclorometano, fez-se a eluição final com uma mistura de diclorometano e hexanos, variando-se a relação dos solventes. O melhor resultado foi alcançado quando empregada a mistura hexanos:diclorometano 4:1, obtendo-se os seguintes níveis aproximados de recuperação: decanal (85%), limoneno (98%) e 1-bromooctano (101%). Os intervalos aceitáveis de recuperação para a análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120% (RIBANI et al., 2004).

**Tabela 2** – Porcentagem de recuperação dos analitos após SPE utilizando diferentes eluentes.

Eluente	% Recuperação		
	DECANAL	LIMONENO	1-BROMOOCCTANO
A	66,58%	93,71%	105,61%
B	81,34%	95,19%	103,07%
C	84,76%	97,65%	100,843%

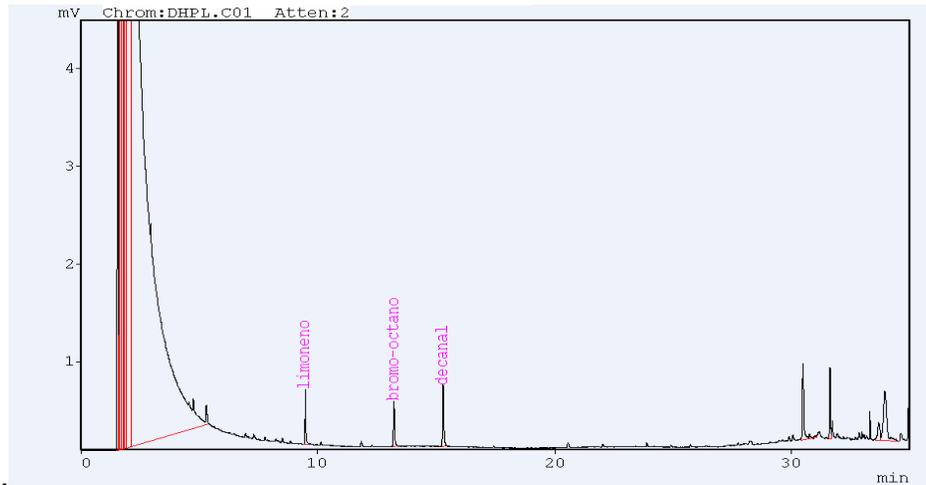
A– 2 mL diclorometano puro e 3 mL hexanos:diclorometano (2:1); B – 2mL diclorometano puro e 3 mL hexanos:diclorometano (3:1); C – 2mL diclorometano puro e 3 mL hexanos: diclorometano (4:1)  
 Fonte: Dados da Pesquisa

Para a extração dos constituintes do óleo essencial das folhas frescas de *Peperomia emarginella* empregou-se metanol a temperatura ambiente em 3 (três) extrações sucessivas durante um período de 3 horas. A escolha do metanol deveu-se à sua versatilidade como solvente, apresentando miscibilidade com água e com compostos apolares. Tal propriedade permite a sua difusão através do tecido vegetal rico em água e também a solubilização de metabólitos secundários de natureza lipofílica tais como os hidrocarbonetos terpênicos e aldeídos de cadeia longa. Adicionalmente, considerando o fato de que a SPE é uma cromatografia em fase reversa, o metanol apresenta-se como um solvente ideal.

A extração com metanol foi realizada empregando-se 2,0 g de folhas frescas. Após adição de água ao extrato metanólico, este foi introduzido no cartucho condicionado contendo 500 mg de adsorvente. A eluição com o eluente C (**Tabela 2**) e posterior análise por CG conduziu ao isolamento de 0,38 mg de decanal e 0,20 mg de limoneno, valores já corrigidos para o nível de recuperação observado para os analitos.

Levando ainda em consideração o rendimento de produção de óleo essencial desta espécie (0,10% para folhas) e o percentual dos analitos no óleo, teremos aproximadamente um total de 1,36 mg de decanal e limoneno no material vegetal submetido à extração metanólica. Sendo assim, o rendimento de limoneno e decanal extraídos por solvente, e posterior SPE, foi 2,3 vezes inferior ao obtido por hidrodestilação. A recuperação do 1-bromo-octano ficou em 96,98% indicando a eficiência da SPE, sem que se possa comprovar a eficiência da extração.

O cromatograma (**Figura 22**) indica que o processo de extração e/ou purificação foi seletivo, pois somente os analitos limoneno e decanal foram detectados por cromatografia gasosa.



**FIGURA 22** – Cromatograma do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* extraído com metanol à temperatura ambiente e posteriormente pré-concentrado, purificado e eluído em cartucho contendo silano C18

## 6. CONCLUSÃO

A espécie epífita *Peperomia emarginella* (Sw.) C. DC. produtora de óleo essencial com destacado odor cítrico foi objeto de estudo neste trabalho.

Os rendimentos de extração do óleo essencial por hidrodestilação das folhas, caule e material vegetal total fresco foi de 0,10-0,12%.

A análise por infravermelho em discos de cloreto de potássio produziu um espectro com as bandas de absorção características que podem ser atribuídas ao decanal e limoneno. Esta técnica espectroscópica, pela sua simplicidade de execução e riqueza de sinais, poderá ser empregada como ferramenta de pré-análise do óleo essencial desta espécie objetivando determinar a presença de limoneno e decanal. Esta técnica permitiu também estabelecer a grande semelhança existente entre a composição química do óleo proveniente das folhas e do caule, indicando não ser necessário separá-los previamente à hidrodestilação.

A cromatografia gasosa, empregando coluna quiral contendo o adsorvente  $\beta$ -ciclodextrina, e os padrões comerciais (+)- e (-)-limoneno, permitiram identificar como constituinte do óleo essencial de *P. emarginella*, o enantiômero (-)-limoneno

Objetivando estabelecer uma técnica de extração e de análise para os constituintes majoritários limoneno e decanal empregando massa vegetal reduzida, investigou-se a extração dos analitos com metanol, sua pré-concentração, purificação e eluição mediante SPE, e posterior análise quantitativa por CG. A técnica apresentou seletividade aos analitos majoritários, linearidade e elevado percentual de recuperação. Entretanto, o rendimento dos analitos por esta técnica foi distinto daquele obtido por hidrodestilação.

Utilizando 2,0 de folhas frescas foi possível isolar 0,38 mg de decanal e 0,20 mg de limoneno, recuperando-se 96,98% do padrão interno 1-bromooctano.

## 6.1 PERSPECTIVAS

1. Confirmar a eficiência da extração dos analitos empregando metanol;
2. Aplicar o procedimento desenvolvido a material vegetal de *Peperomia emarginella* proveniente de diferentes forófitos;
3. Determinar a toxicidade do óleo essencial de *P. emarginella*;
4. Desenvolver produtos comerciais, alimentícios e cosméticos, utilizando o referido óleo essencial;
5. Investigar outras propriedades biológicas associadas ao óleo essencial (anti-bacteriana, antifúngica, antiinflamatória, etc...);
6. Investigar métodos para a propagação da espécie *P. emarginella*, preferencialmente associada a outras culturas agrícolas de interesse comercial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. M.; BRIGHENTE, I. M.C.; AGUIAR, E. M.; REBELO, R. A. **Volatile constituents of Piperaceae from Santa Catarina, Brazil – essential oil composition of *Piper cernuum* Vell. and *Peperomia emarginella* (Sw.) C. DC.** Journal of Essential Oil Research, v. 17, n. 3, p. 286-288, 2005.

ABREU, A. M.; SEVEGNANI, L.; ZIMERMANN, D.; MACHICADO, A. R.; REBELO, R. A. ***Piper mikanianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brazil – a new source of safrole.** Journal of Essential Oil Research, v. 14, n. 5, p. 361-363, 2002.

ADAMCZYK, S.; LÁZARO, R.; PÉREZ-A., C.; CONCHELLO, P.; HERRERA, A. **Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-Varroa treatments,** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 10085-10090, 2005.

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

AGUIAR, E. M. Isolamento e caracterização de óleos essenciais de piperáceas no Vale do Itajaí, Santa Catarina – Santa Catarina, 2002. **Dissertação de mestrado.** Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina.

ARAÚJO, J. M. **Química de alimentos, teoria e prática: óleos essenciais.** 2<sup>a</sup> ed., UFV, 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** Porto Alegre: ARTMED Editora, 2001.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica e de farmacognosia.** Zaragoza: Editorial Acribia S., 1991. 594 p.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie – phytochimie: plantes médicinales**. 2 ed. Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, 1993.

CALDERARI, M. T. Estudo dos óleos essenciais de Piperaceae do Vale do Itajaí em Santa Catarina – Santa Catarina, 2002. **Dissertação de mestrado**. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina.

CHAAR, J. S. Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans. 2000. **Tese de Doutorado**. São Paulo. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo.

CECHINEL-F., V.; LEAL, L. F.; MIGUEL, O. G.; SILVA, R. Z.; YUNES, R. A.; SANTOS, A. S. **Chemical composition of *Piper mikanianum* essential oil**. Journal of Essential Oil Research, v. 17, n. 3, p. 316-317, 2005.

CHAVES DAS NEVES, H. J. **Introdução à prática da cromatografia gás-líquido**. 1<sup>a</sup> Edição em Português, Universidade Nova de Lisboa, 1980.

CHAVES, J. L. **Pimenta longa reativa o safrol**. Química e Derivados, p. 40-41, 1994.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.

CIMANGA, K.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; MIERT, S. V.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; KAMBU, K.; TONA, L. **Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo**. Journal of Essential Oil Research, v. 14, n. 5, p. 382-387, 2002.

CLEVINGER, J. F. **Apparatus for the determination of volatile oil**. Journal of the American Pharmacists Association (Washington), v. 17, p. 315, 1928.

COLLINS, H. C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Ed. da Unicamp, 1997.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. **Óleos essenciais e química fina**, Química Nova, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; CARVALHO, J. L. S.; MONTRUCCHIO, D. P.; FERREIRA, J. L.; OLIVEIRA, J. S. **Extração de esteróides em frutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, com gás liquefeito**. Química Nova, v. 26, n. 6, p. 803-806, 2003.

DELLACASA, A. D.; BAILAC, P. N.; PONZI, M. I.; RUFFINENGO, S. R.; EGUARAS, M. J. **In vitro activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis***. Journal of Essential Oil Research, v. 15, n. 4, p. 282-285, 2003.

DIAS, B. F. S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 1996, p.10.

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções: análise quantitativa**. 4ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

GOTLIEB, O. R, MAGALHÃES, M. T. **Modified distillation trap**. Chemist Analyst, v. 49, p. 114, 1960.

GUIMARÃES, E. F. **Piperáceas**. Flora Ilustrada Catarinense. p. 67-71. Itajaí-Santa Catarina, 2001.

GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L.; FALCÃO, C. G. C. **Piperáceas**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ, 1978.

HOSTETTMANN, K. **Princípios ativos de plantas superiores** – São Carlos: EdUFScar, 2003. 152 p. (Série de textos da Escola de Verão em Química, vol. IV).

IBARZ, M. J.; FERREIRA, V.; ORTE, P. H.-; LOSCOS, N.; CACHO, J. **Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes.** Journal of Chromatography A, n. 1116, p. 217-229, 2006.

JOLY, A. B. **Botânica-introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Companhia Editora Nacional, Brasil, 1977.

KINDERSLEY, D. **Eyewitness visual dictionaries. The visual dictionary of plants.** London, UK, 1992

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE) em: métodos cromatográficos de análise.** 4 ed. São Carlos: RiMa, 2004. 93p.

LAWRENCE, B. M. **The antimicrobial/biological activity of essential oils.** Carol Stream: Allured, 2005. 504p.

LUTTGE, U. **Vascular plants as epiphytes.** New York: Spring Verlag, 1989.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo: Nova Odessa, 2002. 377p.

MAGALHÃES, M. T. **I Simpósio de óleos essenciais – Campinas, SP: Fundação Cargill, 1986.**

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. **Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol.** Química Nova, v. 3, n. 10, 1987.

MALELE, R. S.; MUTAYABARWA, C. K.; MWANGI, J. W.; THOITHI, G. N.; LOPEZ, A. G.; LUCINI, E. I.; ZYGADLO, J. A. **Essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. from Tanzania: composition and antifungal activity.** Journal of Essential Oil Research, v. 15, n. 6, 438-440, 2003.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**, São Paulo: Robe Editorial, 1999, p. 11-15.

MOREIRA, D. L.; SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C.; GUIMARÃES, E. F. **Essential oil analysis of four Peperomia species (Piperaceae)**. Acta Horticulturae, v. 500, n. 1, p. 65-70, 1999.

NETO, L. G.-; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Química Nova, v. 30, n. 2, 374-381, 2007.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASSAD, A. K. WENGEL, J.; OLSEN, C.; BOLL, P. M. **Phytochemistry of genus Piper**. Phytochemistry, v. 46, p. 597-673, 1997.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; GUPTA, S.; TALWAR, S.; RAJWANSHI, V. K.; KUMAR, R.; AZIM, A.; MALHOTRA, S.; KUMAR, N.; JAIN, R.; SHARMA, N. K.; TYAGI, O. D.; LAWRIE, S. J.; ERRINGTON, W.; HOWARTH, O. W.; OLSEN, C. E.; SINGH, S. K.; WENGEL, J. **Polyphenols and alkaloids from Piper species**. Phytochemistry, v. 49, p. 1069-1078, 1998.

PETERSON, C.; ZHU, J.; COATS, J. R. **Identification of components of Osage orange fruit (*Maclura pomifera*) and their repellency to German cockroaches**. Journal of Essential Oil Research, v. 14, n. 3, p. 233-236, 2002.

PINTO, A. J. D'A. **I Simpósio de Óleos Essenciais**. Campinas: Fundação Cargill, 1993.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OPREA, E. **Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis***. Journal of Chromatography A, n. 1027, p. 121-126, 2004.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense. Piperáceas: *Ottonia*, *Sarcorhachis*,**

**Potomorphe**, 1978.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-L., C. A.; BRITO, R. M. S.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W. **Extração por fase sólida e identificação por HPLC de catequinas presentes nas cascas de *Hancornia speciosa* Apocynaceae**. 27a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química-QA220.

RORIG, L. R.; POSER, G. L. V. **Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 1, n. 72, p. 15-17, 1991.

RUFFINENGO, S. R.; EGUARAS, M. J.; CORA, D.; RODRIGUEZ, E.; BEDASCARRASBURE, E.; BAILAC, P. N.; PONZI, M. I. **Biological activity of *Heterotheca latifolia* essential oil against *Varroa jacobsoni***. Journal of Essential Oil Research, v. 14, n. 6, p. 462-464, 2002.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. **Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the brazilian atlantic forest**. Phytochemistry., v. 58, p. 547-551, 2001.

SILVA, A. C. M.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. **Essential oil composition of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud**. Journal of Essential Oil Research, v. 18, n. 3, p. 269-271, 2006.

SILVA, A. J. **Essentia herba: plantas bioativas**. Florianópolis: Epagri, 2003. 21p.

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

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, UFRS/UFSC, 1999. p. 328-405.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

STOJANOVIC, G.; PALIC, R.; NASKOVIC, T.; RANELOVIC, N. **Composition and antibacterial activity of *Achillea crithmifolia* and *Achillea nobilis* essential oils**. Journal of Essential Oil Research, v. 15, n. 6, p. 434-437, 2003.

USDA - United States Department of Agriculture do Serviço de Recursos de Conservação Natural. Disponível em <[http://www.itis.usda.gov/servlet/singleRpt/SingleRpt?search\\_topic=+SN&search\\_value=18226](http://www.itis.usda.gov/servlet/singleRpt/SingleRpt?search_topic=+SN&search_value=18226)>. Acesso em março de 2006.

VELOZO, L. S. M.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. **Unusual chromenes from *Peperomia blanda***. Phytochemistry, v. 67, p. 492-496, 2006.

VICAL, F. B.; VALENTIN, A.; MALLIÉ, M.; BESSIERE, J.-M. **Antiplasmodial activity of *Cochlospermum planchonii* and *C. tinctorium* tubercle essential oils**. Journal of Essential Oil Research, v. 13, n. 1, p. 65-67, 2001.

WISNIEWSKI, A. Jr.; TORRES, E.; SIMIONATTO, E. L. **Composição do óleo essencial de *Capsicodendron dinisii* Schwancke (Canellaceae)**. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, 2007, PN-174.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil, **Hoehnea**, v.2, p.19-366, 1972.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil, **Hoehnea**, v.3, p.29-284, 1973.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil, **Hoehnea**, v.4, p.71-413, 1974.

ZAMBONI, S. **Óleos essenciais**. Revista Brasileira de Química. XCV, v. 11, n. 575, p. 106-110, 1983.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; LOBATO, R. C. L.; TAVARES, A. C. C.; SOUZA, A. P. S.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; GUIMARÃES, E. F. ***Peperomia circinnata* Link and *Peperomia rotundifolia* (L.) Kunth growing on different host-trees in Amazon: volatiles and relationship with bryophytes**. Biochemical Systematics and Ecology, v. 33, p. 269-274, 2005.

## ANEXO

Dados da curva analítica para o limoneno empregando cromatografia gasosa.

Concentração mg/mL	Área	Média da área
0,0413	1945	1972
	1986	
	1985	
0,0824	4146	4133
	4159	
	4095	
0,1028	4620	4699
	4787	
	4691	
0,1551	7568	7411
	7336	
	7329	
0,2063	9635	9428
	9128	
	9521	

Dados da curva analítica para o decanal empregando cromatografia gasosa.

Concentração mg/mL	Área	Média da área
0,0458	1395	1405
	1389	
	1431	
0,0829	2971	2968
	3000	
	2933	
0,1034	3264	3348
	3430	
	3351	
0,1560	5381	5254
	5204	
	5179	
0,2075	6886	6723
	6508	
	6776	

Dados da curva analítica para o 1-bromo-octano (padrão interno) empregando cromatografia gasosa.

Concentração mg/mL	Área	Média da área
0,0421	1120	1118
	1108	
	1126	
0,0840	2354	2354
	2371	
	2339	
0,1048	2618	2665
	2735	
	2643	
0,1581	4279	4199
	4181	
	4139	
0,2104	5462	5323
	5171	
	5337	

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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