

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIEL RODRIGUES SILVA

PIPER OVATUM VAHL: ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, **FITOQUÍMICO** E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTILEISHMANIA.

Maringá
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DANIEL RODRIGUES SILVA

PIPER OVATUM VAHL: ESTUDO FARMACOGNÓSTICO, **FITOQUÍMICO** E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTILEISHMANIA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual
de Maringá como requisito parcial para a obtenção do
título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez

Maringá
2009

Dedico este trabalho

Aos meus pais DELMIRA EVA e ANTONIO RODRIGUES pelo apoio na realização
deste trabalho.

“O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em suas maravilhas; e dela se serve para acalmar as dores e curá-las; o farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à saúde, e seu trabalho não terminará, até que a paz divina se estenda sobre a face da terra”
Eclesiásticos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo professor Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez, meus sinceros agradecimentos, pela valiosa orientação demonstrada ao longo deste trabalho, pelo, incentivo e apoio que fez presente em todas as fases do mesmo.

Às minhas irmãs Dayane Rodrigues e Adriana Rodrigues, ao meu cunhado Jesus Gonçalves e aos meus sobrinhos Kelvin e Karen pela amizade, companheirismo e incentivo constante a mim dispensado.

Aos meus tios paternos Gerolino Rodrigues, Eurika Rodrigues, Valdomiro Rodrigues, Maria dos Anjos Rodrigues Belanisia Rodrigues e Durval Rodrigues, pela amizade dispensada. Em especial, Ildebrando Gomes e Santa Rodrigues pelo constante incentivo e colaboração, além de tudo isso acompanharam meus estudos desde o jardim de infância.

Menção especial a minha esposa Wanessa Soares Luiz Silva que tanto contribuiu comigo nas horas difíceis.

Aos tios maternos Rubens, Marli, Sueli, Marizete e aos meus avós Artur Ribeiro e Oddylia Ribeiro.pela torcida constante ao meu favor.

Aos primos Melquisedequis, Enos, Tiago, Gildásio, Dilneide, Izarlete, Saulo, Páscoa, pelo companheirismo constante.

À Suzana Gomes e Luiz Antonio Ribeiro pelo apoio, amizade e carinho que sempre fez presente tanto nos dias de lutas quanto de conquistas. E principalmente porque os mesmo estenderam-me as mãos nas horas mais difíceis.

Aos professores Dr. Roberto Barbosa Bazzote, Dra. Terezinha Svindzinski e Dra. Márcia Regina Batista, meus sinceros agradecimentos, pela colaboração nos estudos da atividade antibacteriana, antifúngica.

Meus sinceros agradecimentos a Eliana Harue, pela contribuição neste trabalho.

A Dra. Adriana Lenita pela colaboração na identificação da espécie vegetal *Piper ovatum* vahl.

Ao professor Lúcio Cardoso meu muito obrigado, pela colaboração nos trabalhos.

Ao professor Makoto Yamashita obrigado pela identificação dos ácidos graxos.

Aos técnicos Admir, Marinete e em especial ao Cláudio Novello e Jailson pela constante colaboração com meu aprendizado ao longo do meu trabalho.

Aos colegas da pós-graduação Vanessa, Eliana, Mariele, Rodrigo e Mislaine pela amizade e companheirismo dispensada ao longo da nossa convivência.

As secretárias do Departamento de Farmácia e Farmacologia, Helena e Érika pela colaboração.

Aos grandes amigos Welliton Dias e Andréa Dias, pelo incentivo e amizade nas horas difíceis.

Obrigado DEUS por todas as coisas boas que o senhor tem feito na minha vida.

Agradeço a CAPES, CNPQ, UEM, e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Agradeço a Solabia do Brasil pela bolsa de doutorado concedida.

E a todos, que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

A espécie *P. ovatum* Vahl conhecida popularmente como João-burandi é usada na medicina popular em no tratamento de dores de dente e bursite. O objetivo deste trabalho é realizar um estudo fitoquímico, determinar a composição do óleo essencial, obter substâncias através da extração com fluido supercrítico, realizar estudo farmacognóstico, contribuir no controle de qualidade e avaliar a atividade antimicrobiana das amidas presentes na mesma. Por RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC) e por comparação com dados da literatura, foram identificadas as amidas piperovatina e piperlonguminina. Na avaliação das atividades antimicrobiana, a piperovatina e piperlonguminina apresentaram boa atividade, com CIM de 15,6 e de 31,2 $\mu\text{g/ml}$ contra *B. subtilis*, e de 3,9 $\mu\text{g/ml}$ (para ambas) contra *C. tropicalis*. A piperlonguminina foi mais ativa que a piperovatina contra cepas de *C. tropicalis* isoladas da urina, com CIM de 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Na avaliação da atividade antileishmania, a piperlonguminina foi mais efetiva contra a forma promastigota e apresentou baixa citotoxicidade. No óleo essencial foram separados 44 **substância** químicas, dos quais 41 foram identificados. As substâncias químicas em maior quantidade são δ -Amorfene (16.5 %), *cis*-Muurolo-4(14),5-dieno (14.29 %) e γ -Muurolene (13.26%). O óleo essencial da *P. ovatum*, foi ativo contra *C. tropicalis* ATCC 28707, o halo foi de $22,6 \pm 3,1$ mm e contra as cepas isoladas da urina, o melhor resultado foi de $18,7 \pm 2,1$ mm. na extração por fluido supercrítico por CO_2 , foi isolado uma mistura de ácidos graxos poliinsaturado. Na morfodiagnose e validação do método de análise de amidas por CLAE, contribuiu com o controle de qualidade da espécie *P. ovatum*.

Palavras chave: *Leishmania amazonensis*, Piperaceae, *Piper ovatum* Vahl, piperovatina, piperlonguminina, citotoxicidade, validação morfodiagnose e CLAE.

ABSTRACT

Piper ovatum Vahl species, popularly known in Brazil as *João-burandi*, has been used in popular medicine for toothache and Bursitis treatment. The purpose of this investigation is to make a phytochemical study, analyze the essential oil composition, obtain compounds by using supercritical fluid for its extraction, carry out pharmacognostic studies, contribute to the quality control process, and evaluate the antimicrobial activity of amides present in the plant specie. By using NMR (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC) and by comparison with literature data, amides were identified as piperovatine and piperlonguminine. Piperovatine and piperlonguminine presented good activity in the evaluation related to antimicrobial activities, with MIC of 15.6 and 31.2 $\mu\text{g/ml}$ against *B. subtilis*; and of 3.9 $\mu\text{g/ml}$ (for both) against *C. tropicalis*. However, piperlonguminine showed to be more active than piperovatine against *C. tropicalis* strain isolated from urine, with MIC of 31.25 $\mu\text{g/ml}$. In the evaluation related to antileishmanial activity, piperlonguminine showed to be more effective against the promastigote form, besides presenting low cytotoxicity. Forty four (44) chemical compounds were separated in the essential oil, and 41 of them were identified. The most significant chemical compounds, due to the big amount found, are δ -Amorphene (16.5%), cis-Muurolo-4 (14), 5-diene (14.29%) and γ - Muuroloene (13.26%). *Piper ovatum* essential oil showed to be active against *C. tropicalis* ATCC 28707, the inhibition was of 22.6 ± 3.1 mm. Against isolated urine strain, the optimum result found was of 18.7 ± 2.1 mm in the extraction using dust CO_2 supercritical fluid; moreover, a greasy mixture of acid polyunsaturated was isolated. Morphodiagnosis and the validation of the method of analysis of amides using HPLC contributed to the quality control of *P. ovatum* species.

Key-words: *L. amazonensis*; *Piper ovatum*; Amides; Cytotoxicity; Validation; Morphodiagnose; Supercritical fluid; Essential oil; Antimicrobial; HPLC.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - *Piper ovatum*, em detalhe infrutescência, folhas e caules32
- FIGURA 2**- Esquema da extração com fluido supercrítico (A – reservatório de CO₂ ; B, C – banhos termostáticos; D – coluna extratora; E – frasco coletor; F – bomba de pressão; G - absolute transdutor de pressão; H – aquecedor elétrico).....45
- FIGURA 3**- *Piper ovatum*. 1-2- Secções transversais da raiz 1- Aspecto geral da raiz em estrutura secundária (barra - 100µm) ; 2- Detalhe da periderme em formação, esclerênquima e endoderme (barra - 100 µm). 3-4- Secções transversais do caule. 3-Caule em início de crescimento secundário, detalhe a bainha perimedular (barra - 100 µm) 4- Detalhe feixe medular. (barra - 100 µm) 5- Pecíolo em secção transversal, em detalhe as esclereides (barra - 100 µm). 6- Secção transversal do limbo, em detalhe a hipoderme e idioblastos oleíferos (barra – 50 µm) (bp – bainha perimedular; cl – colenquima; cf – câmbio fascicular; su – súber; en – endoderme; ep – epiderme; ec – esclerênquima; es – esclereíde; fm – feixe medular; hp – hipoderme; io – idioblasto oleífero).....77
- FIGURA 4**- *Piper ovatum*. 7-8: Secções paradérmicas da folha. 7: Detalhe do complexo estomático na epiderme abaxial (barra - 50µm), 8: Detalhe da epiderme adaxial (barra - 50µm) 9-11 Vista frontal das epidermes em MEV. 9: Aspecto geral da epiderme abaxial. 10: Aspecto geral epiderme adaxial; 11: detalhe da epiderme abaxial evidenciando tricoma glandular. 12: detalhe do estômato. 13-15: Microscopia do pó. 13: Detalhe das esclereides do pecíolo (Barra - 50 µm); 14: Fragmentos do mesofilo, evidenciando hipoderme (Barra-100 µm); 15: Fragmentos das fibras esclerenquimáticas do caule (Barra - 100 µm). (tg – tricoma glandular; et – estômato).....78

FIGURA 5- Espectro de RMN de ^1H da Piperlonguminina 300 MHz; CDCl ₃	82
FIGURA 6- Espectro de ^1H X ^1H -COSY da substância A e B (piperovatina e piperlonguminina). (300 MHz; CDCl ₃).....	83
FIGURA 7- Espectro de RMN de DEPT 90 ⁰ e 135 ⁰ da Piperlonguminina 75,5 MHz; CDCl ₃	86
FIGURA 8- Espectro de RMN de ^{13}C da Piperlonguminina 75,5 MHz; CDCl ₃	87
FIGURA 9- Espectro de ^1H X ^{13}C -HMBC da Piperlonguminina. 75,5 MHz; CDCl ₃	90
FIGURA 10- Espectro de ^1H X ^{13}C -HSQC da substância piperlonguminina. 75,5 MHz; CDCl ₃	91
FIGURA 11- Cromatograma do óleo essencial da <i>Piper ovatum</i> Vahl, obtido pelo CG.....	97
FIGURA 12- Espectro de RMN da fração hexano, ^1H 300 MHz; CDCl ₃ , extraída por fluido supercrítico.....	98
FIGURA 13- Espectro de RMN da fração diclorometano, ^1H 300 MHz; CDCl ₃ , extraída por fluido supercrítico.....	99
FIGURA 14- Espectro de RMN da fração acetato de etila, ^1H 300 MHz; CDCl ₃ , extraída por fluido supercrítico.....	100
FIGURA 15- Espectro de RMN da fração metanol, ^1H 300 MHz; CDCl ₃ , extraída por fluido supercrítico.....	101

- FIGURA 16-** Inibição do crescimento *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *C. tropicalis* ATCC 28707, de acordo com a densidade optica 530 nm e 495 nm, respectivamente. M (piperovatina e piperlonguminina), 1 (piperovatina) e 2 (piperlonguminina).....104
- FIGURA 17-** Ensaio de inibição da aderência. **A e C** *C. tropicalis* tratado com 10 µg/ml de piperovatina e piperlonguminina, respectivamente **B e D**.....106
- FIGURA 18-** Microscopia eletrônica de varredura. A, B e C) *Candida tropicalis* sem tratamento (células controle). D) *C. tropicalis* tratadas com 3,9 µg/ml de piperovatina. (E e F) *C. tropicalis* tratadas com a mistura de piperovatina e piperlonguminina.....107
- FIGURA 19-** Análise da piperovatina no ultravioleta, no comprimento de onda de 200 a 400 nm.....111
- FIGURA 20-** Análise da piperlonguminina no ultravioleta, no comprimento de onda de 200 a 400 nm.....111
- FIGURA 21-** Cromatograma do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- acetoneitrila/água (50-50, v/v) isocrático; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.....113
- FIGURA 22-** Cromatograma do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- acetoneitrila/água (45-55, v/v) isocrático; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 254 nm.....113
- FIGURA 23-** Cromatograma do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- acetoneitrila/água (45-55, v/v) isocrático; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 270 nm.....114

- FIGURA 24-** Cromatograma do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 35 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.....114
- FIGURA 25-** Cromatograma do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 40 em gradiente por 35 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 320 nm.....115
- FIGURA 26-** Cromatograma do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 5 minutos; em seguida isocrático ate 15 minutos fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.....115
- FIGURA 27-** Cromatograma da piperlonguminina das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 30 minutos e 60-40 isocrático por 10 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.....116
- FIGURA 28-** Cromatograma dos extratos das diferentes partes da *P. ovatum* A(caules), B (folhas) e C (raiz), onde o pico 1 (piperovatina) e 2 (piperlonguminina), obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água com 2% de ácido acético, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 30 minutos e 60-40 isocrático por 10 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.....117
- FIGURA 29-** Curva analítica para a piperlonguminina no intervalo de 31,25 – 500,00 µg/mL.....119

LISTA DE TABELA

- TABELA 1-** Padrões de ácidos graxos utilizados na análise dos ácidos graxos da *P. ovatum*.....47
- TABELA 2-** Sistemas eluentes para coluna de pré-fracionamento a vácuo do extrato bruto hidroalcoólico 90% v/v e suas respectivas frações obtidas.....60
- TABELA 3-** Sistemas eluentes para CC da fração acetato de etila e suas frações obtidas.....62
- TABELA 4-** Dados de RMN ^1H (300 MHz), em CDCl_3 e acoplamentos observadas no $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY da piperlonguminina comparada com os valores de H da piperlonguminina (300MHz) da literatura, em CDCl_3 descrito. Deslocamento químico em PPM e constante de acoplamento em Hz.....81
- TABELA 5-** Dados de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT (75,5MHz) em CDCl_3 , da piperlonguminina comparados com os valores de C para da piperlonguminina da literatura (75,5 MHz), em CDCl_3 , deslocamentos químicos em PPM (C).....85
- TABELA 6-** Dados de RMN ^1H (300 MHz), em CDCl_3 e correlações observadas no $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC- $^1\text{J}_{\text{CH}}$ e $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ da piperlonguminina comparada com os valores da piperlonguminina (300MHz) da literatura, em CDCl_3 , Deslocamento químico em PPM e constante de acoplamento (J, entre parênteses) em Hz.....89
- TABELA 7-** Componentes do óleo essencial das folhas da *P. ovatum* Vahl.....95

TABELA 8: Tabela de ácidos graxos da <i>Piper ovatum</i> Vahl, extraído por fluido supercrítico, identificado por CG-DIC.....	96
TABELA 9- Concentração inibitória mínima dos extratos hidroalcoólico e aminas isoladas da <i>Piper ovatum</i> Vahl dados apresentados em (µg/ml).....	103
TABELA 10- Atividade antifúngica do óleo essencial da <i>Piper ovatum</i> Vahl. Resultados do halo em mm de diâmetro.	104
TABELA 11- Efeito do extrato hidroalcoólico; piperlonguminina (2) no crescimento de <i>L. amazonensis</i> na forma promastigota (PRO), forma células amastigota (AMA), citotoxicidade em células Vero (VERO) e Macrófagos (MF).	110
TABELA 12- Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.....	118
TABELA 13- Parâmetros de linearidade obtidos da curva piperovatina.....	120
TABELA 14- Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação de piperlonguminina por CLAE.....	121
TABELA 15 - Exatidão do método de quantificação de piperlonguminina por CLAE.	122
TABELA 16 - Concentração de aminas nos extratos da folha, caule e raiz de <i>P. ovatum</i>	123

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1- Curva de extração em fluido supercrítico das folhas de *Piper ovatum* em diferentes condições de temperatura e pressão.....101

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH	Agar Miller-Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDS	Dextrose Caldo Sabouraud
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a espectrômetro de massas
CLM	Concentração Letal Mínima
COSY	Correlação espectroscópica
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DE	Dose Efetiva
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL ₅₀	Dose Letal de 50%
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
ESI/MS	Espectrometria de massas com ionização por Electrospray
HSQC	Heteronuclear Spectroscopy Quantum Coherence
eV	Elétrons Volts
F	Fração
FM	Fase Móvel

Hz	Hertz
IS	Índice de Seletividade
J	Constante de Acoplamento em Hz
LTA	Leishmania Tegumentar Americana
RF	Extrato Residual das Folhas solúvel em diclorometano
M ⁺	Íon Molecular
MHz	Megahertz
m/z	razão massa carga
p.a	para análise
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
λ	Comprimento de onda.
δ	Deslocamento químico, em ppm.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO	
	BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	<i>FAMÍLIA PIPERACEAE</i>	22
2.2	<i>PIPER OVATUM VAHL</i>	30
2.3	<i>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS</i>	32
3		
	OBJETIVOS	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	
	37
4.1	COLETA DA PLANTA.....	37
4.2	ESTUDO BOTÂNICO.....	37
4.2.1	Descrição	
	Macroscópica	37
4.2.2	Descrição	
	Microscópica	37
4.2.3	Pó das Folhas	
	38
4.2.4	Testes	
	Histoquímicos	38

4.3	SECAGEM	DA
	PLANTA.....	39
4.4	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	
	BRUTOS.....	39
4.5	DADOS	
	ESPECTROMÉTRICOS.....	40
4.6	TÉCNICAS	
	CROMATOGRÁFICAS.....	40
4.6.1	Cromatografia em coluna (CC) de adsorção a vácuo.....	40
4.6.2	Cromatografia em coluna de adsorção.....	41
4.6.3	Cromatografia em camada delgada.....	42
4.6.4	Cromatografia por exclusão SEPHADEX LH-20.....	42
4.7	ANÁLISE DO ÓLEO	
	ESSENCIAL.....	43
4.7.1	Extração do óleo essencial por arraste a vapor.....	43
4.7.2	Análise do óleo essencial por CG-EM.....	43
4.7.3	Determinação dos Índices de Kovats.....	44

4.8	EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO EM	
	CO ₂	44
4.9	ANÁLISE DOS ÓLEOS FIXOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO COM FLUIDO	
	SUPERCRÍTICO.....	4
		5
4.9.1	Determinação estrutural dos óleos fixos extraídos com fluidos	
	supercrítico	em
	CO ₂	45
4.9.2	Análise dos óleos fixos por CG-	
	FID	46
4.9.3	Padrões de ácidos	
	graxos	46
	4.10 ATIVIDADE	
	BIOLÓGICA.....	53
	4.10.1 Preparo do inoculo de	
	leveduras	53
4.10.2	Determinação da CIM para leveduras e bactérias	53
4.10.3	<i>Atividade antimicrobiana para leveduras de isolados clínicos</i>	54
4.10.4	Ensaio antifúngico de difusão em	
	discos	54
4.10.5	Manutenção do	
	parasita	55
4.10.6	Cultura de macrófagos	
	J774G8	56

4.10.7	Estudo da atividade da piperlonguminina no crescimento de <i>L. amazonensis</i> na forma promastigota.....	56
4.10.8	Estudo da atividade da piperlonguminina no crescimento de <i>L. amazonensis</i> na forma amastigota.....	57
4.10.9	Ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774G8.....	57
4.10.10	Ensaio de citotoxicidade em células Vero.....	58
4.11	PRÉ-FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO PARA TESTES MICROBIOLÓGICOS.....	5
	9	
4.11.1	Fracionamento da fração diclorometano-acetato de etila.....	61
4.12	VALIDAÇÃO.....	63
4.12.1	Reagentes e padrões empregados.....	63
4.12.2	Instrumentação e condições cromatográficas.....	64
4.12.3	Preparo da amostra padrão.....	64
4.12.4	Preparo das amostras dos extratos.....	65
4.12.5	Conformidade do sistema.....	65
4.12.6	Validação do método analítico por CLAE.....	65

4.12.7 Linearidade.....	66
4.12.7.1 Construção da curva analítica	66
4.12.7.2 Determinação dos parâmetros de linearidade	66
4.12.8 Precisão	67
4.12.9 Limite de detecção	68
4.12.10 Limite de quantificação	68
4.12.11 Exatidão	69
4.12.12 Robustez	70
4.12.13 <i>Estabilidade das soluções durante o experimento</i>	70
4.12.14 Análise estatística	71

5 RESULTADOS E

DISCUSSÃO.....	72
5.1 ANÁLISE	
MORFODIAGNÓSTICA.....	72
5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO	
.....	79
5.2.1 Determinação da Piperlonguminina	79
5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL POR CG-EM.....	92
5.4 EXTRAÇÃO EM FLUIDO SUPERCRÍTICO COM CO ₂	96

5.5 ATIVIDADE

ANTIMICROBIANA.....102

5.5.1 **Atividade contra bacterias e fungos**

.....102

5.5.2 **Atividade****antileishmania.....108**

5.6 ANÁLISES DAS AMINAS PIPEROVATINA E PIPERLONGUMININA POR

UV.....11

0

5.7 ANÁLISE POR CLAE

.....112

5.8

VALIDAÇÃO.....11

9

5.8.1 **Linearidade.....11**

9

5.8.2 **Precisão e****repetibilidade.....120**5.8.3 **Limite de detecção e****quantificação.....121**5.8.4 **Exatidão.....12**

1

5.8.5 **Robustez.....12**

2

5.8.6 **Análise das folhas, caule e raiz de P.**

ovatum.....122

6 **CONCLUSÃO**.....12

4

7

REFERÊNCIAS.....126

3 INTRODUÇÃO

A história do homem sempre foi ligada ao ambiente que o rodeia. As primitivas civilizações notaram que existiam vegetais que quando experimentados no combate às doenças, revelou o seu potencial curativo. Toda essa informação foi transmitida às gerações posteriores, que as compilou e documentou através da escrita.

Plantas medicinais podem ser uma alternativa eficaz e de baixo custo para o controle de diversas doenças.

O Brasil apresenta um enorme potencial a ser explorado na área dos fitoterápicos devido a sua grande biodiversidade, que abrange uma enorme quantidade de espécies endêmicas. Tornam-se necessários estudos que demonstrem quais plantas possuem características medicinais, para que estas possam serem utilizadas de maneira correta.

Com a chegada do século XX, o interesse por drogas derivadas de plantas especialmente os fitoterápicos aumentou expressivamente, apesar de toda tecnologia dos medicamentos sintéticos.

Algumas técnicas foram utilizadas para verificar a seletividade de substâncias antifúngicas sobre a parede celular, como os ensaios celulares relacionados com má formação de hifas, bioensaio com *Neurospora crassa*, ensaios enzimáticos entre outros (ZACCHINO, 2001).

No entanto, métodos de controle de qualidade validados precisam ser desenvolvidos a fim de estarem em conformidade com requerimentos regulatórios caso determinada planta seja usada pela indústria farmacêutica (SOUZA, et al., 2002, apud FELIPE, 2006).

Portanto torna-se urgente, o desenvolvimento da pesquisa científica a fim de elucidar, comprovar e racionalizar o uso de plantas medicinais e seus derivados. Os valores da medicina tradicional ou popular devem, entretanto, serem resguardados, sendo esta seguramente uma das maiores fontes de informação para a descoberta de novas substâncias químicas com potencial atividade terapêutica que poderão constituir novos medicamentos (ALBIERO, 2005 apud PESSINI, 2003).

Neste sentido, é de grande importância o estudo da espécie vegetal *Piper ovatum*, já que a mesma é extremamente usada na medicina popular no nordeste mineiro. Diante disso, o trabalho descreve a identificação botânica, isolamento e identificação de substâncias químicas, realização de ensaios biológicos, controle de qualidade e validação do método analítico desenvolvido. Estes estudos constituem o primeiro passo para o registro do fitoterápico, que proporciona assim seu uso como droga vegetal.

O isolamento de substâncias purificadas tem sido utilizado as técnicas de extração em fluido supercrítico com CO₂, pois apresentam inúmeras vantagens aos métodos convencionais empregando-se solventes orgânicos a altas temperaturas.

A análise morfodiagnóstica vem contribuir no controle de qualidade de drogas vegetais principalmente na forma de pó, e existe pouca literatura para sua utilização.

O estudo proposto vem contribuir para o desenvolvimento de um futuro fitoterápico a partir desta droga vegetal.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FAMÍLIA PIPERACEAE

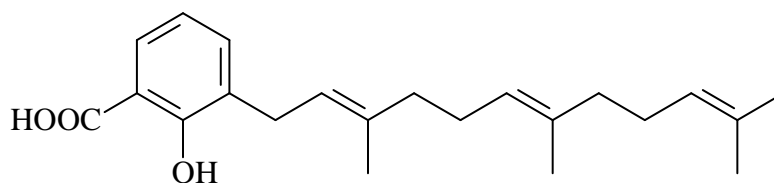
O gênero *Piper* tem cerca de 700 espécies amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, tanto no hemisfério norte quanto no sul, além disso, é usado popularmente como medicinal (PARMAR et al., 1997).

O óleo essencial de *P. crassinervium* expressou concentração mínima inibitória de 240 µg/ml para *Candida albicans*, 90µg/ml para *Rhodotorula glutinis*, 300 µg/ml para *Sacharomyces cerevisae* e 120 µg/ml para *Schizosaccharomyces pombe* (SACCHETTI et al., 2005).

A espécie *P. ottonoides* Yancker, conhecida como João-Brandim é um arbusto ereto de ocorrência na Amazônia brasileira. Suas raízes são usadas popularmente como anestésicas local no tratamento de odontalgias e amigdalite. O óleo essencial de suas folhas contém principalmente mono e sesquiterpenos. O uso popular da espécie como anestésico local, pode estar relacionado à presença, em suas folhas e raízes, de piperovatina, reconhecida por suas propriedades anestésica, piscicida e sialogógica (ativadora de glândulas salivares) (MACFERREN e RODRIGUEZ, 1998; MAKAPUGAY et al., 1983).

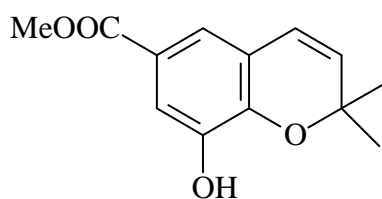
Rüegg et al., (2006), verificaram que a substância ácido 3-farnesil-2-hidroxibenzóico (1), obtida a partir das folhas de *P. multiplinervium*, apresentou CIM (Concentração Inibitória Mínima) de 37,5 µg/ml para *Helicobacter pylori*, e entre 2,5 a 5 µg/ml contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*

pneumoniae, *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*.



(1)

Santos et al., (1999), a partir da purificação do extrato diclorometano das inflorescências de *P. aduncum* L., obtiveram um derivado das chalconas, a 2'-6'-diidróxi-4'-metoxichalcona (2), ativa sobre formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Grayer (1994) realizaram uma revisão de várias substâncias derivadas de plantas com atividade antifúngica, e uma cromona, metil-8-hidróxi-2,2-dimetil-2H-cromona-6-carboxilato, isolada de *P. aduncum*, apresentou atividade contra o fungo *Penicillium oxalicum*.

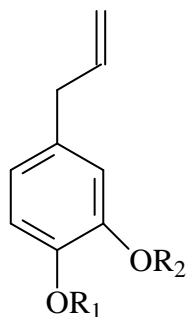


(2)

Devido à presença de várias classes de substâncias com atividade biológica, a espécie *Piper* L. tem sido muito estudada. Entre as classes estão os alcalóides, lignanas, neolignanas, flavonóides, substâncias fenólicas, terpenos, esteróides (PARMAR et al., 1997; SENGUPTA e RAY, 1987).

Na medicina chinesa e indiana, as folhas de *P. betle* são utilizadas para prevenir a halitose e infecção periodontal. Substâncias fenólicas presentes

nesta espécie, como o eugenol (3), acetato de chavibetol (4), monoacetato de alilpirocatecol (5) e alilpirocatecol (6), apresentaram atividade antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus anaerobis*, a substância alilpirocatecol foi a mais ativa (RAMJI et al., 2002).



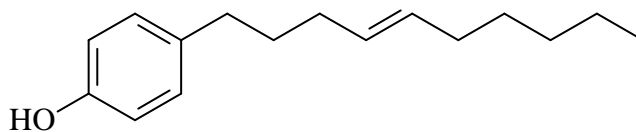
(3) $R_1=H$, $R_2=Me$

(4) $R_1=CH_3$, $R_2=COMe$

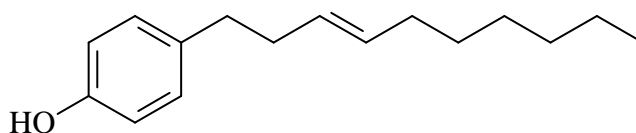
(5) $R_1=C$, $R_2=COMe$

(6) $R_1=H$, $R_2=H$

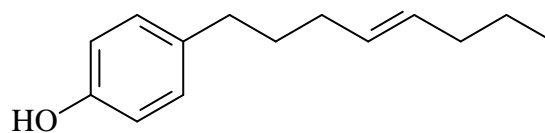
Substâncias alquenilfenólicas presentes nas folhas de *P. gibbilimum*, 4-(4'(*E*)-decenil)fenol (7), 4-(3'(*E*)-decenil)fenol (8), 4-(4'(*E*)-octenil)fenol (9) e 4-(3'(*E*)-octenil)fenol (10), apresentaram atividade antibacteriana sobre *Staphilococcus. epidermidis* e *Bacillus cereus*, observaram pequenas zonas de inibição menores que 2 mm (ORJALA et al., 1998).



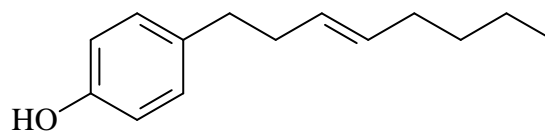
(7)



(8)



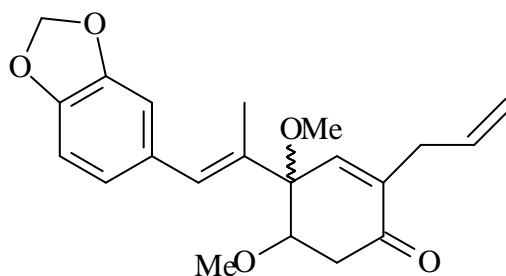
(9)



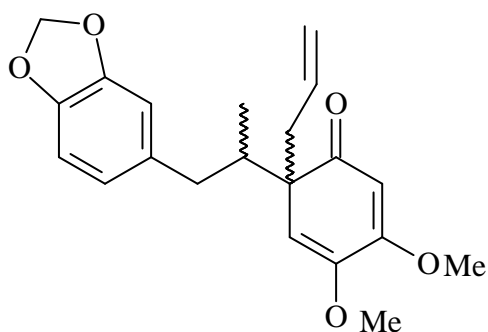
(10)

Diversas classes de substâncias são encontradas em outras espécies de *Piper* como neolignanas e lignanas em *P. clarkii* (PRASAD et al., 1995), ciclohexanos oxigenados em *P. cubeb* (KOUL et al., 1996), fenilpropanóides e neolignanas em *P. regnellii* (BENEVIDES et al., 1999), neolignas em *P. aequale* (MAXWELL et al., 1999).

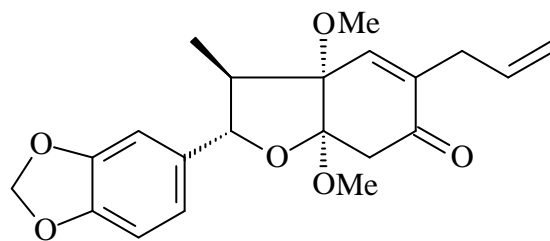
Num estudo feito por Singh (1996) na procura de substâncias em *P. argyrophyllum* a partir do extrato metanólico de caule, foi encontrado nove neolignanas e treze alcalóides, entre as neolignanas estão futoquinol (11); 2,4-ciclohexadieno (15), cadisurina A (16) e cadisurina B (17), (2R,3R,5S)-2-piperonil-3,3a-diidro-5-metóxi-3-metil-3a-2-propenil)-6(2H)benzofuranona (18).



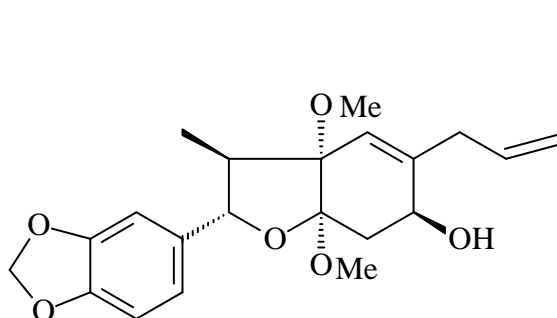
(11)



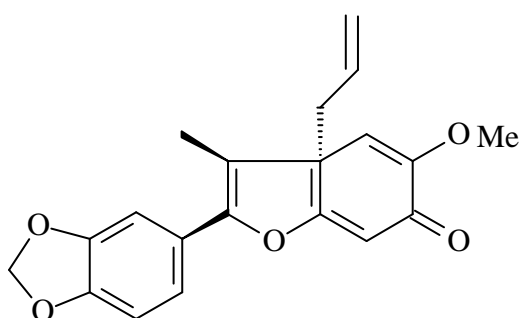
(12)



(13)

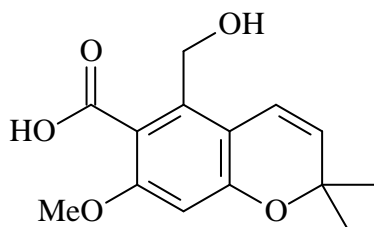


(14)

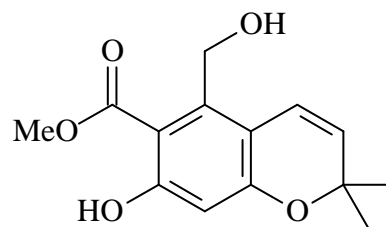


(15)

Salazar et al., (2005), verificaram a atividade antifúngica de cromonas presentes em folhas e caules de *Peperomia villipetiola*, o ácido 5-metanol-7-metóxi-2,2-dimetil-2H-1-cromona-6-carboxílico (16) apresentou atividade contra *Cladosporium cladosporioides* a 100 µg/ml, e o metil 5-acetoximetanol-7-hidróxi-2,2-dimetil-2H-1-cromona-6-carboxilato (17) com atividade na concentração de 5 µg/ml contra *C. sphaerospermun*.



(16)

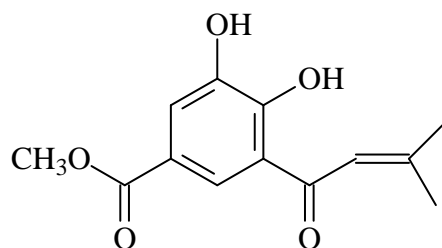


(17)

A espécie *P. callosum* encontrada na região amazônica, é utilizada pela população nativa para aliviar sintomas gastrointestinais (BERG, 1982).

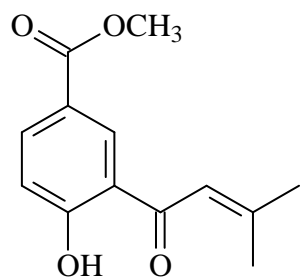
Navickiene et al., (2000), também relataram no gênero *Piper* a presença de aminas em *P. hispidum* e *Piper tuberculatum* que as mesmas possui atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum*.

Do mesmo modo, López et al., (2002) relataram a presença de derivados de ácido benzóico de *P. lanceaefolium*, como o ácido metil-éster lancefólico (21) e chalcona pinocembrina contra *C. albicans*, comprovando assim o uso tradicional no Vale Sibundoy na Colômbia.

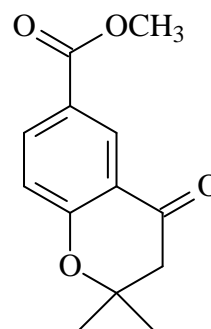


(21)

Terreaux et al., (1998) verificaram a presença de derivados de ácido benzóico de *P. dilatatum* com atividade contra um fungo patogênico de plantas, *Cladosporium cucumerinum*, entre eles o metil 3-(1'-oxo-3'-metil-2'-butenil)-4-hidróxibenzoato (22) e 2,2-dimeil-6-carboxicromana-4-1 metil éster (23), com CIM de 60 e 40 µg/ml respectivamente.

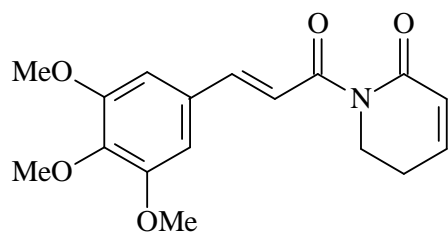


(22)

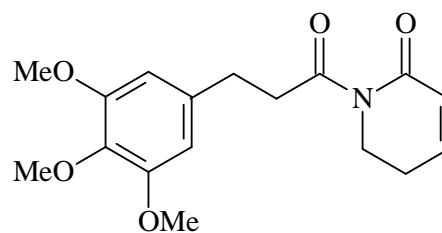


(23)

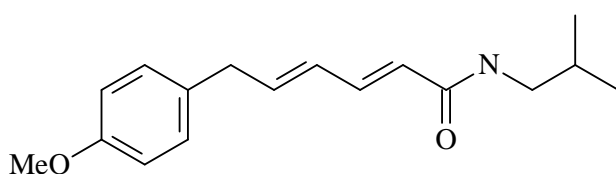
A partir do extrato clorofórmio/etanol das folhas de *P. alatabaccum*, Facundo et al.; (2005), obtiveram quatro substâncias, a piplartina (24), *N*-3',4',5'-trimetóxidihidrocinnamol- Δ^3 -piridina-1 (25), piperovatina (26) e 5,5',7'-trimetóxi-3',4'-metilenodioxiflavona (27).



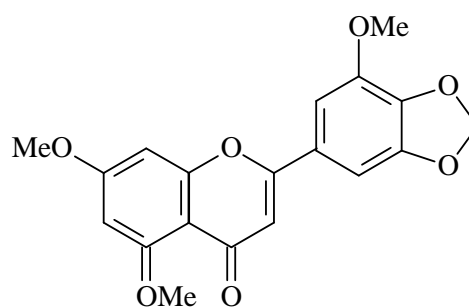
(24)



(25)

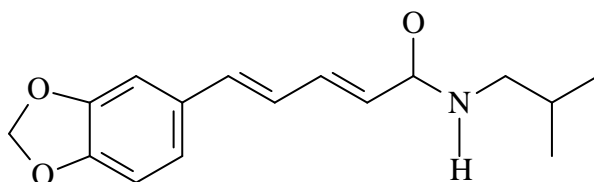


(26)

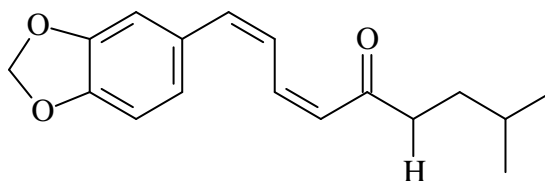


(27)

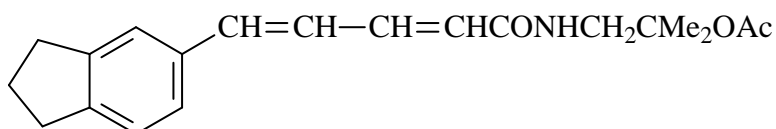
Costa e Mors (1981), a partir do extrato de petróleo das raízes de *Ottonia corcovadensis* obtido da extração por Soxhlet isolaram por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando hexano, tolueno, acetato de etila e metanol, e cinco aminas foram obtidas, entre elas, a piperlongumina (28) e piperovatina (26), isopiperlonguminina (29), corcovadina (30) e isocorcovadina. A piperovatina também está presente em outras espécies, em raízes e caules de *Ottonia frutescens* (MAKAPUGAY et al., 1983), raízes de *P. piscatorum* (McFERREN et al., 2002).



(28)

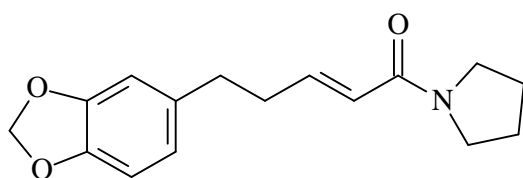


(29)

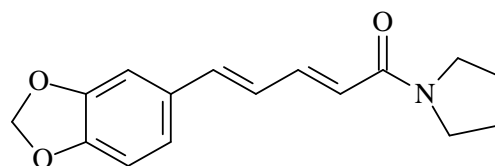


(30)

Folhas de *P. arboreum* apresentaram duas aminas ativas contra *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, *N*-[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7-(*E*)-pentenoil]-pirrolidina (31) e *N*-[10-(13,14-metilenodioxifenil)-7-(*E*), 9 (*E*)-pentadienoil]-pirrolidina (32) apresentaram atividade antifúngica de 0,1 µg/ml, enquanto que, outras aminas, que foram obtidas das sementes de *P. tuberculatum*, apresentaram moderada atividade antifúngica, na concentração entre 5 e 10 µg/ml (VASQUES DA SILVA et al., 2002).



(31)



(32)

4.2 *PIPER OVATUM* VAHL

A *P. ovatum* Vahl (Piperaceae), uma planta herbácea, conhecida popularmente como João Burandi ou anestésica (Figura 1). É usada na medicina tradicional no tratamento das inflamações e como analgésico (CORRÊA, 1984).

Arbusto 1, a 5 m de altura, glabro. Caule 4 a 6 mm diâmetro, estriado. Folhas com pecíolo 0,3 a 1,6 cm comprimento, estriado; bainha basal; lâmina 13 a 15,5 × 4,9 a 6,5 cm, discolor, papirácea, elíptica, lanceolado-elíptica, largo-lanceolada, ápice agudo-acuminado, margem abaxial hirta ou glabra, base obtusa, aguda-subigual, penínérvea, presença ou não de glândulas não translúcidas. Racemo 2 a 11 cm alvoamarelado; raque subestriada; pedúnculo 5 a 7 mm compr., estriado; pedicelos subsésseis, mais curtos que as flores ou frutos; bractéola séssil ou curto-pedicelada. Fruto 2,5 a 2,6 mm comprimento, globoso-sulcado, tetragonal, apiculado, estigmas curvos.

Arbusto ombrófilo da mata secundária, freqüente no estrato arbustivo, ocorrendo em área de baixada na reserva. Em outras localidades, como no Distrito Federal, pode ser observado em matas de galeria, em altitudes de

1000–1150; nesse trabalho a espécie é tratada como *Piper ovatum* Vahl. (CARVALHO-SILVA.; CAVALCANTI, 2002).

Esta espécie esta distribuída nos estados da Paraíba, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro.

Rodrigues-Silva et al., (2008), isolaram a partir do extrato hidroetanólico das folhas da *P. ovatum* a piperovatina e piperloguminina, que apresentaram atividade anti-leishmania e anti-inflamatória tópica.



FIGURA 1- *Piper ovatum*, em detalhe: infrutescência, folhas e caules.

2.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade,

linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (BRASIL, 2003).

ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE- É a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

LINEARIDADE - É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

PRECISÃO - É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

REPETIBILIDADE (precisão intra-corrída) – É a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

PRECISÃO INTERMEDIÁRIA (precisão inter-corrídas) – É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

REPRODUTIBILIDADE (precisão inter-laboratorial) – É a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo,

para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula.

LIMITE DE DETECÇÃO - É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO - É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

EXATIDÃO - A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

ROBUSTEZ - A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

A cromatografia constitui um processo físico-químico de separação dos constituintes de uma mistura, muito útil na análise de produtos vegetais. As técnicas cromatográficas mais utilizadas são CCD (Cromatografia em Camada Delgada), CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e CG (Cromatografia Gasosa) (FARIAS, 2001).

3 OBJETIVOS

Realizar estudos com a espécie vegetal *P. ovatum* visando:

1. Realização do estudo farmacognóstico das diversas partes da *P. ovatum*.
2. Isolar e identificar de substâncias bioativas da *P. ovatum*.
3. Determinação da composição química do óleo essencial obtido das folhas frescas da *P. ovatum*, por CG-EM e determinação do Índice de Kovats.
4. Obtenção de substâncias por extração com fluido supercrítico em CO₂ das folhas secas da *P. Ovatum*.
5. Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos, aminas e óleo essencial da *P. ovatum*.
6. Avaliação da atividade antileishmania da piperlonguminina, nas formas amastigotas e promastigotas.
7. Verificar a atividade citotóxica da piperonguminina.
8. Validação do método de análises das aminas bioativas por CLAE em fase reversa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DA PLANTA

As folhas, caules e raízes de *Piper ovatum Vahl* foram coletados na fazenda Boa Vista, Monte Formoso, Minas Gerais em junho de 2007. A espécie vegetal foi identificada por Elsie Franklin Guimarães, do Departamento de Botânica do Rio de Janeiro, e uma exsicata foi depositada como documento taxonômico no Herbário da Universidade Estadual de Maringá, sob número de registro HUM 10,621.

4.2 ESTUDO BOTÂNICO

4.2.1 Descrição Macroscópica

O material vegetal foi observado à fresco e seco, à olho nu e com auxílio de lupa estereoscópica marca Leica M3Z.

4.2.2 Descrição Microscópica

Foram realizados cortes transversais, longitudinais e paradérmicos, a mão livre, com auxílio de lâmina de barbear comum, ou utilizando micrótomo rotatório manual Spencer-820 com navalha de aço.

Lâminas semipermanentes, foram preparadas com os cortes descorados em solução de hipoclorito de sódio a 33%, lavados com água destilada,

corados com safranina a 1% e solução de azul de Astra a 1%, montados entre lâmina e lamínula, com gelatina glicerizada (solução 1-1), observados em microscópio ótico (Wild Heerbrugg MPS 51).

Para confecção de lâminas permanentes, as peças foram fixadas e desidratadas em série etílicas, passando em seguida para série xilóica e incluídas em parafina, cortadas, coradas e montadas em Permount, e visualizadas em microscópio ótico.

4.2.3 Pó das Folhas

Com a finalidade de comparar dados para a diagnose e identificação do material, foram montadas lâminas semipermanentes com o pó das folhas, obtidos após secagem, moagem e tamização, resultando em pó tamanho 20 mesh. O pó obtido foi clarificado com solução de hipoclorito de sódio 33%, durante 3 minutos, lavado sucessivas vezes com água destilada e corado com safranina e azul de Astra, após nova lavagem foi centrifugado (1000 rpm por 2 minutos) e o material foi montado em lâmina com gelatina glicerizada.

4.2.4 Testes Histoquímicos

Os cortes do material vegetal fresco foram submetidos à solução aquosa de cloreto férrico a 10%, para localização de substâncias fenólicas; solução de floroglucinol ácido, para evidenciar paredes lignificadas; solução de Sudan IV (solução saturada do corante em álcool 95% e adicionada igual quantidade de

glicerina), para localizar paredes suberificadas, cutinizadas e outros materiais lipídicos, reagente de Lugol (água destilada 100,0 mL para 1,0 g de iodeto de potássio), para localização de amido; solução de azul de metileno (solução de 0,3 g de azul de metileno em 20,0 mL de álcool 96°GL, e completa com água destilada para 100,0 mL) para evidenciar estruturas celulósicas e mucilaginosas, solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluído de 5-10%, para evidenciar ráfides e cristais de oxalato de cálcio e solução de vermelho de rutênio para evidenciar a presença de células de conteúdo mucilaginoso.

Os aspectos anatômicos das raízes, caules e folhas foram observados, descritos e ilustrados ao microscópio ótico. As fotomicrografias foram obtidas pelo programa de imagem Pro-Plus, versão 4.0 (Media Cybernetics) acoplada ao microscópio ótico. As escalas referentes às ilustrações foram obtidas utilizando-se régua milimetrada e lâmina micrométrica, nas mesmas condições ópticas utilizadas para cada caso.

4.3 SECAGEM DA PLANTA

O material coletado foi seco em estufa de ar circulante (QUIMIS[®], modelo Q-31) a temperatura de 36°C, durante 80 horas e moído em moinho de facas TECNAL MARCONI (Modelo TE 048), acondicionado e armazenado em local seco e ao abrigo da luz.

4.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Cerca de 2000g das folhas secas e moídas foram extraídas por uma solução hidroalcoólica 90% v/v pelo processo de maceração por agitação durante 4 horas à temperatura ambiente até o completo esgotamento do material. Os extratos foram filtrados e concentrados à pressão reduzida em evaporador rotatório, à temperatura de 37°C. Após a eliminação do solvente foi adicionada água destilada para a liofilização, sendo a parte extraída denominado de extrato bruto, que foi posteriormente congelado em nitrogênio líquido e liofilizado (liofilizador – modelo- 1-2 CHRIST ALPHA). Obtendo assim 223,8g para ensaios microbiológicos de extrato bruto. O liofilizado foi acondicionado em frascos plástico hermeticamente fechado e mantido em freezer.

4.5 DADOS ESPECTROMÉTRICOS

As análises por ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de ^1H e ^{13}C foram realizadas em espectrômetro VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB, 300 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C e DEPT, bem como os bidimensional HSQC, HMBC e COSY. Foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado (ALDRICH®), como referência interna o TMS ($\delta=0,0$ ppm).

4.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

4.6.1 Cromatografia em coluna (CC) de adsorção a vácuo

Na preparação por coluna cromatográfica (CC) de adsorção, foi utilizada coluna de vidro com 5,0 cm de diâmetro e 35,0 cm de comprimento acoplada a Kitassato e este conectado a uma bomba de vácuo.

Como fase estacionária, foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM MERCK®) e como fase móvel, foi desenvolvida com vários sistemas eluentes P. A. (Synth), com solventes puros ou misturas de dois solventes, variando a proporção entre os mesmos. Foram utilizados solventes puros grau P.A. As frações foram eluídas em CC pelos solventes em ordem crescente de polaridade. Em seguida foram concentradas em aparelho evaporador rotatório (modelo- R-114 – BÜCHI) à pressão reduzida com temperatura de 37 °C até completa eliminação do solvente, e a água presente nos extratos foi eliminada através da liofilização. As amostras obtidas foram conservadas a temperatura de aproximadamente -15 °C.

4.6.2 Cromatografia em coluna de adsorção

Para as sub-frações foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna eluição por gravidade. Foi utilizada coluna de vidro com 3,0 cm de diâmetro e 35,0 cm por gravidade. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM-MERCK®) para a eluição desta coluna foi usado como fase móvel solventes puros ou misturas binárias, variando as proporções de forma a obter um sistema com gradiente ideal para cada amostra. As frações foram coletadas em tubos de ensaio e os solventes foram secos a temperatura ambiente ou liofilizada. As amostras obtidas foram conservadas a temperatura de aproximadamente -15 °C.

4.6.3 Cromatografia em camada delgada

Para a realização de CCD, foram utilizadas placas de vidro de 5 x 10 cm preparadas com uma espessura de 0,5 mm de sílica gel GF₂₅₄, ativadas à 105-110 °C por 30 minutos, ou cromatoplasmas pré-fabricadas de alumínio Kieslgel 60 GF₂₅₄ (MERCK®), 20 x 20 cm com 0,2 mm de espessura. Como fase móvel foram utilizados solventes puros ou misturas binárias de diferentes polaridades de solventes grau P.A. (Synth e Nuclear).

A visualização das substâncias nas placas de CCD foi feita pela revelação com reagente de Godin, reagente Dragendorff e radiação UV.

4.6.4 Cromatografia por exclusão SEPHADEX LH-20

Foi utilizado SEPHADEX LH-20 na purificação das frações semi-puras obtidas por adsorção. Para o fracionamento em coluna cromatográfica por exclusão utilizaram-se colunas de diversas dimensões dependendo da quantidade de amostra. Como fase estacionária a SEPHADEX LH-20. Para preparar os sistemas eluentes (fase móvel) foram utilizados solventes puros grau P.A. e mistura em proporções variadas, quando necessário, levados em consideração a polaridades das constituintes. Este sistema de cromatografia foi usado de forma isocrática, as frações eluídas foram coletadas em tubos de ensaio de 10ml. Após foram aplicadas em CCD e unidas de acordo com a semelhança dos constituintes ativos isolados, evaporadas a temperatura ambiente e armazenadas em baixa temperatura e frascos âmbar.

4.7 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

4.7.1 Extração do óleo essencial por arraste a vapor

Para a extração do óleo essencial realizaram-se uma triagem a fim de retirar sujidades e partes danificadas. Na extração do óleo essencial da planta seca, procedeu-se a secagem das folhas em estufa de ar circulante (QUIMIS[®], modelo Q-31) a temperatura de 35 °C, durante 96 horas. Em seguida as folhas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm e acondicionadas em balão volumétrico juntamente com água destilada, numa proporção de 100 g de planta para 1000 ml de água destilada, submetidas a extração do óleo essencial através de aparelhos de extração por arraste a vapor do tipo Clevenger, por aproximadamente 90 minutos. Este processo foi realizado em triplicata.

4.7.2 Análise do óleo essencial por CG-EM

Usou-se cromatografia a gás, acoplada a espectrometria de massa, usando aparelho Agilent 6890, modelo CP 3800 com coluna HP-5 MS Agilent, diâmetro de 0,25 mm e filme de 0,25 µM, hélio como gás de arraste e fluxo de 1 mL/min. A temperatura foi programada mantendo 80 °C por um minuto, seguida de aumento de 10 °C por minuto até 290 °C, temperatura mantida por mais um minuto. Foi injetado um volume de 1 µL de uma solução do composto (1 mg.mL⁻¹), que foi identificado através da comparação de seu espectro de

massa com espectros existentes no banco de dados (Wiley 275) do equipamento.

4.7.3 Determinação dos Índices de Kovats

Para o cálculo dos índices de Kovats, uma mistura de hidrocarbonetos (C5 a C26) foi injetada no cromatógrafo, sendo que, para cada constituinte do óleo essencial, foram utilizados os tempos de retenção do próprio constituinte e dos hidrocarbonetos.

4.8 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO EM CO₂

Os experimentos foram realizados numa câmara constituída de um reservatório de CO₂, dois banhos termostáticos, uma bomba tipo seringa (ISCO 260D), um extrator enjaquetado de aço inox 304 com capacidade de 162 cm³ com 2,54 cm de diâmetro e 32 cm de altura, um transdutor de pressão absoluta (Smar, LD301) equipado com um programador portátil (Smar, HT 201) com uma precisão de + 0,012 Mpa, uma válvula micrométrica e um frasco de vidro como coletor. Inicialmente o CO₂ é bombeado para o extrator (Figura 2). O CO₂ pressurizado é mantido em contato com a matéria-prima por 20 minutos sob pressão para permitir a estabilização do sistema. Posteriormente, abre-se a válvula para recolher a substância extraída. O fluxo de massa de CO₂ é mantido constante. A partícula usada na extração possui uma granulometria média de 0,468 mm.

Foram realizadas duas extrações para obtenção de matéria-prima em triplicata.

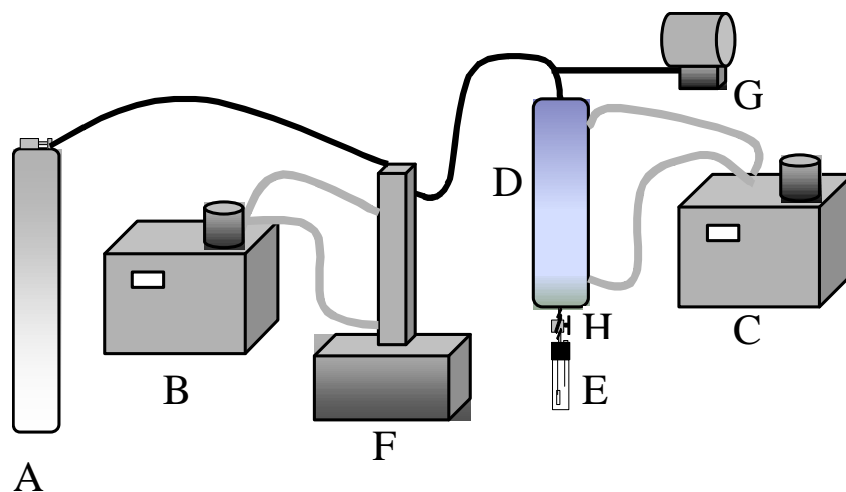


FIGURA 2- Esquema da extração com fluido supercrítico (A – reservatório de CO₂ ; B, C – banhos termostáticos; D – coluna extratora; E – frasco coletor; F – bomba de pressão; G - absolute transdutor de pressão; H – aquecedor elétrico).

4.9 ANÁLISE DOS ÓLEOS FIXOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

4.9.1 Determinação estrutural dos óleos fixos extraídos com fluidos supercrítico em CO₂

Os óleos fixos foram analisados através de métodos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (¹H e ¹³C), RMN 2D (COSY ¹H-¹H, HMQC e HMBC) e por espectrometria de massas.

As análises por RMN foram realizadas em espectrômetro VARIAN, modelo Mercury 300 BB, 300 MHz para ¹H e 75,45 MHz para ¹³C. Foi utilizado o solvente deuterado CDCl₃ (Aldrich®).

4.9.2 Análise dos óleos fixos por CG-FID

Para a análise em CG-FID dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) os mesmos foram preparados por metilação dos triacilgliceróis, como descrito no método 5509 da ISO (1978). Os EMAG foram analisados através de cromatógrafo gasoso 14-A (Shimadzu, Japão), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 mm de Carbowax 20M). Os fluxos dos gases ultra-puros (White Martins), foram de 1,2 mL/min. para o gás de arraste (H_2); 30 mL/min. para o gás auxiliar (make-up) (N_2); 30 e 300 mL/min. para os gases da chamas, H_2 e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra (split) foi de 1:100. A temperatura da coluna foi programada à uma taxa de $2^\circ C/min.$, de $150^\circ C$ até $240^\circ C$. As temperaturas do injetor e detector foram $220^\circ C$ e $245^\circ C$, respectivamente. As áreas dos picos foram determinadas através do Integrador-Processador CG-300 (Instrumentos científicos CG) e a identificação dos picos foi realizada por comparação com os tempos de retenção de padrões (Sigma, EUA).

4.9.3 Padrões de ácidos graxos

Para a análise dos ácidos graxos presentes na *P. ovatum*, foram usados diversos padrões (Sigma, EUA) demonstrados tabela 1.

TABELA 1- Padrões de ácidos graxos utilizados na análise dos ácidos graxos da *P. ovatum*.

Nome comum	Nomeclatura IUPAC	Fórmula IUPAC
Ácido acético	Ácido etanóico	2:0
Ácido butírico	Ácido butanóico	4:0
Ácido isovalérico	Ácido 3-metilbutanóico	3-Me-4:0
Ácido valérico	Ácido pentanóico	5:0
Ácido capríco	Ácido hexanóico	6:0
Ácido enantico	Ácido heptanóico	7:0
Ácido caprílico	Ácido octanóico	8:0
Ácido pelargonico	Ácido nonanóico	9:0
Ácido cáprico	Ácido decanóico	10:0
Ácido caproléico	Ácido 9-decenóico	10:1 Δ^9
Ácido n-undecílico	Ácido undecanóico (hendecanóico)	11:0
Ácido undecilenico	Ácido 10-undecenóico(10-hendecenóico)	11:1 Δ^{10}
Ácido láurico	Ácido dodecanóico	12:0
Ácido lauroléico	Ácido 9-dodecanóico	12:1 Δ^9
Ácido n-tridecílico	Ácido tridecanóico	13:0

Nome comum	Nomeclatura IUPAC	Fórmula IUPAC
Ácido anteisomirístico	Ácido-metiltridecanóico	11-Me-13:0
Ácido isomirístico	Ácido 12-metiltridecanóico	12-Me-13:0
Ácido mirístico	Ácido tetradecanóico	14:0
Ácido fisetérico	Ácido 5-tetradecenóico	14:1 Δ 5
Ácido miristoléico	Ácido 9-tetradecenóico	14:1 Δ 9
Ácido anteisopentadecílico	Ácido 12-metiltetradecanóico	12-Me-14:0
Ácido isopentadecílico	Ácido 13-metiltetradecanóico	13-Me-14:0
Ácido pentadecílico	Ácido pentadecanóico	15:0
	Ácido 5-pentadecenóico	15:1 Δ 5
	Ácido 6-pentadecenóico	15:1 Δ 6
	Ácido 8-pentadecenóico	15:1 Δ 9
Ácido anteisopalmítico	Ácido 13-metilpentadecanóico	13-Me-15:0
Ácido isopalmítico	Ácido 14-metilpentadecanóico	14-Me-C15:0
	Ácido 7,10-pentadecadienóico	15:2 Δ 7,10
Ácido palmítico	Ácido hexadecanóico	16:0
	Ácido 5-hexadecenóico	16:1 Δ 5

Nome comum	Nomeclatura IUPAC	Fórmula IUPAC
	Ácido 7-hexadecenóico	16:1 Δ 7
Ácido palmitoléico	Ácido 9-hexadecenóico	16:1 Δ 9
	Ácido 11-hexadecenóico	16:1 Δ 11
	Ácido 6,9-hexadecadienóico	16:2 Δ 6,9
	Ácido 7,10-hexadecadienóico	16:2 Δ 7,10
	Ácido 6,9,12-hexadecatrienóico	16:3 Δ 6,9
	Ácido 7,10,13-hexadecatrienóico	16:3 Δ 7,10,13
	Ácido 1,4,7,10-hexadecatetraenóico	16:4 Δ 1,4,7,10
	Ácido 4,7,10,13-hexadecatetraenóico	16:4 Δ 4,7,10,13
	Ácido 14-metil-hexadecanóico	14-Me Δ 16:0
Ácido isomargárico	Ácido 15-metil-hexadecanóico	15-Me-16:0
Ácido margárico	Ácido heptadecanóico	17:0
	Ácido 8-heptadecanóico	17:1 Δ 8
	Ácido 9,12-heptadecanóico	17:2 Δ 9,12
	Ácido 10,13-heptadecanóico	17:2 Δ 10
Ácido isoesteárico	Ácido 16-metil-heptadecanóico	16-Me-17:0
Ácido palmitoleico	Ácido <i>cis</i> -9-hexadecenóico	16:1 Δ ⁹

Nome comum	Nomeclatura IUPAC	Fórmula IUPAC
Ácido esteárico	Ácido octadecanóico	18:0
Ácido petroselínico	Ácido 6-octadecanóico	18:1 Δ 6
	Ácido 7-octadecanóico	18:1 Δ 7
	Ácido 9-octadecanóico	18:1 Δ 9
	Ácido 11-octadecanóico	18:1 Δ 11
Ácido vacenico	Ácido 12-octadecanóico	18:1 Δ 12
	Ácido 13-octadecanóico	18:1 Δ 13
	Ácido 15-octadecanóico	18:1 Δ 15
Ácido linoléico	Ácido 9,12-octadecadienóico	18:2 Δ 9,12
	Ácido 11,14-octadecadienóico	18:2 Δ 11,14
Ácido γ -linolenico	Ácido 6,9,12-octadecatrienóico	18:3 Δ 6,9,12
	Ácido 8,11,14-octadecatrienóico	18:3 Δ 8,11,14
Ácido alfa- linolenico	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico	18:3 Δ 9,12,15
Ácido estearidonico	Ácido 6,9,12,15 octadecatetraenóico	18:4 Δ 6,9,12,15
	Ácido 17-metil-octadecanóico	17-Me-18:0
Ácido pristanico	Ácido 2,6,10,14-tetrametilpentadecanóico	2,6,10,14-tetraMe-15:0
Ácido n-nonadecílico	Ácido nonadecanóico	19:0

Nome comum	Nomeclatura IUPAC	Fórmula IUPAC
	Ácido 12- nonadecanóico	19:1 Δ 12
Ácido fitânico	Ácido 3,7,11,15-tetrametil-hexadecanóico	3,7,11,15-tetraMe-16:0
Ácido araquídico	Ácido eicosenóico	20:0
	Ácido 5-eicosenóico	20:1 Δ 5
Ácido gadoléico	Ácido 9-eicosenóico	20:1 Δ 9
Ácido gondóico	Ácido 11-eicosenóico	20:1 Δ 11
	Ácido 13-eicoseóico	20:1 Δ 13
	Ácido 8,11-eicosadienóico	20:2 Δ 8,11
	Ácido 11,14-eicosadienóico	20:2 Δ 11,14
Ácido <i>mead</i>	Ácido 5,8,11-eicosatrienóico	20:3 Δ 5,8,11
Ácido di-homo- γ -linolenico	Ácido 8,11,14-eicosatrienóico	20:3 Δ 8,11,14
Ácido di-homo-(α -)linolenico	Ácido 11,14,17-eicosatrienóico	20:3 Δ 11,14,17
Ácido araquidónico	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico	20:4 Δ 5,8,11,14
	Ácido 8,11,14,17-eicosatetraenóico	20:4 Δ 8,11,14,17
Ácido tminodónico	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	20:5 Δ 5,8,11,14,17
	Ácido 19-metil-eicosanóico	19-Me-20:0

Nome comum	Nomeclatura IUPAC	Fórmula IUPAC
Ácido n-heneicoisanóico	Ácido heneicosanóico	21:0
	Ácido 12,15,18-heneicosatrienóico	21:3 Δ 12,15,18
	Ácido 6,9,12,15,18-heneicosapentaenóico	21:5 Δ 6,9,12,15,18
Ácido beênico	Ácido docosanóico	22:0
Ácido cetoléico	Ácido 11 docosanóico	22:1
Ácido erúico	Ácido 13 docosanóico	22:2
	Ácido 13,16 docosadinóico	22:2n-6
Ácido edrenico	Ácido 7,10,13,16 docosatetraenóico	22:4n-6
Ácido clupanodonico	Ácido 10,13,16,19 docosatetraenóico	22:5n-3
	Ácido tricosanóico	23:0
Ácido lignocérico	Ácido tetracosanóico	24:0
Ácido nervonico	Ácido 15 tetracosanóico	24:1 n-9
	Ácido pentacosanóico	25:0
Ácido cerótico	Ácido hexacosanóico	26:0
Ácido montanico	Ácido octacosanóico	28:0
Ácido melissico	Ácido triacotanóico	30:0

4.10 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.10.1 Preparo do inóculo de leveduras

A partir de uma cultura de 24 horas de leveduras em caldo dextrose Sabouraud , o inóculo foi preparado em solução salina até uma turvação comparada com a escala de Macfarland (suspensão de sulfato de bário) equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml. O inóculo foi então diluído 1-10.

4.10.2 Determinação da CIM para leveduras e bactérias

Em uma placa de 96 poços contendo de 100 μ L de CDS foram adicionados 100 μ L dos extratos, frações ou nistatina obtidos como descrito acima no primeiro poço de coluna, de modo a obter uma concentração inicial foi de 1000 μ g/ml (extratos), 100 μ g/ml (frações) e 50 μ g/ml (nistatina). Após homogeneização, 100 μ l de cada coluna foram transferidos para os poços subsequentes, de modo a obter uma diluição seriada 1-2 para as amostras testes e padrão. A operação foi repetida até o antepenúltimo poço de cada linha. O penúltimo e o último poço foram deixados como controle de esterilidade do meio de cultura e das amostras, respectivamente. Um volume de 5 μ L da suspensão de *C. tropicalis* (10^7 UFC/ml) foi adicionado em todos os poços, com exceção dos penúltimos poços de cada linha. A placa foi incubada a 37°C por 24-48 horas. A CIM foi considerada como a maior diluição que inibiu o crescimento visível do fungo quando comparado com o controle (NCCLS, 2004).

4.10.3 Atividade antimicrobiana para leveduras de isolados clínicos

A atividade antimicrobiana dos extratos da folha, caule e raiz de *P. ovatum* foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo (teste de susceptibilidade antimicrobiana) (NCCLS, 1997; NCCLS, 2004). Os ensaios microbiológicos foram realizados no laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

4.10.4 Ensaio antifúngico de difusão em discos

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados em triplicata pelo método de difusão em disco de papel, em placas de Petri contendo meio de Müller-Hinton. Foram selecionados para os ensaios os microrganismos- *Candida glabrata* 93, *Candida albicans* 109 e *Candida albicans* ATCC 900 isolados clínicos cedidos pelo laboratório de Micologia, Setor de Análises Clínicas, da Universidade Estadual de Maringá. O meio foi inoculado com suspensões de 10^6 UFC/mL de microrganismos.

Os discos foram impregnados com 15 μ L de soluções a 1-100 (amostra-solvente propilenoglicol) de cada amostra (óleo essencial) e então incubados a 25°C por 48h. Discos padronizados de Nistatina foram utilizados como controle positivo.

Os resultados foram analisados através da mensuração dos halos de inibição ao redor dos discos, sendo expressos em milímetros (mm).

4.10.5 Manutenção do parasita

Para o estudo foi utilizada a cepa de *L. (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa), originalmente isolada pelo Dr. César A. C. Cuba (Universidade Federal de Brasília, Distrito Federal, DF, Brasil) de paciente com leishmaniose cutânea difusa.

As formas promastigotas foram cultivadas e mantidas em frascos estéreis e descartáveis para cultura de células de 25cm² contendo meio Warren (infusão de cérebro e coração “Difco[®]” + hemina + ácido fólico) pH 7,0 e esterilizado por autoclavação a 121°C por 15 minutos. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco[®]), inativado a 56°C por 30 minutos, e as culturas mantidas em estufa BOD (FANEM modelo 347F) a 28°C. Os protozoários foram submetidos a repiques semanais. Para os experimentos, foram utilizadas culturas na fase logarítmica de crescimento, ou seja, após 72 horas de incubação após subcultivo.

Formas amastigotas axênicas foram obtidas através da transformação de formas promastigotas. A diferenciação *in vitro* foi realizada através do aumento gradativo de temperatura e diminuição de pH. Formas promastigotas na fase logarítmica de crescimento foram semeadas (5×10^6 células/ml) em meio de Warren pH 7,0 suplementado com 20% de SFB. Posteriormente os parasitas foram incubados durante 7 dias aumentando-se gradativamente a temperatura a cada 24 h (28°C, 30°C, 32°C) e após transformação, mantidas através de subcultivos em meio de Schneider (Sigma[®]) contendo 20% de SFB, a 32°C em estufa BOD.

4.10.6 Cultura de macrófagos J774G8

Os macrófagos da linhagem contínua J774G8 foram mantidos em frascos de cultura de células de 25 cm² em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) pH 7,2, o qual foi previamente esterilizado por processo de filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por 30 minutos a 56 °C e as culturas foram mantidas em estufa (FISHER SCIENTIFIC) à temperatura de 37 °C e tensão de 5% de CO₂. O meio de cultura adicionado de soro fetal bovino foi substituído diariamente nas culturas de células.

4.10.7 Estudo da atividade da piperlonguminina no crescimento de *L. amazonensis* na forma promastigota

Para avaliar o efeito destes sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, várias concentrações (1000 µg/ml, 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml e 0,1 µg/ml) desta substância foram adicionadas ao meio de cultura Warren contendo 1,0 x 10⁶ protozoários/ml na fase exponencial de crescimento. Para estabelecer um parâmetro de comparação, foi utilizado como controle, a cultura dos protozoários sem adição da substância e um outro controle com a adição de DMSO cuja concentração não ultrapassou 0,5% (v/v). As culturas foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino e incubadas a 28 °C (para promastigotas). Estes experimentos foram realizados em placa de 24 poços (TPP) e a mesma foi incubada por um período de até 72 horas. O

crescimento foi avaliado após as 72 h, através da diluição da cultura de protozoários em formalina 5% e contagem das células em hemocítmetro (câmara de Neubauer). Estes experimentos foram realizados em triplicata.

4.10.8 Estudo da atividade da piperlonguminina no crescimento de *L. amazonensis* na forma amastigota

Para avaliar o efeito destes sobre o crescimento de formas amastigotas de *L. amazonensis*, várias concentrações (1000, 100, 10 e 1 µg/ml) desta substância foram adicionadas ao meio de cultura Shneider contendo $1,0 \times 10^6$ protozoários/ml na fase exponencial de crescimento. Para estabelecer um parâmetro de comparação foi utilizada como controle a cultura dos protozoários sem adição da substância e um outro controle com a adição de DMSO cuja concentração não ultrapassou 0,5% (v/v). As culturas foram suplementadas com 20% de soro fetal bovino e incubadas a 32°C. Estes experimentos foram realizados em placa de 24 poços (TPP) e a mesma foi incubada por um período de até 72 horas. O crescimento foi avaliado após 72 h, através da diluição da cultura de protozoários em formalina 5% e contagem das células em hemocítmetro (câmara de Neubauer). Estes experimentos foram realizados em triplicata em tempos diferentes.

4.10.10 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos J774G8

Para verificar a toxicidade das substâncias purificada, foram utilizados macrófagos de linhagem contínua J774G8. O experimento foi realizado em

placa de 96 poços, onde foram adicionadas 5×10^4 células/poço e então incubadas com RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram mantidas a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ até a formação de uma monocamada confluyente de células (aproximadamente 24 horas). O meio de cultura foi retirado e em seguida foram adicionados 100µl/poço da solução de extrato bruto, frações e substâncias purificada em diferentes concentrações. Para estabelecer um parâmetro de comparação, foi utilizado como controle células tratadas com diferentes concentrações de Anfotericina B (Cristália®) e células acrescidas somente com RPMI-1640. A microplaca foi novamente incubada a 37°C com tensão de CO₂ por 48 horas. Após este período as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% a 4 °C por 1 hora. Em seguida foram lavadas com cuidado em água corrente. Após a secagem da placa foram adicionados 50 µl/poço do corante sulforrodamina B (0,4% p/v em ácido acético aquoso 1%). A cultura foi mantida a 4 °C por 30 minutos. Posteriormente, a placa foi lavada 4 vezes com ácido acético 1% e após foram adicionados 150 µl/poço de Trisbase 10mM. A placa foi agitada por 15 minutos e em seguida foi feita a leitura em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) em 530nm.

4.10.10 Ensaio de citotoxicidade em células vero

Preparou-se uma suspensão de células a $2,5 \times 10^5$ células/ml do meio suplementado com DMEM e soro fetal bovino. A linha de células usada foi a VERO. Após o preparo 100 µl dessa suspensão foram inoculados em cada poço de uma placa de 96 poços, incubou-se a 37°C em atmosfera contendo

5% de CO₂ por aproximadamente 36 horas ou até a formação total do tapete de células. Os extratos brutos foram adicionados em cada poço, em triplicata, nas concentrações variando entre 1000 e 50 µg/ml. Após a incubação, o meio contendo as células e a droga teste foi retirada dos poços. Adicionou-se na placa 50µl de ácido tricloroacético a 10% para fixar as células, seguido de incubação a 4°C por 1 hora. Lavou-se 5 vezes com água corrente, deixou-se secar. 50 µl de sulforadamina B (0,4% p/v em 1% de ácido acético aquoso) foram adicionados, e incubou-se a 4°C por 30 minutos. Removeu-se a sulforodamina B, lavou-se 4 vezes com ácido acético a 1 % e adicionou-se 150 µl de Tris-base 10mM em cada poço, agitou-se a placa por 20 minutos. A leitura do material foi feita em leitor de microplaca fluorescente a 530 nm.

4.11 PRÉ-FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO PARA TESTES MICROBIOLÓGICOS

Foram misturados 140 g do extrato bruto, com 2800 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) usando um Gral de porcelana, sendo esta empacotada em coluna e eluída com hexano, diclorometano-acetato de etila 50/50 v/v, acetato de etila e metanol. (tabela 2). As frações foram concentradas em evaporador rotatório, secas á temperatura ambiente, pesadas e mantidas a -20°C. As 4 frações obtidas foram analisadas por CCD após revelação com solução de vanilina sulfúrica (2%) e Dragendorff.

TABELA 2- Sistemas eluentes para coluna de pré-fracionamento a vácuo do extrato bruto hidroalcoólico 90% v/v e suas respectivas frações obtidas.

Sistema Eluente	Proporção (%)	Quantidade utilizada (ml)	Fração (g)
Hexano	100	1000	F1 (20,90)
Diclorometano- Acetato de Etila	50	2000	F2 (30,58)
Acetato de etila	100	1000	F3 (20,16g)
Metanol	100	1500	F4 (30,68g)

4.11.1 Fracionamento da fração diclorometano-acetato de etila

A fração diclorometano-acetato de etila foi escolhida para a realização do fracionamento por apresentar uma boa atividade microbiológica. A cromatografia foi realizada à gravidade, em sílica gel 60 (70-230 mesh) em coluna de 3,0 x 35,0 cm, empacotada com hexano e aplicado para o processamento da cromatografia. A coluna foi eluída como apresentado na tabela 3.

Foram obtidas 58 frações analisadas em CCD e visualizadas após revelação com reagente de Godin e Dragendorff. As frações que apresentaram semelhanças cromatográficas foram reunidas, novamente cromatografadas em CCD, e em seguida evaporadas a temperatura ambiente. As frações denominadas FC-1 à FC-58 foram mantidas a 2°C.

TABELA 3- Sistemas eluentes para CC da fração acetato de etila e suas frações obtidas.

Sistema Eluente	Proporção		Fração
	(v/v)	Quantidade Utilizada (ml)	
Clorofórmio	100	300	FC-01-FC 05
Clorofórmio-acetato de etila	98:2	300	FC-06 a FC-10
Clorofórmio-acetato de etila	95:5	300	FC-11 a FC-16
Clorofórmio-acetato de etila	90:10	300	FC-17 a FC-22
Clorofórmio-acetato de etila	80:20	900	FC-23 a FC-38
Clorofórmio-acetato de etila	50:50	300	FC-39 a FC-43
Acetato de etila	100	300	FC-44 a FC-48
Acetato de etila-metanol	50:50	300	FC-49 a FC-53
Metanol	100	300	FC-54 a FC-58

As frações de interesse (atividade biológica) foram FC-25 a FC-36 e foram reunidas e denominadas de mistura purificada.

Todas as etapas de fracionamento, isolamento e identificação da substância foram realizadas no laboratório de Farmacognosia do DFF/UEM e no DQI/UEM.

Para separação e purificação da mistura purificada foi usada uma coluna de Sephadex (exclusão molecular), eluída com acetato de etila isocrática, coletando 60 frações que foram analisadas em CCD e visualizadas após revelação com Dragendorff e Godin. As frações que apresentaram semelhanças cromatográficas foram reunidas, novamente cromatografadas em CCD e em seguida evaporadas a temperatura ambiente as frações de interesse (atividade biológica) foram da 10 a 41 e 42 a 50 que foi posteriormente identificada pelas análises espectrométricas descritas anteriormente. A amostra obtida da união dos tubos 42-50 foi denominada piperovatina.

4.12 VALIDAÇÃO

4.12.1 Reagentes e padrões empregados

Foram utilizados metanol e acetonitrila grau HPLC da OmniSolv EM Science (Gibbstown, NJ) e ácido acético P.A. (Merck, Darmstadt, Germany). Água de alta pureza foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). Como substância padrão foi utilizada a piperlonguminina.

4.12.2 Instrumentação e condições cromatográficas

Foi utilizado o equipamento GILSON, equipado com bomba quaternária (Pump 321), válvula injetora automático (234) com loop de 20 μ L, degasseificador (865), detector UV/visível modelo (152) e controlado pelo software BOWTER.

Na análise cromatográfica foi utilizada coluna de fase reversa Metasil ODS, 5 μ m, 150,0 x 4,6 mm, mantida em forno à temperatura de 30°C. A separação foi realizada pelo método isocrático, usando como fase móvel uma mistura de acetonitrila-água (60-40, v/v) contendo 2% de ácido acético, com fluxo de 1 mL/min. A detecção das substâncias foi realizada em 280 nm e o tempo de corrida foi 25 min. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

4.12.3 Preparo da amostra padrão

Soluções estoque de 1000 μ g/mL foram preparadas em triplicata dissolvendo 1 mg de piperlonguminina em 1 mL de metanol, em frasco vial, com auxílio de banho de ultrassom. Em seguida, a amostra foi filtrada através de filtro Millex[®] 0,45 μ m (Millipore).

Foram preparadas amostras com as demais substâncias padrão na concentração de 1000 μ g/mL, seguindo o mesmo procedimento.

4.12.4 Preparo das amostras dos extratos

Soluções estoque de 4000 µg/mL foram preparadas em triplicata dissolvendo 4 mg do extrato, obtido a partir das folhas de *P. ovatum* por remaceração, em 1 mL de metanol, em frasco vial, com auxílio de banho de ultrassom. Em seguida, a amostra foi filtrada através de filtro Millex[®] 0,45 µm (Millipore).

Amostras dos extratos das folhas obtidos, dos extratos dos caules e das raízes foram preparadas em triplicata, na concentração de 1000 µg/mL, dissolvendo 1 mg do extrato em 1 mL de metanol, em frasco vial, com auxílio de banho de ultrassom. Em seguida filtrada através de filtro Millex[®] 0,45 µm (Millipore).

4.12.6 Conformidade do sistema

Para avaliar a conformidade do sistema foram determinados os seguintes parâmetros cromatográficos, de acordo com Cass e Degani (2001).

4.12.6 Validação do método analítico por CLAE

O método de análise da piperovatina por CLAE foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros, de acordo com a Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003).

4.12.7 Linearidade

4.12.7.1 *Construção da curva analítica*

A curva analítica para a piperlonguminina foi construída a partir do método de padronização externa, ou seja, a partir de soluções-padrão com concentrações conhecidas.

Desta maneira, foram realizadas diluições sucessivas a partir da solução padrão estoque de 1000,00 µg/mL, em metanol, com auxílio de pipetador automático de volume fixo, de forma a obter 5 concentrações diferentes- 31,25 µg/mL, 62,50 µg/mL, 125,00 µg/mL, 250,00 µg/mL e 500,00 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata. As curvas analíticas foram construídas com os valores das médias, relacionando a área do pico das soluções padrão com a concentração das soluções padrão.

4.12.7.2 *Determinação dos parâmetros de linearidade*

Os dados das curvas analíticas foram submetidos à análise de regressão linear utilizando o Software Microsoft Excel 97, para determinação do coeficiente angular/inclinação (a), intercepto com o eixo y (b), coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear.

Através da Análise de Variância, realizada no Software Estatística 6.0, foram testadas a validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada. Assim, foram realizados o teste de falta de ajuste, teste da

significância da regressão, para ambos empregando o teste F, e foi realizada ainda análise dos resíduos.

O teste de falta de ajuste foi realizado através do cálculo da razão entre a média quadrática (MQ) devido a falta de ajuste e a média quadrática devido ao erro puro, ou seja, $F = MQ_{faj} / MQ_{ep}$, e o valor obtido foi comparado com o $F_{crítico}$ correspondente aos mesmos números de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido.

A validade da regressão foi calculada através da razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática residual ($F = MQ_{reg} / MQ_r$), sendo o valor obtido comparado com o valor de $F_{crítico}$.

Para análise dos resíduos foi construído um gráfico relacionando os resíduos com a concentração, sendo os resíduos calculados a partir da diferença entre a área prevista e a área obtida para cada concentração considerando as 3 curvas analíticas construídas.

4.12.8 Precisão

A precisão foi considerada em termos de repetibilidade e de precisão intermediária. A repetibilidade do método foi verificada no mesmo dia a partir de 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 soluções-padrão com diferentes concentrações, 31,25 µg/mL; 125,00 µg/mL; e 500,00 µg/mL foram preparadas em triplicata. A precisão intermediária foi determinada pela análise em triplicata das 3 soluções-padrão citadas acima, durante 2 dias não consecutivos. A precisão do método foi expressa como o coeficiente de variação (CV), também chamado de desvio padrão relativo.

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

CMD

DP = Desvio Padrão,

CMD = Concentração Média Determinada.

4.12.9 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi estabelecido por método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo determinado pela equação:

$$LD = \frac{DPa}{IC} \times 3$$

IC

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do y das 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do padrão próximas ao suposto limite de quantificação, IC = média da inclinação das 3 curvas analíticas.

4.12.10 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi estabelecido por método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo determinado pela equação:

$$LQ = \frac{DPa}{IC} \times 10$$

IC

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do y das 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do padrão próximas ao suposto limite de quantificação, IC = média da inclinação das 3 curvas analíticas.

4.12.11 Exatidão

A análise da exatidão foi realizada pelo teste de recuperação, no qual a solução padrão de piperlonguminina foi adicionada, em 3 concentrações diferentes (31,25 µg/mL; 125,00 µg/mL e 500,00 µg/mL), ao extrato das folhas *P. ovatum* contendo quantidade conhecida do analito. O extrato foi primeiramente diluído em metanol, obtendo uma concentração de 2000 µg/mL e em seguida foi misturado com cada solução padrão na proporção de 1-1 (v/v).

A amostra sem adição do padrão (extrato) e cada uma das amostras com o padrão adicionado foram analisadas em triplicata, sendo as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão adicionado à amostra, através da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

C₁ = Concentração determinada na amostra adicionada (padrão+ amostra);

C₂ = Concentração determinada na amostra não adicionada (amostra);

C₃ = Concentração adicionada (padrão).

4.12.12 Robustez

A robustez do método foi avaliada durante a otimização das condições cromatográficas, através da análise de parâmetros que pudessem conduzir à variações na resposta do método por CLAE, tais como:

- Variação do fluxo da fase móvel (0,6 mL/min; 0,8 mL/min e 1,0 mL/min);
- Variação na composição da fase móvel (acetonitrila-água 60-40 v/v; acetonitrila-água 70-30, v/v e acetonitrila-água 80-20, v/v);
- Variação da temperatura do forno do sistema cromatográfico (25°C e 30°C).

4.12.13 Estabilidade das soluções durante o experimento

A estabilidade das soluções foi avaliada com as soluções-padrão de piperlonguminina e as soluções amostra do extrato hidroetanólico das folhas de *P. ovatum*, durante o período de 72 h. As amostras foram mantidas sob refrigeração (4°C), sendo analisadas a cada 24 h após atingirem a temperatura ambiente. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos na análise das soluções recentemente preparadas.

4.12.14 Análise estatística

Foi realizada análise estatística dos resultados obtidos para os diferentes extratos através do Software Microsoft Excel 97.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 ANÁLISE MORFODIAGNÓSTICA

Piper ovatum é um arbusto de aproximadamente 2m de altura, bastante ramificado. As folhas são ovado-elípticas, medindo de 11 - 14 cm de comprimento por 3 - 7 cm de largura, de cor verde-acinzentada e glabras. As flores são do tipo espiga, opostas as folhas e de cor creme-esverdeadas. O sistema radical apresenta-se muito ramificado, constituído por raízes superficiais que saem da base da planta, não havendo distinção de uma raiz principal (CORRÊA, 1984).

A mesma possui raízes, são poliarcas e apresentam em início de crescimento secundário, epiderme uniestratificada com divisões anticlinais e células suberificadas. No córtex persistente mais externamente observa-se anel descontínuo de esclerênquima constituído de 2 a 3 estratos de células. Abaixo deste círculo ocorrem idioblastos cristalíferos, contendo cristais prismáticos e células parenquimáticas contendo grãos de amido e endoderme com estrias de Caspary. O xilema apresenta-se bem desenvolvido e poucos elementos de protoxilema são evidenciados (figura 3, foto 1 e 2).

Sistema radicular semelhante ao de *P. ovatum* foi descrito por Albiero et al., (2005, 2006) para *P. crassinervium* e *P. hispidum*, destacando-se nestas espécies a presença de idioblastos oleíferos e a presença de esclereides em grupos de 1 a 3 células no parênquima cortical externo.

O caule circular em secção transversal apresenta-se em estrutura primária, constituído de epiderme unisseriada, com células cubóides (fig.92,

foto 3). No córtex parenquimático ocorrem faixas descontínuas de colênquima angular, que gradualmente sofre esclerificação de dentro para fora (figura 3, foto 3). Idioblastos contendo drusas podem ser observados em região mais interna do córtex. O tecido vascular está organizado em círculos descontínuos de feixes colaterais delimitados externamente por endoderme com estrias de Caspary e periciclo uniestratificado e internamente por bainha perimedular esclerificada. No parênquima medular homogêneo constituído de células arredondadas, ocorrem feixes colaterais dispostos em círculos (figura 3, foto 4).

A estrutura caulinar em *P. ovatum* assemelha-se as espécies de *Piper* já estudadas, entretanto para *P. crassinervium*, conforme descrição de Albiero et al., (2005) o colênquima angular é contínuo.

A distribuição dos feixes vasculares medulares à semelhança das monocotiledôneas foi descrito por Hutchinson (1973) e por Cronquist (1981) como sendo uma característica marcante em Piperaceae, o que pode ser observado no presente estudo.

O pecíolo na região mediana é reto e em secção transversal, é cilíndrico. A epiderme é unisseriada e no parênquima fundamental ocorrem oito feixes vasculares colaterais de tamanho uniforme, dispostos em círculo, opostos as faixas descontínuas de colênquima angular subepidérmico. Entre os feixes vasculares ocorrem esclereídes isolados ou em grupos de 3 a 4 elementos (figura 3, foto 5).

A nervura central tem organização semelhante a dos tecidos do pecíolo, exceto pela presença das esclereídes e pela diminuição do número de feixes vasculares que passam de oito na região basal para apenas um no ápice.

Na folha hipostomática, o mesófilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico uniestratificado e lacunoso constituído por três a quatro camadas de células isodiamétricas. Na face abaxial, abaixo da epiderme foi observada uma camada de células grandes desprovida de cloroplastos, que na região da nervura central se torna constituída por duas ou três camadas de células, tal camada constitui uma hipoderme (figura 3 e foto 6).

A existência desta camada foi relatada em outros estudos realizados para *Piper* spp. por Yuncker (1973), por Vianna e Akisue (1997) para *Piper aduncum*, por Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) para *P. hispidinervium* e por Albiero et al., (2006) para *P. hispidum*.

A epiderme do limbo foliar nas faces abaxial e adaxial é uniestratificada, constituída de células cúbicas a retangulares recobertas por cutícula (figura 3 e foto 6). A face abaxial apresenta estômatos do tipo anomocítico (figura 4, fotos 7-12) e a face adaxial as células têm contorno sinuoso e não foram observados estômatos ou mesmo tricomas (figura 4, foto 8). Além de tricomas glandulares esparsos, os quais ocorrem somente nesta face. Observações em MEV mostraram que a cutícula é espessa e forma crostas no limite entre uma célula e outra (figura 4 e foto 9-10), em ambas as superfícies foliares. Estas observações revelaram na face abaxial a presença de tricomas glandulares esparsos constituídos de pedúnculo unicelular e porção secretora globóide igualmente unicelular, recoberto pela cutícula (figura 4 e foto 11).

Em *P. hispidinervium*, Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999), descreveram a presença de tricomas tectores e glandulares com célula apical em forma de saco, em ambas as faces da epiderme, e em *P. ovatum* var. *pallescens*, Pessini (2003), descreveram a ocorrência de tricomas glandulares

capitados em ambas as faces, raros tricomas tectores pluricelulares e unisseriados e de extremidade afilada, estes últimos sobre as nervuras. Em *P. crassinervium* e *P. hispidum* Albiero et al., (2005, 2006), descreveram a presença de tricomas glandulares com porção secretora curvada sobre a epiderme e três tipos de tricomas tectores, respectivamente. Desta forma, pode-se admitir que a presença de tricomas glandulares e também de tectores em *Piper* parece ter um caráter importante para a diagnose das espécies.

O declínio das florestas e a exploração descontrolada de espécies nativas têm levado à redução drástica de suas populações e a conseqüente extinção, o que representa uma perda inestimável de arsenal químico e biológico, além do desconhecimento de sua estrutura e de seus mecanismos de perpetuação (DI STASI, 1996).

Deste ponto de vista, o trabalho com plantas medicinais que geram produtos fitoterápicos, deve iniciar com a correta identificação, com estudo da morfologia, anatomia e desenvolvimento das espécies que são matéria-prima única para a elaboração do produto e que contém as substâncias ativas que determinam a atividade farmacológica (FERREIRA, 1998).

A Piperaceae é uma família predominantemente tropical, que inclui 4 gêneros e aproximadamente 2000 espécies, das quais cerca de 500 são muito comuns nas formações florestais brasileiras, particularmente na Mata Atlântica, com a predominância de *Piper* e *Peperomia*.

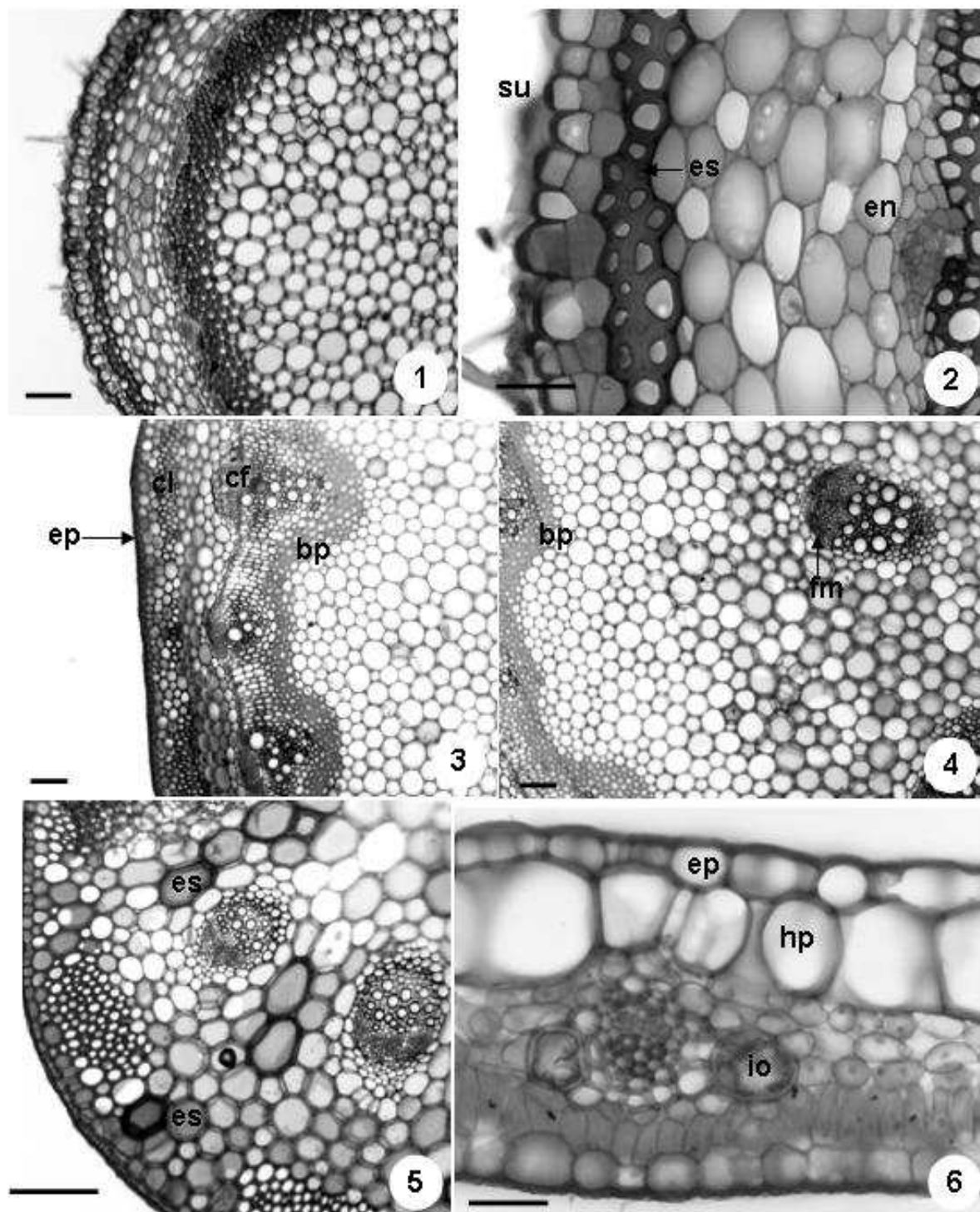
As espécies de *Piper* são pequenos arbustos ou árvores, sublenhosos que se caracterizam pela presença de nós foliares geniculados e folhas de base assimétrica e que ocorrem nas áreas mais alteradas e facilmente

reconhecíveis em seu estado vegetativo ou ainda pela presença de espigas de flores sésseis opostas as folhas.

Aspectos anatômicos de Piperaceae foram estudados por Solereder (1908) e por Metcalfe e Chalck (1957) além de outros autores, que se referem a algumas espécies de *Piper* tais como- *P. betle*, *P. excelsum*, *P. nigrum*, *P. jaborandi*, *P. methysticum* e *P. fluminense* citando a ocorrência de células oleíferas nas folhas e em outros órgãos. Mais recentemente Albiero e colaboradores (2005, 2006) estudando *Piper crassinervium* e *Piper hispidum* constataram a presença de idioblastos oleíferos nos órgãos vegetativos e reprodutivos daquelas plantas.

Idioblastos contendo material lipofílico foram observados no parênquima clorofiliano de *P. ovatum*, mais especificamente ladeando os feixes vasculares. Estas células secretoras de conteúdo oleífero ou mucilaginoso foram relatadas por Metcalfe e Chalk (1950) no caule e nas folhas em todos os gêneros de Piperaceae, com exceção de *Symbrio*. Outras inclusões celulares relatadas para as espécies da família, como por exemplo, cristais de oxalato de cálcio, não foram observados no presente estudo.

No pó das folhas de *P. ovatum*, os elementos marcantes observados que podem facilitar a identificação e auxiliar análises de avaliação de qualidade para comercialização, foram fragmentos do limbo, nos quais puderam ser evidenciados a hipoderme e os idioblastos oleíferos, além das esclereídes, observadas no parênquima fundamental do pecíolo, isoladas ou em grupos.



FIGURAS 3: *Piper ovatum*. **1-2-** Secções transversais da raiz **1-** Aspecto geral da raiz em estrutura secundária (barra - 100 μ m) ; **2-** Detalhe da periderme em formação, esclerênquima e endoderme (barra - 100 μ m). **3-4-** Secções transversais do caule. **3-**Caule em início de crescimento secundário, detalhe a bainha perimedular (barra - 100 μ m) **4-** Detalhe feixe medular. (barra - 100 μ m) **5-** Pecíolo em secção transversal, em detalhe as esclereides (barra - 100 μ m). **6-** Secção transversal do limbo, em detalhe a hipoderme e idioblastos oleíferos (barra - 50 μ m) (bp - bainha perimedular; cl - colenquima; cf - câmbio fascicular; su - súber; en - endoderme; ep - epiderme; ec - esclerênquima; es - esclereíde; fm - feixe medular; hp - hipoderme; io - idioblasto oleífero).

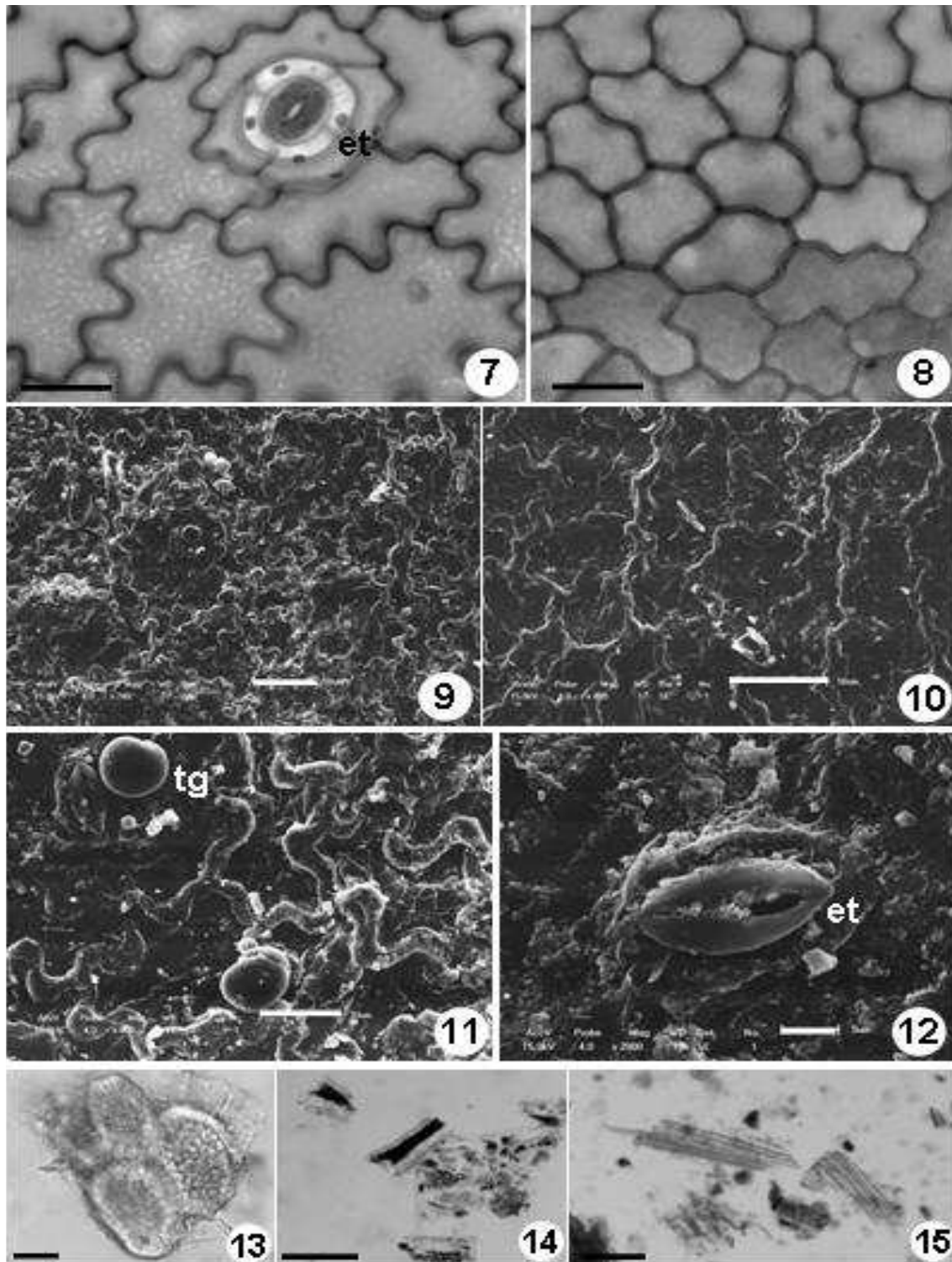
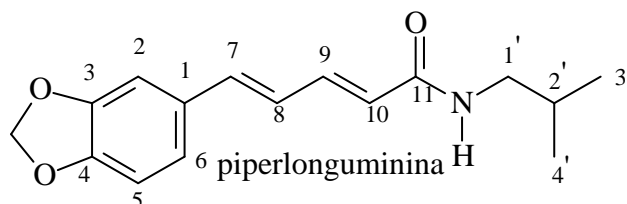


FIGURA 4: *Piper ovatum*. **7-8:** Secções paradérmicas da folha. **7:** Detalhe do complexo estomático na epiderme abaxial (barra - 50µm), **8:** Detalhe da epiderme adaxial (barra - 50µm) **9-11** Vista frontal das epidermes em MEV. **9:** Aspecto geral da epiderme abaxial. **10:** Aspecto geral epiderme adaxial; **11:** detalhe da epiderme abaxial evidenciando tricoma glandular. **12:** detalhe do estômato. **13-15:** Microscopia do pó. **13:** Detalhe das esclereides do pecíolo (Barra - 50 µm); **14:** Fragmentos do mesofilo, evidenciando hipoderme (Barra-100 µm); **15:** Fragmentos das fibras esclerenquimáticas do caule (Barra - 100 µm). (tg – tricoma glandular; et – estômato)

5.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.2.1 Determinação da Piperlonguminina



A interpretação dos espectros unidimensionais de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT e bidimensional COSY, HMQC e HMBC comparados com os dados obtidos da literatura (MACFERRER, et. al., 2004) permitiram propor a estrutura da piperlonguminina.

O espectro de RMN ^1H (tabela 4 e figura 5) apresenta 33 sinais de hidrogênios que foram atribuídos a piperovatina anteriormente identificada, e o restante 16 sinais atribuídos a estrutura piperlonguminina. Foi possível observar sinais referentes ao grupamento metileno dióxido em δ 5,95 (s) e sinais referentes aos hidrogênios aromáticos H-2, H-5 e H-6 em δ 6,97, *d* ($J=8,4$ Hz); δ 6,97 *d* ($J=8,4$ Hz), e δ 6,94 *d* ($J=1,5$ Hz). Aparecem sinais referentes aos hidrogênios olefinicos H-7 com δ 6,82 *d* ($J=8,7$ Hz); H-8 e H-9 δ 6,72 *m* e 7,21 *dd* ($J= 15$ e 9,9 Hz); H-10 δ 5,83 *d* ($J=15$ Hz). Um singleto largo em δ 5,57 ppm foi atribuído ao hidrogênio amídico. Em δ 3,12 observa-se o sinal referente ao hidrogênio metilênico H-1' δ 3,8 *d* ($J= 6,6$ Hz); metínico (H-2') em δ 1,79 noneto ($J=6,6$ Hz); e duas metilas (H-3' e H-4') em δ 0,94 *t* ($J=6,3$ Hz), sendo estes pertencentes ao grupo isobutila.

Através da análise do espectro bidimensional de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (tabela 4 e figura 6) observa-se a correlação do H-5 benzênico, acopla com o H-6. O H-7 olefínico acopla com H-8 olefínico. O próton H-10 olefínico está acoplado com H-11 também olefínico. O H-1' acopla com o H-2' e com o H amidico, o H 2' acopla com H1', H3' e H4'. O H-3' acopla com H-2'. Todos os acoplamentos possíveis foram observados e ficam confirmados as atribuições dos carbonos C-5 à C-10; C-1' à C-4' e NH.

TABELA 4- Dados de RMN ^1H (300 MHz), em CDCl_3 e acoplamentos observadas no $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY da piperlonguminina comparada com os valores de H da piperlonguminina (300MHz) da literatura, em CDCl_3 descrito. Deslocamento químico em ppm e constante de acoplamento em Hz.

H	piperlonguminina ^1H	$^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY	Piperlonguminina (literatura) ^1H
2	6,97 (J=8,4Hz)		6.97 d (J= 1.35Hz)
5	6,97 d (J=8,4 Hz)	H-6	6.76 d (J=8.03 Hz)
6	6,94 d (J=1,5 Hz)	H-5	6,88 dd (J= 1.34, 8.03 Hz)
7	6,82 d (J=8,7) Hz	H-8	6.77(m)
8	6,72 m	H-7	6.67(m)
9	7,21dd (J=15 e 9,9 Hz)	H-10	7.36(m)
10	5,83 d (J=15 Hz)	H-9	5.91 d (J= 14.7 Hz)
1'	3,8 dd (J=6,6 Hz)	NH; H-2'	3.90 t (J= 6.48 Hz)
2'	1,82 noneto (J=6,6 Hz)	H-1'; H-3'; H-4'	1.82(m)
3'	0,94 d (J=6,3 Hz)	H-2'	0,93 d (J=6,70 Hz)
4'	0,94 d (J= 6,3 Hz)	H-2'	0,93 d (J=6,70 Hz)
NH	5,57 sl	H1'	
O-CH-	5,955		
O-			

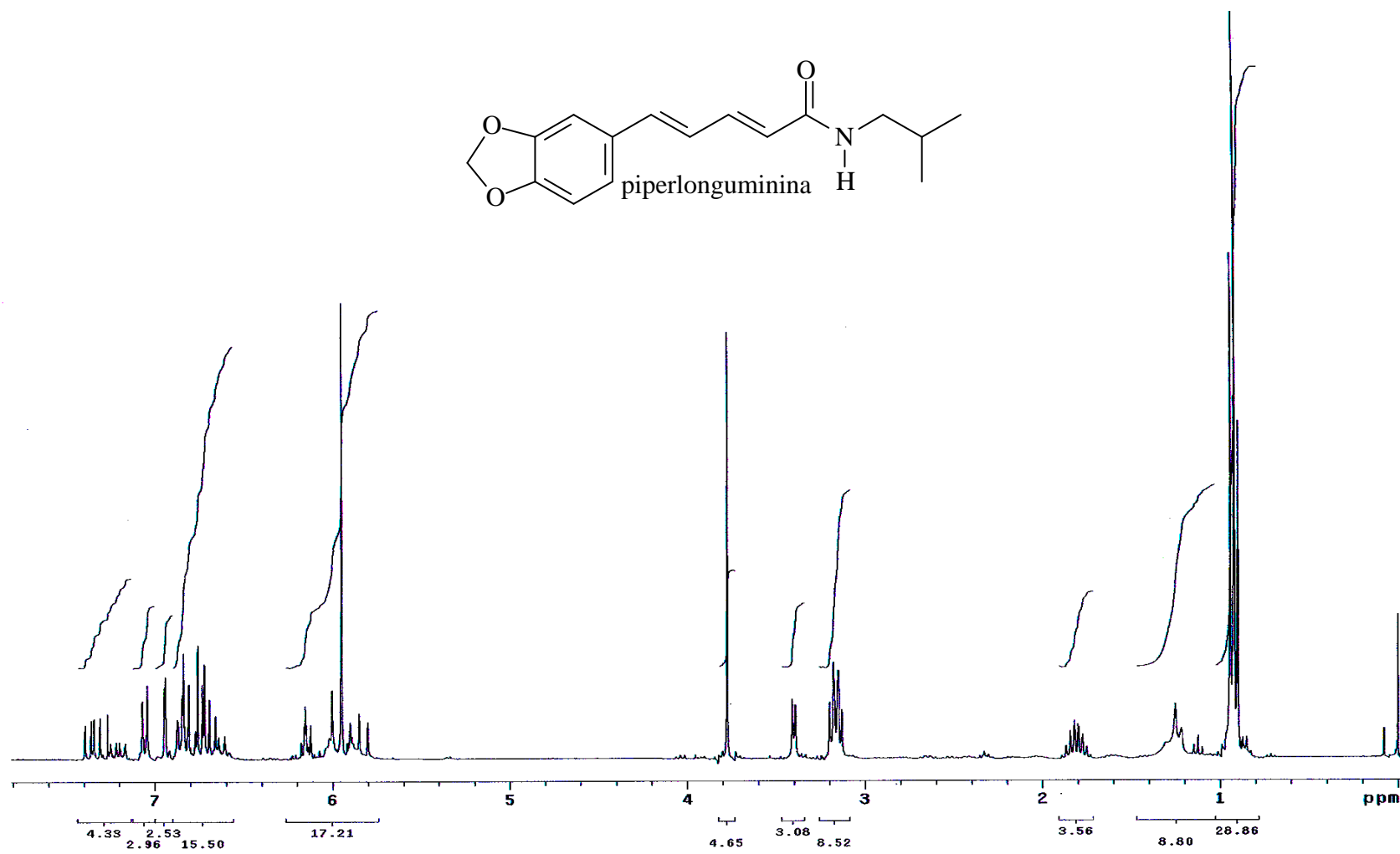


FIGURA 5- Espectro de RMN de ^1H da Piperlonguminina 300 MHz; CDCl_3 .

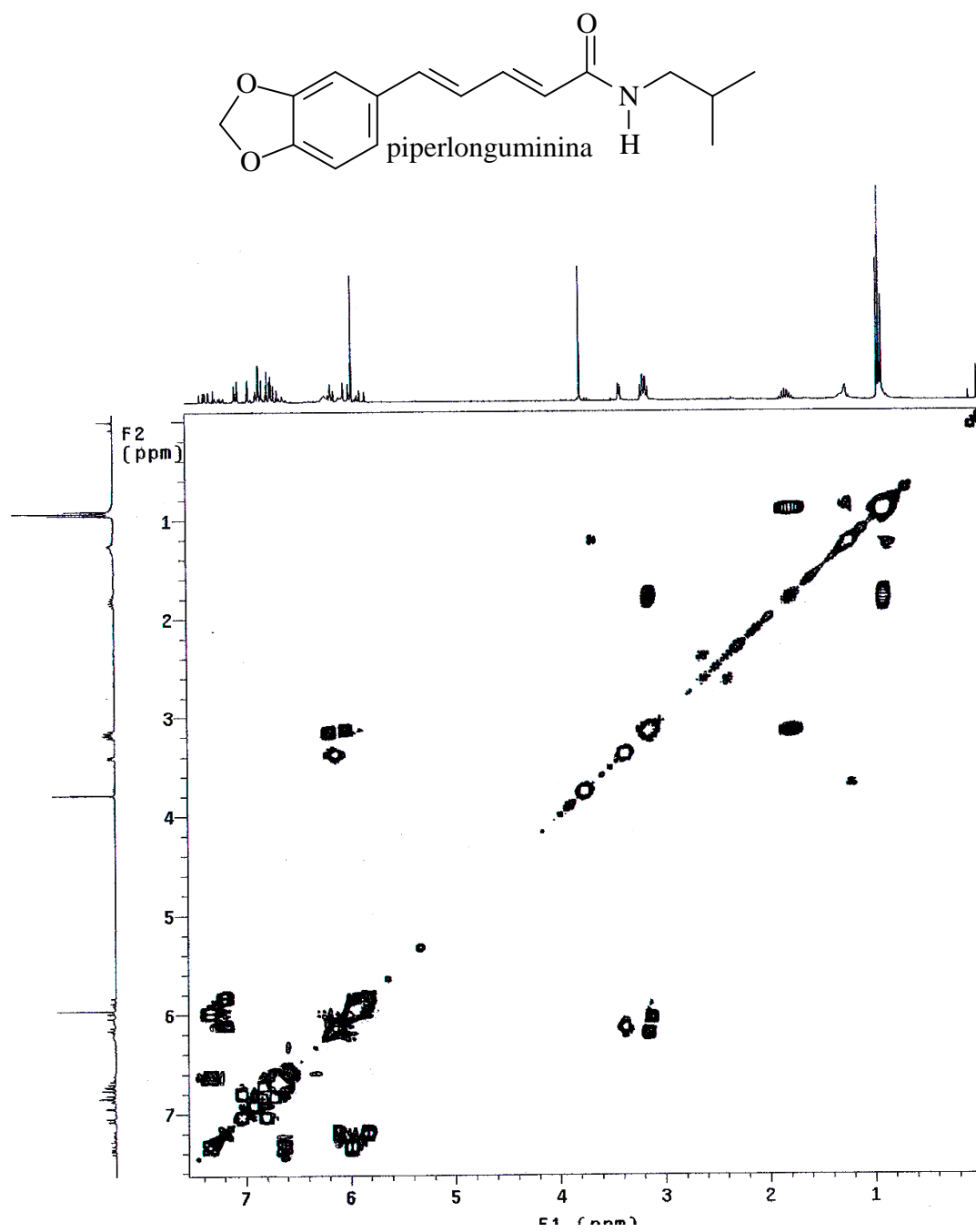


FIGURA 6- Espectro de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY da piperlonguminina. (300 MHz; CDCl_3).

É possível observar um grupamento metileno dióxido em δ 101,45, os sinais de 3 carbonos quaternários (C-4, C-3 e C-1) em δ 148,34, 148,34 e δ 130,98 respectivamente onde C-4 e C-3 são carbonos equivalentes equivalente e 3 carbonos metínicos (C-2, C-5 e C-6) em δ 105,73; 108,10 e 123,41 respectivamente, atribuídos ao anel aromático de acordo com seus típicos deslocamentos químicos. Os sinais apresentados para os carbonos C-3 e C-4 caíram em campo mais baixo que os carbonos C-1, C-2 e C-5 porque os mesmos se encontram desblindados pelo grupo metileno dióxido ligado ao C-3 e C-4 quaternário. Foi possível observar sinais referentes a 4 carbonos olefínicos (C-7) δ 139,00; (C-8) δ 124,41; (C-9) δ 140,01 e (C-10) δ 122,77 (tabela 5).

Esses deslocamentos em campo baixo se explicam pela ação do grupo carbonílico eletronegativo que tende a atrair elétrons para sua órbita. A estrutura possui C-11 carbonílico em δ 166,65 que foi observado em campo baixo devido a desblindagem pelo oxigênio a ele ligado. O deslocamento δ 47,26 foi atribuído ao C-1' metilênico e δ 28,77 ao C-2' metínico. Foi possível observar a presença do C-3' e C-4', equivalente, em δ 20,30 os últimos 4 caíram em campo alto pois os mesmos se encontram blindados de acordo a tabela 5, figura 7 e 8 .

TABELA 5- Dados de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT (75,5MHZ) em CDCl_3 , da piperlonguminina comparados com os valores de C para da piperlonguminina da literatura (75,5 MHZ), em CDCl_3 . deslocamentos químicos em ppm (δ).

C	Piperlonguminina	Piperlonguminina (literatura)
	^{13}C	^{13}C
1	130,98	130,90
2	105,73	105,73
3	148,34	148,22
4	148,34	148,22
5	108,10	108,51
6	123,41	123,22
7	139,00	138,82
8	124,41	124,68
9	140,01	141,02
10	122,77	122,59
11	166,65	166,17
1'	47,26	47,02
2'	28,77	28,66
3'	20,30	20,16
4'	20,30	20,16
CH ₃ -O-	101,45	101,31

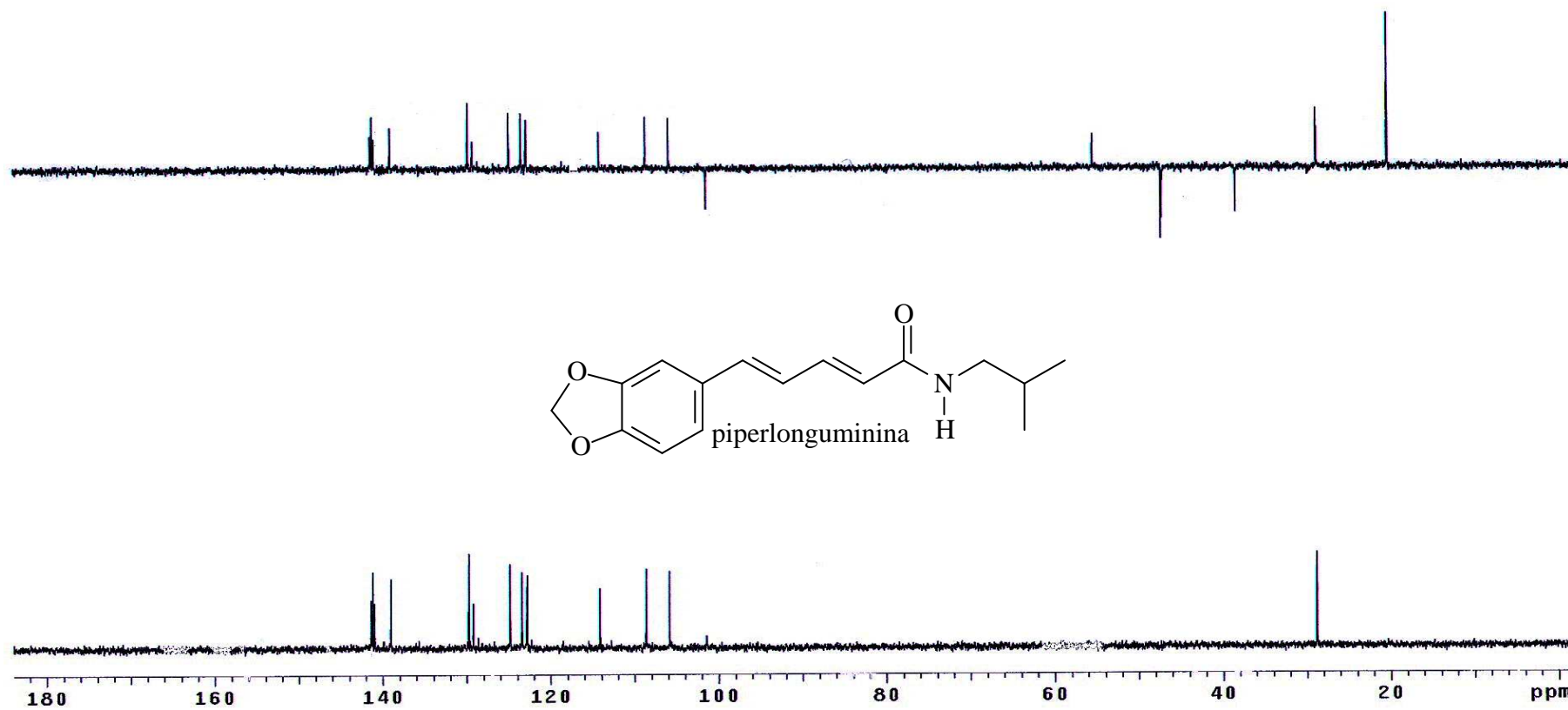


FIGURA 7- Espectro de RMN de DEPT 90° e 135° da Piperlonguminina 75,5 MHz; CDCl₂.

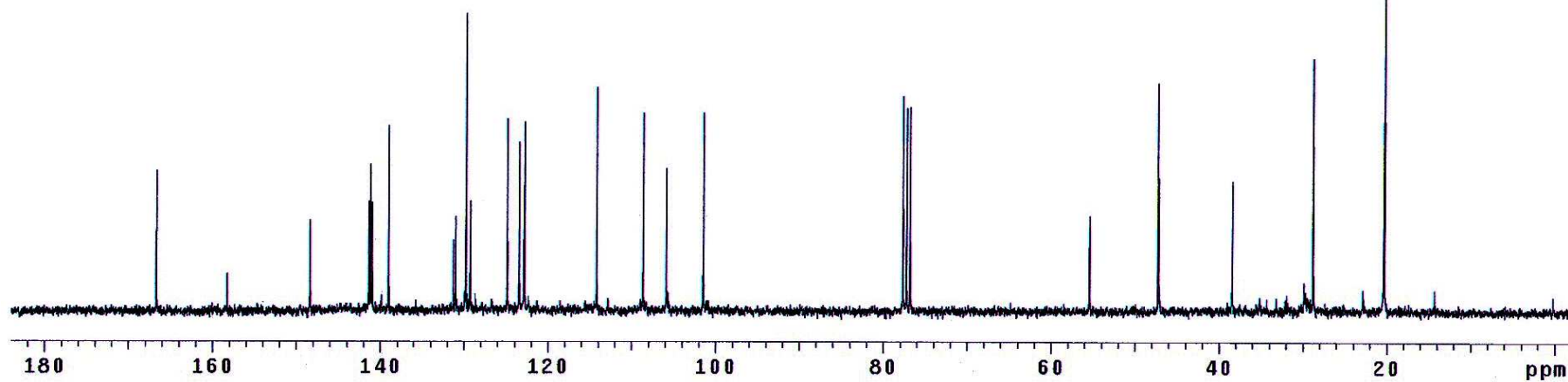
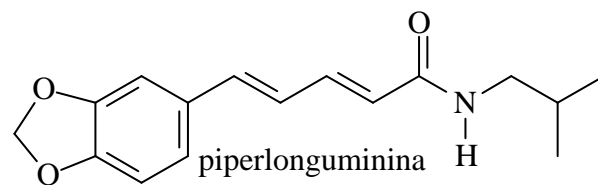


FIGURA 8- Espectro de RMN de ^{13}C da Piperlonguminina 75,5 MHz; CDCl_3 .

Através da análise dos espectros de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC- $^2J_{\text{CH}}$ e 3J , foram observadas as correlações entre os H-7, H-6, H-2 a curta distância, H-5 a longa distância com o C-1 confirmando sua atribuição, observou acoplamento do C-2 com o H-6 a longa distância, C-3 com H-2 a curta distância. Observou também a correlação entre os hidrogênios do grupamento metileno dióxido, H-2, H-6 a longa distância e H-5 a curta distância com o C-4. O H-1' correlacionou-se com o C-11 a curta distância. Todos os carbonos quaternários foram atribuídos inequivocamente e as demais correções podem ser visualizadas na tabela 6, e figura 9 e 10.

TABELA 6- Dados de RMN ^1H (300 MHz), em CDCl_3 e correlações observadas no $^1\text{H X }^{13}\text{C-HMQC-}^1\text{J}_{\text{CH}}$ e $^1\text{H X }^{13}\text{C-HMBC-}^n\text{J}_{\text{CH}}$ da piperlonguminina comparada com os valores da piperlonguminina (300MHz) da literatura, em CDCl_3 , Deslocamento químico em ppm e constante de acoplamento (J, entre parênteses) em Hz.

C	$^1\text{H X }^{13}\text{C-HMQC-}^1\text{J}_{\text{CH}}$		$^1\text{H X }^{13}\text{C-HMBC-}^n\text{J}_{\text{CH}}$	
	^{13}C	^1H	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
1	130,98		H-7; H-6; H-2	H-5
2	105,73	(J=6,97)		H-6
3	148,34		H-2	
4	148,34		H-5	H-2, H-6 O-CH ₂ -O
5	108,1	(J=6,97)	H-6	
6	123,41	(J=6,94)	H-5	H-2
7	139,00	(J=6,82)	H-6	H-9
8	124,41	(J=6,72)		H-6
9	140,01	(J=7,21)		
10	122,77	(J=5,83)	H-11	
11	166,65		H-1'; H-10	H-9;
1'	47,26	(J=3,125)	H-2'; H4'	
2'	28,77	(J=1,82)	H-3'	
3'	20,30	(J=0,94)	H-2'; H-4'	
4'	20,30	(J=0,94)	H-2'; H-3'	
NH		(J=5,57)		
O-CH ₃ -		(J=5,955)		
O-	101,45			

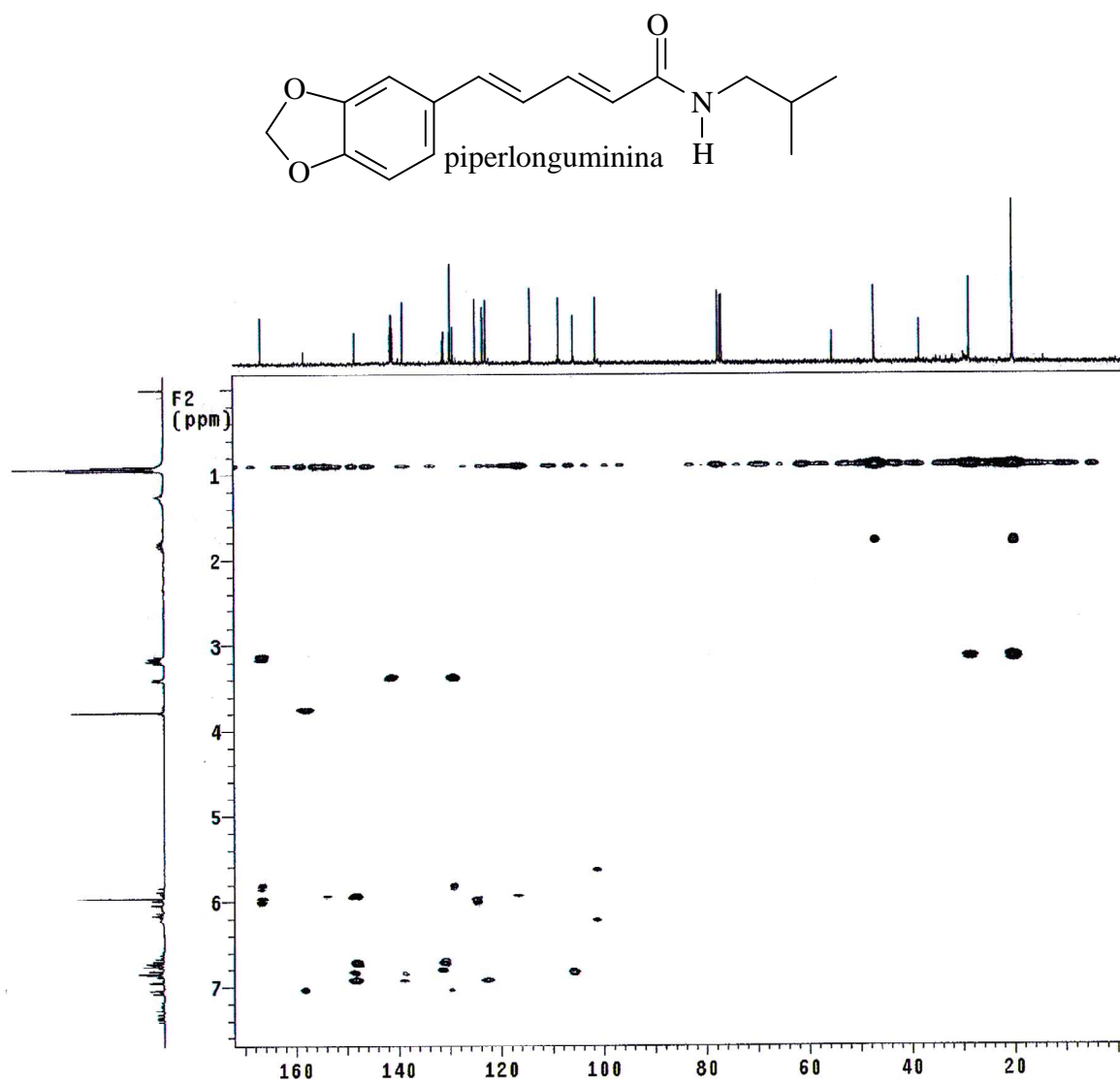


FIGURA 9- Espectro de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC da Piperlonguminina. 75,5 MHz; CDCl_3 .

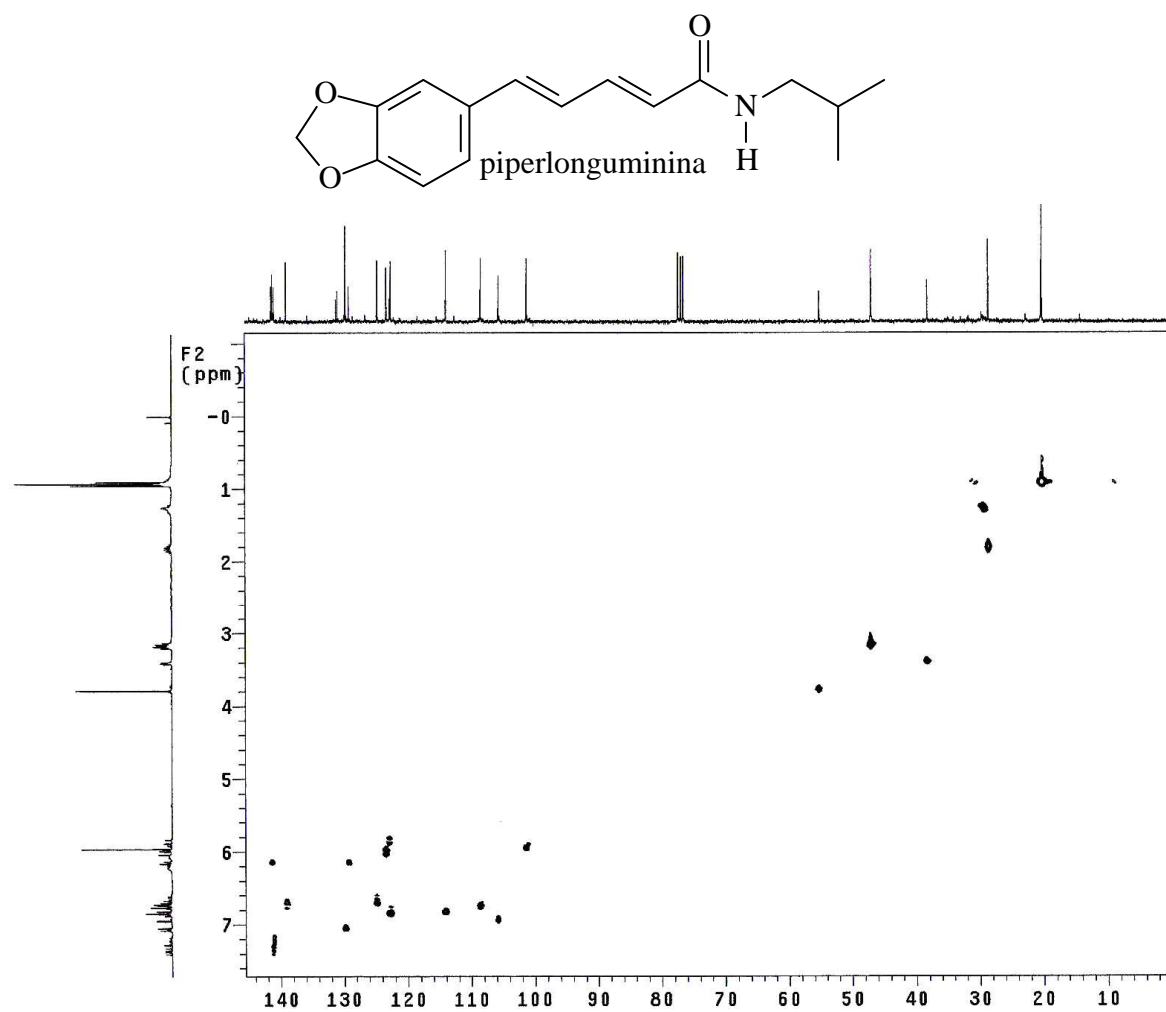


FIGURA 10- Espectro de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC da substância piperlonguminina. 75,5 MHz; CDCl_3 .

5.3 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DO ÓLEO ESSENCIAL POR CG-EM

As análises cromatográficas identificaram a maioria das substâncias da planta estudada. O cromatograma mostrou 44 substâncias, das quais 3 não foram identificadas. Nesta planta, as substâncias encontradas em maior quantidade foram δ -Amorfenol (16.5 %), *cis*-Muurolo-4(14),5-dieno (14.29 %) e γ - Muurolo (13.26%), os demais foram inferiores a 10%. No óleo obtido foram encontradas aproximadamente: hidrocarbonetos monoterpênicos (6.82%), monoterpênicos oxigenados (2.27%), sesquiterpênicos oxigenados (27.27%), hidrocarbonetos do sesquiterpênicos (52.27%), cetonas (4.54%) e substâncias não identificadas (6.82%); Tabela 7 e figura 11.

A cromatografia gasosa aliada a espectrometria de massas e o índice de Kovats demonstraram ser uma ferramenta importante na determinação dos constituintes dos óleos essenciais, isso justifica a grande eficiência em identificar mais que 96% dos óleos constituintes neste vegetal.

Nos estudos realizados por Topul et al., (2007), foram identificados 46 componentes do óleo essencial da *P. aduncum*, os maiores componentes foram: dillapiolo (43.3 %), em menor quantidade foi identificado β -cariofileno (8.3 %), piperitono (6.7 %) and α -humuleno (5.1 %).

Na análise do óleo essencial de *P. umbellata*, foram identificados 28 constituintes, sendo os constituintes majoritários o dillapiol (14,5%) e o apiol (46,6%). Constatou-se que o óleo essencial de *Piper hispidinervum* apresentou 82,5 % de safrol e em menores concentrações os monoterpênicos α -pineno (0,68%), δ -3-careno (1,31%) e α -terpinoleno (13,38%). Miranda (2002) trabalhando com o óleo

essencial de *Piper hispidinervum* coletadas na região amazônica (amazonas) encontrou um teor de safrol superior a 92%. O óleo essencial extraído de plantas desta região apresenta teores de safrol superiores a 90%, grandes variações foram encontradas nos óleos essenciais estudados, que pode ser decorrente da variação de fatores como sazonalidade, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta e fontes de nutrientes.

Estudos de Navickiene *et al.*, (2000) demonstram a atividade fungitóxica dos óleos essenciais extraídos das folhas, caule e frutos das seguintes espécies de pimentas *Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*; sobre *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*.

Um estudo com a *Piper divaricatum* por Almeida *et al.*, (2006) mostrou que na composição química do seu óleo essencial, os maiores foram: linalool (23,4%), beta-pineno (25,3%) e alfa-pineno (18,8%), enquanto que o óleo dos frutos apresentaram beta-pineno (18,0%), alfa-pineno (17,6%) e (E)-cariofileno (11,4%), mas foi possível observar também a presença do alfa-felandreno (4,60%), (E)-muurola-4(14),5-dieno (9,0%) e do (E)-cariofileno (11,4%).

Estudos realizados por diferentes autores mostram uma diversidade muito grande entre os óleos essenciais das diferentes espécies Piper, é possível verificar também que estes óleos essenciais possuem diferentes componentes majoritários, levando em consideração tais achados reforça cada vez mais a autenticidade do nosso estudo. Visto que os óleos identificados em demais espécies correspondem aos identificados na *P. ovatum*.

TABELA 7- Componentes do óleo essencial das folhas da *P. ovatum* Vahl.

pico	Substâncias químicas	TR	KI	KI*	Método de identificação
1	α -Pineno	8,78	930	939	RT GC MS
2	β -Pineno	12,64	1020	1024	RT GC MS
3	Silvestreno	12,81	1024	1030	RT GC MS
4	Terpinil acetato	26,89	1334	1349	RT GC MS
5	Silphiperfol-4,7(14)-diene	27,41	1348	1360	RT GC MS
6	α -Copaeno	28,53	1376	1376	RT GC MS
7	α -Dihidroionono	28,86	1384	1412	RT GC MS
8	Longifoleno	29,13	1390	1407	RT GC MS
9	β -Elemeno	29,22	1392	1390	RT GC MS
10	(E)-Cariofilleno	30,34	1419	1419	RT GC MS
11	β -Gurjuneno	30,72	1428	1433	RT GC MS
12	(E)- α -Ionono	30,95	1433	1430	RT GC MS
13	Aromadendreno	31,08	1436	1441	RT GC MS
14	<i>cis</i> -Calameneno	31,70	1448	1529	RT GC MS
15	α -Humuleno	31,98	1450	1460	RT GC MS
16	Allo-Aromadendreno	32,09	1459	1460	RT GC MS
17	NI	32,61	1470		
18	γ - Muuroleno	32,85	1476	1479	RT GC MS
19	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	32,96	1478	1466	RT GC MS
20	γ -Gurjunene	33,10	1481	1477	RT GC MS
21	<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	33,28	1485	1493	RT GC MS
22	δ - Cadineno	33,45	1489	1523	RT GC MS
23	α -Muuroleno	33,69	1494	1500	RT GC MS
24	γ -Cadineno	34,27	1508	1513	RT GC MS
25	δ -Amorfeno	34,67	1518	1511	RT GC MS
26	<i>trans</i> -Cadina-1,4-dieno	34,92	1525	1534	RT GC MS
27	α -Cadineno	35,11	1530	1538	RT GC MS
28	α -Calacoreno	35,30	1535	1545	RT GC MS
29	Selina-3,7(11)-diene	35,80	1548	1546	RT GC MS
30	<i>trans</i> -Dauca-4(11),7-dieno	36,20	1559	1557	RT GC MS
31	N.I.	36,83	1575		
32	β -Copaen-4 α -ol	36,99	1579	1590	RT GC MS
33	Guaiol	37,13	1582	1600	RT GC MS
34	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	37,56	1593	1619	RT GC MS
35	γ -Eudesmol	38,11	1608	1632	RT GC MS
36	<i>cis</i> -Cadin-4-en-7-ol	38,55	1620	1636	RT GC MS
37	N.I.	38,68	1624		
38	<i>epi</i> - α -Muurolol	39,08	1635	1642	RT GC MS
39	α -Muurolol	39,23	1639	1646	RT GC MS
40	α -Eudesmol	39,41	1644	1653	RT GC MS
41	α -Cadinol	39,54	1647	1654	RT GC MS
42	Bulnesol	40,14	1663	1671	RT GC MS
43	10-nor-Calamenen-10-ono	40,65	1677	1702	RT GC MS
44	7,14-anidro-Amorfa-4,9-dieno	42,68	1738	1756	RT GC MS

TR= Tempo de retenção; MS = Espectro de massa; GC= Cromatografia gasosa; KI= Índice de Kovats, Ki*=calculado usando Adams 2004.

5.4 EXTRAÇÃO EM FLUIDO SUPERCRÍTICO COM CO₂

Através desta técnica foi possível extrair uma mistura de ácidos graxos.

A extração que mostrou-se mais apropriada no estudo foi na condição de 40 °C e 200 Bar, visto que a quantidade extraída foi maior quando comparada com as demais condições, com rendimento de 1,21% (Tabelas 15 a 16). Outra vantagem observada foi que na primeira hora de extração obteve-se um aumento significativo na quantidade extraída (gráfico 1).

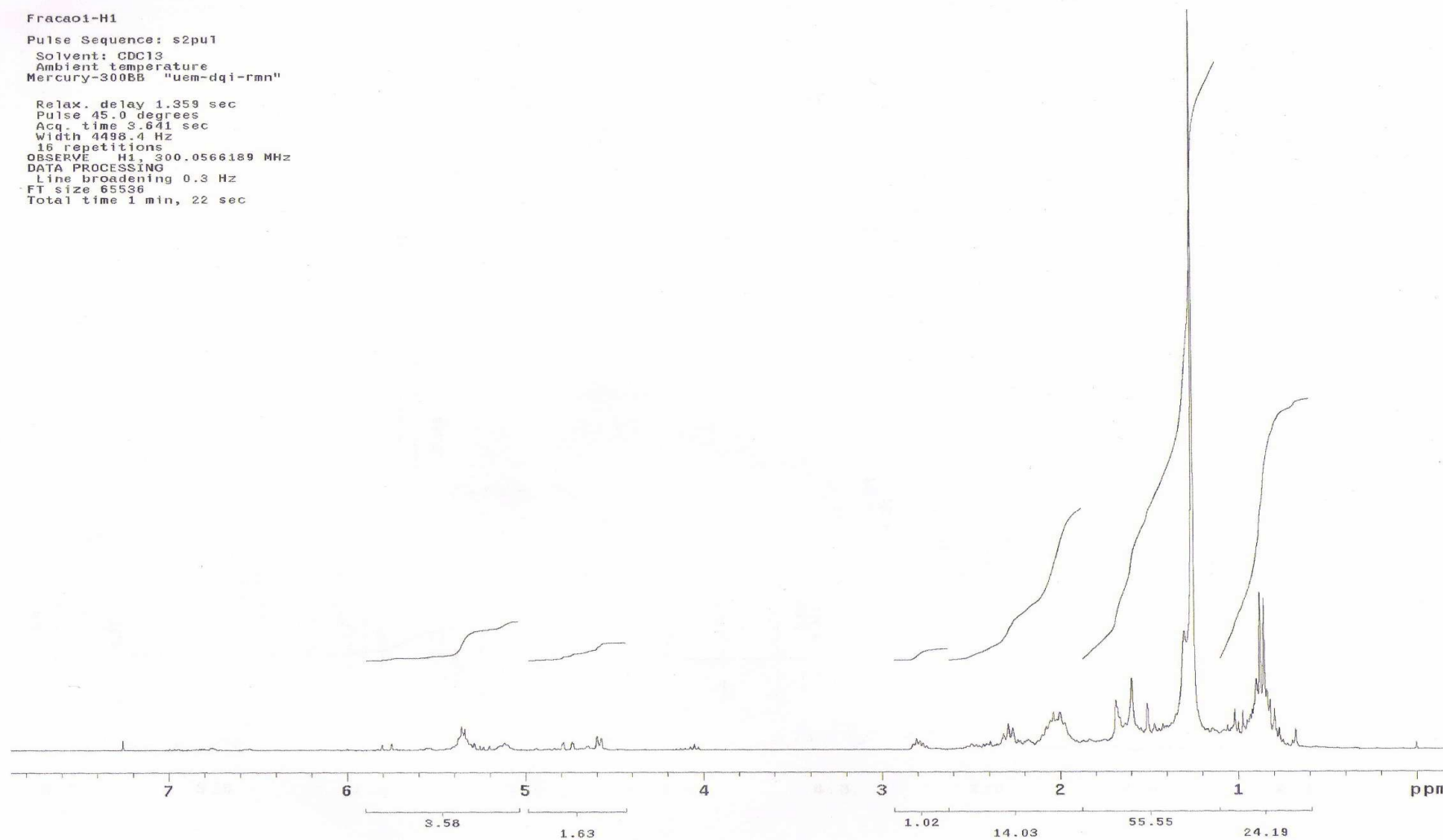
A grande desvantagem do processo é o custo da extração e os valores dos equipamentos usados. Pela extração em fluido supercrítico foram identificados 5 ácidos graxos, sendo o composto majoritário o ácido mirístico com 47,34 %, com prevalência de ácidos graxos poliinsaturados nas proporções de 14,21 % de ácido oléico e 14,15 % de ácido linoléico (tabela 8). Tais resultados foram confirmados pelos espectros de RMH de ¹H, (figura 12,13,14 e 15).

TABELA 8: Tabela de ácidos graxos da *Piper ovatum* vahl, extraído por fluido supercritical, identificado por CG-DIC.

Ác. graxo	%	Nome IUPAC	Nome popular
14:00	47,34	Ácido tetradecanóico	Ácido Mirístico
16:00	11,67	Ácido hexadecanóico	Ácido Palmitico
18:00	12,64	Ácido octadecanóico	Ácido Esteárico
18:1 n-9	14,21	Ácido 9-octadecanóico	Ácido Oléico
18:2 n-9	14,15	Ácido 9,12 octadecanodienóico	Ácido Linoléico

Fraçao1-H1
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4498.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0566189 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 65536
Total time 1 min, 22 sec



FI

GURA 12- Espectro de RMN da fração hexano, ¹H 300 MHz; CDCl₃, extraída por fluido supercrítico.

Fracao2-H1
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4498.4 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 300.0566174 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 65536
Total time 2 min, 45 sec

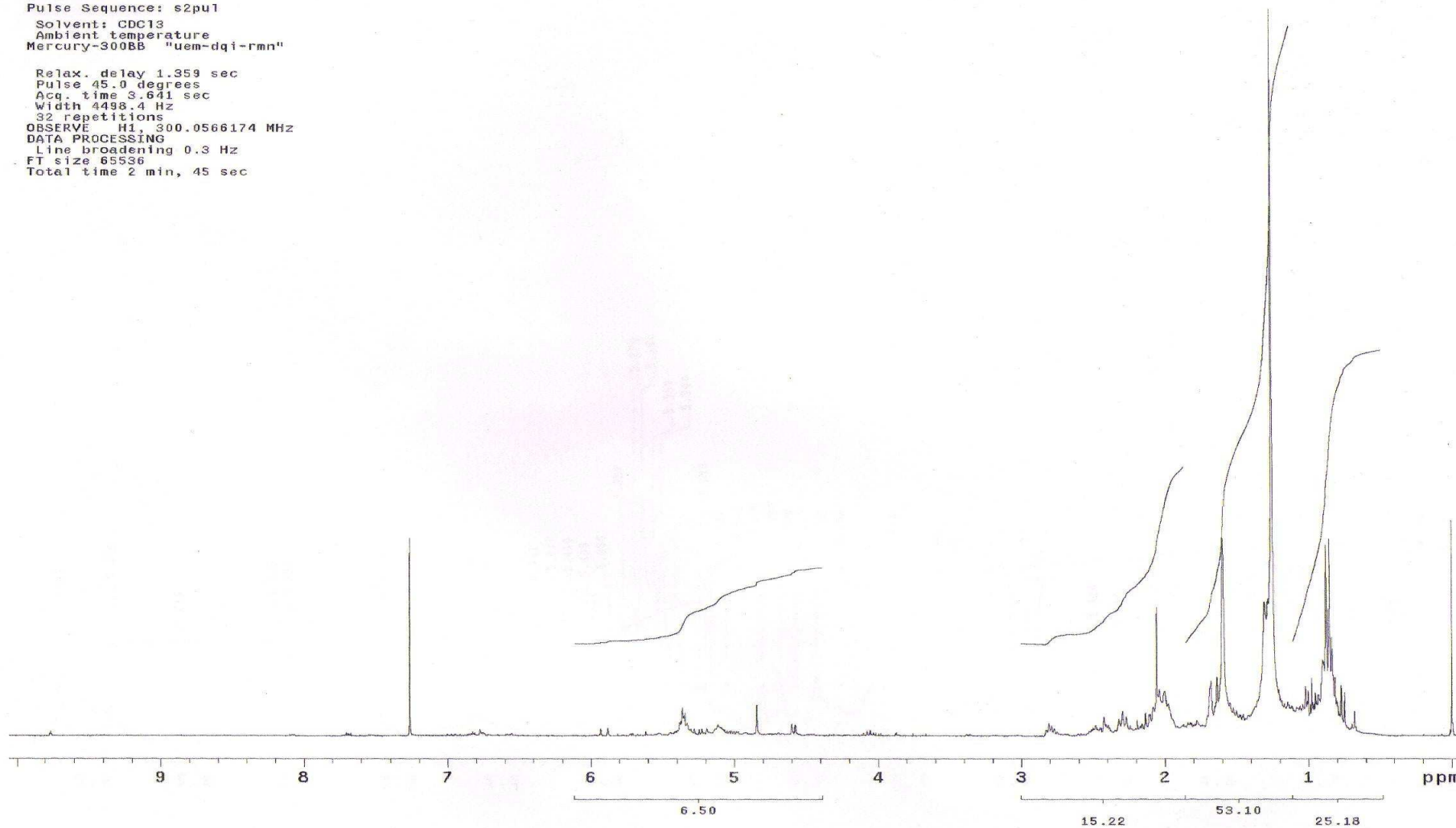


FIGURA 13- Espectro de RMN da fração diclorometano, ^1H 300 MHz; CDCl_3 , extraída por fluido supercrítico

Fracao3-H1
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4498.4 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0566112 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 65536
Total time 1 min, 22 sec

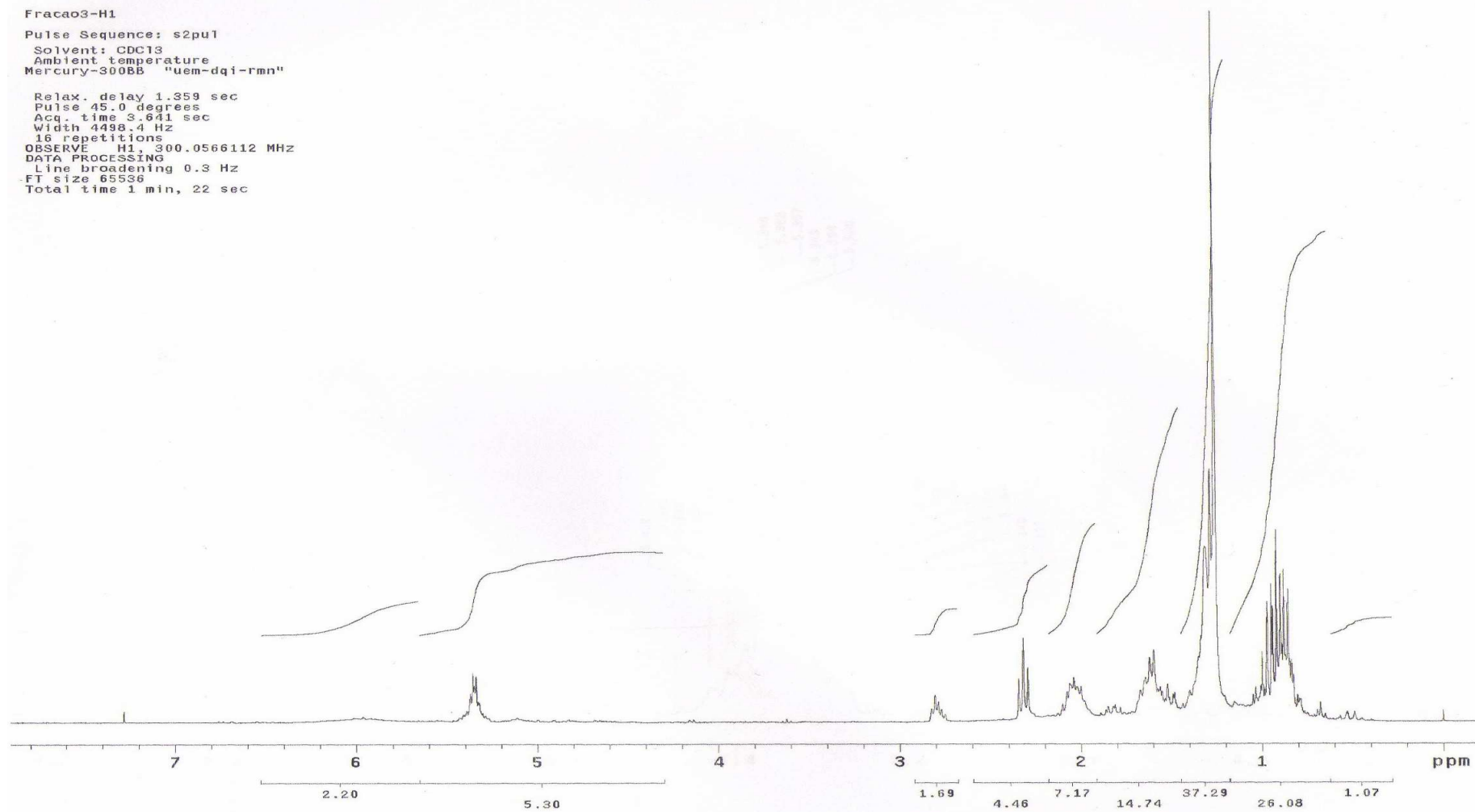


FIGURA 14- Espectro de RMN da fração acetato de etila, ^1H 300 MHz; CDCl_3 , extraída por fluido supercrítico

Fracao4-H1
Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDC13
Ambient temperature
Mercury-300BB "uem-dqi-rmn"

Relax. delay 1.359 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 3.641 sec
Width 4498.4 Hz
32 repetitions
OBSERVE H1, 300.0566155 MHz
DATA PROCESSING
Line broadening 0.3 Hz
FT size 65536
Total time 2 min, 45 sec

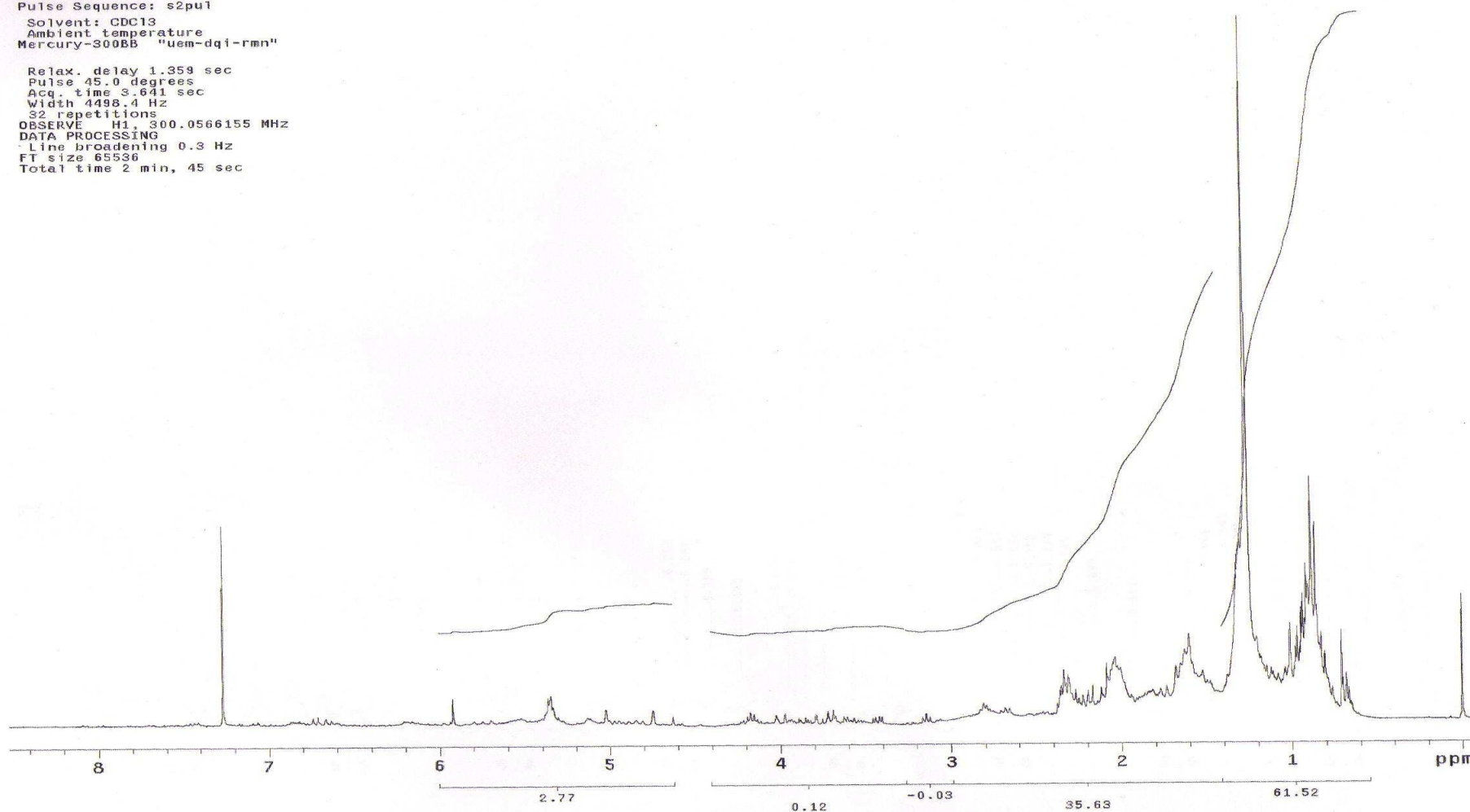


FIGURA 15- Espectro de RMN da fração metanol, ^1H 300 MHz; CDCl_3 , extraída por fluido supercrítico.

TABELA 9- Extração supercrítica representando a condição 40 °C e 150 bar.

Extração com dióxido de carbono										
	Massa	Volume			Volume		Massa			
tempo	do	da	Massa	Massa	Usado	Massa	do	Óleo/Massa	Vazão	Rendimento
(mim)	tempo	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	de CO₂	CO₂	CO₂	Media	%
	(mim)	(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)		(mL)	
30	30	37,452	387,03	0,25	0,00833	90,7	70,817	0,003530203	3,0	0,63
60	30	37,515	302,79	0,31	0,00210	84,2	65,802	0,004756651	2,8	0,79
90	30	37,524	218,98	0,32	0,00030	83,8	65,466	0,004918531	2,8	0,81
120	18	37,531	132,13	0,33	0,00039	86,9	67,841	0,00484955	4,8	0,83
168	30	37,539	269,81	0,34	0,00027	85,8	67,013	0,005028849	2,9	0,85
199	30	37,539	121,59	0,34	0,00027	85,8	67,013	0,005028849	2,7	0,85
229	30	37,539	32,05	0,34	0,00027	85,8	67,013	0,005028849	2,9	0,85

TABELA 10- Extração supercrítica representando a condição 40 °C e 150 Bar.

Extração com dióxido de carbono										
		Massa	do Volume	da Massa	Massa	Volume	Massa	Massa	Vazão	Rendimento
tempo	tempo	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	de CO₂	CO₂	do Oleo/Massa	Media	%
(mim)	(mim)	(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)	CO₂	(mL)	
30	30	37,021	389,13	0,26	0,009	94,6	73,918	0,003544441	3,2	0,63
60	30	37,071	303,68	0,31	0,002	85,5	66,747	0,004674314	2,8	0,75
90	30	37,099	206,57	0,34	0,001	97,1	75,855	0,00448219	3,2	0,81
120	27	37,115	110,98	0,36	0,001	95,6	74,668	0,004767743	3,5	0,85
147	30	37,202	288,11	0,44	0,003	78,2	61,100	0,007250388	2,6	1,06
177	30	37,202	199,01	0,44	0,000	89,1	69,598	0,006365043	3,0	1,06
207	30	37,202	110,91	0,44	0,000	89,1	69,598	0,006365043	3,0	1,06

TABELA 11- Extração supercrítica representando a condição 40 °C e 150 bar.

Extração com dióxido de carbono										
		Volume			Volume		Massa			
tempo	tempo	Massa do	da	Massa	Massa	Usado	de	Massa do	Oleo/Massa	Vazão
(mim)	(mim)	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	CO₂	CO₂	CO₂	CO₂	Media
		(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)	(g)	(g)	(mL)
										Rendimento %
30	30	36,629	364,1	0,29	0,010	98,6	76,980599	0,003741202	3,3	0,68
60	30	36,703	268,91	0,36	0,002	95,2	74,355994	0,004868471	3,2	0,86
90	30	36,738	202,53	0,40	0,001	66,4	51,851569	0,00765647	2,2	0,94
120	26	36,745	102,73	0,40	0,000	99,8	77,957015	0,005182343	3,8	0,96
146	30	36,751	279,89	0,41	0,000	85,7	66,919614	0,006126754	2,9	0,97
176	30	36,758	189,01	0,42	0,000	90,9	70,989313	0,005874124	3,0	0,99
206	30	36,759	101,01	0,42	0,000	90,9	70,989313	0,00588821	3,0	0,99

TABELA 12- Extração supercrítica representando a condição 20 °C e 150 bar.

Extração com dióxido de carbono										
		Massa	Volume			Volume		Massa		
		do	da	Massa	Massa	Usado	de	Massa	Oleo/Massa	Vazao
tempo	tempo	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	CO₂	do CO₂	CO₂	Media	Rendimento %
(mim)	(mim)	(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)		(mL)	
30,000	30	40,520	380,57	0,169	0,006	84,8	76,6766	0,0022	2,8	0,87
60,000	30	40,549	292,89	0,198	0,001	87,7	79,2994	0,0025	2,9	1,02
90,000	30	40,557	208,43	0,206	0,000	84,5	76,3872	0,0027	2,8	1,06
120,000	22	40,566	125,78	0,215	0,000	82,7	74,7502	0,00288	3,8	1,10
142,000	30	40,576	299,89	0,225	0,000	85,7	77,4815	0,0029	2,9	1,15
172,000	30	40,579	208,01	0,228	0,000	91,9	83,098	0,00274	3,1	1,17
202,000	30	40,580	105,01	0,229	0,000	91,9	83,098	0,00276	3,1	1,17

TABELA 13- Extração supercrítica representando a condição 20 °C e 150 bar.

Extração com dióxido de carbono										
						Volume		Massa		
tempo	do	Massa	do	Volume	da	Massa	Massa	Usado	de	Massa
(mim)	(mim)	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	CO₂	CO₂	do	Oleo/Massa	Vazão
		(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)	CO₂	Media	Rendimento
									(mL)	%
30	30	40,851	343,98	0,07	0,002	89,8	81,19869	0,000887	3,0	0,37
60	30	41,172	252,11	0,39	0,011	91,9	83,08892	0,00473	3,1	2,03
90	30	41,300	168,43	0,52	0,004	83,7	75,68173	0,006884	2,8	2,69
120	25	41,422	82,09	0,64	0,005	86,3	78,08749	0,008234	3,5	3,31
145	30	41,433	286,58	0,65	0,000	80,9	73,12223	0,008944	2,7	3,37
175	30	41,439	195,08	0,66	0,000	91,5	82,75428	0,007975	3,1	3,40
205	30	41,440	103,23	0,66	0,000	91,5	82,75428	0,007988	3,1	3,41

TABELA 14- Extração supercrítica representando a condição 40 °C e 200 bar.

Extração com dióxido de carbono										
		Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume
tempo	tempo	Massa	do da	Massa	Massa	Usado	Massa	do	Oleo/Massa	Vazao
(mim)	(mim)	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	de CO₂	CO₂	CO₂	CO₂	Media
		(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)	(g)	(g)	(mL)
										Rendimento
										%
30	30	40,854	342	0,184	0,006	96,1	80,77058618	0,002278057	3,2	0,94
60	30	40,866	250	0,196	0,000	92,0	77,33264573	0,002534505	3,1	1,00
90	30	40,880	157	0,210	0,000	93,0	78,17321797	0,002686342	3,1	1,07
120	26	40,887	399,84	0,217	0,000	90,8	76,34917622	0,002842205	3,5	1,11
146	30	40,888	298,05	0,218	0,000	101,8	85,56184793	0,002547865	3,4	1,11
176	30	40,889	201,87	0,219	0,000	96,2	80,84623768	0,002708846	3,2	1,12
206	30	40,890	101,01	0,220	0,000	96,2	80,84623768	0,002721215	3,2	1,12

TABELA 15- Extração supercrítica representando a condição 40 °C e 200 bar.

Extração com dióxido de carbono										
		Massa	Volume			Volume		Massa		
		do	da	Massa	Massa	Usado de	Massa	do	Oleo/Massa	Vazão
tempo	tempo	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	CO₂	CO₂	CO₂	Media	Rendimento
(mim)	(mim)	(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)		(mL)	%
30	30	41,088	365,78	0,219	0,007	93,0	78,1816237	0,0028012	3,1	1,03
60	30	41,118	276,43	0,249	0,001	89,4	75,1051293	0,0033154	3,0	1,17
90	30	41,122	184,21	0,253	0,000	92,2	77,5175716	0,0032638	3,1	1,19
120	28	41,136	93,84	0,267	0,001	90,4	75,962513	0,0035149	3,2	1,25
148	30	41,141	330,89	0,272	0,000	89,7	75,3825181	0,0036083	3,0	1,28
178	30	41,142	250,76	0,273	0,000	80,1	67,3550533	0,0040531	2,7	1,28
208	30	41,143	155,65	0,274	0,000	80,1	67,3550533	0,004068	2,7	1,29

TABELA 16- Extração supercrítica representando a condição 40 °C e 200 bar.

Extração com dióxido de carbono										
		Massa	Volume			Volume		Massa		
tempo	tempo	do	da	Massa	Massa	Usado	Massa do	Oleo/Massa	Vazao	Rendimento
(mim)	(mim)	Frasco	Bomba	Extraída	Pontual	de CO₂	CO₂	CO₂	Media	%
		(g)	(mL)	(g)	(g/mim)	(mL)	(g)		(mL)	
30	30	41,292	387,03	41,292	1,376	90,7	76,20628	0,541845	3,0	1,69
60	30	41,342	302,79	0,200	1,370	84,2	70,80981	0,002824	2,8	1,05
90	30	41,358	218,98	0,216	0,001	83,8	70,44836	0,003066	2,8	1,13
120	29	41,363	132,13	0,221	0,000	132,1	111,0396	0,00199	4,6	1,16
149	30	41,368	269,81	0,226	0,000	137,2	115,3265	0,00196	4,6	1,18
179	30	41,371	180,12	0,229	0,000	89,7	75,39092	0,003038	3,0	1,20
209	30	41,373	95	0,231	0,000	88,9	74,72687	0,003091	3,0	1,21

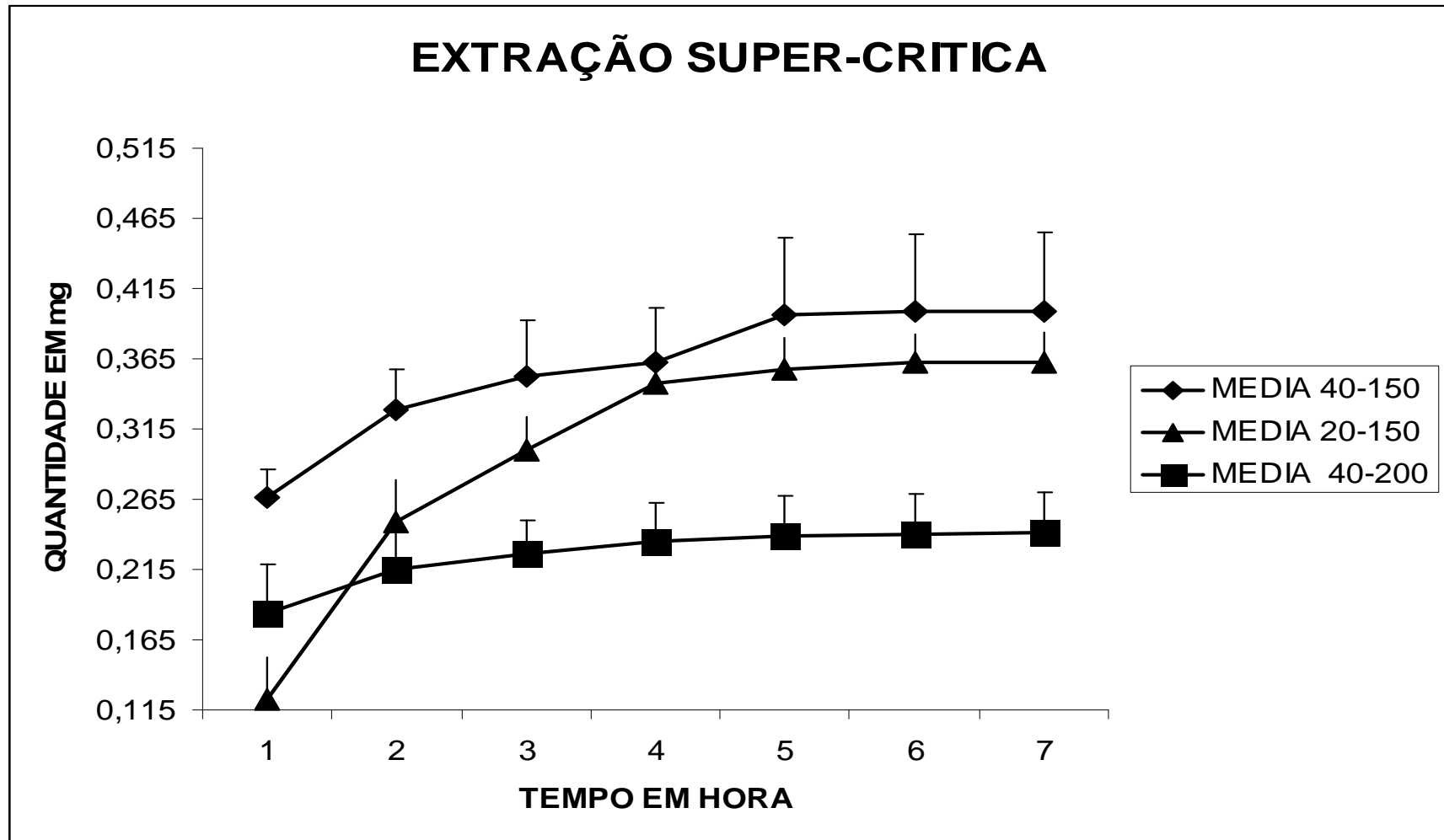


Gráfico 1- Curva de extração em fluido supercrítico das folhas da *Piper ovatum* em diferentes condições de temperatura e pressão.

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.5.1 Atividade contra bacterias e fungos

Os extratos obtidos a partir das folhas, caule e raiz de *Piper ovatum* mostraram-se ativos contra *Bacillus subtilis* ATCC 6623 com valores de CIM de 250 raiz, 500 caule e 250 folha $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, e também, contra *Candida tropicalis* ATCC 28707 com CIM de 500, 250 e 62,5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Piperovatina e piperlonguminina, apresentaram boa atividade, com CIM de 15,6 e de 31,2 $\mu\text{g/ml}$ contra *B. subtilis* e de 3,9 $\mu\text{g/ml}$ (para ambas) contra *C. tropicalis*. A piperlonguminina foi mais ativa que a piperovatina contra cepas de *C. tropicalis* isoladas de urina, com CIM de 31,25 $\mu\text{g/ml}$ (Tabela 8). A redução da densidade óptica a 530 nm e 495 nm indica a redução do crescimento de *B. subtilis* ATCC 6623 e *C. tropicalis* ATCC 28707 nas concentrações testadas de 0 a 125 $\mu\text{g/ml}$ de piperovatina e piperlonguminina (Figura 12).

TABELA 17- Concentração inibitória mínima dos extratos hidroalcoólico e aminas isoladas da *Piper ovatum* Vahl resultados expressados em µg/ml.

Microrganismo	Origem	Raiz	Caule	Folha	1	2	Flu	Tetr
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		1
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		12,5
<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		12,8
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6623	250	500	250	15,6	31,2		2,68
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		0,95
<i>S. epidermidis</i>	ATCC 12228	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		1,9
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 28707	62.5	250	500	3,9	3,9	1,9	
<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		7,8
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		1,9
<i>C. glabrata</i>	Urina	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		31,2
<i>C. krusei</i>	Urina	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		62,5
<i>C. tropicalis</i>	cateter				>1000	>1000		3,9
<i>C. tropicalis</i>	Urina				250	250		3,9
<i>C. tropicalis</i>	Orotraqueal				>1000	>1000		3,9
<i>C. tropicalis</i>	Urina				500	500		3,9
<i>C. tropicalis</i>	Urina				250	125		3,9
<i>C. tropicalis</i>	Urina				125	62,5		3,9
<i>C. tropicalis</i>	Urina				125	31,25		3,9
<i>C. tropicalis</i>	Urina				250	250		3,9

1 (piperovatina), 2 (piperlonguminina), Flu (fluconazol) eTetra (tetraciclina).

TABELA 18- Atividade antifúngica do óleo essencial da *Piper ovatum* Vahl. Resultados do halo em mm de diâmetro.

Microrganismos	Origem	Óleo essencial	Nistatina
<i>C. tropicalis</i>	ATCC 28707	22,6 ± 3,1	32 ± 2,7
<i>C. tropicalis</i>	Cateter	14,3 ± 1,1	27 ± 0,8
<i>C. tropicalis</i>	Urina	18,7 ± 2,1	30 ± 0,3
<i>C. tropicalis</i>	Orotraqueal	13,8 ± 0,8	23 ± 0,7
<i>C. tropicalis</i>	Urina	16,0 ± 1,0	25 ± 1,3
<i>C. tropicalis</i>	Urina	11,9 ± 1,1	35 ± 0,42
<i>C. tropicalis</i>	Urina	10,0 ± 1,0	34 ± 1,2
<i>C. tropicalis</i>	Urina	12,8 ± 1,7	32 ± 2,1
<i>C. tropicalis</i>	Urina	14,0 ± 0,7	26 ± 0,7

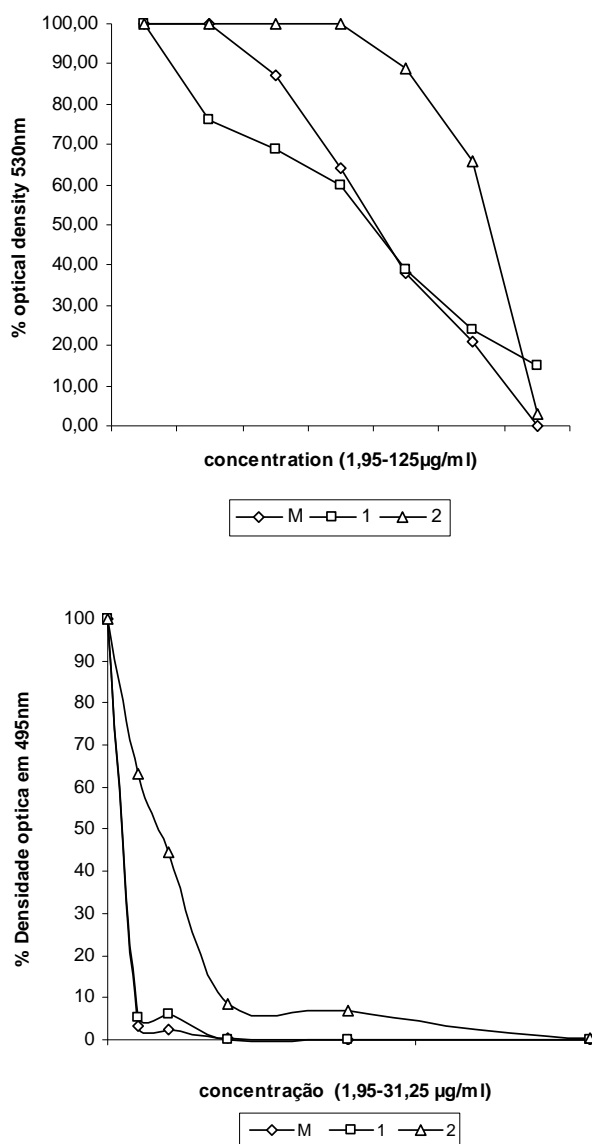


FIGURA 16-Inibição do crescimento *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *C. tropicalis* ATCC 28707, de acordo com a densidade optica 530 nm e 495 nm, respectivamente. M (piperovatina e piperlonguminina), 1 (piperovatina) e 2 (piperlonguminina).

Além dos extratos hidroalcoólicos, também foi extraído o óleo essencial das folhas de *P. ovatum*, que foi testado através do ensaio de difusão em ágar, sendo ativo contra *C. tropicalis* ATCC 28707, o alo foi de $22,6 \pm 3,1$ mm e contra as cepas isoladas da urina o melhor resultado observado foi de $18,7 \pm 2,1$ mm (tabela 9).

A aderência do microrganismo ao tecido ou as células precede o processo infeccioso, entretanto a colonização não significa infecção. Para analisar o efeito de piperovatina e piperlonguminina sobre a aderência de *C. tropicalis*, diferentes concentrações das aminas foram misturadas ao inóculo e, após 1h de incubação a 37°C, foram transferidas para a placa de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após o contato por 1 h com as lamínulas estas foram lavadas com PBS e observadas em microscópio óptico invertido. Na concentração de 10 µg/ml de cada amida ocorre a diminuição de células aderidas na lamínula de vidro, quando compara às células controle, que não sofrem tratamento. Verificou-se que as aminas isoladas reduziram a aderência dos microrganismos analisados, estes resultados são de grande importância clínica, visto que um dos fatores de virulência dos microrganismos patogênicos é a aderência.

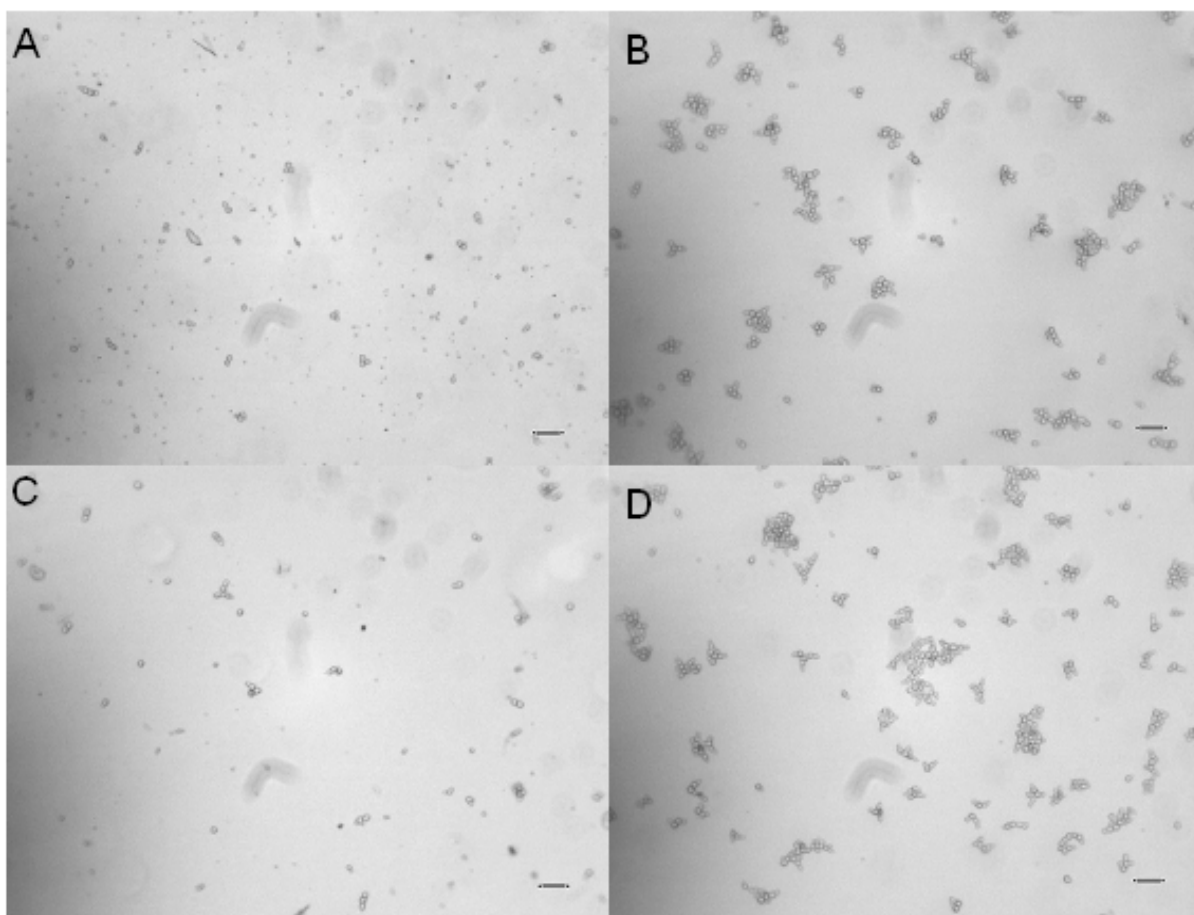
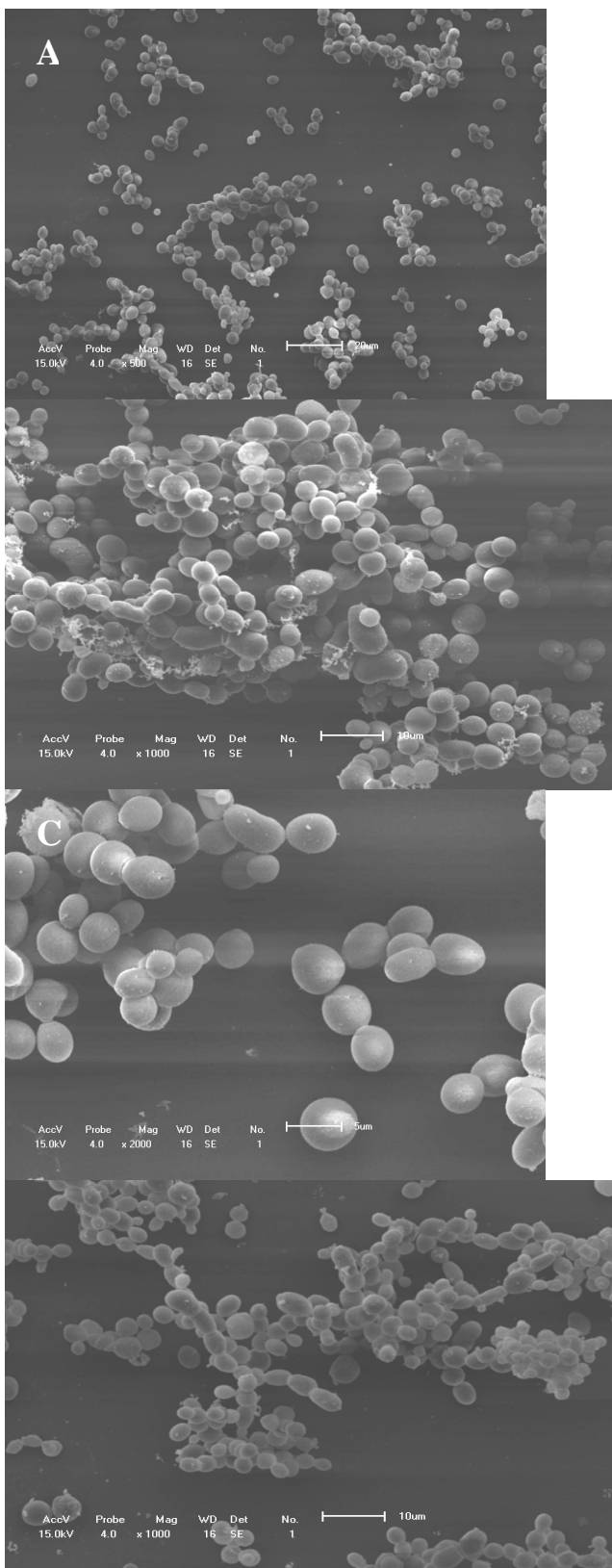


FIGURA 17 Ensaio de inibição da aderência. **A e C**, *C. tropicalis* tratado com 10 µg/ml de piperovatina e piperlonguminina, respectivamente **B e D**.

A microscopia eletrônica de varredura (figura 14) foi utilizada para verificar possíveis alterações morfológicas em *C. tropicalis* tratadas com piperovatina, piperlonguminina e a mistura dessas duas aminas. Neste experimento não foi verificada nenhuma alteração morfológica. Este achado em nenhum momento desabona ou condena os demais resultados anteriores, outras técnicas deverão ser realizadas para comprovar o mecanismo de ação destas substâncias.



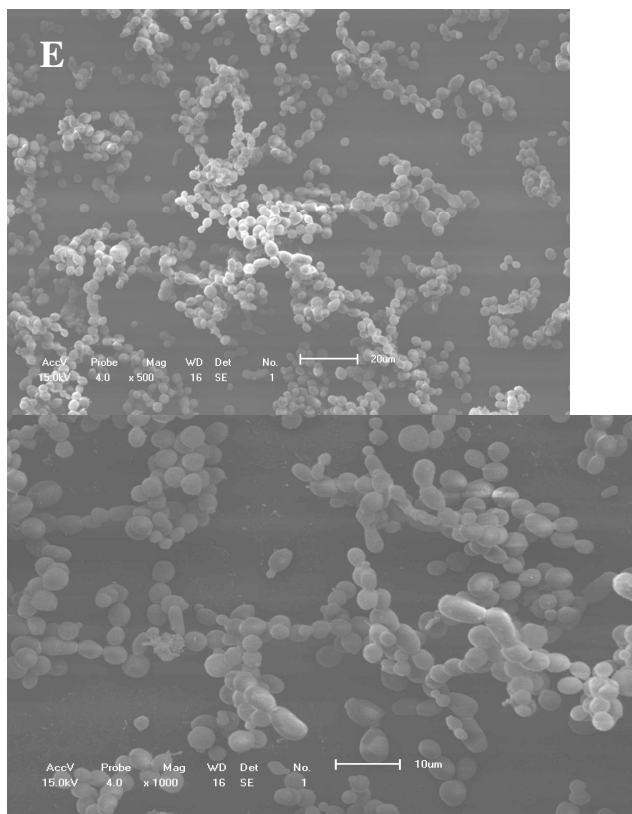


FIGURA 18 Microscopia eletrônica de varredura. A, B e C) *Candida tropicalis* sem tratamento (células controle). D e *C. tropicalis* tratadas com 3,9 µg/ml de piperovatina. (E e F) *C. tropicalis* tratadas com a mistura de piperovatina e piperlonguminina.

Vários trabalhos mostram atividade antifúngica de substâncias extraídas de plantas, porém poucos mostram alterações morfológicas dos fungos. Neste trabalho, a concentração testada não provocou alterações morfológicas visíveis nas células, talvez uma alternativa fosse tratar as células com uma concentração um pouco maior para verificar se ocorre alterações. Nakamura et al., (2004) mostrou alterações como sítios de brotamentos irregulares em diferentes espécies de *Candida* provocadas por óleo essencial de *Ocimum gratissimum*.

Há muitos trabalhos sobre atividade antimicrobiana, incluindo *screening* de plantas na pesquisa por propriedades antimicrobianas. As 16 espécies medicinais siberianas foram testadas e 12 delas apresentaram efeito

antimicrobiano (koskoska, 2005). Extratos hidroalcoólicos obtidos de *Jatropha elliptica*, *Schinus terebinthifolius*, *Erythrina mulungu*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Serjania lethalis* and *Lafoensia pacari* apresentaram atividade antimicrobiana (LIMA, 2006). A atividade antimicrobiana de *Hydnophytum formicarum* Jack foi investigada contra 27 cepas e o extrato acetato de etila apresentou efeito inibitório contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Prachayasitikul, 2008). Flavonóides isolados de *Eysenhardtia texana* e de *Vitex negundo* apresentaram atividade antifúngica contra *Candida* sp. Kaempferol e derivados também demonstraram atividade contra bactérias e leveduras.

Taninos extraídos de *Stryphnodendron adstringens* inibem a aderência de leveduras a células Vero e vidro (ISHIDA et al., 2006). Uma proteína antifúngica de 30 kDa isolada de sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*) inibe a aderência de *C. albicans* em vidro (MINCOFF et al., 2006).

5.5.3 Atividade antileishmania

Foi possível verificar que a piperlonguminina apresentou maior efeito contra a forma promastigota em relação a amastigota, uma baixa toxicidade também foi verificadas para ambos. Esta droga aparentemente parece segura visto que o índice de seletividade foi bastante alto (tabela 10).

A leishmaniose acomete milhões de pessoas em todo mundo principalmente países em desenvolvimento, com baixas políticas preventivas, desmatamento em massa tal como Brasil. Esta doença é responsável por altas taxas de mortalidade constituindo um grave problema de saúde pública (GENARO 1998 e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Os resultados

conseguidos neste trabalho mostram que no futuro seus extratos ou substâncias purificadas podem ser usados terapêuticamente. Os medicamentos usados atualmente para leishmanioses são usados a mais de 50 anos, estes são derivados dos antimoniais pentavalente (CROFT, 2003; GENARO, 1998; RODRIGUES SILVA, 2006).

Os antimoniais são drogas altamente tóxicas, muitos pacientes são intolerantes à mesma, podendo ocorrer toxicidade cardíaca e renal, muitas vezes pode levar à morte. É necessário a busca de novos agentes antileishmania com a finalidade de se evitar os danos causados pelas drogas usadas atualmente (GREVELINK 1996). Grande porcentagem dos pacientes que usam antimoniais e anfotericina B nem sempre responde ao tratamento (RODRIGUES SILVA, 2006). A busca de novas drogas fitoterápicas tem aumentado ao longo do tempo, pois a diversidade molecular que os mesmos oferecem é muito vasta, no entanto, no Brasil essa busca é dificultada pela falta de investimentos, portanto mais investimentos devem ser feitos nesta área com finalidade de encontrar drogas menos tóxicas, altamente efetivas, tratamento de baixo custo e de preferência com um curto tempo da terapêutica.

Apesar de o Brasil possuir a maior flora do mundo, o mesmo não vem se destacando na descoberta de novas moléculas com atividade terapêutica. Isto é muito importante, pois as mesmas podem ser usadas como fármacos ou serem modificadas estruturalmente pela química farmacêutica e em seguida avaliar se o efeito biológico aumentou ou diminuiu. Através da química farmacêutica estas moléculas podem ser sintetizadas em larga escala, atendendo a demanda de forma não danosa ao meio ambiente e, assim, preservando a espécie vegetal.

TABELA 19- Efeito do extrato hidroalcoólico (HE); piperlonguminina (2) no crescimento de *L. amazonensis* na forma promastigota (PRO), forma amastigota (AMA), citotoxicidade em células Vero (VERO) e Macrófagos (MF).

	IC50 (µg/ml)		CC50 (µg/ml)		SI			
					VERO (µg/ml)		MF(µg/ml)	
	PRO	AMA	VER	MF	PRO	AMA	PRO	AMA
			O					
HE	60	78,5	520	722	8,7		12,03	
2	2,5	9,0	326	839	130	36,22	335,6	93,22

5.6 ANÁLISES DAS AMINAS PIPEROVATINA E PIPERLONGUMININA POR UV

Esta análise foi realizada apenas para verificar qual o comprimento de onda que cada substância absorve melhor, no entanto observamos que o comprimento em 280 nm, possibilita analisar ambas as substâncias. Assim, que foi determinado este comprimento ideal partimos então para a análise em HPLC (figuras 15 e 16).

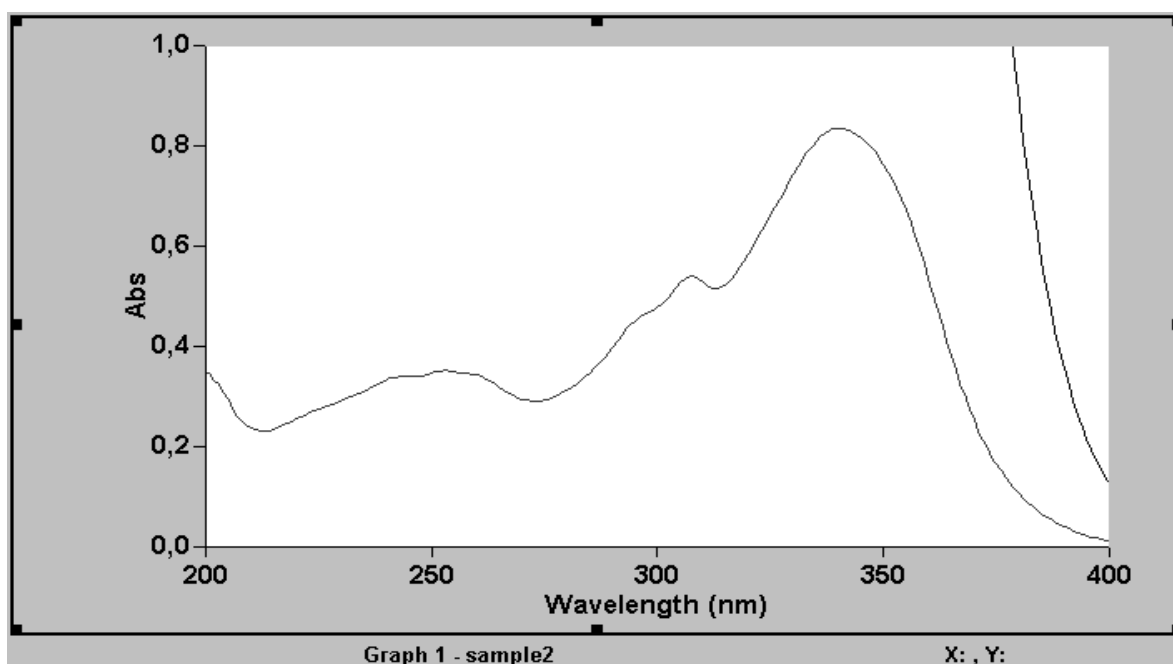


FIGURA 19- Análise de absorvância da piperovatina no ultravioleta, no comprimento de onda de 200 a 400 nm.

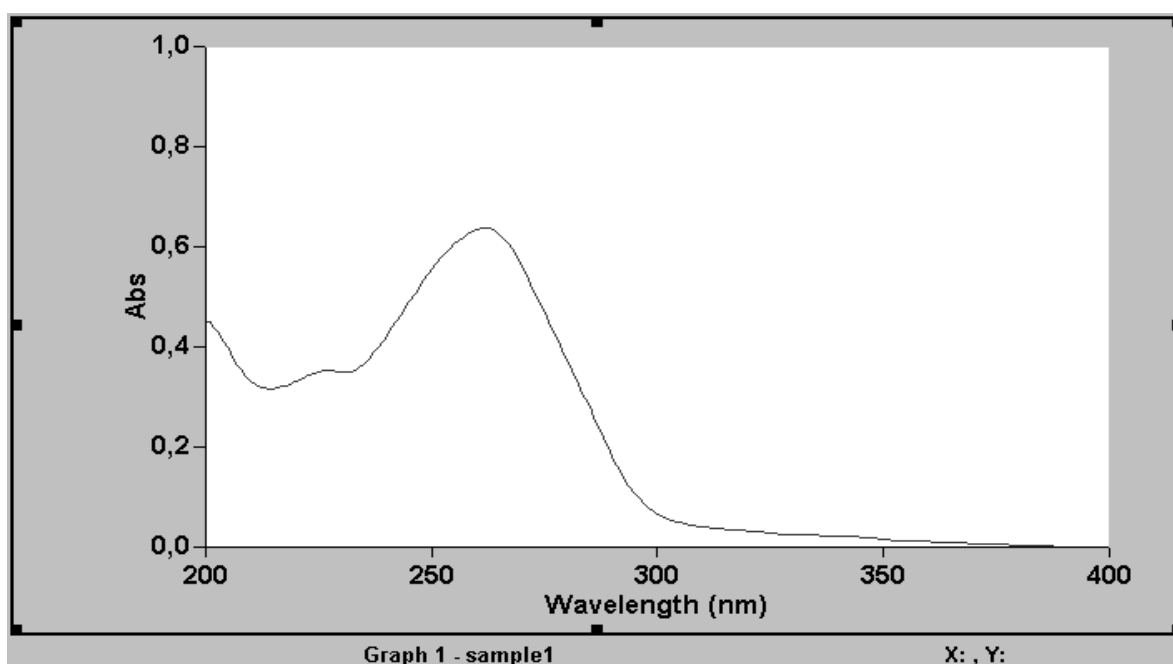


FIGURA 20- Análise de absorvância da piperlonguminina no ultravioleta, no comprimento de onda de 200 a 400 nm.

5.7 ANÁLISE POR CLAE

Na otimização das condições cromatográficas para a quantificação das aminas (piperovatina e piperlonguminina) dos extratos de *P. ovatum*, buscou-se a obtenção de cromatogramas com boa resolução dos picos presentes, dentro de um curto tempo de análise. No intuito de atingir este objetivo foram realizadas diversas análises com o extrato bruto das folhas, estas tentativas têm como finalidade determinar qual seria a melhor fase móvel, melhor detector, melhor comprimento de onda UV, temperatura de forno ideal e por fim melhor método a ser usado na validação.

O primeiro passo neste experimento foi determinar o tipo de coluna que melhor separa as aminas isobutilínicas, ao analisar as características químicas destas substâncias optamos por usar uma coluna de fase reversa.

Os sistemas eluente foram testados os métodos isocrático e gradiente, no qual se utilizou fase móvel acetonitrila/água em diferentes proporções. O emprego do método gradiente/isocrático resultou numa melhor separação das substâncias neste pode observar-se que as mesmas apresentaram uma melhor separação, mas não basta qualquer gradiente, dentre estes o melhor foi mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 30 minutos e 60-40 isocrático por 10 minutos (figura 28).

Devido à complexidade de execução da metodologia que emprega CLAE com derivatização destas substâncias, procurou-se desenvolver um método cromatográfico mais simples, utilizando-se coluna em fase reversa e detecção UV em baixo comprimento de onda. Para definir este comprimento de onda foi realizada uma varredura em vários comprimentos no aparelho de UV.

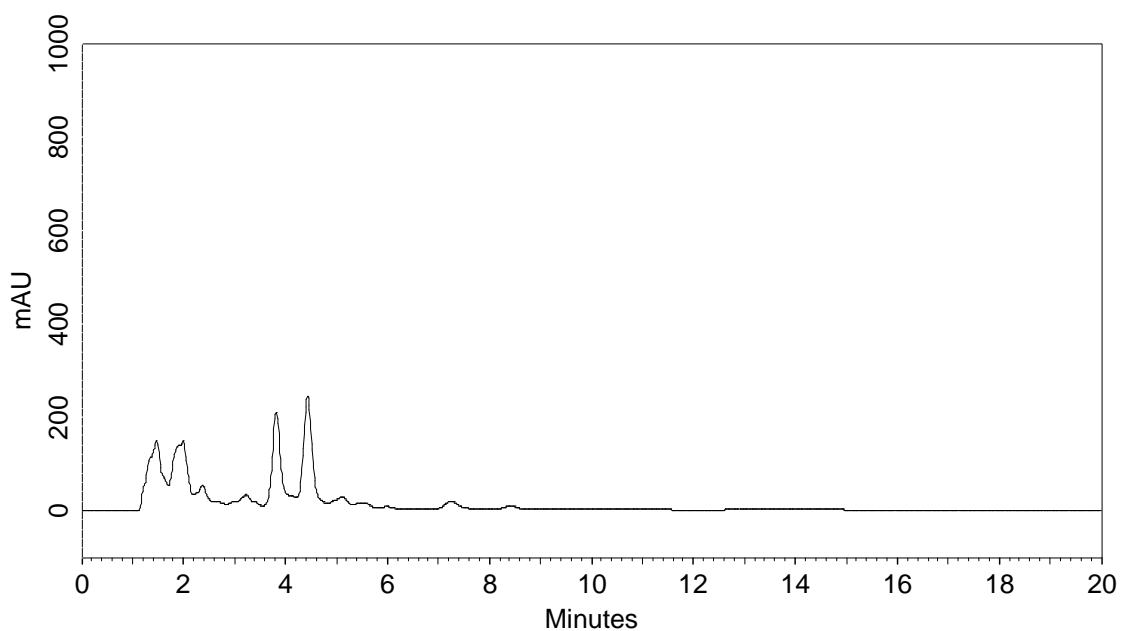


FIGURA 21- Cromatogramas do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- acetonitrila/água (50-50, v/v) isocrático; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.

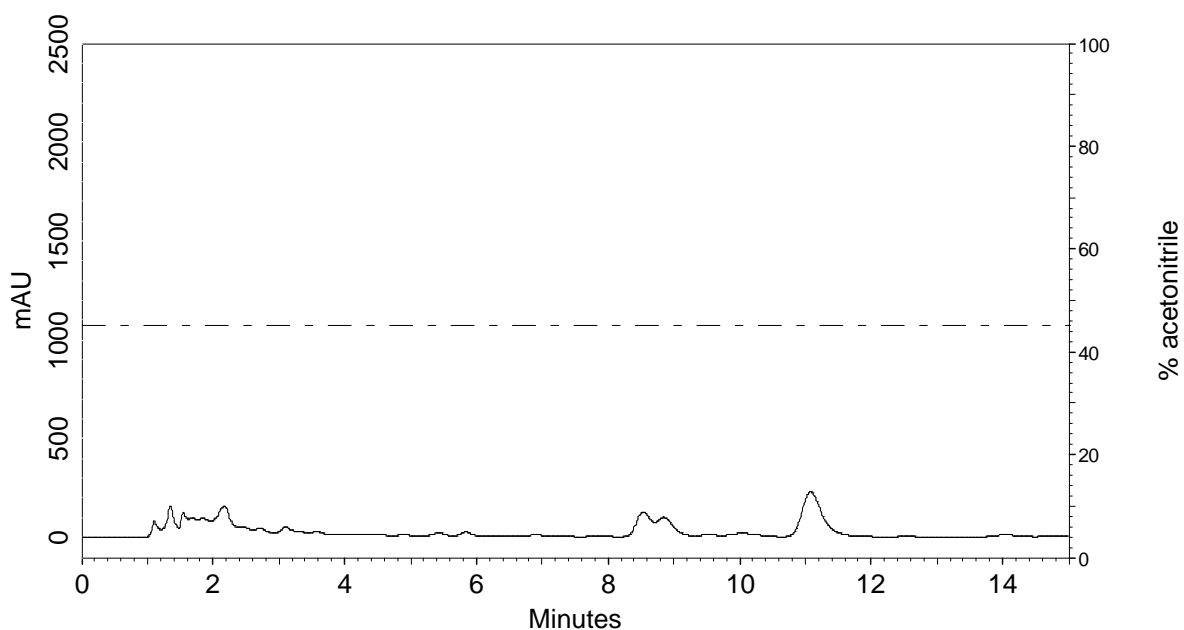


FIGURA 22- Cromatogramas do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- acetonitrila/água (45-55, v/v) isocrático; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 254 nm.

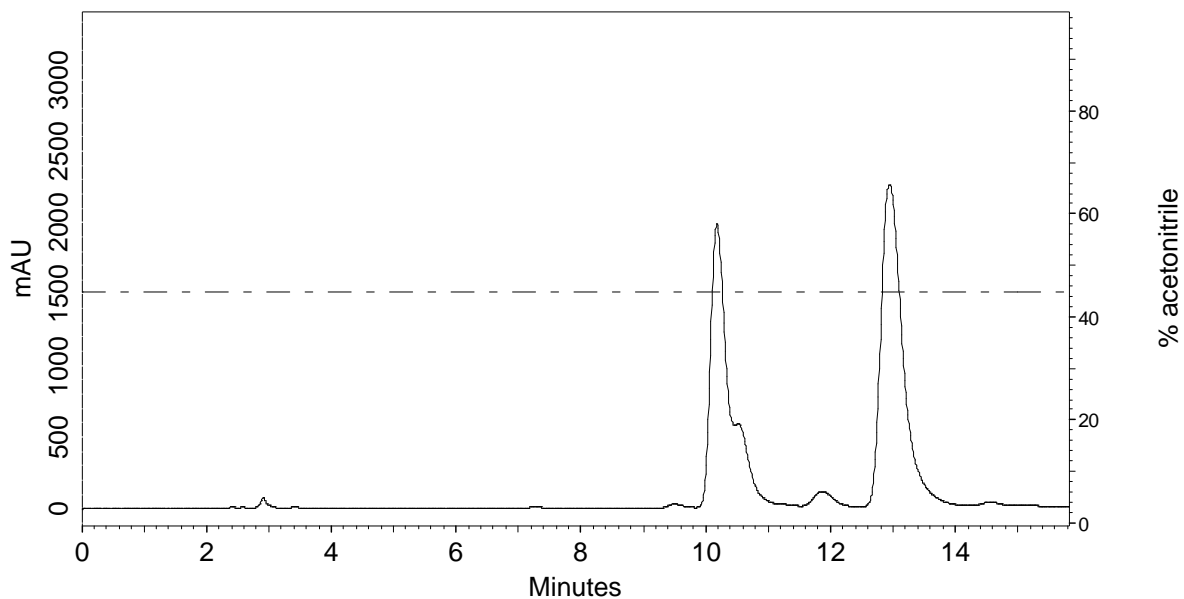


FIGURA 23- Cromatogramas do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- acetonitrila/água (45-55, v/v) isocrático; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 270 nm.

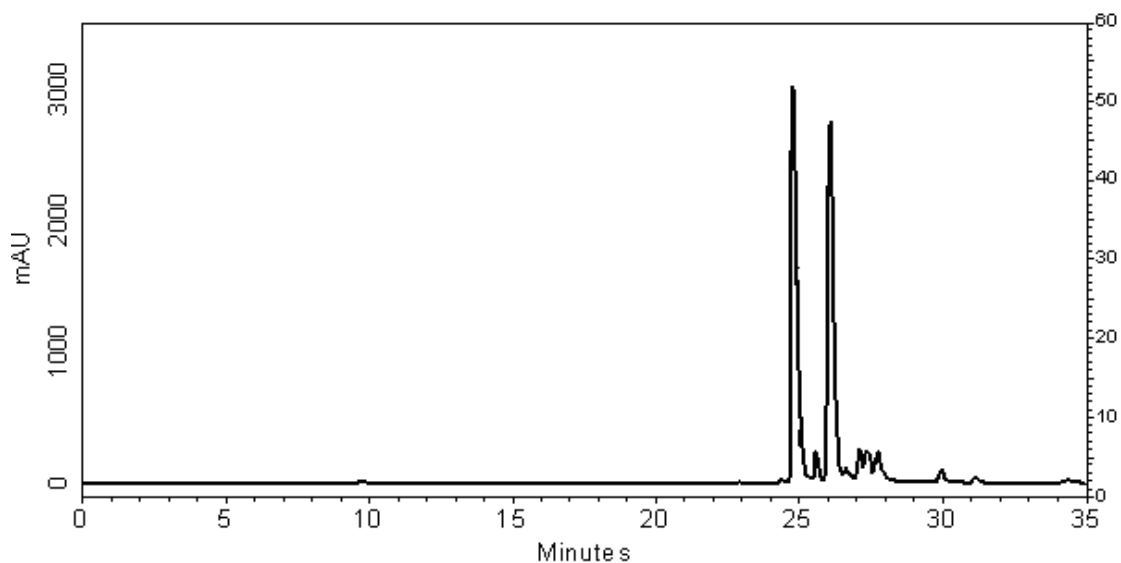


FIGURA 24- Cromatogramas do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 35 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.

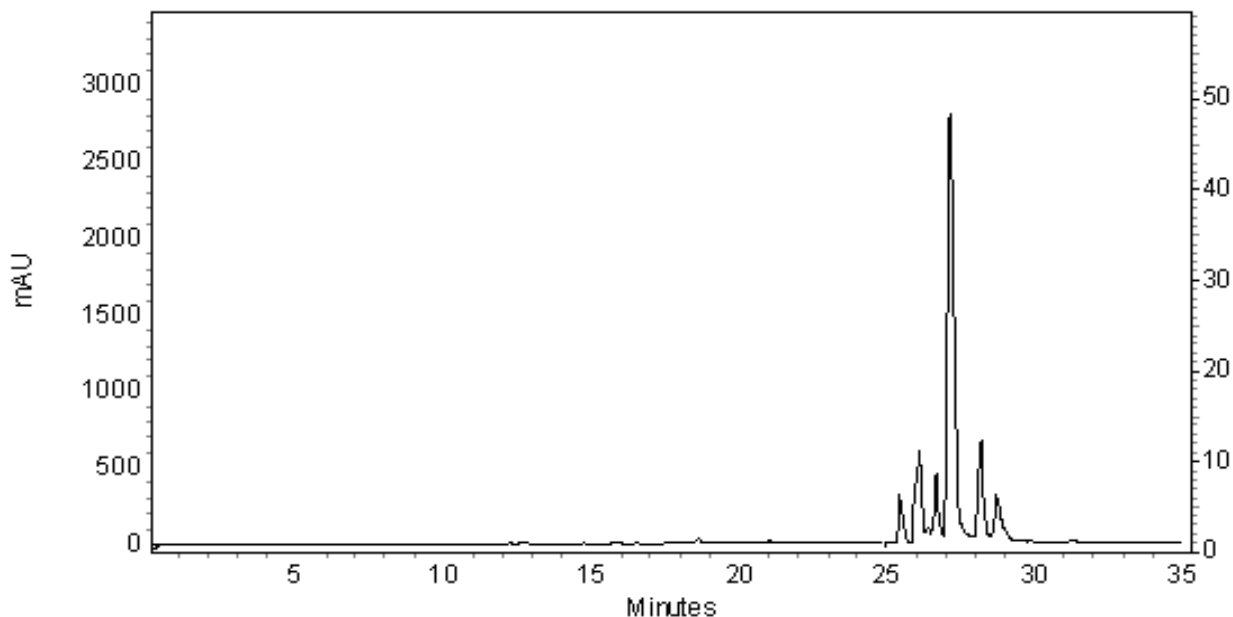


FIGURA 25- Cromatogramas do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 40 em gradiente por 35 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 320 nm.

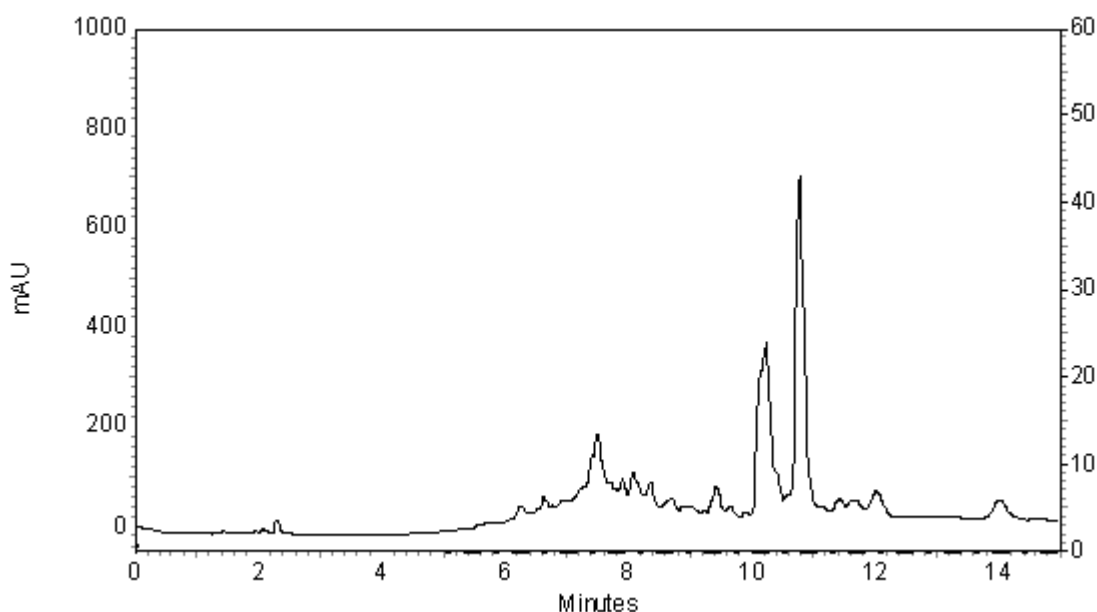


FIGURA 26- Cromatogramas do extrato das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 5 minutos; em seguida isocrático ate 15 minutos fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.

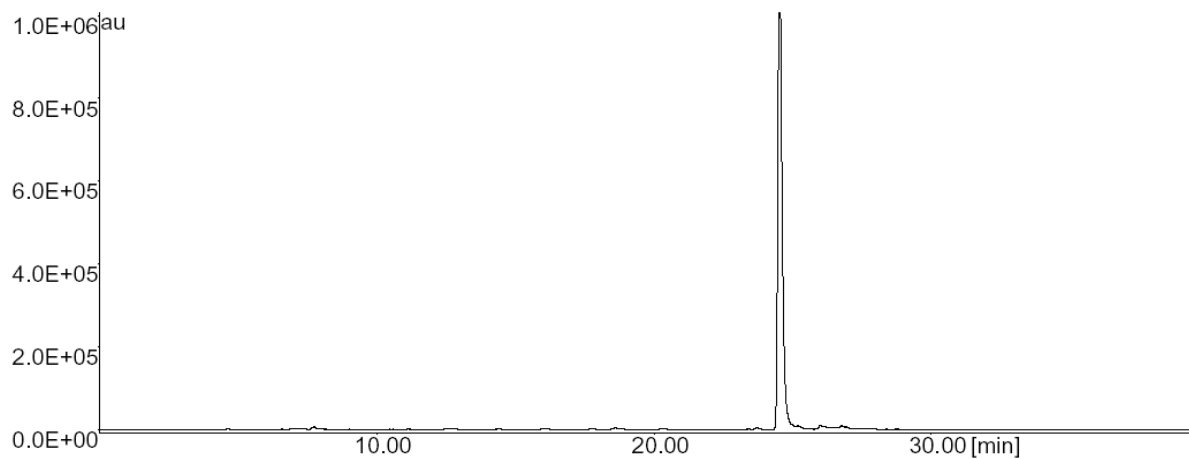


FIGURA 27- Cromatograma da piperlonguminina das folhas de *P. ovatum* obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 30 minutos e 60-40 isocrático por 10 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.

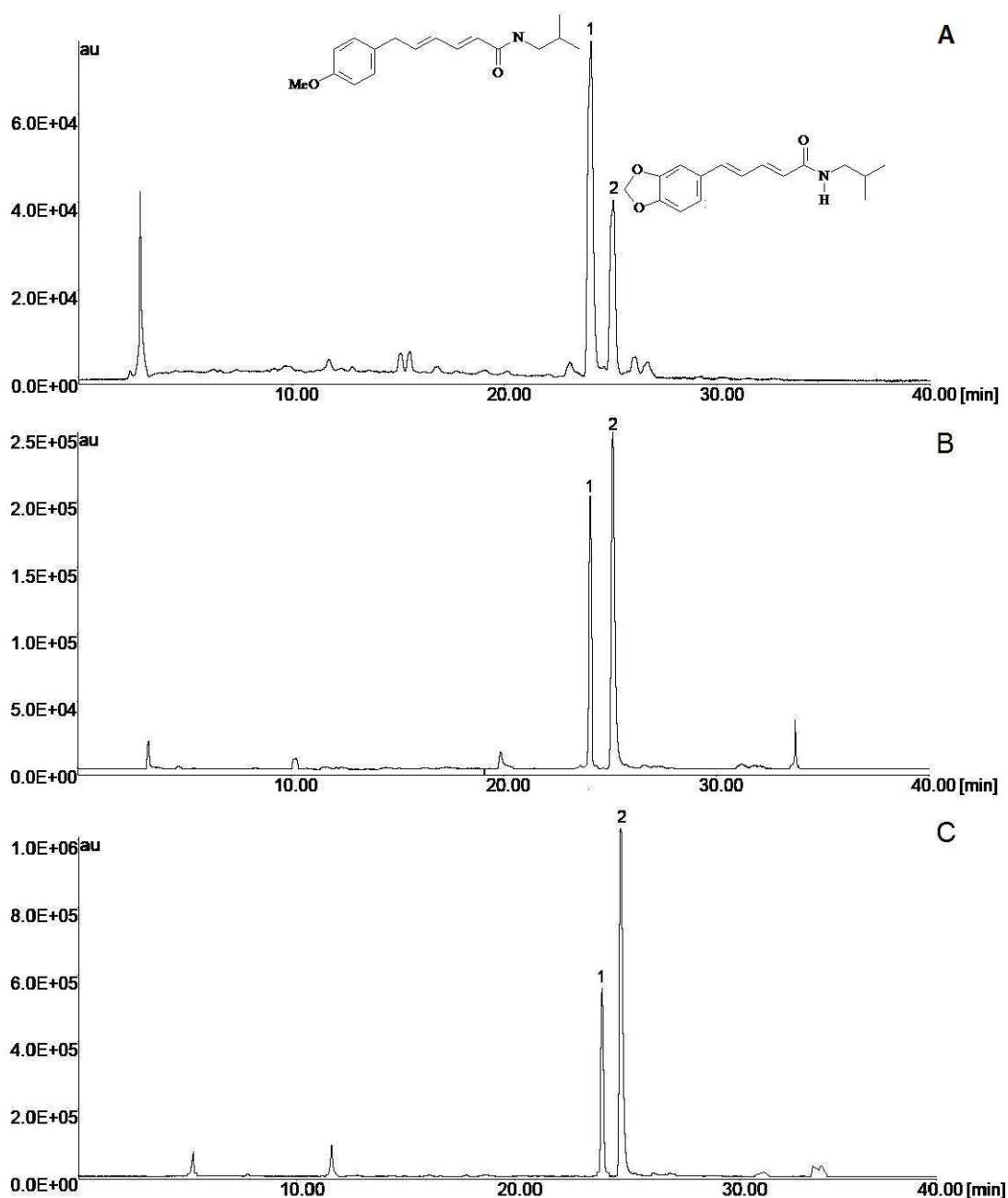


FIGURA 28- Cromatogramas dos extratos das diferentes partes da *P. ovatum* A (caule), B (folha) e C (raiz), onde o pico 1 (piperovatina) e 2 (piperlonguminina), obtidos nas seguintes condições- coluna Metasil ODS; fase móvel- mistura de acetonitrila/água com 2% de ácido acético, iniciando com acetonitrila 0 a 60 em gradiente por 30 minutos e 60-40 isocrático por 10 minutos; fluxo- 1,0 mL/min; detecção- 280 nm.

O método de melhor eficiência foi o da figura 28. Neste foi possível visualizar uma boa separação das substâncias, e os picos mostraram ausência de cauda, aumentando a sua simetria. Com isso, o valor do fator de assimetria

tornou satisfatório. De acordo com Lanças (2004), quanto mais o valor determinado de simetria determinado aproximar-se da unidade, maior a simetria do pico e melhor seu comportamento cromatográfico.

Antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Esta avaliação é alcançada com experimentos de conformidade do sistema, que pode ser definido como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI et al., 2004, apud FELIPE, 2007). A tabela 11 mostra os parâmetros de conformidade do sistema que podem ser avaliados e os valores recomendados. Para garantir a conformidade do sistema no mínimo 2 critérios devem ser avaliados (tabela 11).

TABELA 20 - Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.

Parâmetro	Recomendações
Fator de retenção (k)	O pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um substância não retido (t_m), $k > 2$
Repetibilidade (DPR)	DPR < 1%
Resolução (Rs)	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo
Assimetria (A_s)	$A_s \leq 2$
Número de pratos teóricos da coluna (N)	Em geral deve ser > 2000 para CLAE

Fonte- Ribani et al., (2004).

6.8 VALIDAÇÃO

6.8.1 *Linearidade*

A linearidade é expressa pela sua habilidade em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações do analito em amostras, correspondente à uma determinada faixa de concentração.

Os resultados obtidos no estudo de linearidade mostraram que a curva analítica para a piperovatina foi linear na faixa de 31,25 – 500,00 µg/mL. Segundo a RDC 899/2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) da curva de calibração é de 0,99, sendo obtido um valor médio de 0,998 no experimento. A curva obtida demonstrou que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, obtida correlacionando a área do cromatograma (figura 28).

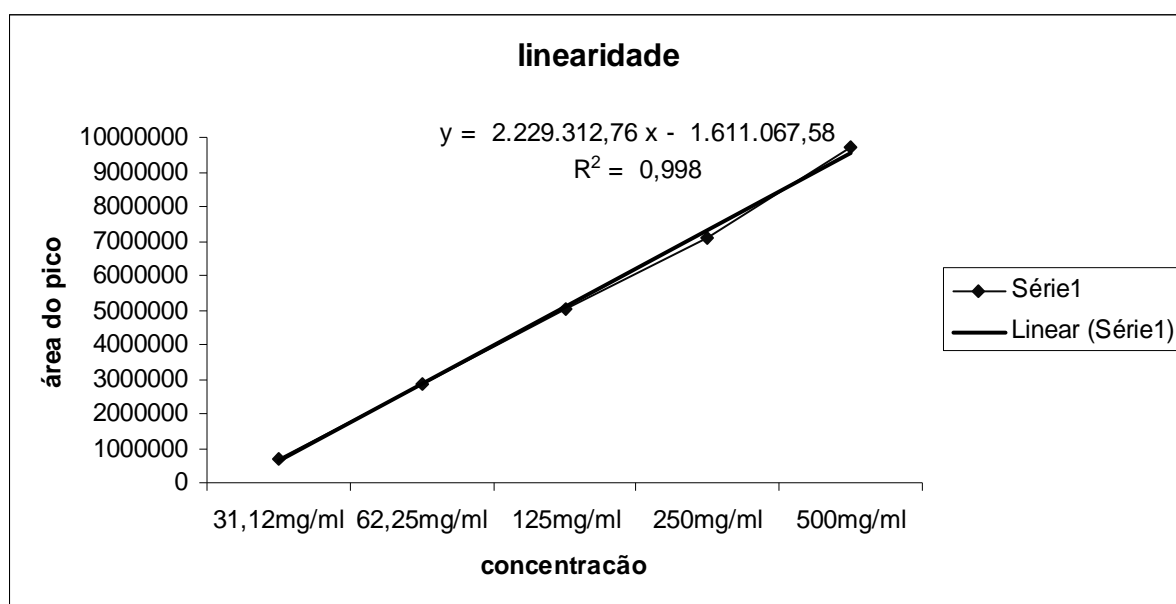


FIGURA 29- Curva analítica para a piperlonguminina no intervalo de 31,25 – 500,00 µg/mL.

A curva analítica foi submetida à análise de regressão linear, como descritos na tabela 12. Como a validade da regressão foi aceita, calculou-se a sua eficiência através do coeficiente de determinação (R^2), a qual apresentou um valor de 0,998, o que mostra alta eficiência pois significa que o modelo consegue explicar 99,84% da variação em torno da área. Segundo Pimentel e Neto (1996), quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , mais o modelo consegue descrever a variação em y .

TABELA 21- Parâmetros de linearidade obtidos da curva piperovatina.

Padrão	Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	Inclinação (a)	Intercepto (b)	(R^2)
Piperlongumini na	31,25 – 500,00	2.229.312,76	-1.611.067,58	0,998

R^2 : coeficiente de determinação.

6.8.2 *Precisão e repetibilidade*

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, pela análise em triplicata de 3 soluções-padrão (31,25 $\mu\text{g/mL}$, 125,00 $\mu\text{g/mL}$ e 500,00 $\mu\text{g/mL}$). Pode-se verificar conforme tabela 13, que a repetibilidade mostrou boa precisão, tornando o resultado adequado já que a legislação não admite valores superiores a 5 % de variação (BRASIL, 2003).

A precisão intermediária, avaliada em dois dias não consecutivos, também mostrou valores dentro dos limites aceitáveis (tabela 13).

TABELA 22 – Repetibilidade e precisão intermediária do método de quantificação de piperlonguminina por CLAE.

Padrão	Concentração (µg/mL)	Repetibilidade (CV%)	Precisão intermediária (CV%)
Piperlonguminina	31,25	2,0	2,67
	125,00	3,2	4,80
	500,00	4,6	4,67

CV, Coeficiente de Variação.

Na repetibilidade, para cada concentração n = 3.

Na precisão intermediária, para cada concentração n = 6.

6.8.3 *Limite de detecção e quantificação*

O método baseou-se em parâmetros das 3 curvas analíticas construídas para o piperlonguminina no intervalo de 3,91 – 31,25 µg/mL. Para calcular estes parâmetros foram usadas fórmulas descritas nos materiais e métodos. Os valores foram 1,21 µg/ml e 4.03µg/ml para o limite de detecção e quantificação respectivamente.

5.8.4 *Exatidão*

Os resultados mostrados na tabela 14 indicam boa exatidão do método uma vez que os valores estão próximos a 100%, que é o valor desejável. Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa 70%-120% são aceitas (LANÇAS, 2004, FELIPE , 2006).

TABELA 23 - Exatidão do método de quantificação de piperlonguminina por CLAE.

Padrão	Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%) (média \pm DP)	Média \pm DP	CV (%)
Piperlonguminina	31,25	101,47 \pm 1,21	103,78 \pm 2,53	2,44
	125,00	103,38 \pm 1,73		
	500,00	106,49 \pm 0,89		

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de Variação.
Para cada concentração n = 3.

5.8.5 **Robustez**

As variações usadas foram: pH, fluxo e temperatura. O método mostrou-se ideal para análise destas matérias primas e apesar das variações, o método se manteve sensível.

5.8.6 **Análise das folhas, caule e raiz de *P. ovatum***

Diferentes partes da espécie vegetal *P. ovatum*, incluindo folhas, caule e raiz são usadas na medicina popular. Por isso, verificou-se existem variações nas concentrações de piperovatina e piperlonguminina nas diferentes partes do vegetal, buscando determinar qual parte apresenta maior ou menor concentração figura 28. Como pode ser visto, todos os extratos demonstraram o mesmo perfil cromatográfico, mas foram encontradas diferenças nas

concentrações conforme a tabela 15, que mostra a concentração das piperovatina e piperlonguminina nas diferentes partes do vegetal.

Não houve diferença significativa nas folha, raiz e caule, nas concentrações de piperlonguminina. A folha possui um teor de piperovatina intermediário em relação às demais partes.

TABELA 24 - Concentração de aminos nos extratos da folha, caule e raiz de *P. ovatum*.

Parte da planta	Piperovatina %	Piperlonguminina %
Folha	1,64 ± 1,43	1,25 ± 3,9
Caule	0,75 ± 2,14	1,22 ± 1,6
Raiz	2,05 ± 0,89	1,03 ± 2,46

Diante dos resultados, pode-se verificar que a raiz apresentou maior teor de piperovatina e teor considerável de piperlonguminina, de acordo com dados estatísticos não tiveram diferenças significativas nas concentrações de piperlonguminina.

6 CONCLUSÃO

- A partir do extrato bruto das folhas, foram isoladas e identificadas duas substâncias, piperovatina e piperlonguminina.
- A caracterização do extrato (CLAE-EM) contribuiu para o controle de qualidade do material vegetal usado.
- O método de CLAE desenvolvido neste trabalho permitiu a detecção e quantificação das aminas piperovatina e piperlonguminina, presentes nos extratos de *P. ovatum*.
- O procedimento de validação, empregando-se como padrão piperlonguminina demonstrou que o método apresenta linearidade, precisão e exatidão para a faixa de concentração estudada, adequando-se assim a legislação em vigor.
- A análise dos extratos, obtidos a partir das folhas, caules e raízes de *P. ovatum*, mostraram que estas aminas estão presentes nas diferentes partes do vegetal e em diferentes concentrações.
- A extração de óleo essencial das folhas secas da *P. diospyrifolium* cujo o rendimento foi de 2%, mostrou-se efetiva e foram identificadas 41 substâncias químicas.

- A extração em fluido supercrítico, utilizando CO₂ como líquido extrator e folhas secas da *P. ovatum*, permitiu o isolamento de uma mistura, predominantemente constituída de ácidos graxos poliinsaturados que foram identificados por CG-FID.
- Os dados obtidos com o estudo da morfologia, anatomia, histoquímica e resultados físico-químicos de *P. ovatum*, foram importantes para sua identificação e avaliação do controle de qualidade, sendo úteis para comercialização desta espécie como droga vegetal.
- Os esclereídes são encontrados apenas na espécie *P. ovatum*.
- O extrato bruto possui atividade antibacteriana, antifúngica e antiprotozoário.
- Ambas as substâncias apresentaram atividades biológica significativa contra *L. amazonensis*.
- A piperlonguminina possui baixa citotoxicidade para macrófagos J774G8 e células Vero e a mesma é mais seletiva para os protozoários em relação aos macrófagos e células Vero.
- A piperlonguminina apresentou maior atividade contra amastigota axênica.

- Evidenciou-se pela primeira vez a importância da atividade antileishmania *in vitro* da piperlonguminina isoladas da *P. ovatum* Vahl.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass Spectroscopy**. Allured Publ Corp., Carol Stream, IL, 2004.
- ALBIERO, A. L. M.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; ALMEIDA, O. J. G.; LOPES, W. A. L. Morfoanatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, p. 550-4, 2005
- ALBIERO, A.L.M.; PAOLI, L.A.; SOUZA, K.S.; MOURÃO A.A.S. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16 p.379-391, 2006.
- ALMEIDA, J.R.G.A.; SILVA-FILHO, R.N.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; PEREIRA, F.O.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, p. 638-641, 2006.
- BENEVIDES, P.J.C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, New York, v. 52, p. 339-343, 1999.
- BERG, M. E. **Plantas Medicinais da Amazônia**. Museu Paraense Emilio Goeldi, Belém, 1982.
- BRASIL, **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Determina a publicação do .Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- CARVALHO-SILVA, M.; CAVALCANTI, T. B. Piperaceae. *In*: Cavalcanti T. B. & Ramos A. E. (org.). Flora do Distrito Federal, Brasil, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. v. 2, p. 91-124, 2002.

COSTA, S. S.; MORS, W. B. Amides of *Ottonia corcovadensis*. **Phytochemistry**, New York, v. 20, p. 1305-1307, 1981.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro- Di Giorgio, 1984.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, no. 11, p. 502-508, 2003.

CRONQUIST, A. “**An integrated system of classification of flowering plants**”. Columbia University Press, New York, 1981.

Di STASI, L.C. **Plantas Medicinais- arte e ciências** – Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo- UNESP, p.09-14, 1996

FACUNDO, V. A.; SILVEIRA, A. S. P.; MORAIS, S. M. Constituents of *Piper alatabaccum* Trelê Yuncker (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.33, p. 753-756, 2005.

FARIAS, M. R. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia- da planta ao medicamento. 3. ed. rev. Porto Alegre- UFRGS; Florianópolis- UFSC, cap. 12, p. 199-222, 2001.

FELIPE D. **Otimização e validação de método de análise de neolignanas por clae e avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck., (Piperaceae)**, dissertação, 2006

FERREIRA, S.H. (Org.) Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro- **Academia Brasileira de Ciências**, p.132-139, 1998.

GENARO, O. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. In- NEVES, D. P. Parasitologia humana. 9. ed. São Paulo- Ateneu, cap. 9. p. 64-81 1998

GRAY, R. J.; HARBORNE, J. B. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. **Phytochemistry**, New York, v. 37, n. 1, p. 19-42, 1994.

GREVELINK, A. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **St. Louis**, v. 34, p. 257-272, 1996.

HUTCHINSON, J. "The Families of the Flowering Plants". **Clarendon Press**, London.

SOLEREDER, M. "Sistematic anatomy of the Dicotyledons". **Clarendon Press**, Oxford. p. 600, 1908.

ISHIDA, K. ; MELLO, J. C. P ; CORTEZ, D. A. G. ; DIAS FILHO, B. P. ; NAKAMURA, T. U. ; NAKAMURA, C. V. . Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 942-949, 2006

KOKOSKA, L., POLESNY, Z., RADA, V., NEPOVIM, A., VANEK, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 82, p. 51-53, 2002.

KOUL, J. L.; KOUL, S. K.; TANEJA, S. C.; DHAR, K. L. Oxygenated cyclohexanes from *Piper cubeb*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, p. 1097-1099, 1996.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. 1. ed. São Carlos- RiMa, p.62-71, 2004.

LIMA, M. R. F., LUNA, J. S., SANTOS, A. F., ANDRADE, M. C. C., SANT'ANA, A. E. G., GENET, J. P., MARQUEZ, B., NEUVILLE, L., MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 105, p. 127-147, 2006.

LÓPEZ, A.; MING, S. D.; TOWERS, G. H. N. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, n. 1, p. 62-64, 2002.

MCFERREN, M. A.; CORDOVA, D.; RODRIGUEZ, E.; RAUH, J. J. In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, na isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.83, p.201-207, 2002.

MCFERREN, M. A.; RODRIGUEZ, E. Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.60, p.183-187, 1998.

MAKAPUGAY, H.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D.; BORDAS, E. Piperovatine, the tongue-numbing principle of *Ottonia frutencens*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.7, p.235-238, 1983.

MAWELL, A.; DABIDEEN, D.; REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S. Neolignans from *Piper aequale*. **Phytochemistry**, New York, v. 50, p. 499-504, 1999.

MIRANDA, E.M. Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de Pimenta Longa (*Piper hispidinervum*) no seringal cachoeira, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 32, n. 1, p. 9-20, 2002.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. "Anatomy of the dicotyledons – leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses". **Clarendon Press**, Oxford. 1957

MINCOFF, P. C.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Isolation and characterization of a 30 kD antifungal protein from seeds of *Sorghum bicolor*. **Research in Microbiology**, Paris, v.157, p. 326-332, 2006.

NASCIMENTO, M.E.; VILHENA-POTIGUARA, V.C.R. Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervium* C. DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras. **Boletim do Museu do Pará Emílio Goeldi**, Belém, v.15, p. 39-104, 1999.

NAKAMURA, C. V.; ISHIDA, K., FACCIN, L. C.; DIAS-FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ROZENTAL, S., SOUZA, W.; UEDA-NAKAMURA. T. In vitro activity of

essential oil from *Ocimum gratissimum* against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, Paris, v.155, p. 579-586 2004.

NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 621-626, 2000.

ORJALA, J.; MIAN, P.; RALI, T.; STICHER, O. Gibbilibols A-D, cytotoxic and antibacterial alkenylphenols from *Piper giggilimum*. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 61, p. 939-941, 1998.

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

PESSINI, G. L. **Estudo fitoquímico, botânico e avaliação da atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck., (Piperaceae). 2003. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.**

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração- uma revisão para químicos analíticos. Qualidade de medições em química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, no. 3, p. 268-277, 1996.

PRACHAYASITIKUL, S.; BURAPARUANGSANG, P.; WORACHARTCHEEWAN, A.; ISARANKURA, C.; RUCHIRAWAT, V. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. **Molecules**, Basel, v.13, p. 904-921, 2008.

PRASAD, A. K.; TYAGI, O. M.; WENGEL, J.; BOLL, P. M.; OLSEN, C. E.; BISHT, K. S.; SINGH, A.; SARANGI, A.; KUMAR, R.; JAIN, S. C.; PARMAR, V. S. Neolignans and a lignan from *Piper clarkii*. **Phytochemistry**, New York, v. 39, p. 655-658, 1995.

RAMJI, N.; RAMJI, N.; IYER, R.; CHANDRASEKARAN, S. Phenolic antibacterials from *Piper betle* in the prevention of halitosis. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 83, p. 149-152, 2002.

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**, São Paulo, v. 27, p. 771-780, 2004.

RÜEGG T.; CALDERON A. I.; QUEIROZ E. F.; SOLIS P. N.; MARSTON A.; RIVAS F.; ORTEGA-BARRIA E.; HOSTETTMANN K.; GUPTA M. P. 3-Famesyl-2-hydroxybenzoic acid is a new anti-*Helicobacter pylori* compound from *Piper multiplinervium*. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, vol. 103, p. 461-467, 2006.

RODRIGUES SILVA, D. **Estudo fitoquímico, atividade antimicrobiana e farmacológica da espécie vegetal *Piper ovatum* Vahl (Piperaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparison evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Washington v. 91, p. 621-632, 2005.

SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromones of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. **Phytochemistry**, New York, v. 66, p. 573-579, 2005.

SANTOS, E. C. T.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; BERGMANN, B. R. Selective effect of 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of Piper species- a review. **Fitoterapia**, Milan, v. LVIII, v. 3, p. 147-166, 1987.

SINGH, S. K.; PRASAD, A. K.; OLSEN, C. E.; JHS, A.; JAIN, S.; PARMAR, V. S.; WENGEL, J. Neolignans and alkaloids from *Piper argyrophyllum*. **Phytochemistry**, New York, v. 43, p. 1355-1360, 1996.

SOUZA, T. P. D.; HOLZSCHUH, M. H.; LIONÇO, M. I.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts. **Journal of**

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, New Jersey, v. 30, p. 351-356, 2002.

TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. **Phytochemistry**, New York, v. 49, p. 461-464, 1998.

TOPUL R.; STEWART W. W.; DAVID N. L.; WATERMAN P. G.; Volatile Chemical Constituents of *Piper aduncum* L and *Piper gibbilimum* C. DC (Piperaceae) from Papua New Guinea. **Molecules**, Basel, v.12, p.389-394, 2007.

VASQUES DA SILVA, R.; NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, New York, v. 59, p. 521-527, 2002.

VIANA, W.O. e G. AKISUE. Caracterização morfológica de *Piper aduncum*. **Lecta** Barcelona, v.15 p. 11-62, 1997.

WANG, P.; KONG, C. H.; ZHANG, C. X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L. **Molecules**, Basel, 11, 549-555 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2001. **Leishmaniasis**- the disease and its impact. [Online.] Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html>>. Acessado em- 12 dez 2005.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil – I. Piper – group I, II, III, IV. **Hoehnea**, São Paulo, v. 2, p. 19-366, 1972.

ZACCHINO, S. **Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos**. In- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó- Argos, v. 4, p. 435-501 2001.

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](#)