UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PGQUI

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

DIÊGO MORENO NEIVA PEREIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES: *Piper klotzschianum* (PIPERACEAE) E *Achyrocline satureioides* (ASTERACEAE)

Jequié – BA

Outubro / 2015

DIÊGO MORENO NEIVA PEREIRA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES: *Piper klotzschianum* (PIPERACEAE) E *Achyrocline satureioides* (ASTERACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia campus Jequié-BA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento

Jequié – BA

Outubro / 2015

P49 Pereira, Diêgo Moreno Neiva.
Estudo fitoquímico e biológico das espécies: *Piper klotzschianum* (PIPERACEAE) e *Acheyrocline satureiodes* (ASTERACEAE). / Diêgo Moreno Neiva Pereira.- Jequié, 2015.
105p.: il.; 30cm

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento)

1.Alcalóides 2.Piperamidas 3.Óleos essenciais 4.Atividades biológicas I.Nascimento, Jeferson Chagas, Cunha, Sandra Lúcia da Silva II. I.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia III.Título

CDD - 547

Jandira de Souza Leal Rangel - CRB 5/1056. Bibliotecária – UESB – *Campus* de Jequié

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUIMICA-PGQUI

Diêgo Moreno Neiva Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia com requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **08/10/2015.**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento (UFBA, Salvador/BA, 2011)
(orientador)

Profa. Dra. Sandra Lúcia da Cunha Silva (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2002)

Jorge maurício David

Prof. Dr. Jorge Maurício David (USP, São Paulo, 1991)

A minha família, por todo amor, carinho e dedicação de uma vida inteira, sempre a cuidar dos filhos, apoiando e incentivando seus sonhos. Que Deus os mantenha sempre presentes em minha vida!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família por todo esforço que fizeram para que seus filhos pudessem estudar, por todo amor que nos foi concedido e todo companheirismo de pais e amigos que sempre estiveram presentes.

A minha queridíssima esposa, uma pessoa excelente a quem tive a sorte de conhecer e concedeu-me prazer de poder compartilhar um futuro ao seu lado.

Faço um agradecimento especial ao Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento, pela oportunidade de sua orientação, sua paciência, dedicação e por sua contribuição para minha formação profissional e pessoal. Aprendi muito com o senhor, muito obrigado.

Agradeço ainda a meus queridos colegas Rafael Pereira, Tiago Oliveira, Hion Oliveira, Oscar Caetano, Daniel Santana, Washington Felix, Wagner Rodrigues, Darllen Guimarães, Felipe Augusto e Italo Freitas por suas contribuições para realização deste trabalho.

Um agradecimento especial também ao Prof. Dr. Djalma Oliveira por todo auxilio, paciência e contribuição por ceder espaço para realização das análises no CG-EM. Por ser uma pessoa atenciosa e altruísta, contribuindo com muito mais que só conhecimento cientifico.

Agraço ainda, ao Pro. Dr. Luiz Augusto Martins por ceder espaço e um pouco de seu tempo para realização das análises no CG-FID.

A Profª. Drª. Sandra Lúcia da Silva e Cunha (UESB-Itapetinga) e toda sua equipe, por toda atenção, dedicação e auxilio na realização dos testes larvicidas realizados no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN).

Á professor Jane Lima dos Santos do DCB da Universidade Estadual de Santa Cruz pela realização do teste de viabilidade celular.

Ao laboratório baiano de ressonância magnética nuclear / Universidade Federal da Bahia pela aquisição dos dados de RMN.

A Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo financiamento e suporte.

Enfim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Química da UESB e todo corpo docente por essa oportunidade.

A todos, um Muito Obrigado!!!

“A química deve ser aprendida porque representa uma das formas de ver o mundo e de interpretá-lo. Um cidadão tem uma visão parcial do mundo quando não domina os princípios fundamentais da química."

(Gallo Neto, 1995)

LISTA DE FIGURAS

Capitulo I - Estudo Químico dos Constituintes Fixos do Extrato Etanólico das Raízes De *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae)

Figura I.1: Distribuição geográfica do gênero *Piper*. Estimativas do número de espécies para cada centro de diversidade. 24
Figura I.2: (a) piperovatina e (b) piperlonguminina, piperamidas com efeito antitripanossoma. 28
Figura I.3: Algumas piperamidas/alcaloides que possuem atividades antitripanossoma, isoladas de espécies de como a *Piper tuberculatum*, *P. arboreum*, *P. nigrum* e *P. longum*. 28
Figura I.4: Algumas piperamidas, alcalóides e derivados com atividades anticarcinogênicas.....32
Figura I.5: a) (DDT), b) alguns organometálicos metabolizados pelo organismo humano 33
Figura I.6: Piperamidas comuns em varias espécies do gênero *Piper* e que possuem atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* 34
Figura I.7: Substâncias isoladas da *P. klotzschianum*, a) substâncias inéditas como metabólicos secundários de plantas, b) substâncias inéditas na literatura. 35
Figura I.8: Piperamidas isoladas a partir dos extratos hexânico, diclorometânico e etanólico das raízes de *P. klotzschianum*. 36
Figura I.9: Fracionamento do extrato etanólico (EER*Pk*) das raízes de *P. klotzschianum* por extração líquido-líquido.....38
Figura I.10: Sólido cristalino identificado como sendo a piperamida tetra-hidropiperlonguminina, substância [II] 40
Figura I.11: Fluxograma Simplificado (Parte 1) de 2 das frações obtidas do fracionamento da FC. 42
Figura I.12: Fluxograma Simplificado (Parte 2) de 2 das frações obtidas do fracionamento da FC. 43
Figura I.13: Estrutura molecular da substância [I], piperovatina encontrada nas frações ECD4-4, ECD20-1, ECD20-2, ECD200-3. 45

Figura I.14: Espectros de RMN de ^{1}H para piperovatina [500 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)].. 47
Figura I.15: Espectro de RMN de ^{13}C para piperovatina [125 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)]. 48
Figura I16: Cromatograma de íons totais e espectro de massas obtidos no CG-EM da fração ECD4-4.....49
Figura I.17: Principais fragmentações apresentadas no EM para o pico com Tr em 32,23. 49
Figura I.18: Estrutura molecular da substância [II], tetra-hidropiperlonguminina.....50
Figura I.19: Espectros de RMN de ^{1}H para a tetra-hidropiperlonguminina [500 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)] 52
Figura I.20: Espectro de RMN de ^{13}C para tetra-hidropiperlonguminina [125 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)]. 53
Figura I.21: Cromatograma e Espectro de Massas Obtidos no CG-EM da tetra-hidropiperlonguminina. 54
Figura I.22: Principais fragmentações apresentadas no EM para a tetra-hidropiperlonguminina, pico com Tr em 29.8.....54
Figura I.23: Substância [III] Estigmasterol e Substância [IV] β-sitosterol.. 55
Figura I.24: Espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C para mistura de Estigmasterol e *β*-sitosterol [$CDCl_3$, δ (ppm)].....57
Figura I.25: Espectro de Infra Vermelho em filme, para as amostras ECD1-1 (A) e ECD1-2 (B).....59
Figura I.26: Cromatogramas em CG-EM para o padrão FAME [C8 a C24] (A) e amostras ECD1-1 (B) e ECD1-2 (C). 60

Capitulo II - Estudo Químico e Biológico dos Voláteis de *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) & *Piper Klotzschianum* Kunth (Piperaceae).

Figura II.1: Cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas CG-EM. 66
Figura II.2: Processo de extração dos voláteis utilizando aparelho do tipo Clevenger.. 68
Figura II.3: Procedimento para avaliação da atividade toxicológica frente a larvas do *Aedes aegypti*.....71

Figura II.4: Reação de redução para formação do reagente de cor (formazan). 72
Figura II.5: Câmara de Neubauer para microscopia e contagem de células. 73
Figura II.6: Cromatogramas para os óleos essenciais das folhas (A) e flores (B) da *A. satureioides* coletadas no inverno (I) e verão (II). 79
Figura II.7: Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas da *Piper I* (A) e *Piper II* (B). 81
Figura II.8: Cromatograma da folha da *P. klotzschianum*. 81
Figura II.9: Cromatograma da folha da *P. klotzschianum* 82
Figura II.10: Ensaio de viabilidade celular com MTT para os compostos ECD10-1 e ECD20-1 isolados da *P. klotzschianum*. Controle -1: células e meio. Controle -2: células+ meio+ DMSO 10%. 92

LISTA DE TABELAS

Capitulo I - **Estudo Químico dos Constituintes Fixos do Extrato Etanólico das Raízes de *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae)**

Tabela I.1: Algumas Substâncias isoladas em plantas do gênero *Piper* com atividades biológicas comprovadas em literatura. 26
Tabela I.2: Substâncias isoladas em plantas do gênero *Piper* que possuem atividade direta na proteção do SNC. 30
Tabela I.3: Frações obtidas do fracionamento em CC da fração clorofórmica FC. ...44
Tabela I.4: Dados de RMN de ^{1}H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da piperovatina.. 46
Tabela I.5: Dados de RMN de ^{1}H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da tetra-hidropiperlonguminina.. 51
Tabela I.6: Dados de RMN ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para à mistura de esteróides Estigmasterol *β*-sitosterol da amostra ECD3-4 [$CDCl_3$, δ (ppm), J (Hz)]..56
Tabela I.7: Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C para os esteroides Estigmasterol (1) e *β*-sitosterol (2).....56
Tabela I.8: Ésteres metílicos identificados por análise em CG-EM. 58

Capitulo II - **Estudo Químico e Biológico dos Voláteis de *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) & *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae)**.

Tabela II.1: Concentrações avaliadas para o cálculo da CL_{50} nos ensaios para teste da avaliação inseticida contra larvas da *Aedes aegypti*. 71
Tabela II.2: Rendimento percentual dos óleos para as folhas e flores da *A. satureioides* coletada em Janeiro e Agosto de 2014. 75
Tabela II.3: Rendimento oleico para *P. klotzschianum* coletada em Janeiro de 2013. 76
Tabela II.4: Rendimento oleico para *P. klotzschianum* coletada em Junho de 2015..... 76
Tabela II.5: Componentes majoritários da *A. satureioides*. 78

Tabela II.6: Composição química dos voláteis extraídos das folhas e flores da *A. satureioides*. 78
Tabela II.7: Composição química dos voláteis extraídos das partes da *P. klotzschianum* I. 83
Tabela II.8: Composição química dos voláteis extraídos das partes da *P. klotzschianum II.* 84
Tabela II.9: Comparação fitoquímica dos voláteis presentes nas folhas de *P. klotzschianum*. 85
Tabela II.10: Concentrações letais expressas pela CL_{50} para os voláteis da *P. klotzschianum e A. satureioides.* 86
Tabela II.11: Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações do Extrato Etanólico da Raiz de *P. klotzschianum*. 88
Tabela II.12: CL_{50} do Extrato Etanólico da Raiz de *P. klotzschianum*, sobre larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição. 89
Tabela II.13: Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações da piperovatina (ECD20-1). 89
Tabela II.14: CL_{50} da Piperovatina (ECD20-1), frente as larvas de *Aedes aegypti* em relação ao tempo de exposição. 89
Tabela II.15: Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações da Fração Acetado de Etila da Raiz de *P. klotzschianum*. 90
Tabela II.16: CL_{50} da Fração Acetado de Etila das Raízes de *P. klotzschianum*, frente as larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição. 90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Absorvância
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DCM	Diclorometano
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
EE	Éter etílico
ECD	Extrato clorofórmico D
EER*Pk*	Extrato etanólico das raízes da *Piper klotzschianum*
FAq	Fração aquosa
FAcOEt	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmica
Hex	Hexano
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
MetOH	Metanol
MHz	Megahertz

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo
m	Multipleto
p.	Página
PBS	Phosphate buffered saline
RMN	Ressonância magnética
RMN ^{1}H	Ressonância magnética de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética de carbono
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
t	Tripleto
δ	Deslocamento químico
Ʊ	Estiramento

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DAS ESPÉCIES: *Piper klotzschianum* (PIPERACEAE) E *Achyrocline satureioides* (ASTERACEAE)

Autor: Diêgo Moreno Neiva Pereira

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento

Coorientadora: Profª. Drª. Sandra Lúcia da Silva e Cunha

RESUMO: Este trabalho relata a investigação fitoquímica de *Piper klotzschianum* em especial os constituintes fixos do extrato etanólico das raízes da planta e dos voláteis extraídos das folhas, caules e raízes. Também foi estudado o efeito da variação sazonal sobre os voláteis das folhas e flores da *Achyrocline satureioides*. A toxicidade dos extratos dos voláteis das espécies foi avaliada através dos testes de letalidade com *Artemia salina*, *Aedes aegypti* e do teste de viabilidade celular. Do extrato etanólico das raízes da *Piper* foi possível isolar duas amidas; a piperovatina e a tetra-hidropiperlonguminina, que compõem respectivamente 1,39 e 1,25% da massa do extrato. Foi identificado também à mistura de estigmasterol / *β*-sitosterol e uma mistura de ésteres graxos (miristato de metila, palmitato de metila e o metil éster do acido 9-octadecenóico). Todas as substâncias purificadas foram identificadas através da técnica de ressonância magnética unidimensional de ^{13}C e ^{1}H e auxilio de dados disponíveis na literatura. Os voláteis da *P. klotzschianum* coletadas em Aracruz/ES e Jequié/BA apresentaram como componente majoritário o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno presente em todas as partes da planta. A análise dos voláteis da *A. satureioides* por CG-EM mostrou *trans*-cariofileno / *α*-humuleno como componentes majoritários no inverno e, para o verão, *α*-humuleno / *trans*-cariofileno. A toxicidade frente a larvas do *A. aegypti* mostrou CL_{50}=0,27 ppm para piperovatina e CL_{50}=3,60 ppm para extrato etanólico e para fração acetato de etila, CL_{50}=232,65 ppm. Para os voláteis das folhas da *A. satureioides* coletadas no inverno a CL_{50} para larvas da *A. salina* foi de 3,12 ppm; já para os voláteis das raízes, folhas e caules da *Piper* CL_{50}=6,69; 13,70 e 15,51 ppm respectivamente. O teste de viabilidade celular mostrou que para as duas piperamidas não houve nenhuma ação tóxica em células de macrófagos. Estes dados mostram uma nova variedade química para a espécie *A. satureioides,* e os resultados indicam atividades biológicas promissoras.

Palavras chave: Alcalóides, piperamidas, óleos essenciais, atividades biológicas.

Phytochemical and biological study of species: *Piper Klotzschianum* (PIPERACERE) e *Achyrocline Satureioides* (ASTERACEAE).

Author: Diêgo Moreno Neiva Pereira

Advisor: Prof. Dr. Jeferson Chagas do Nascimento

Co-advisor: Prof. Dr. Sandra Lúcia da Silva e Cunha

ABSTRACT: This word reports the phytochemical investigation of *Piper klotzschianum* especially the fixed constituents of the ethanol extract of the roots of the plant and volatile extracted from leaves, stems and roots. It was also studied the effect of seasonal variation on the volatile of the *Achyrocline satureioides* leaves and flowers. The toxicity of the extracts and volatile of the species was evaluated through the lethality tests with *Artemia salina*, *Aedes aegypti* and cell viability test. From the ethanolic extract of the roots of the *Piper*, was possible to isolate two amides, the piperovatine and the tetra-hydropiperlonguminine which comprise respectively 1,39 and 1,25% the mass of the extract. Was also identified the mix of estimasterol / *β*-sitosterol and a mixture of fatty esters (ethyl myristate, methyl palmitate and methyl ester of 9-octadecenoic acid). All the purified compounds were identified by one-dimensional magnetic resonance imaging ^{13}C and ^{1}H and with the assistance data available in the literature. The volatile *P. Klotzchianum* collected in Aracruz - ES and Jequie - BA had as the major component the 1-butyl-3,4-methyllenedioxybenzene present throughout the plant; The analysis of the volatile *A. Satureioides by GC-MS* showed *trans*-caryophyllene / *α*-humuleno as the major component in winter, and for summer, *α*-humuleno / *trans*-caryophyllene. The toxicity forefront *A. aegypt* showed CL_{50}= 0,27ppm to piperovatina and CL_{50}= 3,60ppm to ethanolic extract and to the fraction of ethyl acetate the, CL_{50}= 232,65ppm. For the volatile, the leaves of a *A. Satureioides* collected in winter, the CL_{50} for the *A. Salina* larvae was 3,12ppm; For the volatile roots, leaves and stems of Piper, the CL_{50}= 6,69; 13,70 and 15,51ppm respectively. The cell viability test showed that for both piperamides there was no toxic effect for macrophages. These findings show new variety for the specie A. satureioides and the results show promising biological activities studied.

Keywords: Alkaloids; Piperamides; Essential oils; Biological activities.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL **19**

OBJETIVOS **21**

Geral 21

Específicos 21

CAPITÚLO I **22**

Estudo Químico dos Constituintes Fixos do Extrato Etanólico das Raízes de *Piper Klotzschianum* Kunth (Piperaceae) 22

I.1 REFERENCIAL TEÓRICO 23

I.1.1 Família Piperaceae 23

I.1.2 Género *Piper* 23

I.1.3 Aspectos Etnobotânicos do Género *Piper* 24

I.1.4 Aspectos Fitoquímicos e Atividades Biológicas do Gênero *Piper* 25

I.1.4.1 Atividade Antitripanossoma 27

I.1.4.2 Atividade Neuroprotetora 29

I.1.4.3 Atividade Anticarcinogênica 31

I.1.4.4 Atividade Larvicida Contra o *Aedes aegypti* 32

I.1.5 *Piper klotzschianum (*Kunth*)* 35

I.2 PARTE EXPERIMENTAL 37

I.2.1 Coleta do Material Vegetal 37

I.2.2 Preparo dos Extratos 37

I.2.3 Estudo do Extrato Etanólico das Raízes da *P. Klotzschianum* 37

I.2.3.1 Estudo da Fração Clorofórmica (Fc) das Raízes de *P. Klotzschianum* 38

I.2.3.1.1 Purificação da Fração ECD1-7 39

I.2.3.1.2 Purificação da Fração ECD1-12 39

I.2.3.1.3 Purificação da Fração ECD10-2 39

I.2.3.1.4 Análise dos Ésteres metílicos por CG-EM Obtidos nas Frações ECD1-1 e ECD2-2 40

I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO. 45

I.3.1 Identificação da Piperovatina 45

I.3.2 Identificação da Tetra-hidropiperlonguminina. 50

I.3.3 Identificação dos Esteróides Estigmasterol e *β*-sitosterol 55

I.3.4 Identificação dos Ésteres Metílicos 58

CAPITÚLO II 61

Estudo Químico e Biológico dos Voláteis De *Achyrocline Satureioides* (Asteraceae) & *Piper Klotzschianum* Kunth (Piperaceae) 61

II.1 REFERENCIAL TEÓRICO 62

II.1.1 Descrição Botânica e Aspectos Etnobotânicos da *Achyrocline satureioides* 62

II.1.2 Caráter Fitoquímico da *A. satureioides* 62

II.1.3 Descrição Botânica e Aspectos Etnobotânicos da *P. klotzschianum* 63

II.1.4 Voláteis da *Piper klotzschianum* Kunth 64

II.2 PARE EXPERIMENTAL 65

II.2.1 Materiais e Métodos 65

II.2.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação das Espécies 67

II.2.3 Obtenção dos Voláteis 67

II.2.4 Atividades Biológicas Avaliadas para as Espécies Estudadas 68

II.2.4.1 Avaliação da Atividade Tóxica 68

II.2.4.1.1 *Artemia salina* como Bioindicador de Citotoxicidade 68

II.2.4.1.2 Teste para Avaliação Citotóxica 69

II.2.4.2 Avaliação da Atividade Larvicida 70

II.2.4.2.1 O Vetor *Aedes aegypti* e Inseticidas Naturais 70

II.2.4.2.2 Ensaios para Avaliação da Atividade Larvicida 70

II.2.4.3 Avaliação da Atividade Citotóxica por Viabilidade Celular com MTT 72

II.2.4.3.1 Citotoxicidade e Viabilidade Celular com MTT 72

II.2.4.3.2 Cultivo de Células Macrofágicas Peritoniais 72

II.2.4.3.3 Contagem das Células 73

II.2.4.3.4 Metodologia de Viabilidade Celular com MTT 74

II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 75

II.3.1 Teor dos Voláteis Encontrado nas Espécies Estudadas 75

II.3.2 Identificação e Quantificação dos Constituintes Presentes no Voláteis. 77

II.3.2.1 Voláteis da *A. satureioides* 78

II.3.2.2 Voláteis da *P.klotzschianum* 79

II.3.3 Avaliação da Atividade Citotóxica Frente *Artemia salina* 86

II.3.4 Avaliação da Atividade Larvicida 87

II.3.5 Avaliação da Atividade Citotóxica e Viabilidade Celular com MTT 91

CONSIDERAÇÕES FINAIS 93

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95

INTRODUÇÃO GERAL

A Química está inserida em todos os aspectos do nosso cotidiano: no nosso organismo, no ar que respiramos, na água, no desenvolvimento econômico e tecnológico, em todos os instrumentos de trabalho, de uso pessoal, nos alimentos e em praticamente todos os medicamentos. Sem ela, os cientistas não poderiam sintetizar novas moléculas, que curam doenças e fortalecem a obra-prima que é a vida.

Se olharmos atentamente à nossa volta, perceberemos que tudo na natureza, especialmente as plantas, contém elementos e substâncias químicas responsáveis pela sustentação da vida no planeta, de formar que, por uma necessidade de sobrevivência, mesmo antes das primeiras civilizações o homem sempre fez uso da natureza para fins medicinais.

Até meados do século XV, as plantas eram a única forma de tratamento das enfermidades, pois na época, não acreditava-se que substâncias inorgânicas “inanimadas” pudessem ter efeito benéfico sobre os seres vivos e que não poderiam ser usadas no tratamento de enfermidades, pensamento que entrou em colapso com as descobertas da alquimia moderna de Paracelso, que no meio de suas pesquisas trousse a cura para sífilis com a utilização de mercúrio, contrapondo mais de 2000 mil anos de história [1].

Após anos de grandes descobertas, ainda hoje as plantas são utilizadas para fins medicinais e continuam sendo as principais fontes na descoberta de novas substâncias e medicamentos, que, mesmo com todo avanço da medicina moderna, as plantas atuam de forma complementar e até mesmo substituta da medicina convencional, muitas vezes pelos preços elevados tratamentos e medicamentos disponíveis, até mesmo a falta dos mesmos, como por exemplo, para a cura do câncer e do HIV, de forma que há no mundo científico uma busca incessante por novas fontes e formas de terapia, até mesmo em países desenvolvidos. Assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005, iterou o compromisso em estimular o uso complementar da medicina popular. Por sua vez, o Brasil em 2005, através do SUS, propõe a inclusão das plantas medicinais e seus derivados como opções terapêuticas no sistema público de saúde, contanto que esses produtos a base de

plantas atendam a legislação vigente, a qual permanece em vigor até a presente data [2].

Dentro dessa necessidade constante por novas formas de tratamento e novas substâncias com finalidades terapêuticas, o gênero *Piper* se mostra como uma fonte promissora de substâncias com as mais diversas atividades comprovadas na literatura, como antitumoral, anti-inflamatória, larvicidas, fungicidas, analgésicas, neuroprotetoras, entre outras. E com o intuito de descrever de maneira clara e coesa as avaliações e testes biológicos investigados a dissertação foi dividida em dois capítulos: o primeiro contendo o estudo fitoquímico dos constituintes fixos das raízes da *Piper klotzschianum* Kunth e o segundo abordando o estudo da composição química dos voláteis de *Piper klotzschianum* e *Achyrocline satureioides* juntamente com as investigações referentes às atividades biológicas dos voláteis, extratos e substâncias purificadas.

OBJETIVOS

Geral

Realizar o estudo fitoquímico e biológico das espécies *Piper klotzschianum* (PIPERAEAE) e *Achyrocline satureioides* (ASTERACEAE)

Específicos

- Isolar, através de métodos cromatográficos, os constituintes químicos provenientes do metabolismo secundário, presentes no extrato etanólico das raízes de *Piper klotzschianum*;
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos espectrométricos e espectrofotométricos como RMN de ^{1}H e de ^{13}C, IV e EM e comparação com dados da literatura;
- Observar o efeito da variação sazonal sobre os voláteis extraídos das partes da *A. satureioides;*
- Avaliar a atividade tóxica frente à *Artemia salina* e *Aedes aegypti* dos óleos essenciais das duas espécies estudadas; bem como das substâncias isoladas e extratos brutos de *Piper klotzschianum*;
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias e viabilidade celular com MTT.
- Contribuir para o conhecimento químico e taxonômico das espécies em estudo que ocorrem no Estado da Bahia.

CAPITULO I

Estudo Químico dos Constituintes Fixos do Extrato Etanólico das Raízes de *Piper Klotzschianum* Kunth (Piperaceae)

I.1 REFERENCIAL TEÓRICO

I.1.1 Família Piperaceae

A família Piperaceae é composta de um número entre 2500 a 3000 espécies, que são classificadas em cinco gêneros: *Manekia, Marcropiper, Peperomia, Piper e Zippelia*, que tem distribuição tropical e subtropical ao redor do globo. Sendo que quatro desses gêneros se fazem presentes no Brasil, em um número constituído por aproximadamente 500 espécies [3-5].

Espécies pertencentes a essa família são encontradas em todo o território brasileiro desde a região sul à sudeste do país, no berço da Mata Atlântica, percorrendo todo litoral, até região norte do país, atingindo a Floresta Amazônica. Sendo que a Mata Atlântica possui a maior fonte de espécies da família, destacando ainda as localidades de Serra dos Órgãos (RJ), o Parque Nacional do Itatiaia (RJ) e Santa Teresa (ES), por possuírem as maiores variedades da espécie: 70, 68 e 67, respectivamente [6-10].

Como contribuição para as pesquisas realizadas no país, tanto no âmbito regional quanto nacional, pesquisadores apontam a relevância de se estudar as espécies da família Piperaceae encontradas no nordeste brasileiro, destacando sua importância econômica e medicinal, onde algumas delas são utilizadas como iguarias no mercado mundial, como por exemplo, a pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*), empregadas também para fins medicinais em comunidades rurais e urbanas em diversas partes do mundo [11-12].

I.1.2 Gênero *Piper*

O gênero *Piper* é o maior entre os representantes das angiospermas basais, com um número estimado de 1000 a 2000 espécies [13-14]. Ele destaca-se por seu fenótipo marcante, presente em toda espécie: caules nodosos, folhas inteiras, dorsiventrais e alternas, com inflorescências em forma de espigas solitárias e cheiros característicos [15-16]. Tais semelhanças muitas vezes são um problema para identificação taxonômica das plantas, implicando muitas vezes em troca ou falsificação comercial, sugerindo assim uma necessidade de estudos etnobotânicos em caráter morfológicos, anatômicos e histoquímicos, para obtenção de dados físico-químicos, destacando características para identificação das espécies [5, 17].

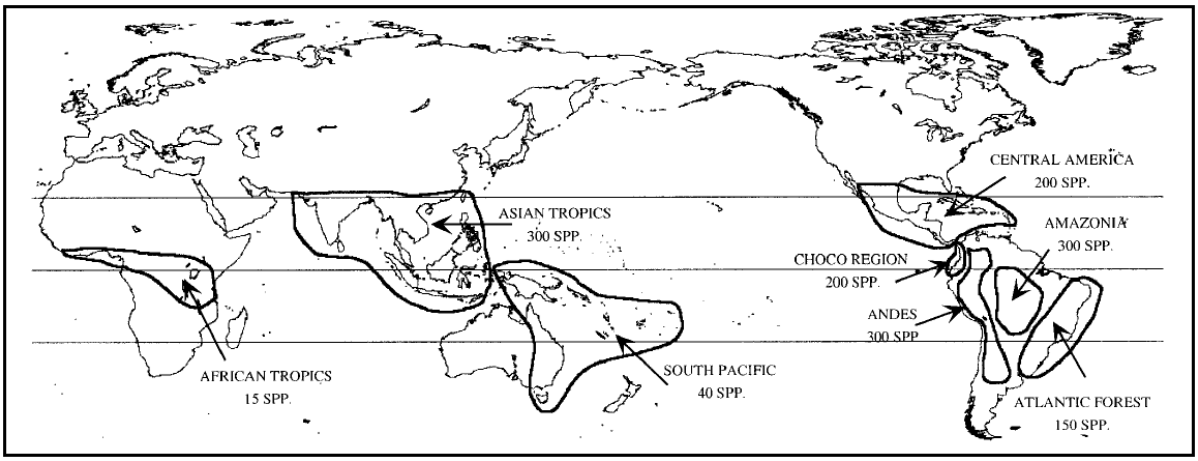


Figura I.1: Distribuição geográfica do gênero *Piper*. Estimativas do número de espécies para cada centro de diversidade [13].

I.1.3. Aspectos Etnobotânicos do Gênero *Piper*

No Brasil, de acordo com a literatura, há relatos da utilização de espécies do gênero *Piper* para fins medicinais, que vem provavelmente, desde a época pré-colonial com a medicina indígena, através de plantas como a *Peperomia elongata* que era utilizada pela tribo de índios Tenharins na cura de diarreias e dores estomacais. *Peperomia rotundifolia* conhecida popularmente como Sava-vida ou Salva-vidas e utilizada para tratamento de hipertensão, gastrite e gripes; *Piper cavalcantei* Yuncker, chamada na região de Céu elétrico ou Óleo elétrico, com atividades analgésicas e antitérmicas, utilizada para náuseas e cólicas menstruais; *Piper cernnum* Vell, conhecida por João-guarandi-do-grado, Jaborandi-cepoti ou Pimenta-de-morcego, sendo utilizada no tratamento de distúrbios renais, estomacais, hepáticos e para o alívio de dores musculares, entre outras espécies [5].

Há também, a inserção do gênero na medicina popular afro-brasileira, em que algumas espécies vêm sendo vinculadas a alguns rituais religiosos no candomblé, a exemplo, do uso da *Peperomia pellucida H.B.K.*, conhecida popularmente na Bahia pelos nomes de: Alfavaquinha-de-cobra, Oriri, Folha-de-oxum ou Folha-de-vidro. A planta é utilizada como banhos em rituais para filhos de Oxum e Yemanjá, sendo um símbolo da água presente na natureza, já que cresce espontaneamente em locais úmidos, também é utilizada contra hipertensão, males gastrointestinais, como diurético e contra afecções oculares [18].

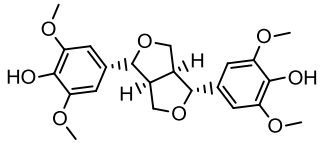
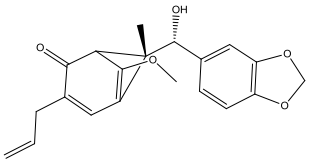
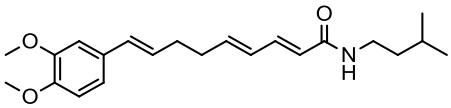
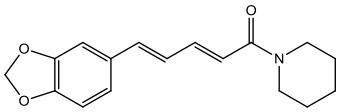
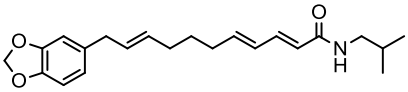
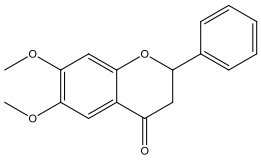
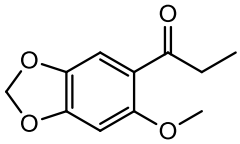
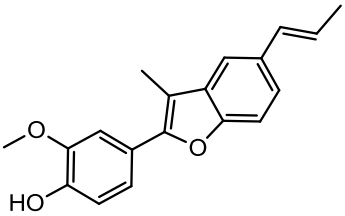
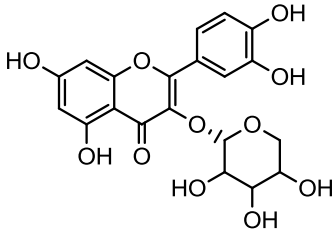
Ainda no Brasil, a única espécie do gênero com propriedades farmacológicas comprovadas e que tem registro simplificado pela ANVISA, é a *Piper methysticum,* através da IN 5, de 11 de dezembro de 2008 [19-20]. A planta nativa da Oceania, que foi disseminada na América por colonizadores europeus, tem empregos milenares, cerca de 3000 anos, consumida na forma de bebidas alcoólicas [21], possuindo atividades antidepressivas, anticonvulsivantes, combate a insônia e euforia, neuroprotetora, além de atividade analgésica e relaxante muscular [22].

Diante disso o gênero *Piper* tem despertado o interesse da comunidade científica na busca pelo desenvolvimento de novos fármacos, já que são tantas espécies e o Brasil conta com uma flora tão rica. Isso contribuiria para uma futura atualização e reconhecimento desse gênero frente às agencias fomentadoras da saúde, e quem sabe passando a ser uma fonte confiável para a população na atribuição das plantas para medicina popular.

I.1.4 Aspectos Fitoquímicos e Atividades Biológicas do Gênero *Piper*

É possível encontrar na literatura uma gama de substâncias, metabólicos secundários, isolados e identificados, pertencentes a diversas classes, que fazem parte da constituição química do gênero *Piper* (Tabela I.1, p.26). Entre elas, são listados alcaloides/piperamidas, chalconas/diidrochalconas, esteroides, flavonas, flavonoides, fenilpropanoides, lactonas, lignanas, neolignanas, terpenos, substâncias que apresentam diversas atividades biológicas, que vão desde propriedades clínicas a tóxicas [23].

Tabela I.1: **Algumas Substâncias isoladas em plantas do gênero *Piper* com atividades biológicas comprovadas em literatura.**

Substâncias	Espécie	Bioatividade	Referência
	*P. wallichii*	Atividade antitrombótica	[24]
	*P. kadsura*	Atividade Neuroproterora	[25]
	*P. longum*	Atividade Larvicida	[26]
	*P. tuberculatum* *P. nigrum* *P. longum*	Neuroproterora Antitrypanosoma Anticarcinogênicas	[27-29]
	*P. laetispicum*	Antidepressivo Antinociceptiva	[30]
	*P. methysticum*	Antioxidantes	[31]
	*P. marginatum.*	Antifúngica	[32]
	*P. regnellii*	Anti-tuberculosi	[33]
	*P. betle L*	Anti-inflamatória Antibacteriana Anticarcinogênica	[34-35]

Em particular, no gênero *Piper,* muitas espécies têm como constituintes majoritários alcaloides/piperamidas, onde, por definição recente, as piperamidas são uma classe de compostos que possuem em sua estrutura um grupo aromático e um grupo amida, sendo o termo alcaloide abrangente também às amidas alifáticas, considerando-as alcamidas de cadeia aberta [36]. Grande parte das bioatividades atribuídas a plantas do gênero contra microrganismos, vírus, fungos e bactérias, podem ser atribuídas à presença destas duas classes de compostos [27]. Incluindo atividade antimicrobiana [37], atividade anti-inflamatória e antinociceptiva [30], anticonvulsivantes [38], antiartríticos [39], entre outras de interesse parcial, que serão comentadas a seguir.

I.1.4.1 Atividade Antitripanossoma

O Mal de Chagas assombra diversos países da América Latina, sendo uma doença de forte impacto social, que atingiu cerca de 16 milhões de pessoas em todo continente no século passado [40]. Em tempos atuais o número de infectados passou para 18 milhões em 2006 com aproximadamente 45 mil mortes por ano [41]. De acordo com Ventura-Garcia et al [42], em 2013 estes números caem para 10 milhões de infectados e aproximadamente 20 mil mortes por ano.

No entanto, a Doença de Chagas não está restrita apenas ao continente americano, sendo um grande problema em países intertropicais. A doença faz parte do grupo das doenças tropicais negligenciadas (DTNs), simplesmente porque os casos de infecção estão restritos a populações carentes, residentes de zonas rurais e favelas de países subdesenvolvidos, em que não se tornam um mercado atrativo para grandes indústrias farmacêuticas [43].

Dessa forma, pessoas que vivem à margem da miséria e da pobreza espalhados em todo o mundo sofrem os impactos das DTNs. Isso se deve à falta de incentivo público e privado no financiamento de pesquisas e produção de drogas eficientes e economicamente acessíveis, que atendam as necessidades dessas pessoas. Muitas delas, por falta de condições financeiras não podem adquirir medicamentos atuais disponíveis, o que as levam a buscarem pela medicina popular, fazendo uso de plantas e ervas para obter tratamento e alívio para suas enfermidades [43-45].

As plantas como *Piper cubeba, Piper ovatum e Pothomorphe umbellata* são um exemplo de plantas do gênero *Piper* utilizadas no tratamento da Doença de chagas, seus efeitos estão atrelados à presença de piperamidas como a piperovatina e piperlonguminina, com atividade intitripanossoma (Figura I.2) [43-45]

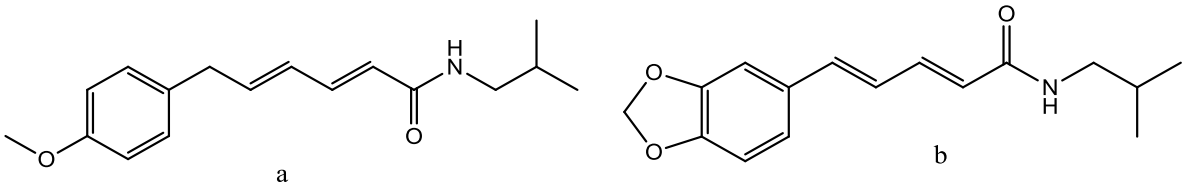


Figura I.2: (a) piperovatina e (b) piperlonguminina, piperamidas com efeito antitripanossoma.

Nesse contexto, é possível encontrar na literatura várias espécies de *Piper* presentes na flora brasileira, cujos extratos ou componentes vêm mostrando altos níveis de inibição na proliferação do *Tripanosoma cruzi*, sendo suas atividades, em boa parte dos estudos, atribuídas à presença de diversas piperamidas, na Figura I.3 estão presentes algumas alcalamidas com efeito antitripanossoma [27, 46].

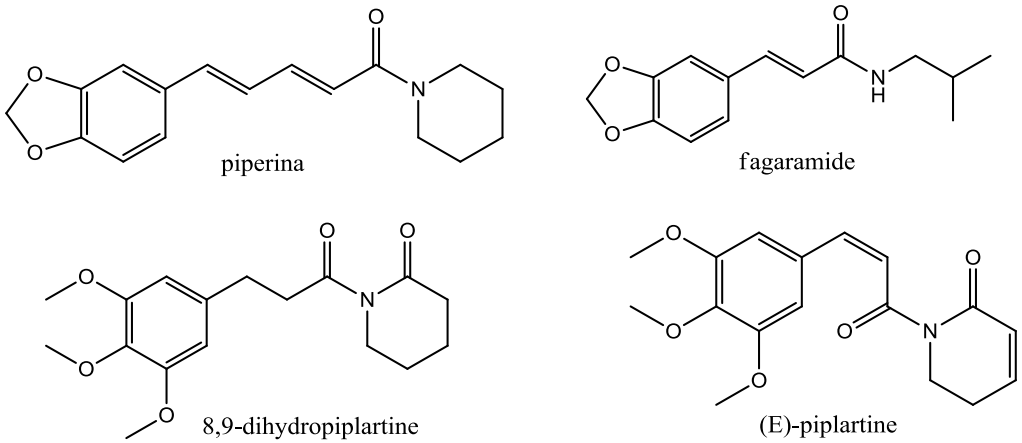


Figura I.3: Algumas piperamidas/alcaloides que possuem atividades antitripanossoma, isoladas de espécies de como a *Piper tuberculatum*, *P. arboreum*, *P. nigrum* e *P. longum* [27, 46].

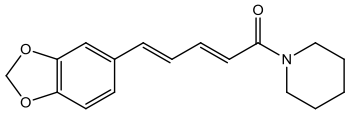
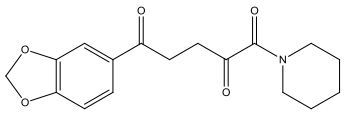
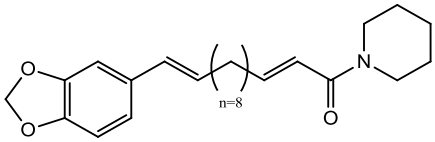
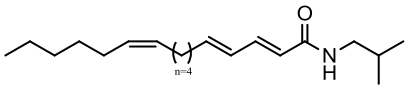
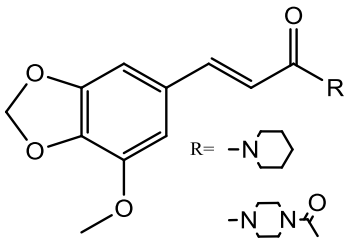
Assim, diante destes exemplos pode-se perceber o grande potencial da família Piperaceae e das espécies do gênero *Piper* como fontes alternativas no tratamento da Doença de Chagas e como fonte de novos metabólicos com atividades antitripanossoma de grande potencial farmacológico.

I.1.4.2 Atividade Neuroprotetora

A neurodegeneração é um processo que está envolvido tanto a processos patológicos quanto ao próprio envelhecimento do organismo. Os distúrbios neurodegenerativos envolvendo disfunção cognitiva e transtornos neuropsiquiátricos, são um dos principais problemas de saúde pública do século XXI, sendo responsáveis por duas a cada mil mortes por ano em todo o mundo. Mediante a situação, os estudos fitoquímicos fazem parte do mecanismo científico no direcionamento para a busca por novos compostos com atividades neuroproteroras, destacando uma gama de compostos naturais com atividade antioxidantes como fenóis, flavonoides, alcaloides, terpenoides, saponinas e ácidos graxos [47].

Em outras palavras, muitas doenças que atacam o sistema nervoso central como câncer, Alzheimer, Parkinson, Esclerose Múltipla, Doença de Huntington estão direta ou indiretamente ligadas ao estresse oxidativo. E a ação protetora desses antioxidantes possui ação direta no (SNC), pois melhoram os aspectos cognitivos e impedem a degeneração do mesmo. Sendo assim, estão listados na Tabela I.2, p.30 alguns trabalhos recentes que contribuem para confirmação da relevância do estudo fitoquímico voltado para o gênero *Piper* e sua ação sobre celular do sistema nervoso central.

Tabela I.2: Substâncias isoladas em plantas do gênero *Piper* que possuem atividade direta na proteção do SNC.

Substâncias	Espécie	Atividade	Referência
	*P. tuberculatum* *P. nigrum* *P. longum*	Neuroproterora Antidepressiva Melhora Cognitiva	[28], [48-49]
	*P. retrofractum*	Neuroprotetora	[50]
	*P. retrofractum*	Neuroprotetora	[50]
	*P. retrofractum*	Neuroprotetora	[50]
	*P. nigrum*	Antidepressiva	[51]

Estes trabalhos deixam claro que os metabólicos secundários provenientes do gênero *Piper* são substâncias promissoras no tratamento de doenças neurodegenerativas, os quais além de atuarem de forma benéfica no SNC, diminuem o efeito degenerativo das células nervosas, melhoram o aspecto cognitivo e ainda amenizam os danos gastrointestinais causados pela maioria dos fármacos atuais utilizados para o tratamento dessas doenças [47, 50, 51].

I.1.4.3 Atividade Anticarcinogênica

Outra doença de preocupação a nível global é o câncer. De acordo com estimativas da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012 houve 14,1 milhões de novos casos e um total de 8,2 milhões de mortes em todo o mundo. Número que deve chegar a 22 milhões de novos casos, com cerca de 13 milhões de mortes por ano nas próximas duas décadas [52].

Para o período de 2014 a 2015 no Brasil, há uma estimativa de 576 mil novos casos de câncer, distribuídos entre câncer de pele do tipo não melanoma, próstata, mama, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero, com números de 182, 69, 57, 33, 27, 20 e 15 mil respectivamente [53].

Nessa perspectiva, pesquisas multidisciplinares vêm sendo realizadas no intuito de combater essa terrível doença. Dessa forma, estudos fitoquímicos de plantas com propriedades anticarcinogênicas vêm sendo fortemente explorados e utilizados como medicina complementar. Nesse sentido, há relatos de mais de 3000 mil espécies de plantas que possuem alguma atividade anticancerígena [54].

Como contribuição, extratos e substâncias como amidas e alcaloides isolados de espécies de *Piper,* assim como muitos derivados, vêm apresentando propriedades anticarcinogênicas em muitas linhagens tumorais evidenciando ainda mais a importância e contribuição do gênero para os estudos fitoquímicos, na descoberta de novas substâncias para produção de fármacos destinados a cura de diversos tipos de câncer [54-56].

Entre estas substâncias ativas podem ser destacadas a piperina, piperlonguminina, piperlongumina e seus derivados (Figura I.4, p.32), incluindo alcaloides que têm atividades comprovadas e que também são drogas consideradas potencialmente promissoras. Estes compostos atacam as células cancerígenas por diversas formas, tendo ainda menos efeitos colaterais que a quimioterapia ou ate mesmo que os métodos invasivos como as cirurgias. [57-58].

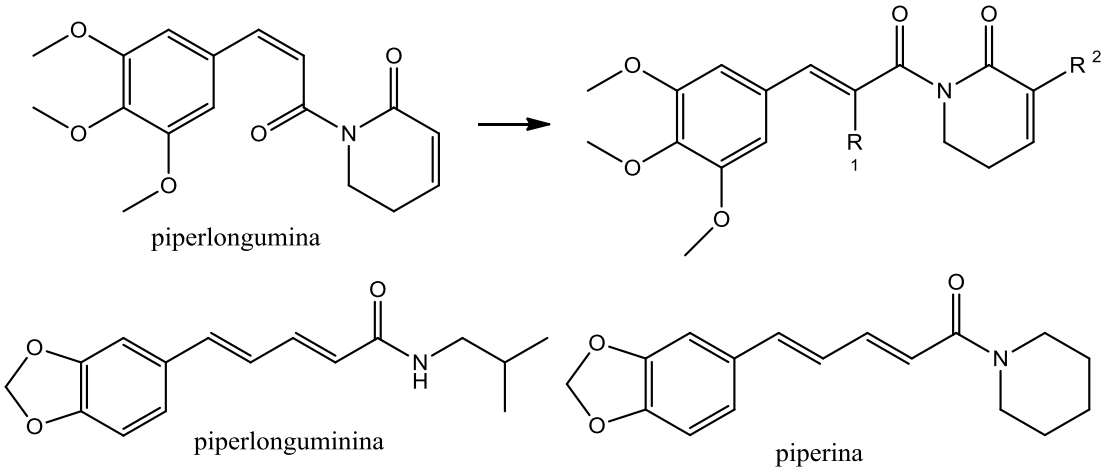


Figura I.4: Algumas piperamidas, alcalóides e derivados com atividades anticarcinogênicas [57- 58].

I.1.4.4 Atividade Larvicida contra o *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é um dos principais vetores de doenças que tem um forte impacto na saúde mundial. De origem africana, foi disseminado pelo mundo juntamente com o desenvolvimento humano, acompanhando o crescimento da população e sua locomoção geográfica, adaptando-se a urbanização e infectando cerca 500 mil pessoas por ano, com aproximadamente 50 mil vítimas em todo o mundo [60]. Endêmicos de zonas tropicais, áreas de clima quente e úmido, é o principal transmissor da febre amarela, dengue e dengue hemorrágica, zika e chikungunya, sendo responsável por constantes e graves epidemias, pondo em risco cerca de 2,5 bilhões de pessoas residentes de zonas tropicais ao redor do mundo [61-62].

No Brasil, nos anos de 2001-2011, foram aproximadamente 6 milhões de infectados, quase 300 mil pessoas e cerca de 5% dos casos, resultaram em óbito [63]. Atualmente no país, está ocorrendo dois surtos epidêmicos, sucessivos, ocasionados por dois vírus distintos: o chikungunya (um RNA vírus da família *Togaviridae* do gênero *Alphavirus*) e o Zika vírus (*arbovírus* do gênero *Flavivírus*). Ambos são de ascendências africana e asiática e utilizam o mesmo inseto vetor como meio de proliferação - mosquitos do gênero *Aedes* incluindo o *Aedes aegypti* – sendo que o Zika vírus é também transmitido por via perinatal e sexual e isso faz que se propague geograficamente com maior rapidez. [64-65].

Em 2014 foram registrados aproximadamente 830 casos de Chikungunya no país e foram identificados dois genótipos do vírus. Em maio de 2015, quando finalmente foi identificada a presença do Zika Vírus no país,16 casos foram catalogados na região Nordeste do país, sendo metade na Bahia e a outra metade no Rio Grande do Norte, tendo relatos da proliferação de casos não somente no Brasil, mas por todos os países da costa sul do pacífico [66-67].

Por ser uma enfermidade que afeta principalmente os países subdesenvolvidos, a dengue é negligenciada pelas instituições de saúde, de forma que ainda não foi desenvolvido uma vacina capaz de inocular o vírus e o método mais fácil e barato de combater a doença é o ataque direto ao mosquito vetor, seja pela extinção do ambiente de reprodução ou ataque direto ao inseto através de inseticidas [61, 68].

A ofensiva direta a mosquitos vetores teve inicio em 1948, quando o primeiro inseticida com efeito prolongado foi criado, o diclorodifeniltricloroetano (DDT) que se encaixa no grupo dos organoclorados (Figura I.5), seguido de compostos organofosforados, carbamatos e piretróides, substâncias que atuam no sistema nervoso central dos insetos, sendo utilizadas no controle de vetores [69].

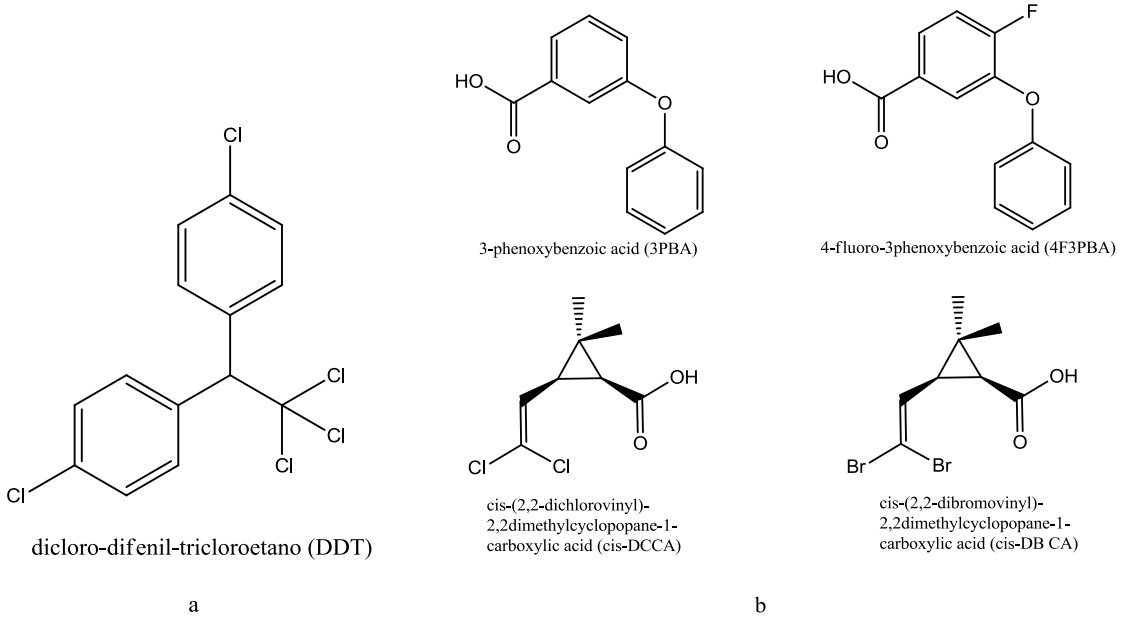


Figura I.5: a) DDT [69], b) alguns organometálicos metabolizados pelo organismo humano [70].

Tais substâncias atuam diretamente no SNC através de três grupos de enzimas: esterases e oxidases de função mista (MFO), glutationa S-transferases (GST) e receptores como o acetilcolinesterase insensível (iAChE). Pesquisas

apontam que o uso contínuo e indiscriminado desses inseticidas vem provocando alterações genéticas nessas enzimas e receptores nas populações de insetos vetores. Tal uso torna-os mais resistentes frente a estas substâncias; por esse motivo há necessidade de estudos voltados à busca por novos inseticidas que sejam mais eficazes no controle dos mosquitos; principalmente àqueles que sejam inofensivos à saúde humana, visto que alguns dos inseticidas mais usuais são acumulativos e nocivos à saúde do ser humano [70-71].

Com uma importante contribuição para melhoria dessa situação, varias espécies do gênero *Piper* constituem fontes naturais de substâncias com bioatividades, cujas propriedades inseticidas de algumas espécies já foram comprovadas em literatura. Relatam atividades larvicidas tanto de extratos quanto de substâncias isoladas dessas plantas, até mesmo contra linhagens de insetos resistentes a inseticidas como os piretróides [73-74].

Entre estas substâncias pode-se destacar algumas amidas e lactamas (Figura I.6), classes de moléculas encontradas em abundância muitas plantas que compõe o gênero. Alguns estudos destacam a eficácia de determinadas piperamidas frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

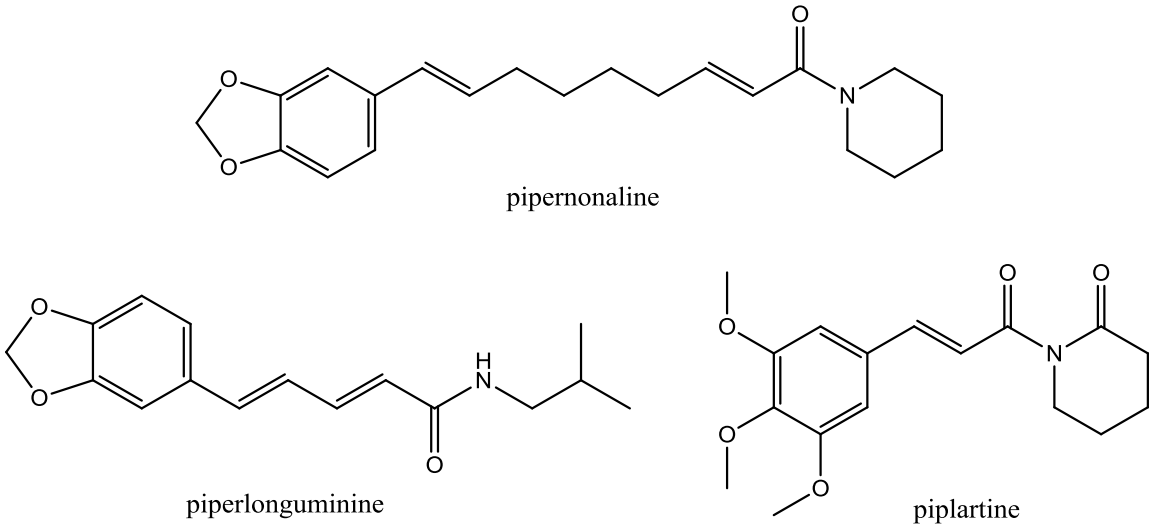


Figura I.6: Piperamidas comuns em varias espécies do gênero Piper e que possuem atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* [75-77].

Os inseticidas naturais compõem uma excelente alternativa para o controle de vetores, além de serem mais viáveis economicamente falando; podem atuar de diversas formas sobre as larvas e/ou mosquitos, tendo uma eficácia diferenciada dos inseticidas comuns utilizados. Além de algumas dessas substâncias não serem

nocivas aos seres humanos, ainda contam com a vantagem de permanecer pouco tempo no ambiente reduzindo os danos ambientais.

I.1.5 Piper Klotzschianum (Kunth)

A planta, conhecida popularmente por Jambuaçu na região amazônica, foi identificada em 1973 pelo Dr. Truman George Yuncker, taxonomista botânico reconhecido por seus trabalhos direcionados para a família Piperaceae. Yuncker descreve as características fenotípicas da espécie para sua identificação. Conhecida também por João Barandi, ou ainda João Barandinho no sudeste e nordeste do país, a espécie foi estudada recentemente por Nascimento [78], sendo o trabalho mais completo disponível na literatura que descreve a constituição química da planta. Em sua tese, tem como foco o estudo químico dos constituintes fixos das raízes da planta e composição química dos óleos essenciais, juntamente com suas atividades biológicas, que deram origem a dois artigos [36,79]. Nesse estudo foram isoladas 46 substâncias, sendo duas inéditas como metabólicos secundários em plantas Figura I.7 (a), e três outras nunca relatadas na literatura Figura I.7 (b).

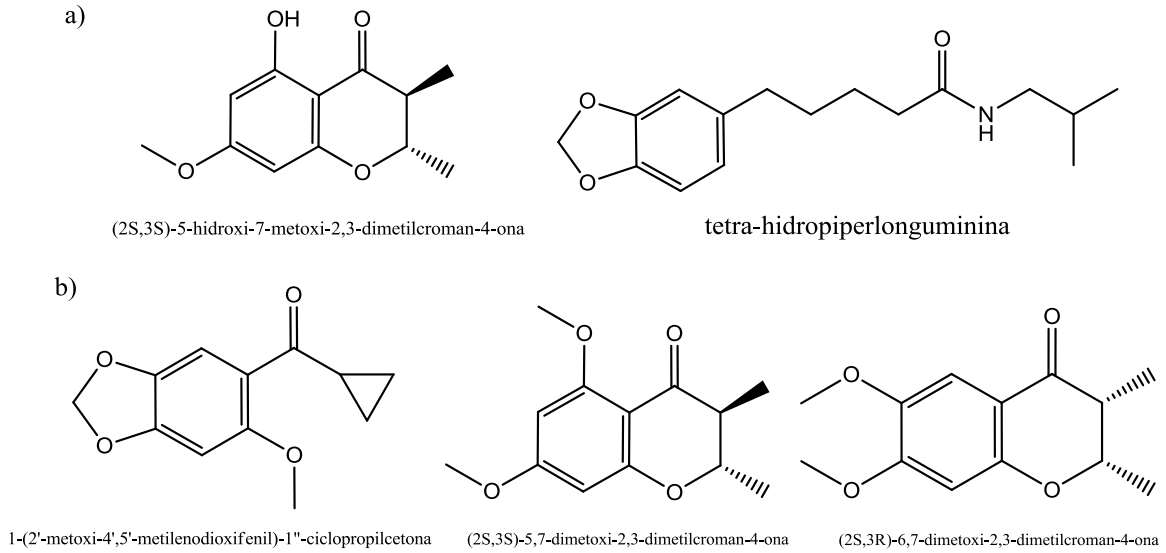


Figura I.7: Substâncias isoladas da *P. klotzschianum*, a) substâncias inéditas como metabólicos secundários de plantas, b) substâncias inéditas na literatura [78].

Na busca por traçar o perfil químico as raízes da *P. klotzschianum*, Nascimento [78] isolou e identificou substâncias como *β*-sitosterol e estigmasterol D-glicosilados e não glicosilados, o ácido 4-metoxibenzóico, metileugenol, isoasarona, 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, os ácidos *trans*-feruloiloxidocosanóico,

tetracosanóico e hexacosanóico. E como esperado para táxons pertencentes ao gênero, algumas piperamidas comuns em varias espécies de *Piper* (Figura I.8, p.36).

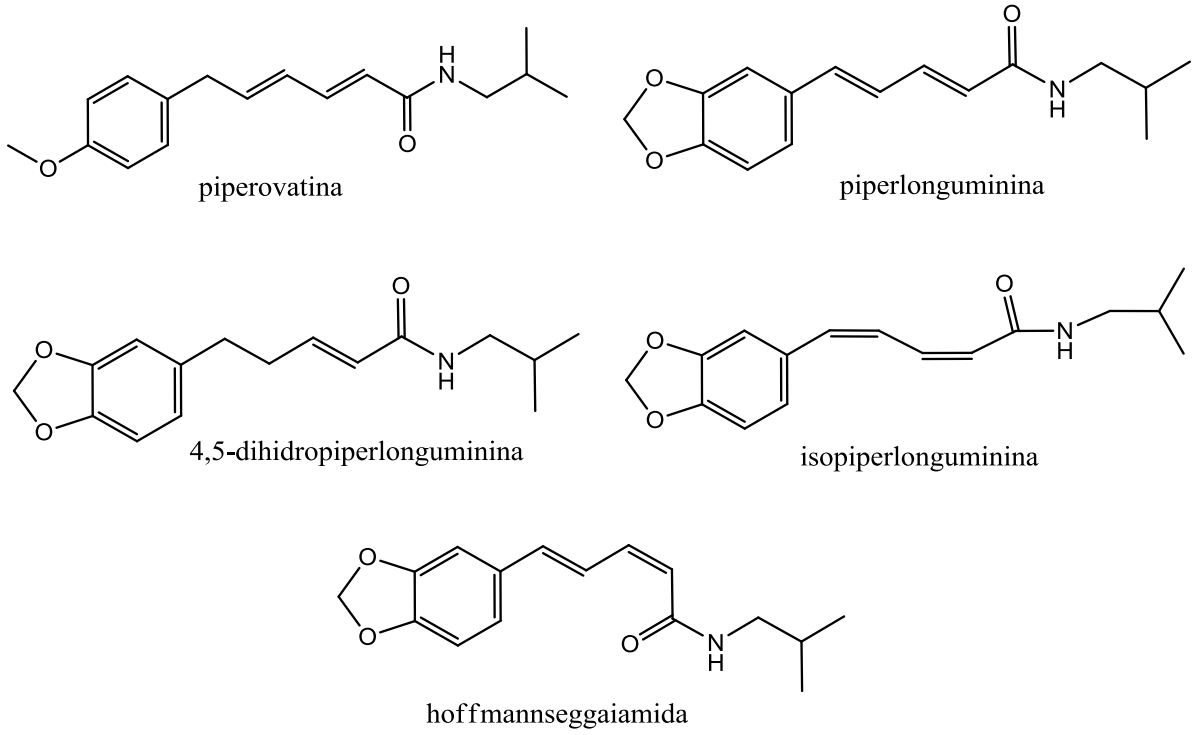


Figura I.8: Piperamidas isoladas a partir dos extratos hexânico, diclorometânico e etanólico das raízes de *P. klotzschianum* [78].

No entanto, ainda há muito que se estudar, uma vez que ainda não foi explorado o potencial químico dos constituintes fixos dos caules e folhas da planta, e seu extrato etanólico foi muito pouco explorado, tornando-se assim, uma opção de estudo que irá contribuir para totalização do estudo fitoquímico da espécie, sendo possível a descoberta de alguns novos compostos bioativos.

I.2 PARTE EXPERIMENTAL

I.2.1 Coleta do Material Vegetal

A *P. klotzschianum* foi coletada no estado do Espirito Santo, em Vila do Riacho-Aracruz, no dia 02 de Janeiro de 2013. Sua exsicata foi identificada Profa. Dra. Elzie Flanklim Guimarães e depositadas no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com registro nº 480408, 480409 e 480410 respectivamente.

I.2.2 Preparo do Extrato

As raízes foram secas a sobra, permanecendo sobre a bancada durante o período de 3 a 9 de janeiro de 2013, obtendo-se uma massa de material vegetal igual a 156,0 g. No dia 9 de janeiro o material foi submetido ao processo de hidrodestilação para obtenção do óleo essencial. Uma vez extraído os voláteis, as foram raízes submetidas à secagem em estufa com circulação de ar, a 50°C por um período aproximado de 48 horas. Após a secagem a massa de raízes foi de 155,0 g. Em seguida, as raízes foram transferidas para um balão de 5,0 L, com 3,0 L de solvente (etanol) e deixados em repouso por 3 dias. Após esse período todo o líquido foi submetido ao processo de rotaevaporação para obtenção do extrato etanólico das raízes de *Piper klotzschianum* (EER*Pk*) com massa igual a 4,0 g.

I.2.3 Estudo do Extrato Etanólico das Raízes da *P. klotzschianum*

O extrato etanólico das raízes da *P. klotzschianum* (EER*Pk*), foi submetido a um fracionamento por extração líquido-líquido. Primeiramente o EER*Pk* foi diluído em 100,0 mL de solução metanol:água (7:3) e transferida para um funil de separação de 200,0 mL. Em seguida foi feito o fracionamento, primeiro com clorofórmio, gerando a fração clorofórmica (FC), em seguida com Acetato de Etila (AcOEt), gerando a fração acetato (FAcOEt). O procedimento foi realizado em triplicata para cada solvente utilizando volumes de 40,0 mL. A solução de partida ao fim do procedimento foi denominada, fração aquosa (FAq). Ao final deste processo foram obtidas três frações chamadas de FC, FAcOEt e FAq, ilustração na Figura I.9, p.38.

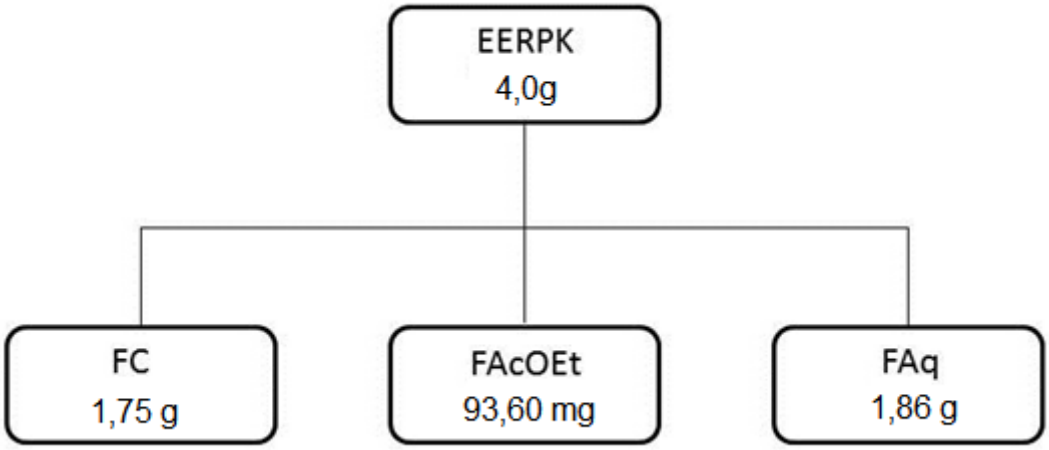


Figura I.9: Fracionamento do extrato etanólico (EER*Pk*) das raízes de *P. klotzschianum* por extração líquido-líquido.

I.2.3.1 Estudo da Fração Clorofórmica (Fc) das Raízes de *P. klotzschianum*

Uma massa de 1,75 g da fração clorofórmica (FC) foi incorporada em sílica-gel 60 e submetida à cromatografia clássica (CC), utilizando como fase móvel hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt) em ordem crescente de polaridade (8:1, 7:1, 6:1, 5:1; 4:1, 2:1, 1:1, 1:6, 0:1) sendo chamada agora de coluna (ECD1). Foram coletadas 69 frações de 50,0 mL cada, que após análise por cromatografia em camada delgada CCD, foram reagrupadas em 23 subfrações, que foram submetidas a sucessivos fracionamentos por CC, exibidos nos fluxogramas compostos pelas Figuras I.11, p.41 e Figura I.12 p.43, e suas massas e polaridades estão listadas a Tabela I.3, p.44.

I.2.3.1.1 Purificação da Fração ECD1-7

A fração ECD1-7 apresentava-se como um sólido de aparência cristalina com impurezas. Sua massa 31,0 mg foi solubilizada na mistura de Hex:AcOEt (3:1) e submetida a CC em sílica-gel 60 com gradiente de polaridade, partindo da polaridade utilizada para solubilização da amostra. Seu fracionamento gerou a terceira coluna chamada de ECD3, resultando em 6 subfrações, onde a fração ECD3-2 foi identificada através dos dados de RMN de ^{1}H como sendo uma mistura dos esteróides estgmasterol e *β*-sitosterol, substâncias [III e IV], Figura I.23, p.55.

I.2.3.1.2 Purificação da Fração ECD1-12

A fração ECD1-12 com massa igual a 180,0 mg foi submetida a CC em sílica-gel 60 e fase móvel DCM:AcOEt (5:1) com polaridade constante (isocrática), tornando-se a quarta coluna ECD4. Foram coletadas 42 frações com volumes de aproximadamente 20 mL cada, que foram reunidas em 11 subfrações após análise por CCDC. A subfração ECD4-4 de massa 27,7 mg, apresentou-se como um solido amorfo branco foi identificado através do espectro de RMN de ^{13}C e ^{1}H como sendo a piperovatina substância [I]. A substância também foi encontrada na fração ECD4-3, que passou por sucessivos fracionamentos (conforme o fluxograma da Figura I.11, p.42) por CC em sílica flash e fase móvel DCM:AcOEt (5:1) para purificação resultando finalmente na coluna ECD20 sendo as subfrações (ECD20-1, ECD20-2 e ECD20-3) com massa de 28,1 mg a piperovatina, resultando assim num total de 55,8 mg da substância, que representa 1,39% da massa total do extrato etanólico da *P. klotzschianum*.

I.2.3.1.3 Purificação da Fração ECD10-2

O fracionamento das subfrações (ECD8-4 e ECD8-5) gerou a coluna ECD10 (conforme o fluxograma da Figura I.11, p.42), onde a subfração ECD10-2 (22,1 mg) apresentava-se como um sólido amorfo semicristalino de coloração amarela fraca e translucida depositada nas paredes do recipiente, sua purificação foi obtida através do processo de recristalização com uma mistura de Hex:éter etílico (4:1), resultando em 15,0 mg de um sólido cristalino (Figura I.10, p.40) que foi identificado por RMN de ^{13}C e ^{1}H como sendo a piperamida tetra-hidropiperlonguminina, substância [II], sendo identificada e purificada também nas frações (ECD10-3, ECD10-4 e ECD10-5) que deram origem a coluna ECD21 presentes também nas frações (ECD22-4 e ECD22-5) originária do fracionamento sucessivo de ECD1-15. O total em massa da tetra-hidrropiperlonguminina é de 50,2 mg que representa 1,25% da massa total do extrato etanólico etanólico das raízes da *P. klotzschianum*.

Figura I.10: Sólido cristalino identificado como sendo a piperamida tetra-hidropiperlonguminina, substância [II]. Fonte própria.

I.2.3.1.4 Análise dos Ésteres metílicos por CG-EM Obtidos a partir das Frações ECD1-1 e ECD1-2

Após a análise dos espectros de infravermelho (Figura I.25, p.59) para as frações ECD1-1 (45,2 mg) e ECD1-2 (58,0 mg) implicam que ambas as amostras são compostas por uma mistura de ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos. Para sua análise por CG-EM as amostras foram submetidas a uma reação de transesterificação seguida de uma reação de esterificação para obtenção dos ésteres metílicos, de acordo com a metodologia de Jham (1982) citada por Milinsk [80], procedimento: 10 mg da fração foi dissolvida em 1,0mL de solução de KOH/MeOH 0,5 M, em um tubo de ensaio. Aqueceu-se o tubo a 100ºC durante 5 minutos; em seguida, adicionam-se 0,4 mL de uma solução de HCl 36% : MeOH (4:1 v/v) e aqueceu-se por mais cinco minutos mantendo a temperatura utilizada anteriormente. Em seguida, adicionou-se 2 mL de água destilada.

Os ésteres metílicos obtidos foram extraídos com hexano (3 x 5 mL), sendo a fase orgânica submetida a secagem com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e em seguida filtrada. O solvente orgânico foi removido em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, sendo os ésteres metílicos obtidos redissolvidos em 1,0 mL DCM grau HPLC para posterior análise por CG-EM. Para análise por CG-EM foi utilizada

uma mistura contendo os padrões de ésteres metílicos (FAME mix C8-C24, Supelco) para identificação dos constituintes presentes nas amostras ECD1-1 e ECD1-2.

A identificação dos componentes das amostras foram obtidas através da análise em um cromatógrafo de fase gasosa acoplado à espectrometro de massas de baixa resolução (CG-EM) da Shimadzu, com detector seletivo de massas, modelo QP2010, do Laboratório de Cromatografia Dr. Jailson Bittencourt, instalado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Jequié (Figura II.1, p.66). Coluna cromatográfica e condições de análises: coluna DB-5 composta de 5% de fenila com 95% dimetilpolissiloxano, 30 m X 0,25 mm de diâmetro interno, espessura do filme de 0,25 µm. Fluxo de gás de arraste (He) foi de 1,8 $mL.min^{-1}$; a temperatura do injetor foi 290°C; a temperatura da interface foi 290ºC; e a temperatura inicial da coluna foi de 100°C, aumentando 6°$C.min^{-1}$, até atingir 285ºC, permanecendo constante nesta temperatura por 28 minutos. A razão de split 1/27; volume injetado 1 µL de cada amostra dissolvida em hexano, na concentração de 10.000 $\mu g.mL^{-1}$. As condições do espectrômetro de massas foram, energia de impacto 70 eV; velocidade de varredura 1000; intervalo de varredura de 0,5 e registro da razão m/z de 30,00 a 600,00.

Fração Clorofórmica do Extrato Etanólico das Raízes de *P. klotzschianum*

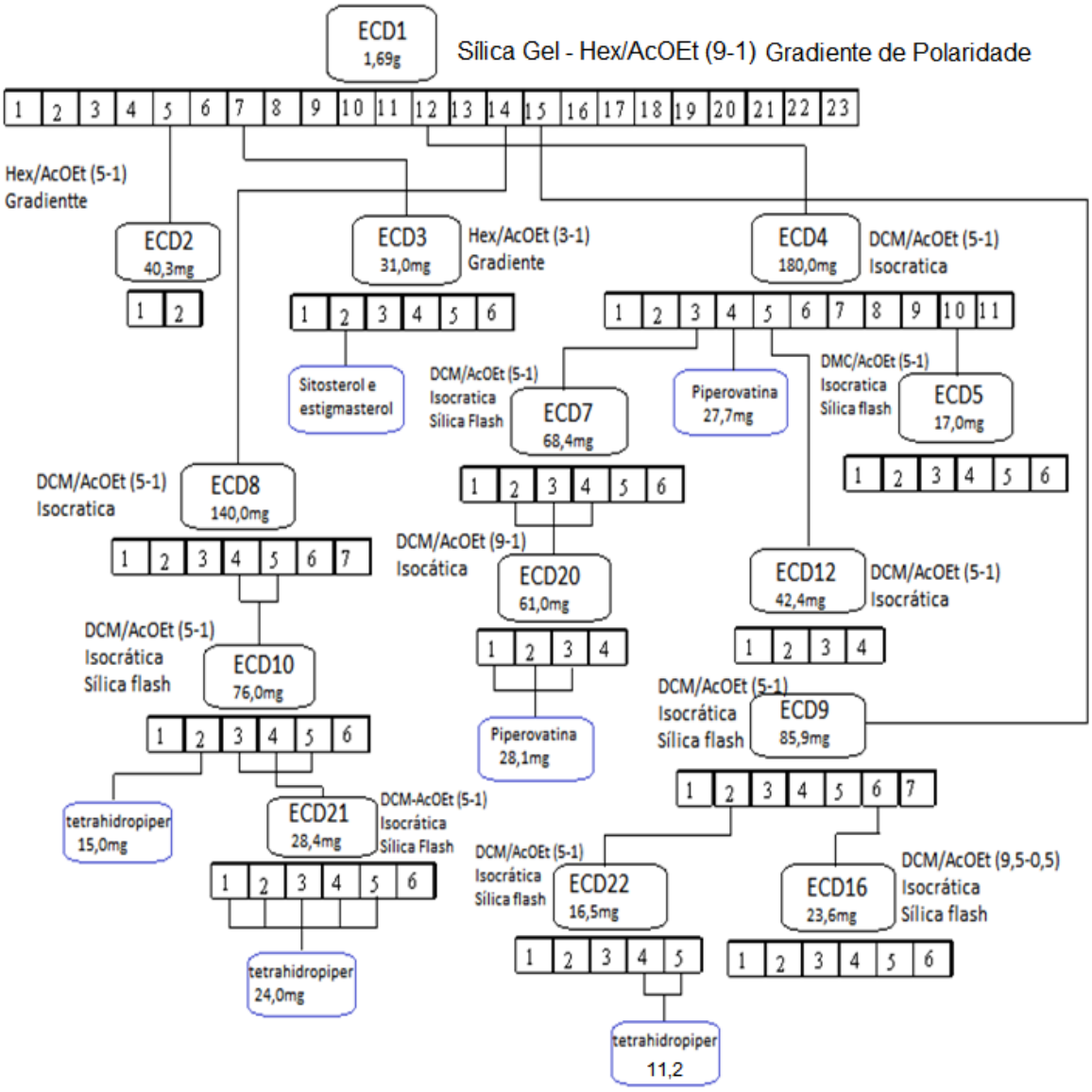


Figura I.11: Fluxograma Simplificado (Parte 1) de 2 das frações obtidas do fracionamento da FC.

Fração Clorofórmica do Extrado Etanólico das Raízes de *P.klotzschianum*

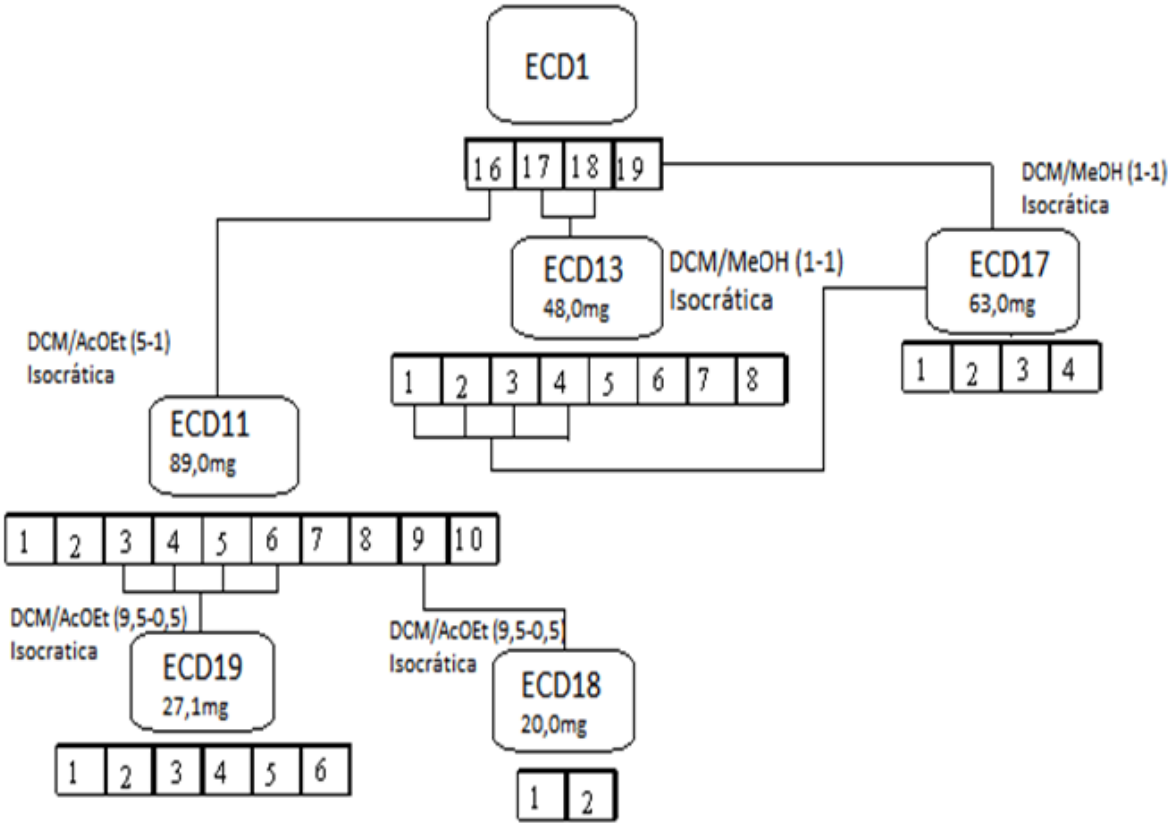


Figura I.12: Fluxograma Simplificado (Parte 2) de 2 das frações obtidas do fracionamento da FC.

Tabela I.3: Frações obtidas do fracionamento em CC da fração clorofórmica FC.

Código	Frações	Sistema Eluente	Massa (mg)	Substâncias
ECD1-1	1 – 2	Hex-AcOEt (8/1)	45,2	Ésteres Graxos
ECD1-2	3 – 5	Hex-AcOEt (8/1)	58,0	Ésteres Graxos
ECD1-3	6	Hex-AcOEt (8/1)	3,20	Não trabalhada
ECD1-4	7 – 10	Hex-AcOEt (8/1)	13,6	Não trabalhada
ECD1-5	11 – 16	Hex-AcOEt (8/1)	40,3	NI
ECD1-6	17 – 18	Hex-AcOEt (8/1)	6,10	Não trabalhada
ECD1-7	19 – 20	Hex-AcOEt (7/1)	31,0	Esteróides
ECD1-8	21 – 22	Hex-AcOEt (7/1)	63,9	Não trabalhada
ECD1-9	23 – 28	Hex-AcOEt (6/1)	31,6	NI
ECD1-10	29 – 34	Hex-AcOEt (5/1)	21,0	NI
ECD1-11	35 – 39	Hex-AcOEt (5/1)	51,0	Não trabalhada
ECD1-12	40 – 43	Hex-AcOEt (5/1)	180	Piperovatina
ECD1-13	44 – 45	Hex-AcOEt (5/1)	65,6	Não trabalhada
ECD1-14	46 – 49	Hex-AcOEt (3/1)	140	Tetra-hidro.
ECD1-15	50 – 53	Hex-AcOEt (3/1)	85,9	Tetra-hidro.
ECD1-16	54 – 56	Hex-AcOEt (1/6)	89,0	NI
ECD1-17	57	Hex-AcOEt (1/6)	18,2	NI
ECD1-18	58	Hex-AcOEt (1/6)	29,8	NI
ECD1-19	59	Hex-AcOEt (1/6)	25,4	NI
ECD1-20	60 – 64	Hex-AcOEt (1/6)	286	NI
ECD1-21	65 – 67	AcOEt-MeOH (1/1)	135	Não trabalhada
ECD1-22	68	MeOH	59,7	Não trabalhada
ECD1-23	69	MeOH	55,8	Não trabalhada

***NI –** não identificado.

I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

I.3.1 Identificação da Piperovatina

A piperovatina (Fig. I.13) foi identificada através da análise dos dados de EM e espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C (Figura I.14 e I.15, p.47 e 48), que estão listados na Tabela I.4 (p.46), e também por comparação com aqueles descritos na literatura.

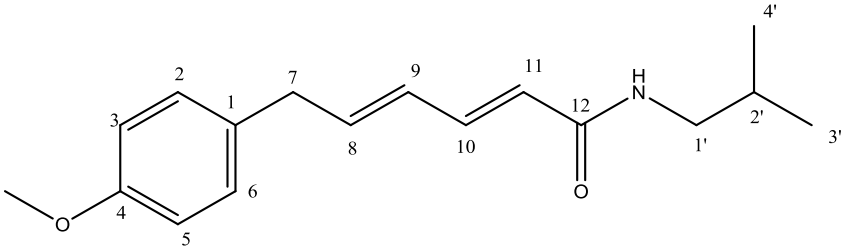


Figura I.13: Estrutura molecular da substância [I], piperovatina encontrada nas frações ECD4-4, ECD20-1, ECD20-2, ECD200-3.

A amostra ECD4-4 apresentava-se como um sólido amorfo branco. Feita sua análise cromatográfica Figura I.16 (A) p.49 pode-se perceber que a amostra apresentava algumas impurezas, o que não dificultou a identificação do composto uma vez que sua concentração era muito superior. Para o pico principal do EM (Figura I.16 (B) p.49) apresentou íon molecular *m/z= 273* e pico base com m/z= 173, o que esta de acordo com a literatura [94]. Suas principais fragmentações são apresentadas na Figura I.17 p.49

Através da análise dos dados de RMN de carbono e hidrogênio, foram encontrados os sinais característicos da substância (Tabela I.4 p.46)**.** Assim podemos observar os valores para o carbono acila em δ_C 166,2, o sinal do grupo metoxila, um singleto com δ_H 3,79 e δ_C 55,28 e os dois singletos referentes aos grupos CH_3 com δ_H (0,93 e 0,91) e δ_C 20,10 referentes aos carbonos. É possível observar os sinais dos carbonos e hidrogênios aromáticos C1 e C5 com deslocamentos de δ_C 131,9 e 158,20 respectivamente e os sinais dobrados com δ_C 129,59 e 113,98 que são os sinais de (C2, C6) e (C3, C5) respectivamente e δ_H 7,08 e 6,08 que são dubletos com J= 10Hz. Fora da região dos aromáticos pode-se visualizar ainda o dubleto referente ao hidrogênio do carbono alfa carbonílico com δ_H 5,76 e δC 122,59 e J= 15Hz, o tripleto característico para o hidrogênio de C1' com δ_H 3,16 e δ_C 46,94, por fim o multipleto referente ao hidrogênio de C2' com δ_H 1,80 e δ_C 28,61.

Tabela I.4: Dados de RMN de ^{1}H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da piperovatina. Deslocamento químicos δ (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (JHz) entre parênteses.

	Amostra		**[81]**	
C	**δH**	**δC**	**δH**	**δC**
1	-	131,09	-	131,32
4	-	158,20	-	158,39
12	-	166,19	-	166,53
CH				
2	7,10 (d, 10,0)	129.59	7,07 (d, 8,3)	129,81
3	6,85 (d, 10,0)	113,98	6,84 (d, 8,3)	114,20
5	6,85 (d, 10,0)	113,98	6,84 (d, 8,3)	114,20
6	7,08 (d, 10,0)	129,59	7,07 (d, 8,3)	129,81
8	6,17 (m)	141,18	6,17 (td, 15,0/6,1)	140,96
9	6,12 (m)	129,02	6,11	129,27
10	7,22 (dd, 10,0/10,0)	140,80	7,20 (dd, 15,0/10,2)	141,19
11	5,79 (d, 15,0)	122,59	5,80 (d)	122,92
2'	1,80 (m)	28,61	1,79 (m)	28,82
CH_2				
7	3,42 (d, 5,0)	38,27	3,42 (d, 6,1)	38,48
1'	3,16 (t, 5,0)	46,94	3,15 (t, 6,7)	47,18
CH_3				
MeO-4	3,79 (s)	55,28	3,90 (s)	55,49
3', 4'	0,93/0,91 (s,s)	20.10	0,92 (d, 6,7)	20,33

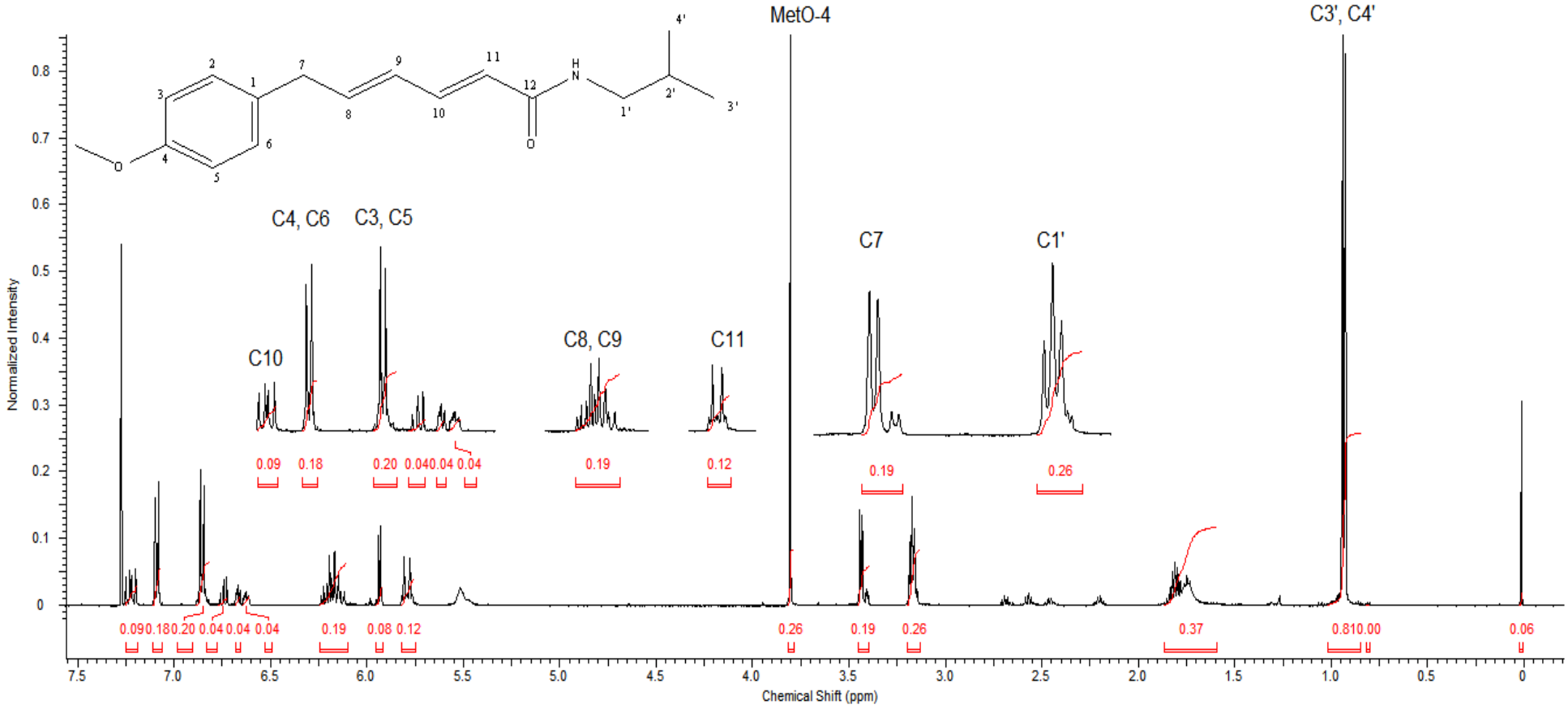


Figura I.14: Espectros de RMN de ^{1}H para piperovatina [500 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)].

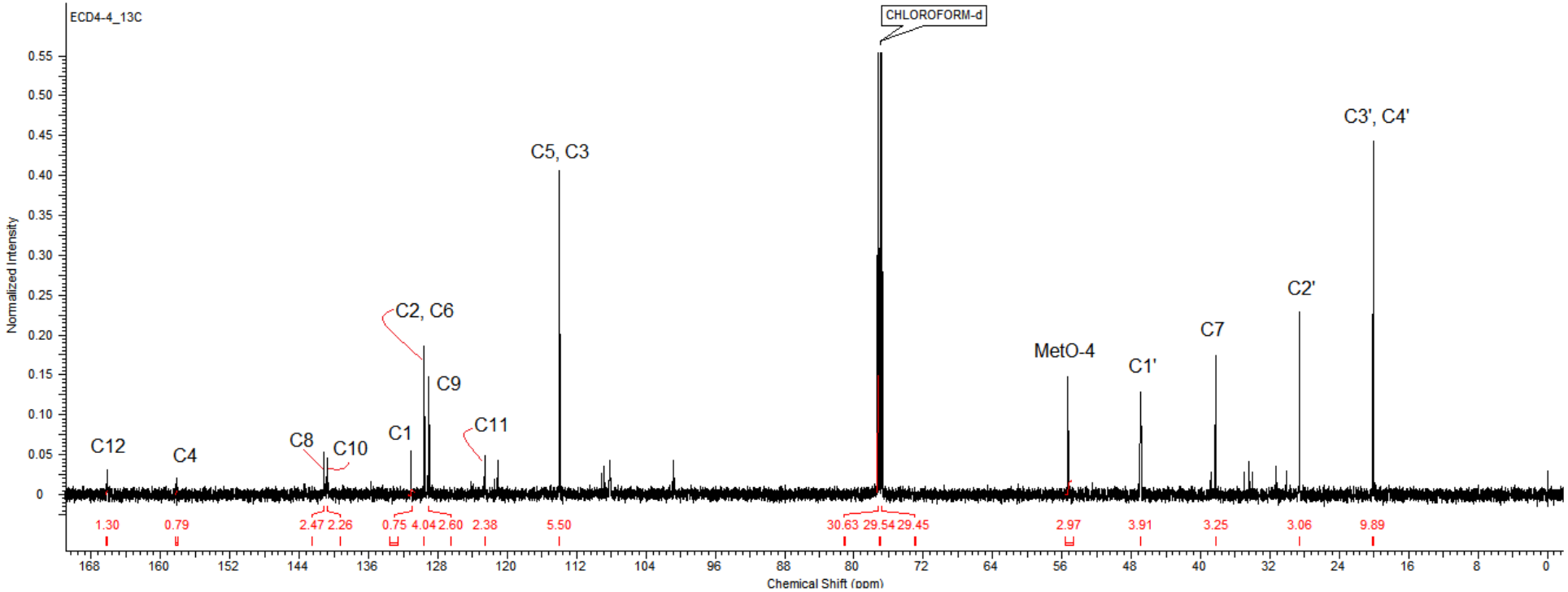


Figura I.15: Espectro de RMN de ^{13}C para piperovatina [125 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)].

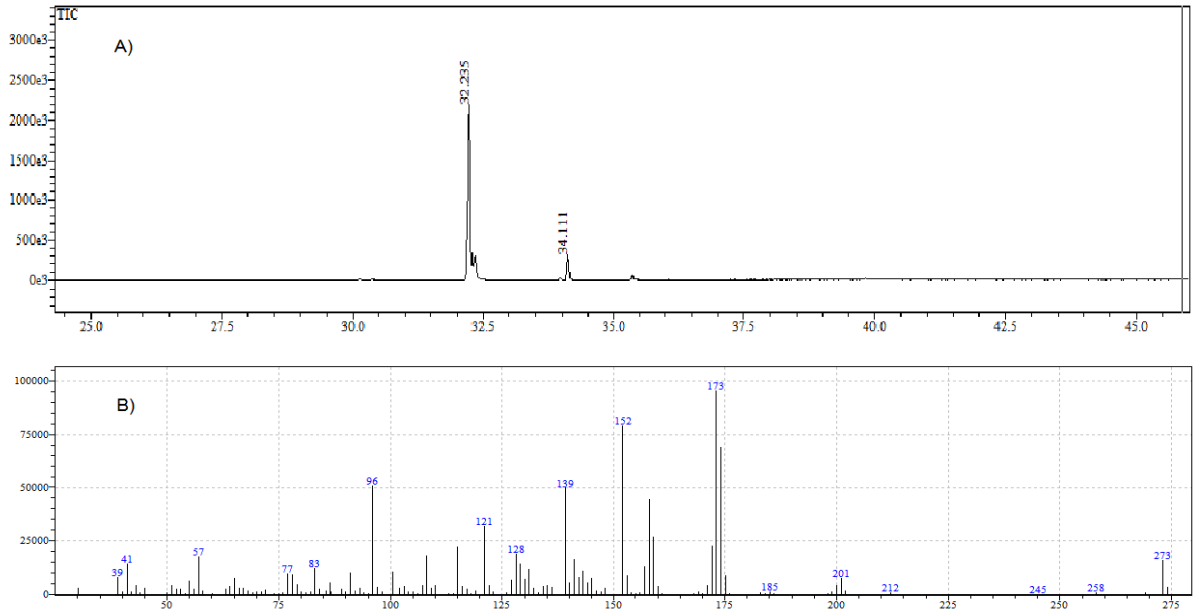


Figura I.16: Cromatograma de íons totais e espectro de massas obtidos no CG-EM da fração ECD4-4.

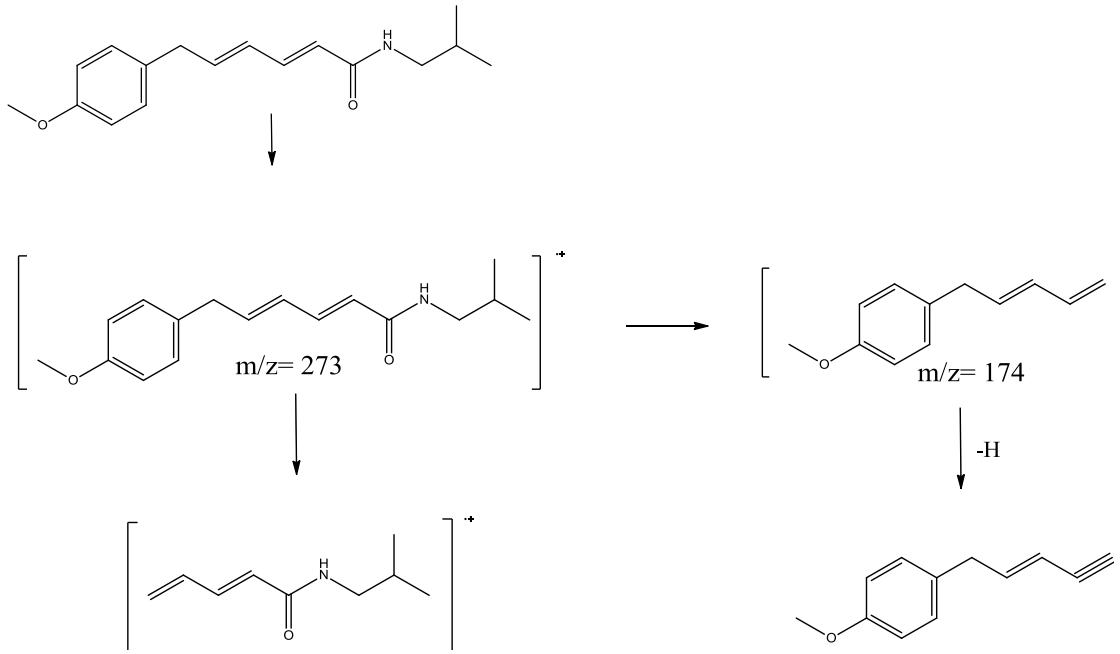


Figura I.17: Principais fragmentações apresentadas no EM para o pico com Tr em 32,23.

I.3.2 Identificação da Tetra-hidropiperlonguminina

Para o sólido cristalino (Figura I.10 p.40) encontrado na fração ECD10-2, as análises dos dados de ressonância magnética de ^{1}H (Figura I.19, p.51) e ^{13}C (Figura I.20, p.53) juntamente com o cromatograma e espectro de massa obtidos no CG-EM (Figura I.21, A e B p.54) e comparação com dados obtidos com a literatura (Tabela I.5, p.51)**,** sugerem que se trata da tetra-hidropiperlonguminina (Figura I.18).

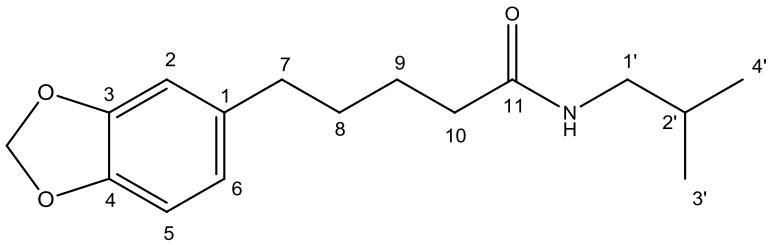


Figura I.18: Estrutura molecular da substância [II], tetra-hidropiperlonguminina.

Na análise dos espectros de RMN de hidrogênio (Figura I.19, p.52) e carbono (Figura I.20, p.53) é notória a presença de sinais do grupo metilenodióxido singleto em δ_H 5,91 e δ_C100,7, dois singletos referentes a duas metilas δ_H 0,89/ 0,91 com δ_C 20,0, o multipleto referente ao hidrogênio de C2' δ_H 1,75 e δ_C 28,5, a presença do tripleto referente ao hidrogênios de C1'(δ_H 3,08, J=10, δ_C 46,8). A comparação dos dados de RMN de carbono com relatos da literatura (Tabela I.5, p.51) permitiu verificar a presença dos carbonos não hidrogenados (4), metínicos (4), metilênicos (6) e metílicos (2).

É bastante evidente os sinais dos hidrogênios aromáticos, sendo de fácil percepção o dupleto de dubleto referente ao hidrogênio de C6 (δ_H 6,61, J=5,0/0,9 e δ_C 121,0), o dubleto referente a C2 (δ_H 6,66, J=0,9 e δ_C 108,8) e um outro referente a C5 (δ_H 6,71, J=10 e δ_C 108,0). O motivo para que os valores de δ_C para C2 e C5 sejam menores que o de C6, é que as posições *orto* em relação ao metilenodióxido são blindadas por efeito de ressonância e as posições *meta* sofrem o efeito oposto. Por fim encontramos dois tripletos integrados para 2 hidrogênios referentes a C7 e C10 (δ_H 2,55, J=5,0 e δ_C 36,6) e (δ_H 2,20, J=5,0 e δ_C 31,3) respectivamente, e um multipleto integrado para 4 hidrogênios que é referente aos hidrogênios de C8 e C9 simultaneamente obtendo valores de δ_H 1,65 e δ_C (35,5 e 25,3) respectivamente.

Associando os sinais da análise de ressonância magnética de hidrogênio e carbono (Figura I.19, p.52 e Figura I.20, p.53) com os obtidos com aparelho CG-EM (Figura I.21, A e B p.54), podemos perceber que a estrutura corresponde não somente com os sinais descritos, mas também com sua massa observada no EM com *m/z*= 277,1. As fragmentações para os principais picos do EM estão disponíveis na Figura I.22 p.54.

Tabela I.5: Dados de RMN de ^{1}H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da tetra-hidropiperlonguminina. Deslocamento químicos δ (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (JHz) entre parênteses.

	Amostra		**Referência [78]**	
C	**δH**	**δC**	**δH**	**δC**
1	-	136,0	-	136,0
3		147,5		147,4
4	-	145,5	-	145,4
11	-	172,9	-	172,8
CH				
2	6,66 (d, 0,9)	108,8	6,66 (d, 0,9)	108,7
5	6,71(d, 10)	108,0	6,71 (d, 7,8)	108,0
6	6,61 (dd, 5,0/0,9)	121,0	6,61 (dd, 7,8/0,9)	121,0
2'	1,75 (m)	28,5	1,75 (m)	28,4
CH_2				
7	2,55 (t, 5,0)	36,6	2,56 (dd, 7,2/6,9)	36,6
8	1,65 (m)	35,5	1,65 (m)	35,3
9	1,65 (m)	25,3	1,65 (m)	25,3
10	2,20 (t, 5,0)	31,3	2,19 (t, 7,2)	31,3
1'	3,08 (t, 10,0)	46,8	3,08 (dd, 6,9/6,0)	46,7
OCH_2O	5,91 (s)	100,7	5,89 (s)	100,8
CH_3				
3', 4'	0,89/0,91 (s, s)	20,0	0,89 (d, 6,6)	20,0

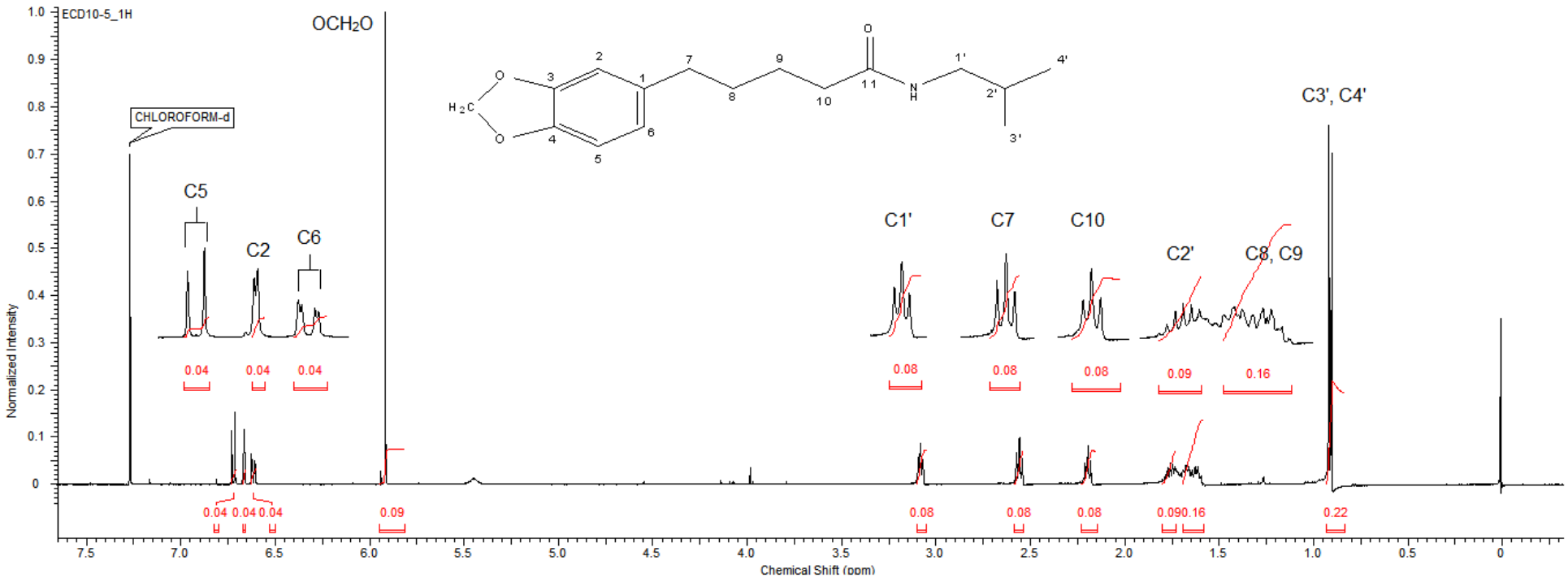


Figura I.19: Espectros de RMN de ^{1}H para a tetra-hidropiperlonguminina [500 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)].

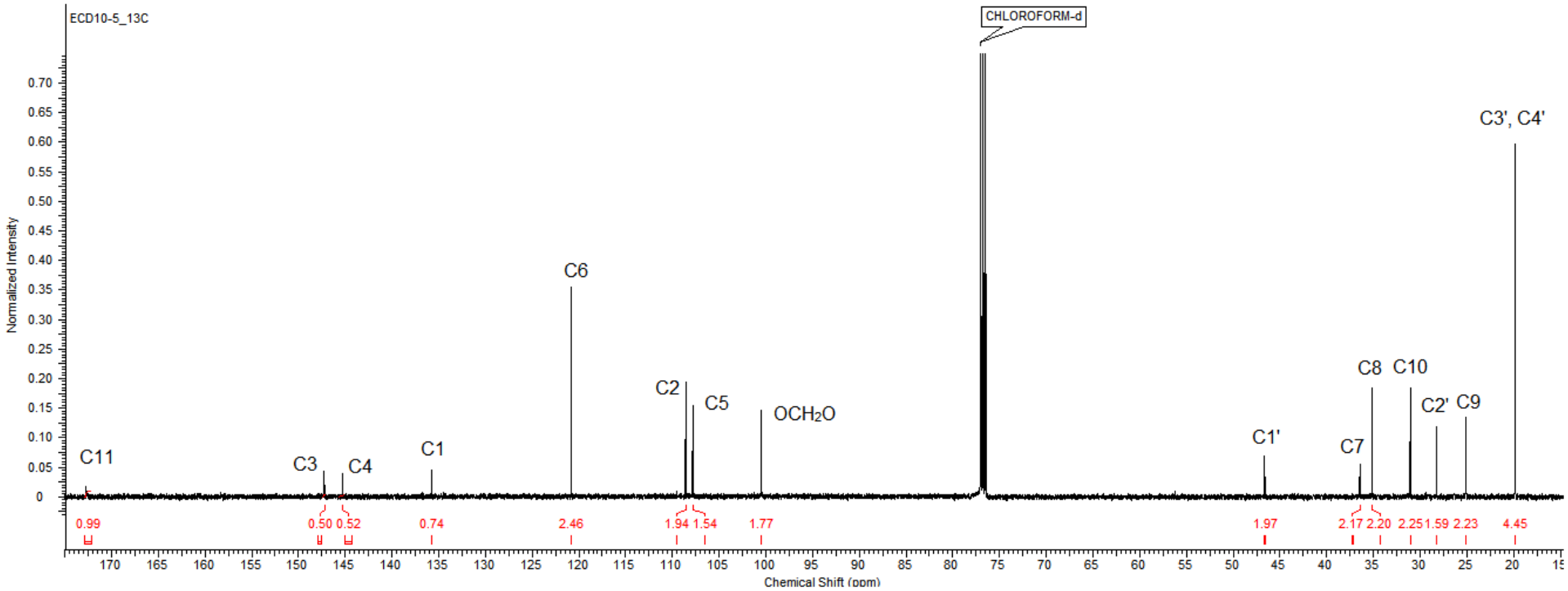


Figura I.20: Espectro de RMN de ^{13}C para tetra-hidropiperlonguminina [125 MHz, $CDCl_3$, δ (ppm)].

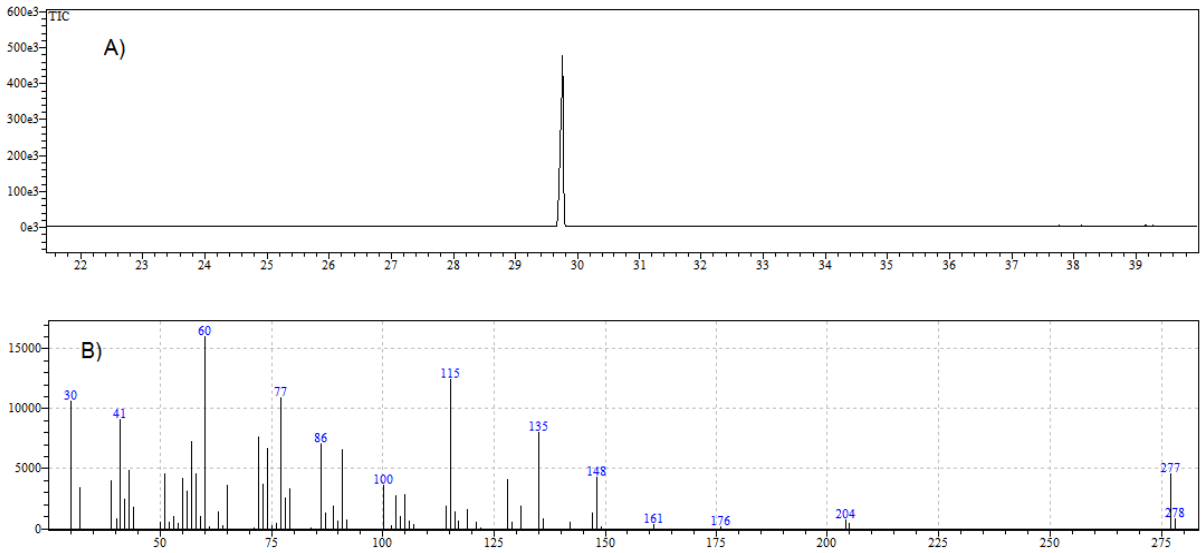


Figura I.21: Cromatograma de íons totais e espectro de massas obtidos no CG-EM para a tetra-hidropiperlonguminina.

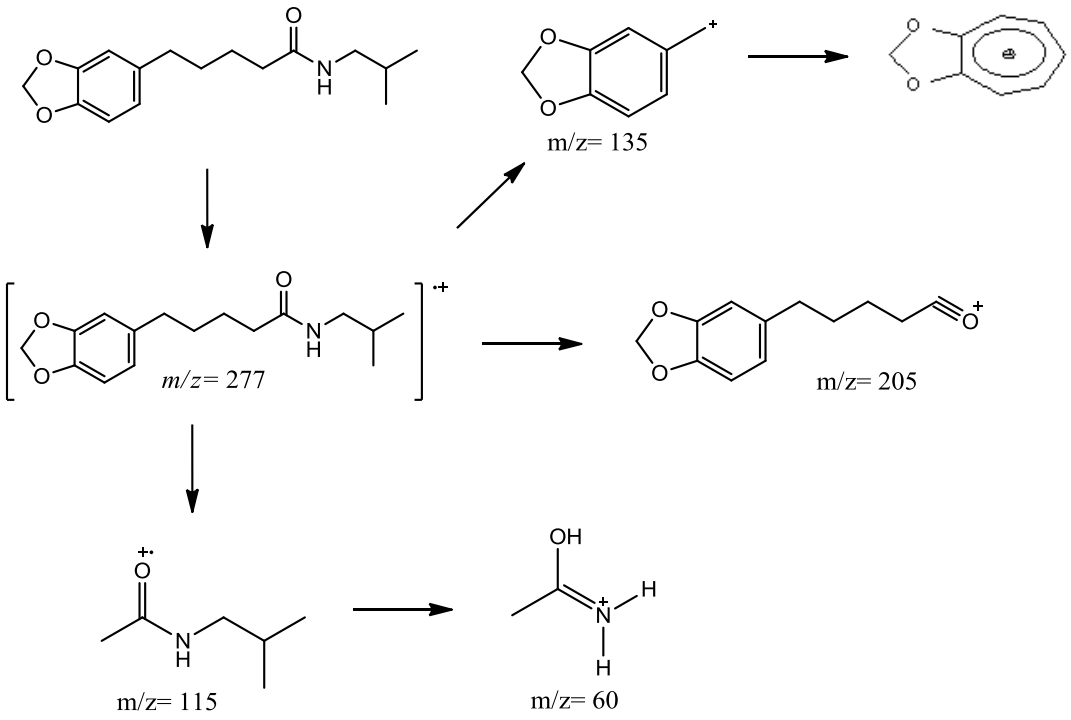


Figura I.22: Principais fragmentações apresentadas no EM para a tetra-hidropiperlonguminina, pico com Tr em 29.8.

I.3.3 Identificação dos Esteróides Estigmasterol e *β*-sitosterol

O sólido amorfo branco da fração ECD3-4 foi analisado através do RMN de ^{1}H e ^{1}C e o mesmo foi identificado como sendo uma mistura dos esteróides estigmasterol e *β*-sitosterol (Figura I.23).

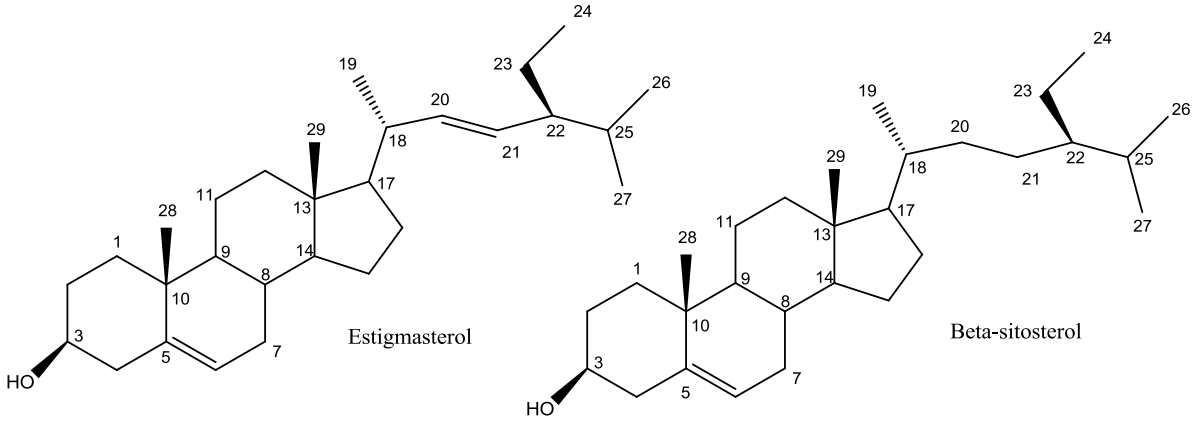


Figura I.23: Substância [III] Estigmasterol e Substância [IV] *β*-sitosterol.

Pela análise dos espectros de ressonância magnética unidimensional de hidrogênio e carbono (Figura I.24, p.57) foi possível identificar os sinais característicos dos hidrogênios H3 (δ 3.50) e H6 (d, δ 5.35, J= 5 Hz) para ambas as moléculas. Bem explicito também estão os sinais que diferenciam as duas moléculas, o H20 (dd, 5.00, J= 15 e 5 Hz) e H21 (dd, 5.13, J= 15 e 10Hz), estes sinais são característicos da insaturação presentes no estigmasterol e encontram-se ausentes na molécula do *β*-sitosterol.

Através da análise do RMN de ^{13}C, podemos confirmar a presença da insaturação através dos valores de C20 e C21, que no estigmasterol apresenta deslocamento δ 138.3 e 129.3 respectivamente e no composto *β*-sitosterol apresenta deslocamento δ 33.96 e 26.10, onde ambos se fazem presentes no espectro de RMN de carbono. Os valores estão disponíveis na Tabela I.6, p.56 e estão de acordo com dados disponíveis na literatura (Tabela I.7 p.56).

Com auxílio do RMN de hidrogênio foi possível estimar o teor de cada um dos constituintes. O cálculo foi baseado na integração de um sinal que corresponde a um hidrogênio presentes em ambas às moléculas H6 (intensidade relativa de 0,02) e um sinal de hidrogênio que pertence a uma única molécula H20 ou H21(ambos com intensidade relativa de 0,01), subtraindo o de 0,01 do valor que corresponde ao

próton presente nas duas moléculas que é 0,02, podemos deduzir que a mistura contém 50% de estgmasterol e 50% de *β*-sitosterol.

Tabela I.6: Dados de RMN ^{1}H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para à mistura de esteróides Estigmasterol *β*-sitosterol da amostra ECD3-4 [$CDCl_3$, δ (ppm), J (Hz)].

	Amostra ECD3-4			
Carbonos	**Estigmasterol**		**Beta-sitosterol**	
	δH	**δC**	**δH**	**δC**
3	3.51	71.81	3.51	71.81
6	5.35 (d, J= 5.0)	121.7	5.35 (d, J= 5.0)	121.7
20	5.00 (dd, J= 15/5)	138.30	---	33.96
21	5.13 (dd, J= 15/10)	129.28	---	26.10

Tabela I.7: Dados de RMN ^{1}H e ^{13}C para os esteroides Estigmasterol (1) e *β*-sitosterol (2). [$CDCl_3$, δ (ppm), J (Hz)], [82].

Position	1		2	
	^{1}H	^{13}C	^{1}H	^{13}C
3	3.51 (tdd, 1H, *J* = 4.5, 4.2, 3.8 Hz)	72.1	3.53 (tdd, 1H, *J* = 4.5, 4.2, 3.8 Hz)	72.0
6	5.31 (t, 1H, *J* = 6.1 Hz)	121.8	5.36 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz)	121.9
20	4.98 (m, 1H)	138.7		34.2
21	5.14 (m, 1H)	129.6		26.3

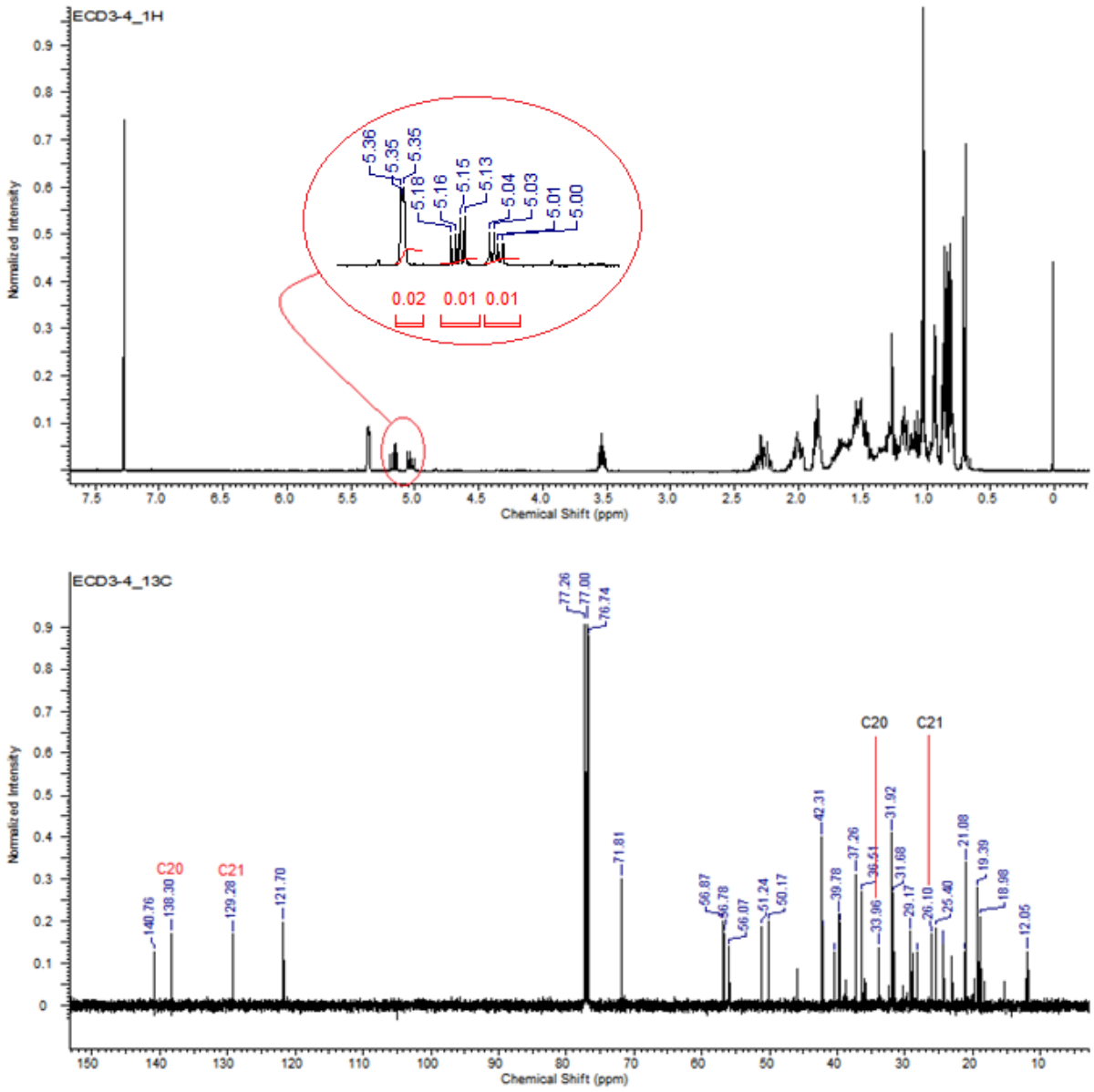


Figura I.24: Espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C para mistura de Estigmasterol e *β*-sitosterol [$CDCl_3$, δ (ppm)].

I.3.4 Identificação dos Ésteres metílicos

Os espectros de IV obtidos para as frações ECD1-1 e ECD1-2 (Figura I.25 p.59) inferem que as amostras são compostas com uma mistura de ésteres graxos pois apresentam bandas em CH_3 2920 e CH_2 2850cm^{-1} para (υC-H) de cadeias alifáticas, bandas de estiramento C=O de éster (υ1740cm-1) e banda de estiramento C-O (υ1157cm^{-1}) para ésteres saturados, aparecendo ainda bandas de deformação angular de CH_2 em (δ 1463 cm^{-1})de cadeia longa, confirmadas pela da banda de deformação angular de cadeia em (δ 723 cm^{-1}).

De acordo com os cromatogramas para o padrão contendo a mistura de ésteres metílicos e para as amostras ECD1-1 e ECD1-2 (Figura I.26 A, B e C, p.60) pode-se ver que há uma boa separação dos componentes das amostras. A análise dos cromatogramas para as amostras foram baseados na comparação dos tempos de retenção e da razão massa carga (*m/z*) obtidos das amostras com os obtidos para o padrão e levando em consideração a similaridade com o banco de dados do aparelho que foram acima dos 91%. Os compostos identificados estão dispostos na Tabela I.8.

Tabela I.8: Ésteres metílicos identificados por análise em CG-EM.

N° de C: N° Insaturações	**Tempo de Retenção (min)**		***M/Z***	**Ésteres Metílicos**
	Padrões	**Amostras**		
C14:0	17,492	17,482	242	Miristato de metila
C16:0	21,784	21,795	270	Palmitato de metila
C18:0	25,236	25,248	264	Metil ester do acido 9-octadecenoico
C24:0	35,761	35,776	382	Lignocerato de metila

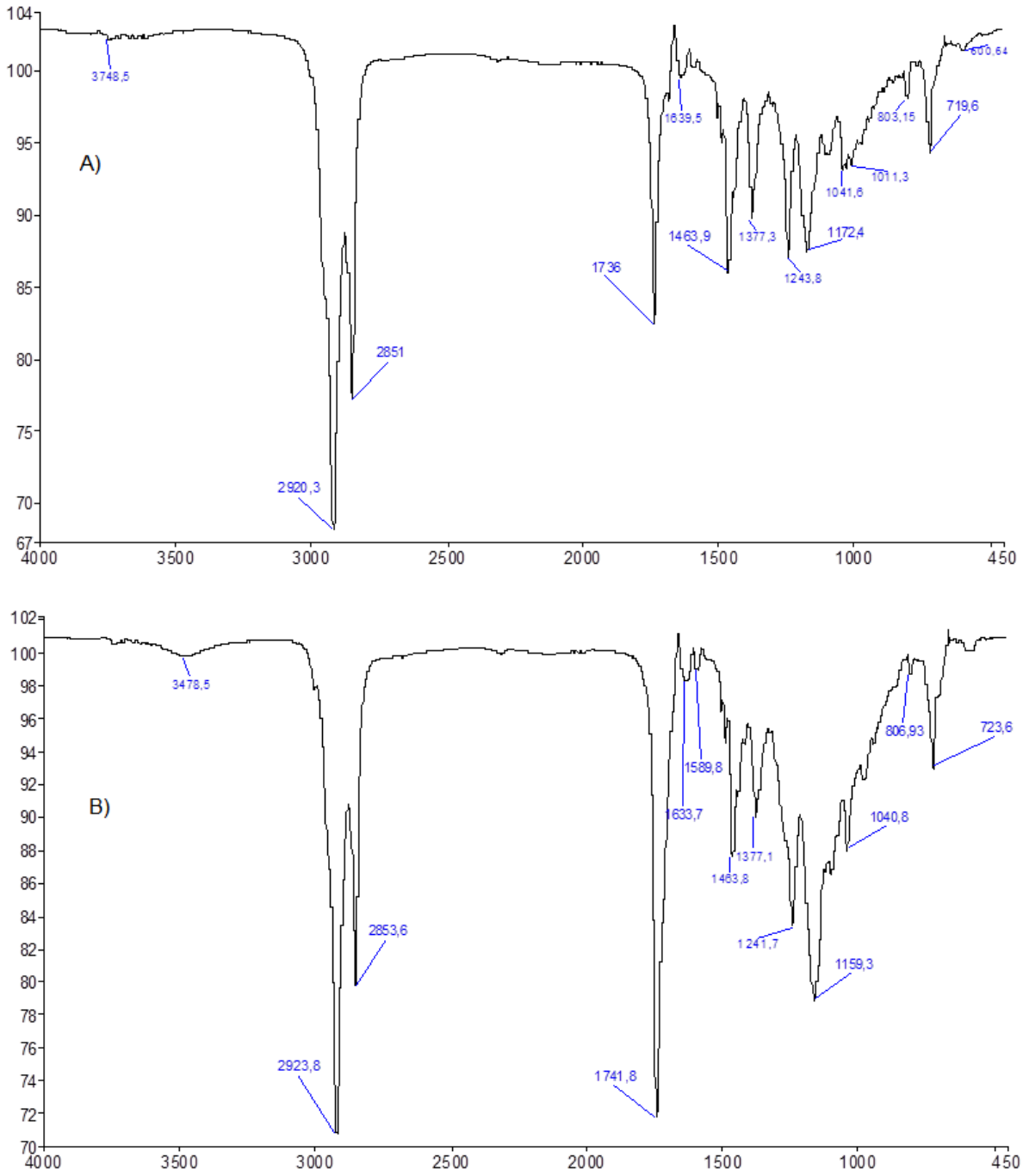


Figura I.25: Espectro de Infra Vermelho em filme, para as amostras ECD1-1 (A) e ECD1-2 (B).

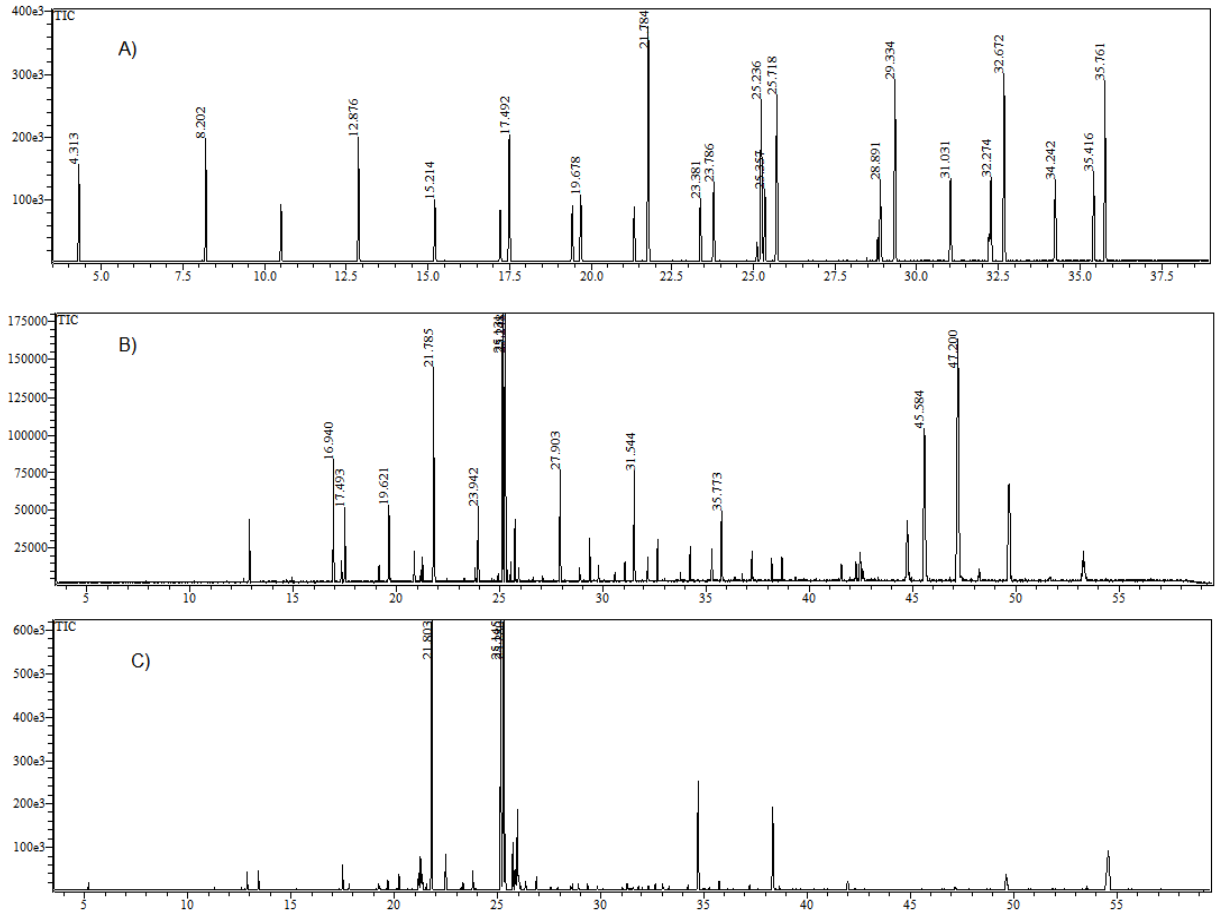


Figura I.26: Cromatogramas em CG-EM para o padrão FAME [C8 a C24] (A) e amostras ECD1-1 (B) e ECD1-2 (C).

CAPITULO II

Estudo Químico e Biológico dos Voláteis de *Achyrocline Satureioides* (Asteraceae) e *Piper Klotzschianum* Kunth (Piperaceae)

II.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1.1 Descrição Botânica e Aspectos Etnobotânicos da *Achyrocline satureioides*

A marcela ou macela, também conhecida por marcela-branca, macela-do-campo e outros nomes de conhecimento popular, faz parte da família Asteraceae e do gênero *Achyrocline*. A família é constituída por um número estimado de 1500 a 1700 gêneros que por sua vez, possuem cerca de 24 a 30 mil espécies. Com esses números a família é considerada o maior e mais diversificado grupo de plantas do planeta [83]. Já o gênero em estudo o *Achyrocline,* é composto por 40 espécies distribuídas entre as regiões tropicais do planeta, principalmente no território Sul Americano, em que 25 espécies foram relatadas pela primeira vez no Brasil [84].

Achyrocline satureioides é uma erva de médio porte que possui aroma agradável, com isso é cultivada em grande escala para extração de seus voláteis para produção de perfumes além de fazer parte da culinária e produção de bebidas alcoólicas em alguns países da América do Sul [85]. Pertencente a uma classe de plantas de grande interesse terapêutico, encontra-se em diversas literaturas de caráter etnobotânico, referências ao uso medicinal da *A. satureioides* por inúmeras sociedades espalhadas pelas regiões tropicais do planeta. Estudos recentes mostram que a planta possui propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênica, anti-espasmódica, caminativa, digestiva, sendo usada também no auxílio contra diabetes, asma, como estimulante e no tratamento de desarranjos intestinais como cólicas e diarreias, usada também para regular a pressão sanguínea e o sono, entre outras atividades [84, 86].

II.1.2 Caráter Fitoquímico da *A. satureioides*

Estudos recentes mostram que grande parte de todas as atividades biológicas de *A. satureioides* estão diretamente ligadas a grande presença de compostos polifenólicos e flavonoides nos diferentes extratos das partes aéreas e inflorescências da planta. Em sua composição também estão presentes outras classes de compostos como cumarinas, polissacarídeos, lactonas, e glicolipídeos [84-87].

Em seu trabalho de *revisão* Retta [84], aponta que os estudos sobre a constituição química dos voláteis extraídos por hidrodestilação da *A. satureioides* de origens brasileiras têm o *α*-pineno como composto mais abundante nos óleos essenciais da planta compondo valores variados de 41-78%, destacando a presença de *β*-cariofileno as vezes em quantidades equivalentes ou maiores. Sendo encontrado também, às vezes em grande quantidade, os isômeros do ocimeno. Em escalas menores, ainda fazem parte da constituição química dos óleos essenciais da planta, monoterpenos como o limoneno e sesquiterpenos como *α*-copaeno, humuleno e cadieno, encontrados nos caules da planta [88].

II.1.3 Descrição Botânica e Aspectos Etnobotânicos da *Piper klotzschianum* Kunth

Arbusto ramificado, glabro, com folhas obliquamente elípticas com ápice atenuadamente acuminado, base inequilateral, o lado mais curto obtuso, o mais logo cordulado-arredondado, 5,0-9,0 cm de largura e 15,0-18,5 cm de comprimento. Espigas com 2.0 mm de diâmetro e 7,0-8,0 cm de comprimento; pedúnculo cerca de 5,0 mm de comprimento; brácteas sacadogaleadas; estames 4; raque esparsamente puberulenta, glabrescene, ovário ovóide, levemente angular, subapiculado, subpedicelado [73].

A planta que povoa locais de matas nativas com vegetação densa e clima úmido alastra-se de norte a sul do país, sendo encontrada por quase toda Mata Atlântica desde o Rio de Janeiro até o estado da Bahia, e nos Estados do Acre, Amazonas e Pará, sendo encontrada também em regiões centrais do país como o Estado do Mato Grosso. Conhecida popularmente como João Barandinho, João Barandi ou Jambuaçu, é utilizada na maioria das vezes para o alívio das dores de dentes e dores reumáticas [73,79].

II.1.4 Voláteis da *Piper klotzschianum* Kunth

A composição química dos óleos essenciais das folhas de *P. klotzschianum* para uma espécie coletada no Estado do Pará, município de Bujaru, tendo como compostos majoritários *α*-felandreno 3,6%, *α*-pineno 4,6%, *β*-cariofileno 10,4%, *β*-pineno 13,2%, limoneno 24,6% *e p*-cimeno 32,5%. Apresentando em concentrações menores ou traços de *α*-tujeno, canfeno, sabineno, mirceno, *γ*-terpineno, acetato de mirtenila, *α*-cubebeno, *β*-copaeno, *α*-copaeno, *α*-humulano, *cis*-muurola-4(14)5-dieno, germancreno D, biciclogermancreno, pentadecano, *(z)-α*-bisaboleno, cubebol, *δ*-cadineno, *trans*-calameneno, *(e)- γ*-bisaboleno, *trans*-cadina-1(2),4-dieno, *α*-cadineno, *α*-calacoreno, elemicina, *(e)*-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol, *α*-cadinol e heptadecano [73].

Uma análise mais recente conseguiu identificar 22 compostos distribuídos nos voláteis das folhas, caules, raízes e sementes da *P. klotzschianum*, para uma espécie coletada no Estado do Espirito Santo, cidade de Vila do Riacho-Aracruz. O composto majoritário para essa espécie foi o *1*-Butil-*3,4*-metilenodioxibenzeno, presente em todas as partes da planta nas percentagens de 96,19% nas raízes, 84,75% nos caules, 81,04% nas folhas e 36,92% nas sementes. Em menores concentrações, mas também presente em todas as partes da planta *α*-copaeno, *β*-cubebeno, *β*-elemeno, 3,4-metilenodioxibenzilmetilcetone, germancreno D, biciclogermancreno, torreiol, *δ*-cadieno *e* 2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno. Os compostos *α*-pineno, *β*-pineno, *β*-mirceno, *α*-felandreno, *o*-cimeno *e* limoneno, tiveram presentes apenas nas sementes da planta. E distribuídos entre as partes das plantas temos o *α*-cubebeno presente nas folhas; *α-trans*-bergamoteno nos caules e sementes; *β(e)*-farneseno nas raízes e caules, eremofielno nos caules, folhas e sementes; *β*-bisalonono nas raízes e caules, por fim o *(z)*-isoelemicina presente nos caules, folhas e sementes [79].

Os dados encontrados na literatura inferem que há uma grande diferença fitoquímica quando comparado os constituintes químicos dos voláteis presentes nas folhas da *P. klotzschianum*. No decorrer do capitulo será feita uma abordagem comparativa minuciosa dos compostos químicos que compõem os óleos essenciais das partes *da P. klotzschianum* coletadas em diferentes regiões do país.

II.2 PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1 Materiais e Métodos

1 - Todos solventes e reagentes utilizados nas extrações, na solubilização das amostras, nas análises cromatográficas e nos testes de atividades biológicas foram todos de padrão analítico Merck, Sigma, Quimex, e Quemis

2 – Para identificação dos componentes presentes nos óleos essenciais as amostras obtidas foram submetidas à análise em um cromatógrafo de fase gasosa acoplado à espectrometro de massas de baixa resolução (CG-EM) da Shimadzu, com detector seletivo de massas, modelo QP2010, do Laboratório de Cromatografia Dr. Jailson Bittencourt, instalado na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Jequié (Figura II.1, p.66). Coluna cromatográfica e condições de análises: coluna DB-5 composta de 5% de fenila com 95% dimetilpolissiloxano, 30 m X 0,25 mm de diâmetro interno, espessura do filme de 0,25 µm. Fluxo de nitrogênio 1,8 $mL.min^{-1}$; a temperatura do injetor foi 220° C; a temperatura da interface foi 240º C; e a temperatura inicial da coluna foi de 40° C, aumentando 3° C/min, até atingir 240° C, permanecendo constante nesta temperatura por 10 minutos. A razão de Split Ratio igual a 5,0; volume injetado 1 µL de cada amostra, preparada a partir de 10 mg diluídos em 1 mL de diclorometano grau. As condições do espectrômetro de massas foram, energia de impacto 70 eV; velocidade de varredura 1000; intervalo de varredura de 0,5 e registro da razão m/z de 40,00 a 500,00. A identificação dos compostos foi feita por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com os existentes no banco de dados do National Institute of Standards and Technology (NIST), disponível no endereço eletrônico http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html, e também pela comparação dos índices de Kovats calculados a partir das injeções de uma mistura de hidrocarbonetos lineares de C8 a C26, com aqueles disponíveis no próprio site da NIST.

3 – Para quantificação dos componentes identificados no item acima, as amostras dos óleos essenciais foram analisadas em um Cromatografo em fase gasosa (CG-FID) da Shimadzu, modelo CG-2010 PLUS, operando com coluna DB-5 (5% de fenila com 95% de dimetilpolissiloxano) nas mesmas condições relatadas no ítem acima.

4 – Nos ensaios com larvas do mosquito *Aedes aegypti*, os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Inseticidas Naturais (LAPIN), da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) - campus de Itapetinga, a partir de ovos da linhagem Rockefeller, cedidos pelo Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores (LAFICAVE), da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, juntamente com a colaboração da professora Drª. Sandra Lúcia da Cunha e Silva.

5 – Para a avaliação citotóxica frente a larvas da *Artemia salina* foram utilizados ovos adquiridos em lojas de produtos para aquários, que foram eclodidos em aquário adaptado com dois recipientes interligados, um ao abrido da luz e outro sob exposição continua a luz branca, contendo solução salina de concentração similar a água do mar (30 $g.L^{-1}$) e sobre oxigenação, preparada com sal marinho comercial e água destilada.

6 – Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular com MTT para as duas substâncias isoladas ECD10 e ECD20 da espécie *P. klotzschianum*.

Figura II.1: Cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas CG-EM. (Fonte: Lab. de Cromatografia Dr. Jailson Bittencourt – UESB – Jequié).

II.2.2 Coleta do Material Vegetal e Identificação das Espécies

A coleta da *Achyrocline satureioides* foi feita nos arredores do Campo de Terra do distrito de São Sebastião, município de Cairú-Ba, nos meses de Janeiro e Agosto de 2014. A identificação da planta foi confirmada pela Dra. Guadalupe Lincona de Macedo, do Departamento de Ciências Biológica (DCB) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, sob o numero de deposito 9654, no herbário da UESB.

A primeira amostra da *P. klotzschianum* foi coletada no estado do Espirito Santo, em Vila do Riacho-Aracruz, no dia 02 de Janeiro de 2013. Sua exsicata foi identificada pela Prof(a). Dr(a). Elzie Flanklim Guimarães e depositadas no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro com registro n° 480408.

A segunda amostra da *P. klotzschianum* foi coletada no dia 24 de Maio de 2015, no estado da Bahia, no município de Jequié, na zona rural do Cajueiro, as beiras do Rio-Preto-do-Crisciuma e enviadas para identificação. A Prof(a). Dr(a). Elsie Flanklim Guimarães identificou como sendo a espécie *Piper corcovadensis*, com registros HUESB11405 11407 e 11409.

II.2.3 Obtenção dos Voláteis

Para extração dos óleos essenciais da *A. satureioides*, foram utilizadas três amostras de aproximadamente 50 g para as folhas. Para a primeira amostra de *P. klotzschianum* foram feitas triplicatas de aproximadamente 220 g dos caules, 120 g para folhas e 78 g para as raízes. Para segunda amostra de *P. klotzschianum* foram feitas três amostras para folhas com massas de 152, 155 e 740 g, três amostras dos caules com respectivamente 599, 700, 1333 g e três amostras das raízes com 76, 80, 100 g.

As massas de material vegetal fresco foram transferidas para balões de fundo redondo de 1,0 L com 0,3 L de água destilada, em seguida submetidas à hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger (Figura II.2, p.68) por um período de 120 minutos, contados a partir da primeira gota do destilado. Os óleos resultantes foram tratados com sulfato de sódio anidro (Merck) para completa secagem. Após pesados, seus rendimentos foram calculados pela razão da massa obtida e a massa do material fresco vezes 100%, sendo armazenados a baixas temperaturas em freezer até que fossem analisados por CG-EM-IE e CG-FID.

Uma observação: as massas de 740 g de folhas e 1333 g de caules, da segunda amostra de *P. klotzschianum* foram feitas em balões de 5 L, com volumes de água destilada igual a 1,5 L.

Figura II.2: Processo de extração dos voláteis utilizando aparelho do tipo Clevenger. (Fonte: própria).

II.2.4 Atividades Biológicas Avaliadas para as Espécies Estudadas

Para os voláteis extraídos das duas espécies em estudo foram investigadas as atividades tóxicas frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Sendo avaliada a atividades larvicida apenas para o Extrato Etanólico Bruto das Raízes da *P. klotzschianum* (EER*Pk*) e de suas três frações: clorofórmica, acetato de etila e aquosa (FC, FAcOEt e FAq), assim como para as duas moléculas isoladas da fração clorofórmica: piperovatina e tetrahidropiperlonguminina. Ainda para as duas substâncias foram avaliadas a atividade citotóxica e viabilidade celular com MTT.

II.2.4.1 Avaliação da Atividade Tóxica

II.2.4.1.1 *Artemia salina* como Bioindicador de Toxicidade

A fim de estabelecer a toxicidade dos voláteis paras as espécies em estudo foi utilizado como base o método desenvolvido por Meyer, 1982 [89], que se baseia

na taxa de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina*, desenvolvido no intuito de detectar substâncias bioativas em diferentes extratos de plantas.

O uso de *Artemia salina* no pré-teste como bioindicador para avaliação tóxica de extratos e substâncias faz-se rotineira em laboratórios espalhados pelo mundo, uma vez que seu procedimento é simplificado e seu custo é significativamente mais barato quando comparados com outros tipos de testes utilizados para o mesmo fim [90], o que faz esse crustáceo uma excelente alternativa na determinação das condições letais para diversos compostos.

Os testes de toxicidade são elaborados no âmbito de se obter informações sobre os efeitos toxicológicos de determinadas substâncias sobre sistemas vivos, determinando assim as toxicidades relativas desses compostos, sendo consideradas toxicas soluções com concentração de substâncias que estejam inferior a 1000 $mg.L^{-1}$ [89].

II.2.4.1.2 Teste para Avaliação Tóxica

Para realização dos ensaios os ovos de *Artemia salina* foram postos para eclodirem com 48 horas de antecedência em aquário adaptado, na parte escura do mesmo. Foram utilizados como material auxiliar uma bomba de oxigenação comum para aquários e uma lâmpada florescente de 60 W para iluminação do segundo compartimento. Após as 48 h, surgiram as larvas.

As soluções de partida foram preparadas dissolvendo-se 40 mg dos óleos essenciais em duas gotas de Tween-80 aferindo para 10,0 mL em um balão volumétrico com a solução salina previamente filtrada. Esta solução correspondeu à concentração de 4000 ppm e foi considerada a solução estoque e dela foram retiradas alíquotas para se obter as concentrações desejadas.

As concentrações utilizadas para avaliação da atividade tóxica dos óleos essenciais da *A. satureioides* foram: 1000, 500, 100, 10 e 1 ppm e para os voláteis da *P. klotzschianum* as concentrações utilizadas foram: 50, 40, 30, 20, 10 e 5 ppm. Os testes foram realizados em triplicata para caca concentração, incluindo o branco (larvas + solução salina), utilizando 10 larvas em todos os tubos e volume final igual a 5 mL.

II.2.4.2 Avaliação da Atividade Larvicida

II.2.4.2.1 O Vetor *Aedes aegypti* e Inseticidas Naturais

A flora brasileira compõe uma das maiores fontes de compostos e agentes que podem atuar no controle do *Aedes aegypti* de maneira mais eficiente e segura, minimizando os impactos ambientais. Assim, a ação de plantas com atividades inseticidas vem sendo constantemente relatadas no meio científico. Diversos extratos e óleos essenciais oriundos de fontes naturais vêm mostrando eficiência no combate a esse vetor de doenças que há tempos vem sofrendo mutações e se adaptando ao contato humano [91].

Reforçando a importância dos estudos que visam o controle do mosquito da dengue, segundo o mistério da saúde foi registrado para esse ano de 2015, no período de Janeiro a Abril, 745,9 mil casos e 229 mortes causadas pela doença no país só nesse período, levando o país a um alerta geral e pondo 340 cidades de diversos estados em situação de epidemia [92].

Os números assombram, uma vez que são os maiores quando comparados com o mesmo período dos anos anteriores, destacando assim a necessidade de investimentos em pesquisas para um controle mais eficiente do mosquito vetor e uma mobilização social no intuído de combater e minimizar os criadouros dos mosquitos no meio urbano.

II.2.4.2.2 Ensaios para Avaliação da Atividade Larvicida

Na realização dos ensaios larvicidas foram observadas 5 concentrações e um branco, ambos com cinco repetições. Foram utilizadas 30 larvas no terceiro instar do *Aedes aegypti* em recipiente com volume final de 30 mL para cada análise, totalizando 150 larvas para cada concentração (Figura II.3, p.71**)**. O experimento foi realizado em ambiente com temperatura e umidade controladas a 27°C e umidade relativa de 70% respectivamente. As observações e contagem das larvas mortas foram realizadas com 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 e 24 horas após o contato das larvas com as amostras. Seus dados de mortalidades percentuais foram submetidos ao teste de Tukey com nível de confiança de 5% no programa Bioestat. Os valores da concentração letal média (CL_{50}) foram calculados a partir do programa computacional Probit for Logit Analysis (POLO-PC).

Para o preparo das soluções de partida, as massas das amostras de maior polaridade como o extrato bruto das raízes (EER*Pk*), e frações aquosa e acetato (FAq e FAcOEt), foram dissolvidos em uma solução de dimetilsufóxido e água deionizada, as amostras de menor polaridade, sendo elas a fração clorofórmica (FC) e as substâncias ECD10 e ECD20, foi utilizado Tween 80 e água. Todas as amostras foram preparadas na proporção de 1:1 (m/v), em seguida foram transferidas para um balão volumétrico de 10,0 mL, homogeneizada e aferida para o volume total. As concentrações de teste foram obtidas através das diluições das respectivas soluções de partida com volume final de 30,0 mL. Todos os testes foram realizados com 5 repetições para cada concentração (Tabela II.1).

Tabela II.1: Concentrações avaliadas para o cálculo da CL_{50} nos ensaios para teste da avaliação inseticida contra larvas da *Aedes aegypti*.

Amostra	Concentração (ppm)				
EERPK	177	88,5	44	22	11
FC	---	---	---	---	---
FAcOEt	223	111,5	55,8	27,9	13,9
FAq	447	223,5	111,8	55,9	27,9
ECD10	---	---	---	---	---
ECD20	56	28	14	7	3,5

*O ensaio para as amostras (FC) e ECD10 foram cancelados.

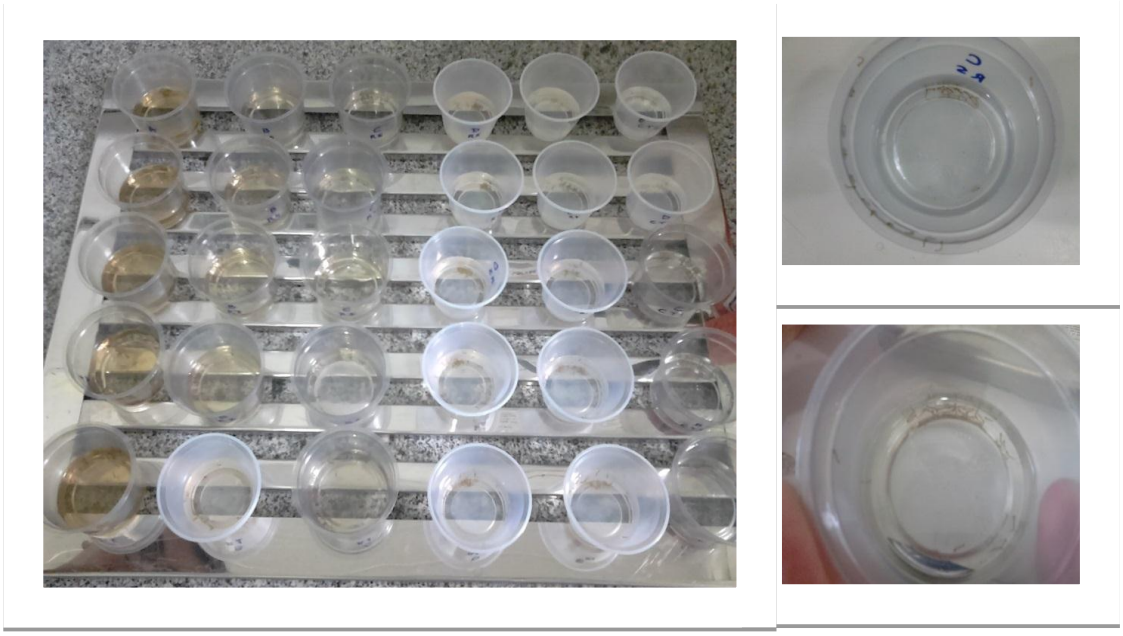


Figura II.3: Procedimento para avaliação da atividade toxicológica frente a larvas do *Aedes aegypti*. (Fonte própria).

II.2.4.3 Avaliação da Atividade Citotóxica por Viabilidade Celular com MTT

II.2.4.3.1 Citotoxicidade e Viabilidade Celular com MTT

A citotoxicidade foi obtida a partir do método desenvolvido por Mosmann 1983 [93], para avaliar a viabilidade celular através do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo (MTT). Inicialmente de cor amarela, ao ser inoculado com células vivas tem seu substrato clivado por enzimas mitocondriais, dando origem a uma substância de cor azul (formazan). A reação (Figura II.4**)** pode ser quantificada através de técnicas espectrofotométricas, uma vez que a formação do fornazan esta diretamente relacionada ao processo de respiração celular, ou seja, é diretamente proporcional ao numero de células vivas.

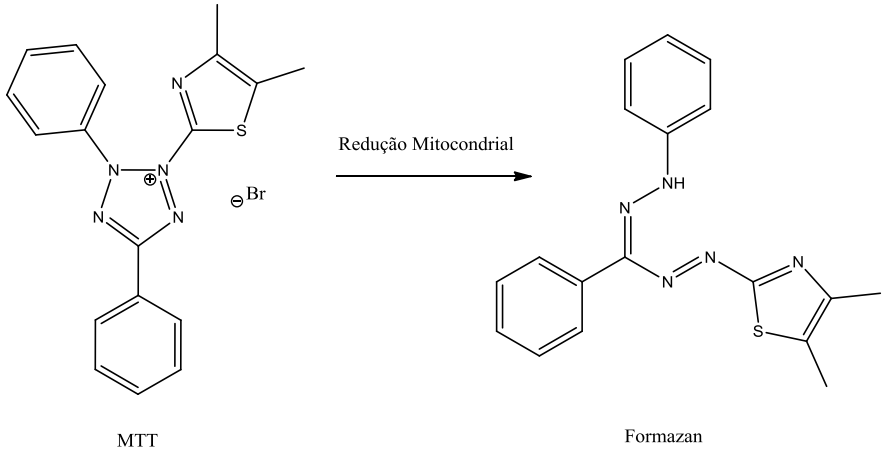


Figura II.4: Reação de redução para formação do reagente de cor (formazan).

II.2.4.3.2 Cultivo de Células Macrofágicas Peritoniais

O experimento foi iniciado com o cultivo das células três dias antes do teste in vitro. Foi injetado 3,0 mL de tioglicolato no peritônio dos camundongos, após três dias, o sacrifício do animal foi feito por deslocamento cervical, a pele da região abdominal do camundongo foi retirada fazendo–se um corte no abdômen e injetou-se com ajuda de uma seringa 5 mL de PBS (tampão) estéril gelado no peritônio. Em seguida realizou-se uma pequena massagem no abdômen do camundongo e coleta-se os 5 mL de PBS contendo as células e desprezando-o em tubo Falcon de 15 mL. As células são Centrifugadas a 2000 RPM por 10 minutos à 4ºC, descarta-se o

sobrenadante (PBS) e novamente as células são suspensas, agora em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), meio de cultura para células de mamíferos, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina).

II.2.4.3.3 Contagem das Células

Após todo processo de centrifugação e suspensão das células em meio RPMI+SFB e antibiótico, foi realizado a contagem das células usando-se uma câmara de new bauer (Figura II.5). Para a contagem das células no fluxo laminar foi acrescentado 990 µL de PBS 1X estéril + 10 µL da cultura de células (diluição de 1:100 - 10^2) num tubo eppendorf, obtendo volume final de 1 mL, após a homogeneização, 10 µL dessa solução deve ser colocada em câmara hemocitométrica de Neubauer.

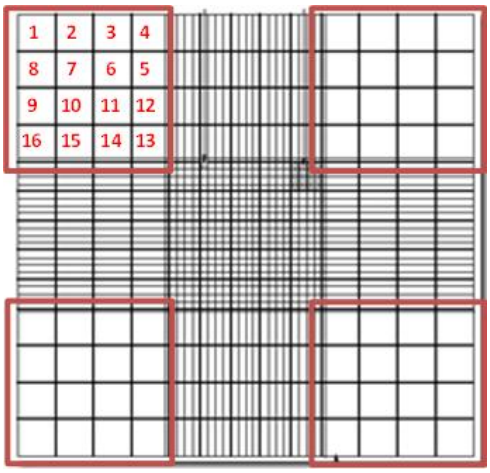


Figura II.5: Câmara de Neubauer para microscopia e contagem de células.

Para obtenção do número de células, as mesmas são contadas nos quatro quadrantes laterais, contando todos os 16 quadros de cada quadrante. Após a contagem de cada quadrante soma-se os valores e divide por 4 (nº de quadrantes contados). O valor obtido corresponde ao número de células x 10^6 (10^4 do fator de correção da câmara + 10^2 da diluição feita) por mL.

II.2.4.3.4 Metodologia de Viabilidade Celular com MTT

Todas as amostras avaliadas foram dissolvidas em dimetilsufóxido (DMSO) a 10%, sendo utilizado o controle positivo de célula e meio, como forma de mostrar a viabilidade das linhagens celulares trabalhadas e também utilizado o controle do DMSO a 10%, concentração preconizada como limite na avaliação de citotoxicidade celular.

Para as análises foram utilizadas seis concentrações que partiram de uma concentração máxima de 100 µg L^{-1} e sofrendo diluições seriadas até atingir a concentração mínima de 0,78 µg L^{-1} (realizada em duplicata). Após a leitura no aparelho, obteve-se o gráfico de viabilidade celular Figura II.10, p.92.

II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.3.1 Teor dos Voláteis Encontrado nas Espécies Estudadas

Com a análise dos resultados para *A. satureioides* percebe-se que o teor de óleos essenciais encontrados para as folhas e inflorescências da Macela no inverno teve rendimento superior ao período do verão, obtendo valores iguais a 0,25 e 0,08% no inverno e 0,08 e 0,05% no verão (Tabela II.2). Isso mostra o quanto à variação sazonal afeta a produção de óleos nas plantas, que também é afetada por fatores como vulnerabilidade a predadores, estresse hídrico, entre outros. Sendo importante considerar todas essas variáveis no caso de interesse comercial dos óleos essenciais. Em estudos anteriores para a Macela de origem brasileira e uruguaia foram observados teores de óleo extraídos das partes aéreas da planta de 0,30 a 0,45% respectivamente [88].

Tabela II.2: Rendimento percentual dos óleos para as folhas e flores da *A. satureioides* coletada em Janeiro e Agosto de 2014.

		Amostra (g)	Massa de Óleo (mg)	Rendimento (%)	Desvio Padrão
Verão	Folhas	107,8	90,00	0,080	---
	Flores	21,26	10,50	0,050	---
Inverno	Folhas	1- 50,00	125,0	0,250	0,250 ± 0,010
		2- 50,00	132,0	0,260	
		3- 50,00	117,0	0,230	
	Flores	10,60	9,300	0,080	---

Os óleos essenciais extraídos das partes da *P. klotzschianum* coletada em Janeiro de 2013 na cidade de Aracruz-ES apresentam rendimentos de (0,73 ± 0,172; 0,083 ± 0,025 e 0,40 ± 0,014%) para folas, caules e raízes respectivamente (Tabela II.3, pag. 76). Para os óleos extraídos da *P. klotzschianum* coletada em Junho de 2015 no município de Jequié-BA, os rendimentos foram de (0,55 ± 0,215; 0,11 ± 0,011 e 0,82 ± 0,253%) respectivamente (Tabela II.4, pag. 76). Como resultado para os óleos presentes nas folhas de *P. klotzschianum* encontra-se na literatura rendimentos de 0,1% [73], sendo encontrada uma análise mais completa da planta,

com rendimentos de 1,81, 0,13 e 0,77% para folhas, caules e raízes [79]. Os rendimentos obtidos diferem dos relatados na literatura, fato que pode ser explicado pela diferença regional e climática, além da variação da altitude e da composição química do solo, uma vez que as plantas foram coletadas em estados diferentes. Essas variações podem não somente modificar a taxa de óleo presente na planta, como também sua composição química [94].

.

Tabela II.3: Rendimento oleico para *P. klotzschianum* coletada em Janeiro de 2013.

	Amostra (g)	Massa de Óleo Extraído (mg)	Rendimento (%)	Média/Desvio padrão
Folhas	1- 122,3	833,5	0,680	0,730 ± 0,172
	2- 60,76	564,0	0,930	
	3- 58,00	350,7	0,600	
Caules	1- 239,8	271,4	0,110	0,083 ± 0,025
	2- 214,4	130,6	0,060	
	3- 245,5	213,4	0,080	
Raízes	1- 78,37	325,9	0,410	0,400 ± 0,014
	2- 77,36	305,8	0,390	

Tabela II.4: Rendimento oleico para *P. klotzschianum* coletada em Junho de 2015.

	Amostra (g)	Massa de Óleo Extraído (mg)	Rendimento (%)	Média/Desvio padrão
Folhas	1- 152,6	118,0	0,770	0,550 ± 0,215
	2- 155,5	867,8	0,550	
	3- 740,5	255,0	0,340	
Caules	1- 599,3	653,8	0,110	0,110 ± 0,011
	2- 700,0	909,0	0,130	
	3- 1333	1490	0,110	
Raízes	1- 100,0	715,8	0,710	0,820 ± 0,253
	2- 80,00	888,0	1,110	
	3- 75,80	488,2	0,640	

II.3.2 Identificação e Quantificação dos Constituintes Presentes nos Voláteis

II.3.2.1 Voláteis da *A. satureioides.*

Os óleos essenciais encontrados nas folhas e inflorescências obtidos durante o verão e o inverno de 2014 para a espécie *A. satureioides* apresentam como constituintes majoritários os sesquiterpenos *trans*-cariofileno e o *α*-humuleno; as coletadas no verão trazem o *α*-humuleno como constituinte majoritário, já as coletadas no inverno o *trans*-cariofileno aparece como sendo o principal constituinte. Através dos cromatogramas obtidos dos óleos essenciais extraídos das folhas e inflorescências da Macela pode-se perceber uma diferença entre os principais picos nas duas estações (Figura II.6, p.79), e sua composição esta descrita na Tabela II.6, p.78.

Estudos encontrados na literatura para *A. satureioides* pertencentes a regiões e países diferentes, relatam algumas variedades químicas da espécie, a exemplo a Macela coletada na Argentina tem os *trans*-cariofileno / *α*-copaeno como constituintes majoritários [95], plantas coletadas no sul do Brasil e no Uruguai apresentam o *α*-pineno / *trans*-cariofileno como componentes majoritários em suas inflorescências [88],

Nessa perspectiva podemos perceber que os resultados apontam para descoberta de uma nova variedade química da planta, apresentando como componentes majoritários o *α*-humuleno / *trans*-cariofileno, diferentemente dos relatos da literatura (Tabela II.5).

Tabela II.5: Componentes majoritários da *A. satureioides.*

	(%) em Relação a Área	
Jan./2014	*α*-humuleno (37,16)	*trans*-cariofileno (20,70)
Ago./2014	*trans*-cariofileno (39,14)	*α*-humuleno (14,37)
[88]	*trans*-cariofileno (32,40)	*α*-pineno (29,90)

Ainda há na literatura relatos de algumas atividades biológicas atribuídas aos voláteis extraídos das partes da *A. satureioides*, a exemplo: atividades antioxidantes, repelentes, antimicrobianas [84, 95], antitripanossoma [96]. Sendo ainda atribuída atividade anti-inflamatória para o *α*-humuleno e *trans*-cariofileno [97-98].

Dessa forma, se tratando de uma nova variedade química para a espécie rica em *α*-humuleno e *trans*-cariofileno, e levando em conta seu grande potencial biológico, é conveniente que sejam examinadas algumas possíveis atividades biológicas para essa espécie coletada no município de Cairú-BA.

Tabela II.6: Composição química dos voláteis extraídos das folhas e flores da *A. satureioides*.

Compostos	T.R	IR_{Cal}	IR_{Lit}	% em relação à área			
				Folhas		Inflorescências	
				Janeiro	Agosto	Janeiro	Agosto
α-pineno	9.73	912	912	2,67	7,99	tr	2.37
Canfeno	10.28	924	928	tr	tr	tr	tr
β-pineno	11.56	979	980	tr	tr	tr	tr
β-mirceno	12.42	989	991	tr	tr	tr	tr
Limoneno	14.12	1023	1026	2,10	tr	tr	tr
Borneol	20.85	1140	1149	0,80	tr	tr	tr
α-terpineol	22.13	1188	1189	0,90	tr	tr	tr
α-ylangeno	30.70	1345	1350	tr	0,22	tr	tr
α-copaeno	30.97	1351	1353	6,30	4,14	2,78	10,02
***trans*-cariofileno**	33.14	1398	1400	**20,70**	**39,14**	**21,12**	**30,13**
Aromadendreno	33.73	1412	1419	1,60	2,36	2,00	0,48
***α*-humuleno**	34.48	1429	1430	**37,16**	**14,37**	**23,65**	**13,61**
Alloaromadendreno	34.68	1434	1434	0,90	1,00	1,34	tr
γ-muuroleno	35.39	1450	1445	2,90	2,89	1,73	1,75
β-selineno	35.75	1459	1464	1,30	1,05	1,48	tr
Valenceno	36.14	1467	1466	2,60	1,71	4,63	tr
α-muuroleno	36.38	1473	NI	1,40	1,59	1,00	tr
γ-cadineno	36.97	1487	1483	2,50	2,42	1,80	1,11
δ-cadineno	37.40	1497	1497	6,00	3,62	8,18	2,48
Óxido de cariofileno	39.76	1555	1555	1,60	9,83	tr	1,87
Óxido de humuleno	40.79	1603	1608	0,90	2,20	tr	tr
δ-cadinol	42.06	1635	1638	0,80	0,38	tr	1,89
α-cadinol	42.57	1648	1652	tr	0,21	tr	tr
Total				**93,13**	**95,50**	**74,09**	**83,96**

* tr – traço (< 0.20%); $IR_{cal.}$ = Índice de retenção Calculado, $IR_{Lit.}$ = Índice de retenção Literatura.

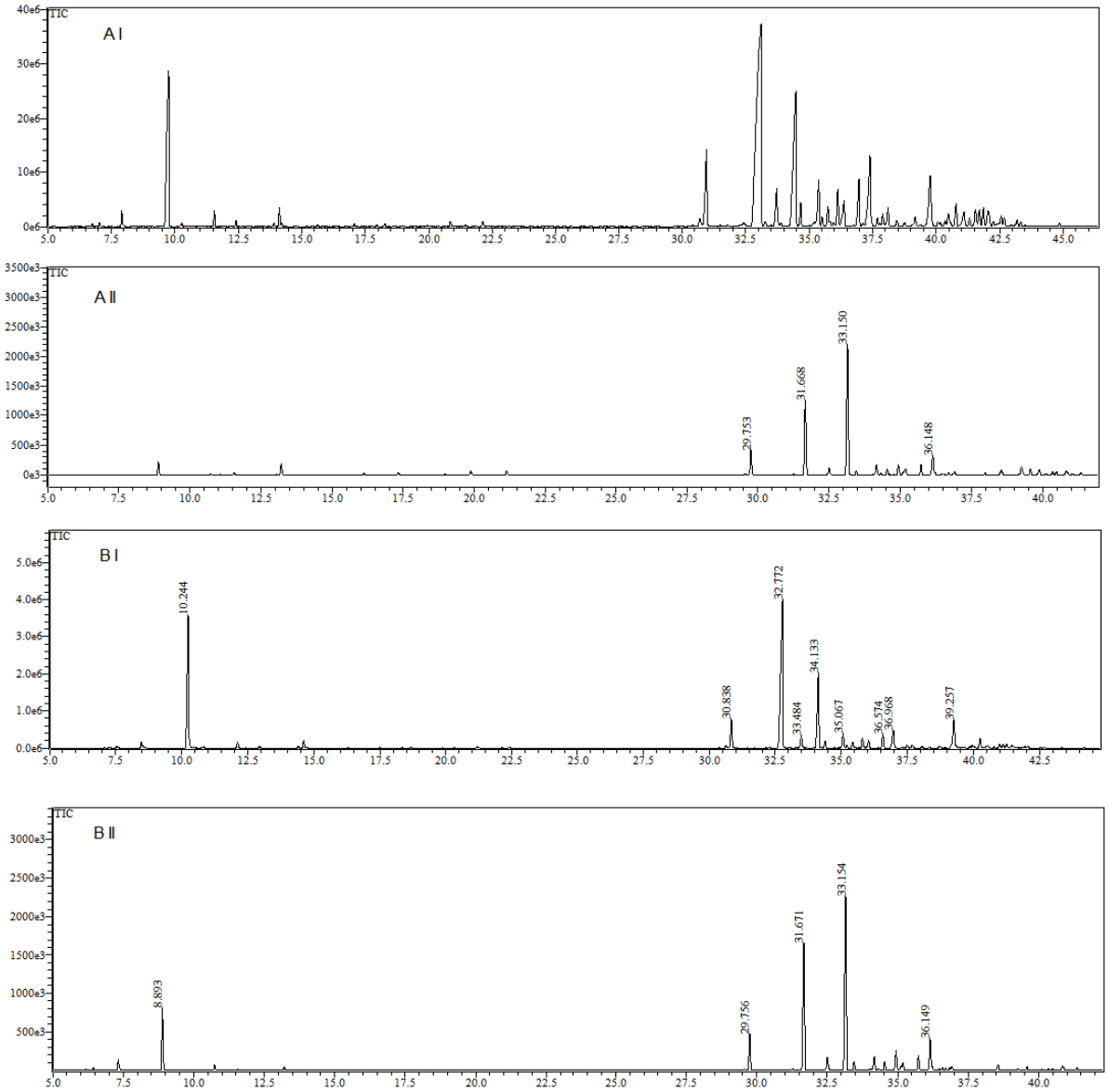


Figura II.6: Cromatogramas para os óleos essenciais das folhas (A) e flores (B) da *A. satureioides* coletadas no inverno (I) e verão (II).

II.3.2.2 Voláteis da *P.klotzschianum*

Os resultados do estudo fitoquímico dos óleos essenciais por CG-EM para as partes das plantas, folhas, caules e raízes são expostos na Tabela II.7, p.83 e Tabela II.8, p.84. Para as plantas em estudo, foi possível identificar um total de 18 substâncias, 16 na *Piper* coletada no estado do Espirito Santo (denominada *Piper* I) e 10 substâncias na *Piper* coletada na Bahia (denominada *Piper* II). Ambas apresentam como componente majoritário o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, este se encontra presente em todas as partes das plantas com concentrações >97,0%

nas raízes de ambas as plantas, assumindo valores de 50,59% nas folhas da *Piper* I e 87,18% nas folhas da *Piper* II e valores >50,0% para os caules das duas plantas, característica descrita também por Nascimento [79].

Para a *Piper* I, suas folhas e caules ainda apresentam percentagens significativas de *α*-pineno (4,83 e 7,34%), *β*-pineno (5,63 e 14,26%), limoneno (4,71 e 4,96%), *α*-ocimeno (4,38 e 2,36%), *α*-terpinoleno (4,00 e 1,63%), *α*-asarone (4,75 e 2,79%). Já para a *Piper* II, essas substâncias foram quase todas suprimidas, a única que se encontrou presente foi o *β*-pineno representando 0,22% nas folhas e 1,09% nos caules. Além dessa diferença, a *Piper* II apresentou quatro componentes que não foram encontrados na *Piper* I, são eles: *α*-thujeno, *(Z,E)-α*-farneseno, *β*-bisabolono e *T*-cadinol todos com concentrações inferiores a 2,0%.

Na Tabela II.9, p.85 foi feita uma comparação dos constituintes químicos identificados nas folhas das duas amostras estudadas com dados obtidos na literatura para a espécie *P. klotzschianum*. Com o auxilio da Tabela nota-se que seis substâncias (*cis-β*-ocimeno*, α*-ocimeno*, α*-terpinoleno*, β*-cariofileno*, (Z,E)-α*-farneseno*, T*-cadinol) estão sendo relatados pela primeira vez na espécie, sendo o *cis-β*-ocimeno*, α*-ocimeno*, α*-terpinoleno*, β*-cariofileno encontrados na *Piper I* e *(Z,E)-α*-farneseno*, T*-cadinol encontrados na *Piper* II.

Ainda na Tabela II.9, p.85 é possível perceber a similaridade das amostras em estudo com a planta estudada por Nascimento et al [79], onde o constituinte majoritário é o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, porem essa substância não é encontrada nas folhas da *P. klotzschianum* estudada por Andrade et al [73], que tem como componente de maior concentração o limoneno (24,6%), seguidos pelo *β*-pineno (13,2%) e *β*-carifileno (10,4%). Com base na análise da composição dos óleos e levando em conta que as plantas, ao pertencerem a regiões distintas, com o objetivo de se adaptarem ao solo, a altitude, condições de luz, condições climáticas como período de chuvas e secas, umidade relativa e condições de ventos, são capazes de modificarem seus constituintes químicos sem alterarem sua estrutura física, seu fenótipo [89], concluindo-se assim, que os as duas espécies de *Piper* analisadas neste trabalho fazem parte da mesma variedade química, que por sua vez, pertencem a uma variedade química diferente da espécie estudada por Andrade et al [73].

Para uma percepção mais apurada as Figuras (II.7 e II.8, p.81) e a Figura II.9 p.82 mostram o perfil cromatográfico para as folhas de *P. klotzschianum* para as plantas em estudo e as respectivas referências.

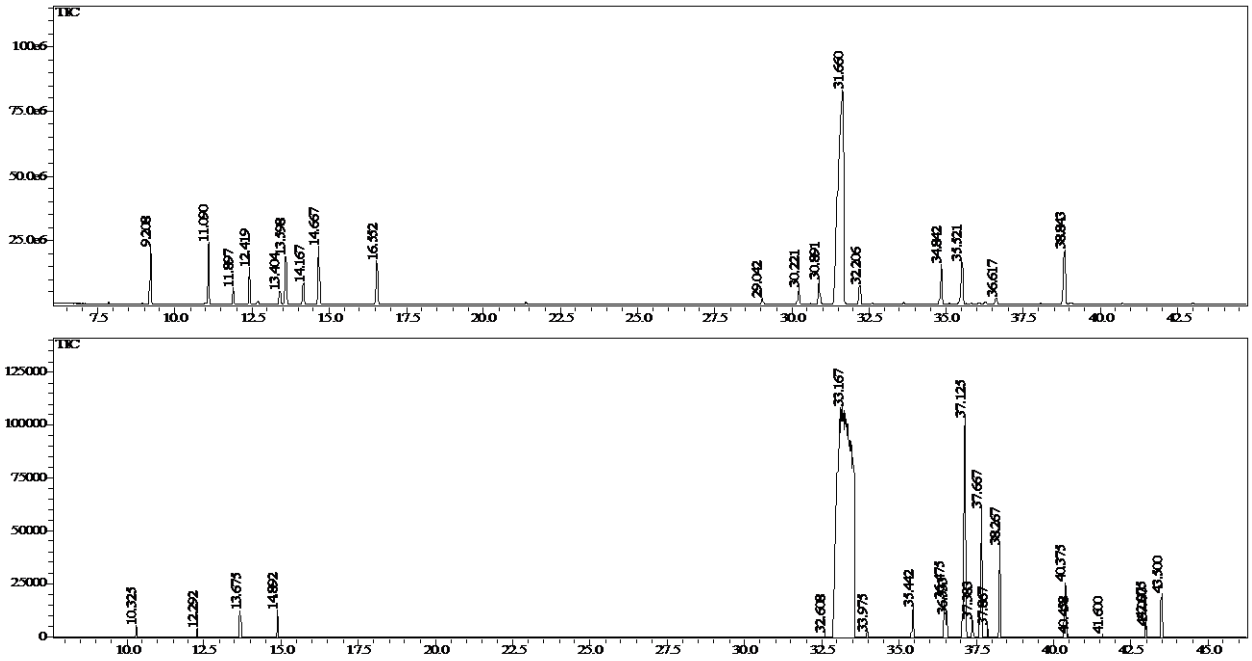


Figura II.7: Cromatogramas dos óleos essenciais das folhas da *Piper I* (A) e *Piper II* (B).

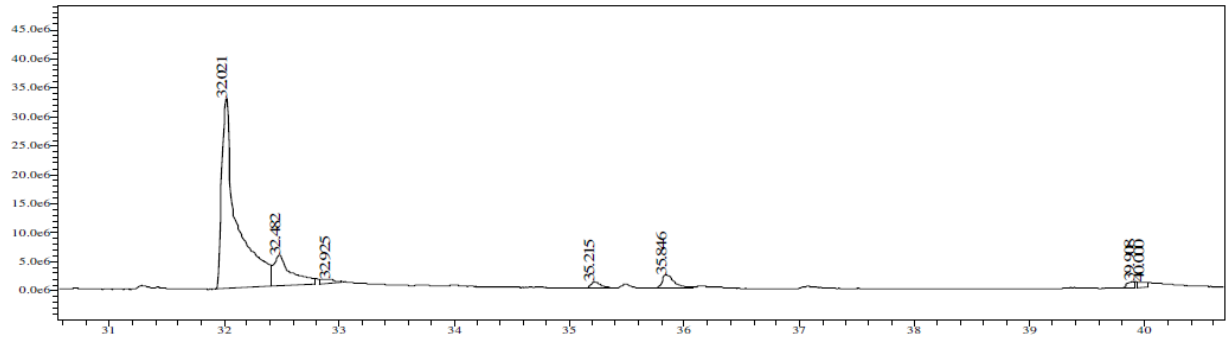


Figura II.8: Cromatograma da folha da *P. klotzschianum* [79].

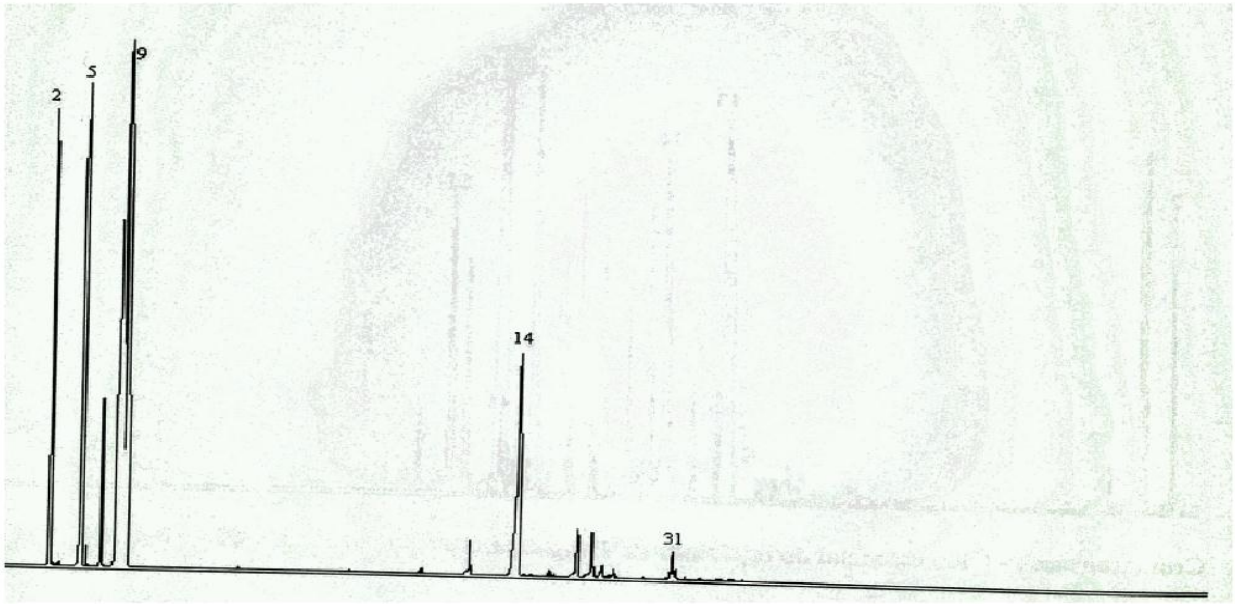


Figura II.9: Cromatograma da folha da *P. klotzschianum* [73].

Tabela II.7: Composição química dos voláteis extraídos das partes da *P. klotzschianum* I.

SUBSTÂNCIAS	I.R Cal	I.R Lit	% em relação à área *PIPER* - I		
			Folhas	Caules	Raízes
α-pineno	930	930	4,83 ± 0,03	7,34 ± 0,07	-
β-pineno	973	973	5,63 ± 0,04	14,26 ± 0,13	Tr
β-mirceno	991	991	1,22 ± 0,004	1,27 ± 0,04	-
α-felandreno	1002	1002	2,96 ± 0,03	1,56 ± 0,06	-
o-cimeno	1023	1026	1,51 ± 0,02	2,69 ± 0,01	-
Limoneno	1027	1027	4,71 ± 0,04	4,96 ± 007	-
cis-*β*-ocimeno	1038	1038	1,56 ± 0,01	1,00 ± 0,06	-
α-ocimeno	1048	1049	4,38 ± 0,02	2,36 ± 0,03	-
α-terpinoleno	1087	1087	4,00 ± 0,03	1,63 ± 0,01	-
α-cubebeno	1349	1349	0,73 ± 0,004	-	-
α-copaeno	1375	1375	1,90 ± 0,004	-	-
β-cubebeno	1390	1390	2,42 ± 0,007	-	-
1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno	1408	Ne	**50,6 ± 0,22**	**58,7 ± 0,52**	**98,2 ± 0,03**
β-cariofileno	1421	1421	1,73 ± 0,003	1,33 ± 0,02	-
Germacreno D	1482	1482	2,93 ± 0,01	-	-
Bibiclogermacreno	1498	1498	3,38 ± 0,05	-	-
δ-cadineno	1525	1525	0,70 ± 0,003	-	-
α-asarone	1580	Ne	4,75 ± 0,07	2,79 ± 0,02	1,12 ± 0,01
N.I.	1697	N.I	-	-	0,67 ± 0,01
Total	-	-	**100**	**100**	**100**

Tabela II.8: Composição química dos voláteis extraídos das partes da *P. klotzschianum II.*

SUBSTÂNCIAS	I.R Cal	I.R Lit	% em relação à área *PIPER* - II		
			Folhas	Caules	Raízes
α-thujeno	925	925	Tr	tr	-
β-pineno	967	973	0,21± 0,2	1,09 ± 0,51	-
α-felandreno	996	998	0,20 ± 0,13	1,78 ± 0,68	-
NI	1000		-	0,28 ± 0,004	0,29 ± 0,02
β-cubebeno	1386	1390	0,26 ± 0,11	0,35 ± 0,07	-
1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno	1399	Ne	**86,1 ± 0,30**	**89,7 ± 2,18**	**97,7 ± 0,61**
N.I.	1417	N.I	0,49 ± 0,02	0,22 ± 0,06	tr
N.I.	1451	N.I	0,53 ± 0,02	0,18 ± 0,07	0,18 ± 0,08
N.I.	1458	N.I	-	-	0,22 ± 0,05
Germacreno D	1475	1482	0,34 ± 0,04	0,24 ± 0,04	-
N.I.	1477	N.I	0,80 ± 0,06	0,17 ± 0,05	0,15 ± 0,05
(Z,E)-α-farneseno	1490	1491	1,90 ± 0,13	0,76 ± 0,27	0,12 ± 0,03
N.I.	1496	N.I	1,84 ± 0,04	0,34 ± 0,02	-
β-bisabolono	1503	1503	1,83 ± 0,21	0,62 ± 0,13	-
Biciclogermacreno	1508	1503	0,70 ± 0,04	0,22 ± 0,07	0,17 ± 0,04
δ-cadineno	1518	1522	0,69 ± 0,09	0,88 ± 0,24	0,44 ± 0,05
N.I.	1569	N.I	1,39 ± 0,28	0,17 ± 0,06	-
N.I.	1635	N.I	0,64 ± 0,03	0,61 ± 0,07	-
Tcadinol	1649	1648	0,68 ± 0,02	0,68 ± 0,11	-
N.I.	1809	N.I	-	-	0,69 ± 0,10
Total			**98,8**	**98,2**	**99,9**

Tabela II.9: Comparação fitoquímica dos voláteis presentes nas folhas de *P. klotzschianum*.

SUBSTÂNCIAS	% em Relação à área dos Constituintes			
	***Piper* I**	***Piper* II**	**[79]**	**[73]**
α-thujeno	-	tr	-	0,1
α-pineno	4,83	-	-	4,6
β-carifileno	-	-	-	10,4
β-pineno	5,63	0,22	-	13,2
β-mirceno	1,22	-	-	-
α-felandreno	2,96	0,21	-	3,6
o-cimeno	1,51	-	-	-
Limoneno	4,71	-	-	**24,6**
cis-*β*-ocimeno	1,56	-	-	-
α-ocimeno	4,38	-	-	-
α-terpinoleno	4,00	-	-	-
α-cubebeno	0,73	-	Tr	tr
α-copaeno	1,90	-	Tr	0,1
β-cubebeno	2,42	0,26	1,44	-
β-elemeno	-	-	Tr	-
1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno	**50,6**	**87,2**	**81,0**	-
3,4-metilenodioxibenzilmetilcetona	-	-	Tr	-
β-carcariofileno	1,73	-	-	-
Germacreno D	2,93	0,34	1,05	1,5
(Z,E)-*α*-farneseno	-	1,92	-	-
Eremofileno	-	-	0,76	-
Bibiclogermacreno	3,38	0,70	2,68	1,2
Torreiol	-	-	Tr	-
β-bisabolono	-	1,86	-	-
δ-cadineno	0,70	1,85	0,72	-
(Z)-isoelemicina	-	-	1,23	-
α-asarono	4,75	-	9,10	-
T-cadinol	-	0,68	-	-

II.3.3 Avaliação da Atividade Citotóxica frente a *Artemia salina*

Os resultados para as amostras testadas são disponibilizados na Tabela II.10. Em ambos não houve mortalidade nos grupos controle, que é composto todos constituintes da matriz exceto a amostra, onde apresentaram taxa de mortalidade igual a 0,0%. As amostras analisadas apresentam valores significativamente baixos para CL_{50}, evidenciando o alto poder tóxico dos constituintes presentes nas amostras, valendo ressaltar a ótima atividade do óleo essencial das raízes da *P. klotzschianum* onde 98% da sua massa é composta por uma única substância, a 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, podendo à atividade ser atribuída a sua presença, uma vez que com o aumento das massas de outras substâncias os valores da CL_{50} diminuem, como é possível perceber quando observado os valores da CL_{50} para os óleos extraídos das folhas e caules da planta. Curiosamente o mesmo não acontece para a *A. satureioides* coletada no período do inverno, que adquirindo um comportamento contrário obteve um excelente resultado, uma CL_{50} igual a 3,12 ppm e sendo composta por uma matriz muito mais rica em substâncias.

Tabela II.10: Concentrações letais expressas pela CL_{50} para os voláteis da *P. klotzschianum e A. satureioides* frente a larvas da *Artemia salina.*

Amostras	Atividade Toxica CL_{50}(µg/mL)
OEFPK I	13,70
OECPK I	15,51
OERPK I	6,69
OEFM	3,12

II.3.4 Avaliação da Atividade Larvicida

Nesse ano o número de casos já ultrapassa os 745 mil, uma media de 367,8 casos a cada 100 mil habitantes, considerado pela OMS como índice de epidemia [99]. Perante a urgência por novas formas de combate ao mosquito vetor, o presente estudo obteve resultados promissores para algumas das amostras testadas.

A exemplo, pode-se citar o extrato etanólico das raízes da *P. klotzschianum* (EERPK), que apesentou mortalidade de 100% para a concentração de 177 ppm a partir de 8 horas de exposição das larvas do mosquito *A. aegypti*, com confiabilidade de 95% pelo teste de Tukey (Tabela II.11, p.88). As concentrações de 88,67 ppm e 44 ppm apresentaram 100% de mortalidade quando as larvas são exposta durante 16 horas e 24 horas, respectivamente. As concentrações de 22 ppm e 11 ppm não apresentaram letalidade satisfatória para as larvas em nenhum dos momentos estudados (Tukey 5%). As concentrações de 177 ppm, 88,67 ppm e 44 ppm não diferiram estatisticamente entre si quando se avalia a mortalidade após 24 horas de exposição das larvas, entretanto diferem das concentrações de 22 ppm, 11 ppm e o controle (Tukey 5%). A CL_{50} de 3,60 ppm para o tempo de exposição de 24 horas é eficiente no combate de 100% das larvas para as três maiores concentrações no mesmo período de observação, que estão dentro de um intervalo de confiança de 95% (Tabela II.12, p.89). A substância I (piperovatina) isolada da fração clorofórmica (FC) apresentou resultados mais satisfatórios no controle das larvas (Tabela II.13, p.89), em que nas concentrações de 28 ppm e 56 ppm obteve-se 100% de mortalidade com 4 horas de exposição (Tukey 5%). As concentrações de 14 ppm e 7 ppm foram eficientes no combate às larvas a partir de 8 horas e 24 horas de exposição, respectivamente. A concentração de 3,5 ppm de piperovatina não apresentou mortalidade satisfatória das larvas em nenhum dos momentos do estudo. As concentrações de 56 ppm, 28 ppm, 14 ppm, 7 ppm e 3,5 ppm não diferiram estatisticamente entre si (Tukey 5%) após 24 horas de exposição das larvas à substância, sendo diferentes apenas do grupo controle. Uma CL_{50} de 0,27 ppm para um período 16 horas mostrou 100% de mortalidade das larvas para as três maiores concentrações e valores acima de 96% de mortalidade para as duas concentrações menores pelo teste Tukey com 95% de confiabilidade (Tabela II.14, p.89), revelando-se uma excelente alternativa para produção de bioinseticidas. A fração acetato de etila (FAcOEt), obtida do fracionamento do EERPK, apresentou baixa toxicidade em

todas as concentrações estudadas (Tabela II.15, p.90), mostrando não ser bom no combate às larvas do *A. aegypti* pelo teste de Tukey (5%). A concentração de 223 ppm diferiu estatisticamente das demais concentrações quando se avaliou 24 horas de exposição das larvas à substância, mostrando que esta concentração é a mais eficiente no combate às larvas, entretanto apresenta baixa letalidade às mesmas. A CL_{50} igual 232,65 ppm para o período de 24 horas de observação é muito alta e apresenta percentuais de mortalidade relativamente baixos quanto comparados com as duas amostras anteriores (Tabela II.16, p.90). Por fim a fração aquosa (FAq) proveniente do fracionamento de EER*Pk* não obteve valor para CL_{50}, pois não apresentou mortalidade para nenhuma das concentrações analisadas, mostrando-se completamente inativa frente as larvas do *Aedes aegypti*. Testes larvicidas com a piperovatina e tetra-hidropiperlonguminina estão disponíveis na literatura, onde obtiveram valores de 1,5 e 10,43 ppm respectivamente, porem o teste não foi realizado para os extratos e frações da planta [78]. Dessa forma a planta se mostra uma fonte promissora de substâncias com atividades larvicidas que ainda podem ser estudadas, trazendo grandes benefícios para saúde humana com o controle efetivo do mosquito vetor além das atividades farmacológicas variadas que tais substâncias podem ter.

Tabela II.11: Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações do Extrato Etanólico da Raiz de *P. klotzschianum*.

Concentrações (ppm)	**Mortalidade (%)**			
	4h	**8h**	**16h**	**24h**
177	$95,99^{a}$	$100,00^{a}$	$100,00^{a}$	$100,00^{a}$
88,67	$63,99^{b}$	$92,66^{a}$	$100,00^{a}$	$100,00^{a}$
44	$41,99^{c}$	$65,33^{b}$	$99,33^{a}$	$100,00^{a}$
22	$15,99^{d}$	$28,66^{c}$	$51,99^{b}$	$71,33^{b}$
11	$7,33^{d}$	$12,66^{cd}$	$16,66^{c}$	$23,99^{c}$
CONTROLE	$0,00^{d}$	$0,00^{d}$	$0,00^{d}$	$0,00^{d}$

Tabela II.12: CL_{50} do Extrato Etanólico da Raiz de *P. klotzschianum*, sobre larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição.

Tempo Exposição (Horas)	Concentração Letal (ppm)	
	CL_{50}	Intervalo de Confiança
4	11.83	11.20 – 12.50
8	6.96	6.62 – 7.31
16	4.33	4.17 – 4.50
24	3.60	3.46 – 3.74

Tabela II.13: Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações da piperovatina (ECD20-1).

Concentrações (ppm)	Mortalidade (%)					
	1h	2h	4h	8h	16h	24h
56	88.93[a]	99.59[a]	100,00[a]	100,00[a]	100,00[a]	100,00[a]
28	81.33[a]	91.99[a]	100,00[a]	100,00[a]	100,00[a]	100,00[a]
14	73.33[a]	79.33[a]	95.99[a]	100,00[a]	100,00[a]	100,00[a]
7	3.33[b]	4.66[b]	25.33[b]	94.00[b]	97.33[a]	100,00[a]
3,5	0.66[b]	1.33[b]	10.66[c]	81.33[b]	96.66[a]	98.66[a]
CONTROLE	0.00[b]	0,00[b]	0,00[d]	0,00[c]	1.33[b]	1.99[b]

Tabela II.14: CL_{50} da Piperovatina (ECD20-1), frente as larvas de *Aedes aegypti* em relação ao tempo de exposição.

Tempo Exposição (Horas)	Concentração Letal (ppm)	
	CL_{50}	Intervalo de Confiança
1	14.77	14.08 - 15.48
2	12.29	11.79 - 12.81
4	7.71	7.43 - 8.01
8	1.74	1.36 - 2.07
16	0.27	0.04 - 0.63

Tabela II.15: Percentual de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição às diferentes concentrações da Fração Acetado de Etila da Raiz de *P. klotzschianum*.

Concentrações (ppm)	Mortalidade (%)		
	8h	**16h**	**24h**
223	13.99[a]	27.33[a]	51.32[a]
111,5	0.66[b]	3.33[b]	13.33[b]
55,8	0.66[b]	2.66[b]	3.99[b]
27,9	0.66[b]	0.66[b]	1.33[b]
13,9	0,00[b]	0,00[b]	0,00[b]
Controle	0,00[b]	0,00[b]	0.66[b]

Tabela II.16: CL_{50} da Fração Acetado de Etila das Raízes de *P. klotzschianum*, frente as larvas de *Aedes aegypti*, em relação ao tempo de exposição.

Tempo Exposição (Horas)	Concentração Letal (ppm)	
	CL_{50}	**Intervalo de Confiança**
8	775.38	562.45 - 1286.79
16	437.15	368.96 - 547.77
24	232.65	214.95 - 255.04

II.3.5 Avaliação da Atividade Citotóxica e Viabilidade Celular com MTT

Com os resultados exibidos no gráfico (Figura II.10, p.92) pode-se visualizar que a substância tetra-hidropiperlonguminina (ECD10-2) mantem as células viáveis e não interferem no processo de respiração celular, que é diretamente proporcional ao numero de células vivas. De acordo com o aumento da absorbância apresentada no gráfico pode-se sugerir que a substância ECD10-2 tenha estimulado tanto a ativação dos macrófagos quanto sua proliferação, indicando um potencial anti-inflamatório a ser explorado. Entretanto a piperovatina (ED20-1) não foi tão significante em relação ao controle 1 (células + meio). Em relação ao controle 2 (DMSO + células + meio) podemos ver que ele manteve a viabilidade abaixo do controle 1, o que já era esperado pois o DMSO é uma substância tóxica em concentrações acima de 10%. Pode-se concluir ainda que tais substâncias não são tóxicas para as células de mamíferos, podendo estas consumidas de forma assegurada.

As piperamidas compõem uma classe de substâncias presente na maioria das plantas pertencentes ao gênero *Piper* e possuem as mais diversas atividades, analgésicas, antitérmicas, anti-inflamatórias, entre outras. Possui também atividades diretamente ligadas a integridade celular, como atividades neuroprotetora reduzindo os processos neurodegenerativos e inibidora de células cancerígenas [50, 100].

A piperina (Figura I.3, p.28) substância isolada da *Piper nigrum* entre outras espécies do gênero, é capaz de inibir a produção anormal ou desregulada de células do *musculo liso vascular* que compõem as paredes dos vasos sanguíneos e são responsáveis por pequenas contrações involuntárias para ajudar no bombeamento sanguíneo [101]. Sendo encontrada ainda atividades citotóxicas através do teste de viabilidade celular com reagente MTT do extrato etanólico de plantas como a *Piper sarmentosum,* que pode agir no controle de células de tumores benignos humanos [102-103].

Dessa forma o presente trabalho teve o intuído de avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular para duas piperamidas isoladas da *P. klotzschianum* uma vez que estruturas análogas apresentam atividades que estão diretamente ligadas ao metabolismo celular, validando a pesquisa no intuito de uma nova descoberta já que não se tem relatos dessa investigação para nenhuma das duas substâncias avaliadas.

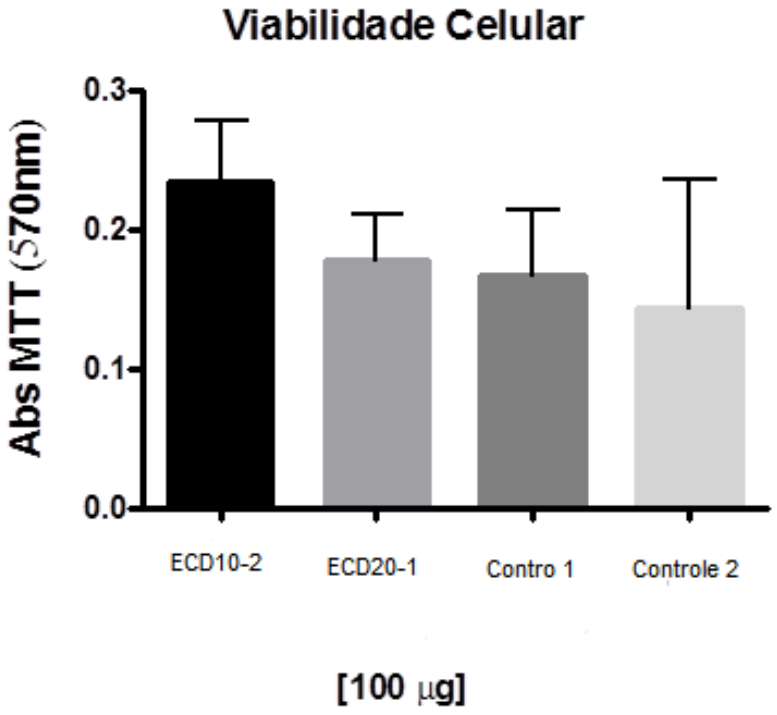


Figura II.10: Ensaio de viabilidade celular com MTT para os compostos ECD10-1 e ECD20-1 isolados da *P. klotzschianum*. Controle -1: células e meio. Controle -2: células+ meio+ DMSO 10%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta investigação trouxe uma contribuição para o conhecimento fitoquímico ao examinar os constituintes fixos presentes nas raízes e os voláteis extraídos das partes da *Piper klotzschianum Kunth*, que quando comparados com dados da literatura chamou atenção para uma possível descoberta de um quimiotipo diferente da planta. Trazendo ainda o estudo do efeito da variação sazonal sobre a composição dos óleos essenciais presentes nas folhas da *Achyrocline satureioides (Lam.) DC* que também revelou um quimiotipo diferente para a espécie estudada, além de realizar avaliações das atividades biológicas (citotóxica, larvicida e viabilidade celular) dos extratos, das substâncias isoladas das raízes da *P. klotzschianum* e dos voláteis extraídos das duas plantas.

Sendo assim através do estudo do extrato etanólico das raízes da *Piper klotzschianum* e com a utilização das técnicas de cromatografia clássica e recristalização foi possível isolar 4 substâncias e identifica-las através das técnicas de RMN 1D, sendo isolados dois alcaloides (piperovatina e tetra-hidropiperlonguminina), classe de substâncias amplamente encontradas em plantas do gênero *piper*, e a mistura dos esteróides estgmasterol e β-seitosterol comumente encontrados como metabólicos secundários de varias espécies. Sendo identificados também 4 substâncias através das técnicas de CG-EM, os ésteres graxos (miristarto de metila, palmitato de metila e o metil ester do acido 9-octadecenoico).

Os óleos essenciais extraídos das folhas, caules e raízes da *P. klotzschianum* apresentam como constituinte principal o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, sendo ainda encontrados seis substâncias (*cis*-*β*-ocimene, *α*-ocimene, *α*-terpinolene, *β*-caryophyllene, *(Z,E)*-*α*-farnesene, *T*-cadinol) que estão sendo relatadas pela primeira vez para os voláteis da espécie. Já para a *A. satureioides* podemos perceber que de uma estação para a outra seus componentes voláteis majoritários tiveram uma alteração significativa, onde no inverno o percentual de *β*-cariofinelo é superior ao de *α*-humuleno, que tem suas proporções invertidas no verão. Através da análise comparativa dos voláteis das plantas estudadas com dados da literatura é possível concluir que as espécies de plantas compõem uma variedade química diferente. Podendo se tornar alvo de pesquisas ainda mais aprofundadas, uma vez que assim como houve modificação na composição química dos voláteis, o mesmo pode ocorrer com os constituintes fixos da espécie, alterando suas atividades e podendo fornecer novas moleculares bioativas.

No ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* todas as amostras de óleos essenciais apresentam-se altamente ativas com destaque para os voláteis das folhas da *A. satureioides* com CL_{50}= 3,12 ppm e para os voláteis extraídos das folhas, caules e raízes da *P. klotzschianum* obtiveram CL_{50}= 13,70; 15,51 e 6,69 respectivamente. Nos testes de atividade larvicida utilizando larvas do mosquito *Aedes aegypti* que se encontravam no terceiro instar foram constatados resultados promissores, sendo calculado uma CL_{50}= 3,60 ppm para o EER*Pk*, e CL_{50}= 0,27 ppm para piperovatina extraída no fracionamento da FC, demostrando-se potencialmente eficientes no controle das larvas do mosquito vetor, enquanto a FAcOET obteve um valor para CL_{50}= 323,65ppm demostrando uma baixa atividade e a FAq foi totalmente inativa frente as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. No teste de viabilidade celular com MTT podemos avaliada apenas para as substâncias isoladas da FC a piperovatina e tetra-hidropiperlonguminina, pode-se perceber que a tetra-hidropiperlonguminina teve um resultado positivo frente aos controles, onde de alguma forma a substância fornece condições para ativação celular, mantendo suas funções metabólicas em plena atividade, o que não foi percebido para a piperovatina. Entretanto ficou claro que ambas as substâncias não apresentaram toxicidade frente a células de mamíferos nas concentrações avaliadas.

Assim, este trabalho contribuiu para o conhecimento fito e geoquímico das espécies *Piper klotzschianum (kunth)* e *Achyrocline satureioides (Lam.) DC* com a comprovação de algumas atividades biológicas, que futuramente podem vir a ser exploradas minunciosamente no intuito de maiores contribuições na descoberta de novas substâncias bioativas, na produção de bioinseticidas, fármacos e que venham a explorar as potenciais atividades citotóxicas e toxicológicas das espécies estudadas.

Referencias:

[1] GLEISER, M. **Mundos Invisíveis: Da alquimia à física de partículas**. São Paulo, Ed. Globo, 2008, 285 p.

[2] ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. MEDICINAL PLANTS: POPULAR CULTURE VERSUS SCIENCE. **Vivências,** vol.7, n.12, p.51-60. 2011.

[3] CARVALHO-SILVA, M.; GUIMARÃES, E.F. Piperaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Bol. Bot. Univ**. São Paulo, n. 27(2), p. 235-245, 2009.

[4] YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. III: Peperomia; Taxa of uncertain status. Hoehnea, v.4, 1974.

[5] DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. II ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002, 601 p.

[6] BARDELLI, K.C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A.V.G. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea** n. 35(4), p. 553-561, 2008.

[7] GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILVA, M. Uma nova espécie e novos nomes em *Piper* seção *Ottonia* (Piperaceae) para o Sudeste do Brasil. **Hoehnea,** n. 36(3), p. 431-435, 2009.

[8] ARAÚJO, M.S.; MIGUEL, J.R.; JASCONE. C.E.S. O GÊNERO *Piper* L. (PIPERACEAE) NO PARQUE NATURAL MUNICIPAL DA TAQUARA, DUQUE DE CAXIAS, RJ, BRASIL. **II SIMPÓSIO DE PESQUISA EM MATA ATLÂNTICA,** Engenheiro Paulo Frontin – RJ, 2012.

[9] JUNIOR, V.B.S.; BERMIDEZ, G.M.M.; GUIMARÃES, E.F. Diversidade de Piperaceae em um remanescente de Floresta Atlântica na região serrana do Espírito Santo, Brasil. **Revista Biotemas,** n. 27 (1), p. 49-57, 2014.

[10] MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E.F. Flora Do Parque Nacional Do Itatiaia – Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). **Rodriguésia,** n. 59 (1), p. 161-195, 2008.

[11] GUIMARÃES, E.F.; GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguesia***,* n. 55(86), p. 21-46, 2004.

[12] Guimarães, E.F.; Monteiro, D. Piperaceae Na Reserva Biológica De Poço Das Antas, Silva Jardim, Rio De Janeiro, Brasil. **Rodriguesia,** n.57 (3), p. 567-587, (2006).

[13] JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny And Patterns Of Floral Diversity In The Genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany,** 88(4), p. 706–716, 2001.

[14] QUIJANO-ABRIL, M.A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, D.R. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). **Journal of Biogeography,** n. 33, p. 1266–1278, 2006.

[15] CARVALHO-SILVA, M.; GUIMARÃES, E.F.; PEREIRA, L.A.; JUNIOR, V.B.S. DUAS NOVAS ESPÉCIES DE *Piper* SECT. *Ottonia* (PIPERACEAE) DO SUDESTE DO BRASIL. **64° Congresso Nacional de Botânica**, Belo Horizonte, 2013.

[16] MELO, A.; GUIMARÃES, E.F.; ALVES, M. Piperaceae do Parque Nacional do Viruá, Caracaraí, Roraima, Brasil. **Rodriguésia,** n. 65(2), p. 455-470, 2014.

[17] PESSINI, G.L.; ALBIERO, A.L.M.; MOURÃO, K.S.M.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G. Análise Farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck: Aspectos Botânicos e Enfoque Físico-quimico Preliminar. **Lat. Am. J. Pharm,** vol. 22, n.3, p. 209-16, 2003.

[18] ALMEIDA, M.Z. **Plantas Medicinais**. III ed. Salvador: Editora da UFBA, 2011, 221 p.

[19] Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). **Química verde no Brasil: 2010-2030.** Ed. rev. E atual. – Brasília: CGEE, 2010, 438p.

[20] CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** Vol. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

[21] SHOWMAN, A.F.; BAKER, J.D.; LINARES, C.; NAEOLE, C.K.; BORRIS, R.; JOHNSTON E.; KONANUI, J.; TURNER, H. Contemporary Pacific andWestern perspectives on `awa (*Piper methysticum*) toxicology. **Fitoterapia**, n. 100, p. 56-57, 2015.

[22] WANG, J.; QU, W.; BITTENBENDER, H.C. Kavalactone content and chemotype of kava beverages prepared from roots and rhizomes of Isa and Mahakea varieties and extraction efficiency of kavalactones using different solvents. **J Food Sci Technol,** vol. 52, n. 2, p. 1164-1169, 2015.

[23] 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, v.46, n.4, p.597-673, 1997.

[24] SHI, Y.; SHI, Y.; YANG, L.; LI, X.; ZHAO, J.; QU, Y.; ZHU, H.; WANG, D.; CHENG, R.; YANG, C.; XU, M.; ZHANG, Y. Lignans and aromatic glycosides from

Piper wallichii and their antithrombotic activities. **Journal of Ethnopharmacology.** vol. 162 p. 87-96, 2015.

[25] KIM, K.H.; CHOI, J.W.; HA, S.K.; KIM, S.Y.; LEE, K.R. Neolignans from *Piper kadsura* and their anti-neuroinflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** vol.20, p. 409-412, 2010.

[26] KISHORE, N.; MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K.; TRIPATHI, V.; LALL, N. Natural products as leads to potential mosquitocides. **Phytochem Rev,** vol. 13, p. 587-627, 2014.

[27] COTINGUIBA, F.; REGASINI, L.O.; BOLZANI, V.S.; DEBONSI, H.M.; PASSERINI, G.D.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agentes. **Med. Chem. Res.,** n.18, p. 703–711, 2009.

[28] CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive déficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology,** vol. 48, p. 798-802, 2010.

[29] BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; ALENCAR, N.M.N.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; ALVEZS, A.P.N.N.; PESSOA, O.D.L.; CHAVES, J.H.; SILVEIRA, E.R.; COSTA-LOTUFO, L.V. In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by piperlonguminine, an alkaloid amide from the Piper species. **J. Appl. Toxicol**, vol.28, p. 599-607, 2008.

[30] YAO, C.Y.; WANG, J.; DONG, D.; QUIAN, F.G.; XIE, J.; PAN, S.L. Laetispicine, an amide alkaloid from Piper laetispicum, presents antidepressant and antinociceptive effects in mice**. Phytomedicine**, vol. 16, p. 823-829, 2009.

[31] XUAN, T.D; FUKUTA, M.; WEI, A.C.; ELZAAWELY, A.; KHANH, T.D.; TAWATA, S. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methysticum)* roots. **J Nat Med,** vol. 62, p. 188-194, 2008.

[32] REIGADA, J.B.; TCACENCO, C.M.; ANDRADE, L.H.; KATO, M.J.; PORTO, A.L.M.; LAGO, H.G. Chemical constituents from *Piper marginatum Jacq*. (Piperaceae) antifungal activities and kinetic resolution of (RS)-marginatumol by *Candida Antarctica* lipase (Novozym 435).

[33] SCODRO, R.B.L.; PIRES, C.T.A.; CARRARA, V.S.; LEMOS, C.O.T.; CARDOZO-FILHO, L.; SOUZA, V.A.; CORRÊIA, A.G.; SIQUEIRA, V.L.D.; LONARDONI, M.V.C.; CARDOSO, R.F.; CORTEZ, D.A.G. Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii.* **Phytomedicine**, vol. 20, p. 600-604, 2013.

[34] DWIVEDI, V.; TRIPATHI, S. Review study on potential activity of *Piper betle.* **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry,** vol. 3, n. 4, p. 93-98, 2014.

[35] PRADHAN, D.; SURI, K.A.; PRADHAN, D.K,; BISWASROY, P. Golden Heart of the Nature: *Piper betle* L. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry,** vol. 1, N. 6, p. 147-167, 2013.

[36] NASCIMENTO, J.C.; PAULA, V.F. OCCURRENCE, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND ^{13}C NMR DATA OF AMIDES FROM *Piper* (Piperaceae), **Quim. Nova**, vol.35, n.11, p.2288-2311, 2012.

[37] SILVA, D.R.; ENDO, E.H.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; SVIDZINSKI, T.I.E.; SOUZA, A.; YOUNG, M.C.M.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G. Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Piper ovatum* Vahl. **Molecules,** n. 14, p. 1171-1182, 2009.

[38] CRUZ, G.M.P.; FELIPE, C.F.B.; SCORZA, F.A.; COSTA, M.A.C.; TAVARES, AF.; MENEZES, M.L.F.; ANDRADE, G.M.; LEAL, L.K.A.M.; BRITO, G.A.C.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A.; VIANA, G.S.B. Piperine decreases pilocarpine-induced convulsions by GABAergic mechanisms. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, vol. 104, p. 144–153, 2013.

[39] BANG, J.S.; OH, D.H.; CHOI, H.M.; SUR, B.; LIM, S.; KIM, J.Y. Antiinflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1[beta]-stimulated fibroblastlike synoviocytes and in rat arthritis models. **Arthritis Research & Therapy,** 2009.

[40] DIAS, J.C.P. Chagas' Disease and its Control in Latin America. An Analysis of Possibilities. **Cad. Saúde Públ**., Rio de Janeiro, vol. 9, n 2, p. 201-209, 1993.

[41] LUIZE, P.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; Dias FILHO, P.B.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. Activity of Neolignans Isolated from Piper regnellii (MIQ.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. **Biol. Pharm. Bull**. vol. 29, n. 10, p. 2126-2130, 2006.

[42] VENTURA-GARCIA, L.; ROURA, M.; PELL, C.; POSADA, E.; GASCO´N, J.; ALDASORO, E.; MUÑOZ, J.; POOL, R. Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research. **PLoS. Negl. Trop. Dis,** vol. 7, n. 9, 2013.

[43] FERREIRA, D.S.; ESPERANDIM, V.R.; MARÇAL, M.G.; NERES, N.B.R.; CUNHA, N.L.; SILVA, M.L.A.; CHUNHA, W.R. Natural products and Chagas' disease: the action of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. **Universitas Scientiarum**, vol. 18, n. 3, p. 243-256, 2013.

[44] IBRAHIM, M.A.; MOHAMMED, A.; ISAH, M.B.; ALIYU, A.B. Anti-trypanosomal activity of African medicinal plants: A review update. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 154, p. 26-54, 2014.

[45] VEIGA-SANTOS, P.; DESOTI, V.C.; MIRANDA, N.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; SILVA, S.O.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica,** vol. 125, p. 349-356, 2013.

[46] FREIRE-DE-LIMA, L.; RIBEIRO, T.S.; ROCHA, G.M.; BRANDÃO, B.A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O.; LIMA, M.E.F.; CARVALHO, T.M.U.; HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitol Res.,** n.102, p.1059–1067, 2008.

[47] KUMAR, G.P.; KHANUM, F. Neuroprotective potential of phytochemicals. **Pharmacogn Rev**. vol. 6, n. 12, p. 81-90, 2012.

[48] WATTANATHORN, J.; CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; MUCHIMAPURA, S.; PRIPREM, A.; TANKAMNERDTHAI, O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, p. 3106-3110, 2008.

[49] PRIPREM, A.; CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; SUTTHIPARINYANONT, S.; WATTANATHORN, J. Antidepressant and cognitive activities of intranasal piperine-encapsulated liposomes. **Advances in Bioscience and Biotechnology**. vol. 2, p. 108-116, 2011.

[50] KUBO, M.; ISHII, R.; ISHINO, Y.; HARADA, K.; MATSUI, N.; AKAGI, M.; KATO, E.; HOSODA, S.; FUKUYAMA, Y. Evaluation of Constituents of *Piper retrofractum* Fruits on Neurotrophic Activity. **J. Nat. Prod**., n. 76, p. 769−773, 2013.

[51] PRASHANTH, M.K.; REVANASIDDAPPA, H.D.; RAI, K.M.L.; VEERESH, B. Synthesis, characterization, antidepressant and antioxidant activity of novel piperamides bearing piperidine and piperazine analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** vol. 22, p. 7065–7070, 2012.

[52] GAUDIN, N. International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report**, 2008. Lyon/London, 2014.

[53] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil.** Coordenação de Prevenção e Vigilância, Rio de Janeiro, 2014.

[54] BALACHANDRAN, P.; GOVINDARAJAN, R. Cancer-an ayurvedic perspective. **Pharmacological Research**, vol. 51, p. 19-30, 2005.

[55] Tsai IL, Lee FP, Wu CC, Duh CY, Ishikawa T, Chen JJ, Chen YC, SEKI, R. New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and anti-platelet aggregation constituents from Piper arborescens. **Planta Medica**, vol.71, p. 535 - 542, 2005.

[56] SUNILA, E.S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum Linn.* and piperine. **Journal of Ethnopharmacology,** vol. 90, p. 339-346, 2004.

[57] WU, Y.; MIN, X.; ZHUANG, C.; LI, J.; YU, Z.; DONG, G.; YAO, J.; WANG, S.; LIU, Y.; WU, S.; ZHU, S.; SHENG, C.; WEI, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, W.; MIAO, Z. Design, synthesis and biological activity of piperlongumine derivatives as selective anticâncer agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry,** vol. 82, p. 545-551, 2014.

[58] ARIFFIN, S.H.Z.; OMAR, W.H.H. W.; ARIFFIN, Z.Z.; SAFIAN, M.F.; SENAFI, S.; WAHAB, F.M.A. Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line. **Cancer Cell International**, vol. 9, n. 6, 2009.

[59] SHRIVASTAVA, S.; KULKARNI, P.; THUMMURI, D.; JEENGAR, M.K.; NAIDU, V.G.M.; ALVALA, M.; REDDDY, G.B.; RAMAKRISHNA, S. Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3 K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells. **Apoptosis,** vol. 19, p. 1148-1164, 2014.

[60] HEMME, R.R.; THOMAS, C.L.; CHADEE, D.D.; SEVERSON, D.W. Influence of Urban Landscapes on Population Dynamics in a Short-Distance Migrant Mosquito: Evidence for the Dengue Vector *Aedes aegypti.* **Urban Landscape and *Aedes aegypti* Populations,** vol. 4, n. 3, 2010.

[61] CABRAL, M.M.O.; ALENCAR, J.A.; GUIMARÃES, A.E.; KATO, M.J. Larvicidal Activity of Grandisin Against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, vol. 25, n. 1, p 103-105, 2009.

[62] OLIVEIRA, G.P.; SILVA, S.L.C.; GUALBERTO, S.A.; CRUZ, R.C.D.; CARVALHO, K.S. ATIVIDADE LARVICIDA DO EXTRATO ETANÓLICO DA RAIZ DE *CROTON LINEARIFOLIUS* SOBRE *AEDES AEGYPTI.* **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA,** vol. 10, n. 18; p. 442-448, 2014.

[63] LINSS, J.G.B.; BRITO, L.P.; GARCIA, G.A.; SAORI, A.S.; BRUNO, R.V.; LIMA, J.B.P.; VALLE, D.; MARTINS, A.J. Distribution and dissemination of the Valle and

Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. **Parasites & Vectors,** vol. 7, n. 25, 2014.

[64] HAYES, E.B. Zika Virus Outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 15, n. 9, 2009.

[65] Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil**. Ministério da Saúde, Brasília, 2014, 91p.

[66] European Centre for Disease Prevention and Control. **Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak, Brazil and the Pacific region**. 25 May 2015. Stockholm: ECDC; 2015.

[67] DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **REV. BRAS EPIDEMIOL**, vol. 18, n. 1, p. 283-385, 2015.

[68] TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. Cad. Saúde Pública, vol. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

[69] BRAGA, I.A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. Epidemiol. Serv. Saúde, vol. 16, n. 4, p. 279-293, 2007.

[70] BARR, D.B.; OLSSON, A.O.; WONG, L.; UDUNKA, S.; BAKER, S.E.; WHITEHEAD Jr., R.D.; MAGSUMBOL, M.S.; WILLIAMS, B.L.; NEEDHAM, L.L. Urinary Concentrations of Metabolites of Pyrethroid Insecticides in the General U.S. Population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. **Environmental Health Perspectives**, vol. 118, n. 6, 2010.

[71] MAESTRE-SERRANO, R.; GOMEZ-CAMARGO, D.; PONCE-GARCIA, G.; FLORES, A.E. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** vol. 116, p. 63-73, 2014.

[72] AGUIRRE-OBANDO, O.A.; BONA, A.C.D.; DUQUE L, J.E.; NAVARRO-SILVA, M.A. Insecticide resistance and genetic variability in natural populations of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Diptera: Culicidae) from Colombia. **ZOOLOGIA**, vol. 32, n. 1, p. 14-22, 2015.

[73] ANDRADE, E.H.A.; GUIMARÃES, E.F.; MAIA, J.G.S. **Variabilidade Química em Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* da Amazônia**. Belém, FEQ/UFPA, 2009, 448 p.

[74] SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; KUSTER, R.M.; LAGE, C.L.S.; FILHO, A.M.O. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes*

aegypti larvae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 40, n. 4, p. 405-407, 2007.

[75] MALECK, M.; FERREIRA, B.; MALLET, J.; GUIMARÃES, A.; KATO, M. Cytotoxicity of Piperamides Towards *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, vol. 51, n. 2, p. 458-463, 2014.

[76] YANG, Y.; LEE, S.; LEE, H.; KIM, M.; LEE, S.; LEE, H. A Piperidine Amide Extracted from *Piper longum L*. Fruit Shows Activity against *Aedes aegypti* Mosquito Larvae. **J. Agric. Food Chem**, vol. 50, p. 3765-3767, 2002.

[77] KANIS, L.A.; RABELO, B.D.; MOTERLE, D.; NOGARETTI, R.M.; NUNES, T.; SILVA, O.S.; PROPHIRO, J.S. Standardized extract of *Piper ovatum* (Piperaceae) to control *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Industrial Crops and Products,** vol. 50, p. 816-820, 2013.

[78] NASCIMENTO, J.C. **ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE *Piper klotzschianum Kunth* (PIPERACEAE) E Croton grewioides Baill (EUPHORBIACEAE)**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

[79] NASCIMENTO, J.C.; DAVID, J.M.; BARBOSA, L.C.A.; PAULA, V.; DEMUNER, A.J.; DAVID, J.P.; CONSERVA, L.M.; FERREIRA, J.C.; ELSIE, F.G. Larvicidal activities and chemical composition of essential oils from *Piper klotzschianum* (Kunth) C. DC. (Piperaceae). **Pest Manag Sci,** vol.69, p.1267–1271, 2013.

[80] MILINSK, M.C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V.; DIAS, L.F.; YAMAGUCHI, M.M.; PEDRÃO, M.R.; SOUZA, N.E. Influence of the esterification method on the quantification of olive oil fatty acids. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina,** vol.32, n.2, p.139-150, 2011.

[81] FACUNDO, V.A.; MORAIS, S.M.; FILHO, R.B. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Ottonia corcovadensis* MIQ. DA FLORESTA AMAZÔNICA – ATRIBUIÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DOS ÁTOMOS DE HIDROGÊNIO E CARBONO. **Quim. Nova**, vol.27, n.1, p.79-83, 2004.

[82] CHATURVEDULA, V.P.; PRAKASH, I. Isolation of Stigmasterol and β-Sitosterol from the dichloromethane extract *of Rubus suavissimus.* **International Current Pharmaceutical Journal,** vol.1, n.9, p.239-242, 2012.

[83] GARCÍA-SÁNCHEZ, C.A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, A.; VILLASEÑOR, J.L. LA FAMILIA ASTERACEAE EN EL PARQUE NACIONAL LOS MÁRMOLES, HIDALGO, MÉXICO. **Acta Botanica Mexicana**, vol. 106, p. 97-116, 2014.

[84] RETTA, D.; DELLACASSA, E.; VILLAMIL, J.; SUÁREZ, S.A.; BANDONI, A.L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, vol. 38, p. 27–38, 2012.

[85] CASERO, C.; MACHÍN, F.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S.; DEMO, M.; RAVELO, A.G.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; JOSEPH-BATHAN, P.; ESTÉVEZ-BRAUN, A. Structure and Antimicrobial Activity of Phloroglucinol Derivatives from *Achyrocline satureioides*. **J. Nat. Prod.** vol. 78, p. 93−102, 2015.

[86] CARINI, J.P.; KLAMT, F.; BASSANI, V.L. Flavonoids from Achyrocline satureioides: promising biomolecules for anticancer therapy. **RSC Adv.**, vol. 4, p. 3131–3144, 2014.

[87] CARINI, J.P.; LITÃO, G.G.; SCHNEIDER, P.H.; SANTOS, C.C.; COSTA, F.N.; HOLZSCHUH, M.H.; KLAMT, F.; BASSANI, V.L. Isolation of Achyrobichalcone from *Achyrocline satureioides* by High-Speed Countercurrent Chromatography**. Current Pharmaceutical Biotechnology**, vol. 16, n. 1, p. 66-71, 2015.

[88] LORENZO, D.; ATTI-SERAFINI; SANTOS, A.C.; FRIZZO, C.D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Achyrocline satureioides Essential Oils from Southern Brazil and Uruguay. **Planta Med**. vol. 66, 2000.

[89] MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, vol.45, n.1, p.31-34, 1982.

[90] PEREIRA, E.M.; FILHO, M.T.L.; MENDES, F.A.; MARTINS, A.N.A.; ROCHA, A.P.T. Potencial toxicológico frente *Artemia salina* em plantas condimentares comercializadas no município de Campina Grande-PB. **Revista Verde (Pombel Brasil)**, vol.10, n.1, p.52-56, 2015.

[91] MENDONÇA, F.A.C.; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; JÚNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Fitoterapia, vol.76, p.629-636, 2005.

[92] CARVALHO, E. **Brasil tem 745,9 mil casos de dengue até 18 de abril, segundo ministério**. G1, disponível em: <http://g1.globo.com/bemestar/dengue/noticia/2015/05/brasil-tem-7459-mil-casos-de-dengue-no-pais-ate-18-de-abril.html>, acesso 15 de agosto de 2015.

[93] MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, vol.65, p.55-63, 1983.

[94] FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Fragr. J**. vol.23, p.213-226, 2008.

[95] GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, vol.99, p.2507-2515, 2008.

[96] BALDISSERA, M.D.; OLIVEIRA, C.B.; RECH, V.C.; REZER, J.F.P.; SAGRILLO, M.R.; ALVES, M.P.; SILVA, A.P.T.; LEAL, D.B.R.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; SILVA, A.S.; MENDES, R.E.; MONTEIRO, S.G. Treatment with essential oil of *Achyrocline satureioides* in rats infected with *Trypanosoma evansi*: Relationship between protective effect and tissue damage. **Pathology – Research and Practice,** 2014.

[97] ROGÉRIO, A. P.; ANDRADE, E. L.; LEITE, D. F. P.; FIGUEREDO, P.; CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene *α*-humulene in experimental airways allergic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, vol.158, p.1074–1087, 2009.

[98] PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.110, p.323-333, 2006.

[99] **Epidemia de zika pode estar ligada a aumento de casos de síndrome rara**. Jornal Hoje**.** Disponível em: <http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2015/07/epidemia-de-zika-pode-estar-ligada-aumento-de-casos-de-sindrome-rara.html >, acesso em 15 de agosto de 2015.

[100] OVADJE, P.; MA, D.; TREMBLAY, P.; ROMA, A.; STECKLE M.; GUERRERO, J.A.; ARNASON, J.T.; PANDEY, S. Evaluation of the Efficacy & Biochemical Mechanism of Cell Death Induction by *Piper longum* Extract Selectively in *In-Vitro* and *In-Vivo* Models of Human Cancer Cells. **PLOS ONE,** vol.9, n.11, 2014.

[101] MAIR, C.E.; LIU, R.; ATANASOV A.G.; WIMMER, L.; NEMETZ-FIEDLER, D.; SIDER, N.; HEISS, E.H.; MIHOVILOVIC, M.D.; DIRSCH, V.M.; ROLLINGER, J.M. Piperine Congeners as Inhibitors of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. **Planta Med**, vol.81, p.1065-1074, 2015.

[102] ARRIFFIN, S.H.Z.; OMAR, W.H.H.W.; ARIFFIN, Z.Z.; SAFIAN, M.F.; SENAFI, S.; WAHAB, R.M.A. Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line. **Cancer Cell International**, vol.9, n.6, 2009.

[103] STUNZ, G.M.; FINLAY, H. SYNTHESIS OF SARMENTOSINE, AN AMIDE ALKALOID FROM PIPER SARMENTOSUM. Phytochemistry, Vol. 39, N. 3, p. 731-733, 1995.