

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA



LEANDRO SOARES MOREIRA DILL

ESTUDO FITOQUÍMICO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS E FIXOS DE *Piper hispidum* SW. E  
AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTIPLASMODIAL.

UNIR

PORTO VELHO, RO – NOVEMBRO 2009

**LEANDRO SOARES MOREIRA DILL**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS E FIXOS DE *Piper hispidum* SW. E  
AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTIPLASMODIAL.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental, na área: Parasitologia com ênfase na relação patógeno/hospedeiro do Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Alves Facundo

PORTO VELHO, RO – NOVEMBRO 2009

**ESTUDO FITOQUÍMICO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS E FIXOS DE *Piper hispidum* SW. E  
AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA E ANTIPLASMODIAL.**

LEANDRO SOARES MOREIRA DILL

Área de concentração: Química de Produtos Naturais

APROVADO EM: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Dr. Valdir Alves Facundo

---

Dra. Izaltina Silva Jardim

---

Dr. Julio Sancho Linhares Teixeira Militão

*A minha esposa Margarete Zanata  
Dill Moreira, pela dedicação e paciência no  
desenvolvimento deste trabalho, e ao meu  
grande amigo João Gabriel pela parceria e  
amizade durante todos estes anos de  
caminhada científica ”...*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Valdir Alves Facundo, pela confiança, amizade, constante incentivo e principalmente por sua paciência e dedicação ao trabalho de orientar.

Ao CNPQ pela bolsa e apoio financeiro do projeto.

Ao diretor de pesquisa e inovação do instituto de pesquisas em patologias tropicais - IPEPATRO. Atualmente diretor executivo da fundação Oswaldo Cruz - unidade de Rondônia, Dr. Rodrigo Guerino Stabeli, pelo suporte, apoio e colaboração na execução desta pesquisa.

A Dr<sup>a</sup> Izaltina Silva Jardim e a amigos Homero Gonçalves Neto e Delvânia Marta Ferreira Santos do Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais (IPEPATRO) pela orientação e ajuda na realização dos ensaios biológicos frente a *Leishmania*.

A Dr<sup>a</sup> Selene Maia de Moraes, da Universidade Estadual do Ceará pela obtenção dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

Ao Dr. Wanderlei Rodrigues Bastos pelo apoio e colaboração nas análises de cromatografia gasosa e espectroscopia de massas CG/MS.

A pesquisadora do CEPEM (Centro de Pesquisa da Malária) Joana Darc Neves Costa e ao colega Francisco Lurdevanhe da Silva Rodrigues pela ajuda na realização dos ensaios biológicos com cepa 3D7 de *P. falciparum*.

A Pesquisadora do laboratório de parasitologia do CEPEM, Elieth Afonso de Mesquita e ao parceiro e amigo Rosimar Pires Esquerdo pela ajuda na realização dos ensaios biológicos com cepa W2 de *P. falciparum*.

Aos amigos Raphael B. de Moraes, José Maria Fonteneli Junior e Consuelo Tamires pela ajuda na coleta e tratamento do material vegetal no LPQPN (lab. de pesquisa em química de produtos naturais).

As minhas amigas de coração Aline Roberta Polli e Fernanda Bay por toda amizade, companheirismo, e ajuda ao longo de todos esses anos de convívio no laboratório.

Agradeço a paciência e dedicação de minha esposa, Margarete Z. D. Moreira, que com carinho acompanhou a edição deste trabalho. Agradeço também pelo apoio e confortante presença nas minhas decisões.

A todos os amigos de bancada do LPQPN, e a todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

*" A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada."*

***Albert Einstein***

## RESUMO

MOREIRA, L. S. **Estudo Fitoquímico dos Constituintes Voláteis e Fixos de *Piper hispidum* sw. e Avaliação *in vitro* da Atividade Leishmanicida e Antiplasmodial.**

Dissertação apresentada ao departamento de Medicina da Universidade Federal de Rondônia - UNIR

O Presente trabalho relata o isolamento, caracterização estrutural, avaliação de atividade leishmanicida e antiplasmodial de constituintes voláteis e fixos de *Piper hispidum* SW. Foi realizado o levantamento bibliográfico da distribuição de metabólitos secundários nos óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* pesquisadas no Brasil. Em virtude da ausência de padronização na literatura especializada, a respeito do habitat e condições a que as plantas estão submetidas, torna-se inviável o estabelecimento de correlação entre a distribuição dos metabólitos secundários com a variação de fatores bióticos e abióticos influentes na composição de tais produtos naturais desta espécie. Foram identificados 82,12% da composição do óleo essencial extraído das folhas de *P. hispidum*, o que corresponde a 28 substâncias, sendo 9,16% de monoterpenos, 71,68% de sesquiterpenos e 1,28% de fenilpropanóides. Já do óleo essencial extraído dos talos foram identificados 77,32% da constituição, isto é, 37 substâncias, sendo 5,25% de monoterpenos, 57,16% de sesquiterpenos e 14,91% de fenilpropanóides. Foi isolado um fenilpropanóide do óleo essencial dos talos (dilapiol), duas substâncias do extrato de acetato de etila, uma amida do tipo piperidina (Piplartina) e um ácido carboxílico derivado do ácido cinâmico (ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico). Avaliou-se o potencial leishmanicida *in vitro* frente a promastigotas de *Leishmania amazonensis*, de ambos óleos essenciais e do extrato de acetato de etila dos talos de *P. hispidum*. Também investigou-se o potencial antiplasmodial *in vitro* frente a cepas 3D7 e W2 de *Plasmodium falciparum*, de ambos óleos essenciais, da amida Piplartina, do ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico e de extratos de *P. hispidum*. Os resultados apresentados relatam uma inédita e eficiente atividade leishmanicida e antiplasmodial dos óleos essenciais das folhas e talos de *P. hispidum*, e também relatam pela primeira vez a promissora atividade antiplasmodial da amida Piplartina.

**Palavras-chaves:** Piperaceae, *Piper hispidum*, óleo essencial, *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum*.

## ABSTRACT

MOREIRA, L. S. **Phytochemical Study of Volatiles and No Volatiles Compounds of the *Piper hispidum* sw. and Evaluation leishmanicidal and antiplasmodial activity *in vitro*.**

Dissertation submitted from medicinal department of the Federal University of the Rondônia

The present essay reports isolation, structural characterization, leishmanicidal activity evaluation and antiplasmodial of volatiles and no volatiles compounds from the *Piper hispidum* SW. A biographical study was done about secondary metabolites distribution on the essential oils from plants from the *Piper* gender researched in Brazil. Due to the absence of a standard in specialized literature, about the habitat and conditions in which the plants are exposed, it is impossible to establish a correlation between secondary metabolites with biotic variations and abiotics that exist in the composition of natural products. It were identified 82,12% of the essential oil composition extracted of the *P. hispidum* leaves, which relates to 28 substances, 9,16% of monoterpenes, 71,68% of sesquiterpenes and 1,28% of phenylpropanoids. From the essential oil extracted from stems 77,32% were identified on constitution, 37 substances, being 5,25% monoterpenes, 57,16% sesquiterpenes and 14,91% phenylpropanoids. An isolated phenylpropanoid of essential oils from the stem (dilapiol) was isolated, two substances of ethyl acetate extract, an amide type piperidine (Piplartine) and a carboxylic acid derived from cinnamic acid (3,4,5-trimethoxyphenylpropanoic). The leishmanicidal potential was evaluated *in vitro* with promastigotes of *Leishmania amazonensis*, from both essential oils and ethyl acetate extract from the stems of *P. hispidum*. Antiplasmodial potential was also investigated *in vitro* with *Plasmodium falciparum*, from both essential oils, from Piplartine amide, from cinnamic acid 3,4,5-trimethoxyphenylpropanoic and extracts of *P. hispidum*. The results presented a new and efficient leishmanicidal and antiplasmodial of essential oils from the leaves and stems of *P. hispidum*, and also relate for the first time a antiplasmodial activity of Piplartine amide.

**Word-keys:** Piperaceae, *Piper hispidum*, essential oil, *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum*



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD – Cromatografia em Camada Delgada (placa cromatográfica)

CG/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a um Espectrômetro De Massas.

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

IV – Espectroscopia no Infravermelho.

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana.

LVA - Leishmaniose Visceral Americana

OEPHF – Óleo essencial das folhas de *Piper hispidum*

OEPHT – Óleo essencial dos talos de *Piper hispidum*

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPS - Organización Panamericana de la Salud

PHTAC – *Piper hispidum*, extrato de acetato de etila dos talos

PBS – solução salina tamponada com fosfato 0,01 M e pH entre 7,4 e 7,6

RMN H<sup>1</sup> - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio.

RMN C<sup>13</sup> - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13.

SFB – Soro Fetal Bovino

UV – Ultra Violeta.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina.
01 Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações.....	24
02 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	24
03 Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i> em regiões tropicais e subtropicais do mundo.....	26
04 <i>Piper hispidum</i> Sw. no local das coletas.....	29
05 Ciclo de vida <i>Leishmania</i> spp.....	31
06 Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> .....	31
07 Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> .....	31
08 Fêmea de <i>Flebotóneo</i> .....	32
09 Mosquito Vetor de malária – <i>Anopheles</i> .....	35
10 Ciclo de vida <i>Plasmodium</i> spp.....	36
11 Morfologia dos Plasmódios dentro dos eritrócitos.....	39
12 Representação gráfica da distribuição das Publicações por Região no Brasil.....	61
13 Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero <i>Piper</i> na região norte.....	66
14 Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero <i>Piper</i> na região nordeste.....	68
15 Representação Gráfica da comparação da composição do óleo essencial de <i>P. marginatum</i> nas regiões norte e nordeste.....	68
16 Representação Gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero <i>Piper</i> na região sudeste.....	70

17	Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de <i>Piper hispidinervum</i> nas regiões norte e sudeste.....	70
18	Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero <i>Piper</i> na região centro-oeste.....	71
19	Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero <i>Piper</i> na região sul.....	73
20	Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de <i>Piper regnelli</i> nas regiões sul e sudeste.....	73
21	Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de <i>Piper cernuum</i> nas cidades de São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina.....	74
22	Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de plantas do gênero <i>Piper</i> nas cinco regiões do Brasil.....	75
23	Principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários em plantas.....	77
24	Cromatograma de OEPHF.....	80
25	Cromatograma de OEPHT.....	81
26	Distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das folhas e talos de <i>Piper hispidum</i> .....	83
27	Representação gráfica da comparação dos óleos essenciais de diferentes partes de <i>P. hispidum</i> .....	89
28	Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos nos óleos essenciais das folhas <i>P. hispidum</i> . das regiões norte, sudeste e centro-oeste.....	91
29	Espectro de massas do dilapiol [45] na literatura.....	92
30	Espectro de massas de PHTO-1.....	93
31	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) de PHTO-1.....	94
32	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de PHTO-1.....	95

33	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz) de PHTO-1.....	96
34	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> 500 MHz) de PHTAC-1.....	100
35	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> 50 MHz) de PHTAC-1.....	101
36	Espectro de Massas (CDCl <sub>3</sub> 50 MHz) de PHTAC-1.....	101
37	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl 500 MHz) do PHTAC-2.....	103
38	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> 126 MHz) do PHTAC-2, DEPT 135.....	104
39	Espectro de massas (I. E. 75 e V) do PHTAC-2.....	105
40	Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> na presença de etanol.....	107
41	Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> na presença de OEPHF.....	108
42	Regressão linear dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas <i>L. amazonensis</i> frente a OEPHF.....	109
43	Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> na presença de OEPHT.....	110
44	Regressão linear dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas <i>L. amazonensis</i> frente a OEPHT.....	110
45	Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> na presença de PHTAC.....	111
46	Regressão linear dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas <i>L. amazonensis</i> frente a PHTAC.....	112
47	Regressão linear redefinida dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas <i>L. amazonensis</i> frente a PHTAC.....	113
48	Ensaio com OEPHF e OEPHT - 100µg/mL frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> . Evolução após 48hs. (n=2).....	115
49	Ensaio de OEPHF (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> , evolução após 48hs.....	116
50	Ensaio de OEPHF (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> , evolução após 48hs, destacando trofozoítos e esquizontes.....	116
51	Ensaio de OEPHT (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> , evolução após 48hs.....	116
52	Ensaio de OEPHT (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> , evolução após 48hs. destacando diferenças morfológicas.....	117

53	Ensaio com extratos de <i>P. hispidum</i> - 100µg/mL frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> . Evolução após 48hs. (n=2).....	118
54	Ensaio de PHTAC-2 (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> , evolução após 48hs, destacando parasitas na forma de anéis.....	119
55	Ensaio de PHTAC-2 (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> , evolução após 48hs, destacando a forma de anel.....	119
56	Ensaio de PHTAC-2 100µg/mL frente a cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i> . Evolução após 48hs destacando as formas de trofozoítos e esquizontes.....	119
57	Ensaio de OEPHF frente a cepa W2 de <i>P. falciparum</i> . Evolução após 48hs.	120
58	Ensaio de OEPHT frente a cepa W2 de <i>P. falciparum</i> . Evolução após 48hs.	121
59	Ensaio de Piplartina frente a cepa W2 de <i>P. falciparum</i> . Evolução após 48hs.....	122
60	Ensaio do ácido 3,4,5-trimetoxi-propanóico frente a cepa W2 de <i>P. falciparum</i> . Evolução após 48hs.....	123

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
01 Avaliação semiquantitativa e quantitativa da densidade parasitária por plasmódio na gota espessa de sangue.....	38
02 Relação das espécies do gênero <i>Piper</i> .....	60
03 Distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides em óleos essenciais de espécies do gênero <i>Piper</i> analisadas no Brasil.....	62
04 Composição química (%) do óleo essencial das folhas e dos talos de <i>P. hispidum</i> ..	82
05 Estruturas químicas dos componentes presentes nos óleos essenciais e de substâncias deste gênero.....	84
06 Comparação da composição química (%) do óleo essencial das folhas <i>P. hispidum</i> com a composição de outros autores.....	89
07 Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de PHRO-1 e do Dilapiol.....	97
08 Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de PHTAC-1.....	99
09 Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de PHTAC-2.....	105

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE TERAPÊUTICO E BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DOS VEGETAIS.....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Metabólitos Secundários.....	21
1.2.2 Óleos Essenciais.....	25
1.2.3 O Gênero <i>Piper</i> .....	25
1.2.4 <i>Piper hispidum</i> Sw. Var. <i>obliquum</i> Tr. Yunker.....	29
<b>1.3. CONSIDERAÇÕES FARMACOLÓGICAS SOBRE LEISHMANIOSE E MALÁRIA.....</b>	<b>30</b>
1.3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	30
1.3.2 Tratamento de Leishmaniose.....	33
1.3.3 Relação Entre Leishmaniose E Plantas Medicinais.....	34
1.3.4 Malária.....	35
1.3.5 Aspectos Clínicos da Malária.....	37
1.3.6 Diagnóstico da Malária.....	38
1.3.7 Tratamento da Malária.....	40
1.3.8 Aspectos Epidemiológicos da Malária.....	43
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>

2.1 Objetivo Geral.....	46
2.2 Objetivos Específicos.....	46
<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS – <i>Piper hispidum</i>.....</b>	<b>47</b>
3.2.1 Material Botânico.....	47
3.2.2 Obtenção Do Óleo Essencial.....	48
3.2.3 Materiais e Métodos Cromatográficos.....	48
3.2.4 Materiais e Métodos Espectroscópicos.....	49
3.2.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - $^1\text{H}$ e de carbono – $^{13}\text{C}$ .....	49
3.2.6 Análise do Óleo Essencial via análise em CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa).....	49
3.2.7 Isolamento e Purificação dos Constituintes Majoritários do Óleo Essencial dos Talos de <i>P.hispidum</i> .....	51
3.2.8 Obtenção do extrato das folhas e talos de <i>P. hispidum</i> .....	51
3.2.9 Tratamento cromatográfico do Extrato Acetato de Etila dos Talos.....	51
<b>3.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS FRENTE A <i>L. amazonensis</i> in vitro.....</b>	<b>52</b>
3.3.1 Obtenção E Cultivo Dos Parasitas ( <i>Leishmania amazonensis</i> ).....	52
3.3.1.1 Parasitas.....	52
3.3.1.2 Criopreservação do Parasita.....	52
3.3.1.3 Meio de Cultura.....	53
3.3.1.4 Curva de Crescimento e ensaio da atividade leishmanicida.....	53
<b>3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM <i>P. falciparum</i> in vitro.....</b>	<b>54</b>
3.4.1 Ensaio qualitativo frente a cepa 3D7 (sensível a cloroquina) de <i>Plasmódium Falciparum</i> .....	54



3.4.1.1 Cultivo da <i>P. falciparum</i> cepa 3D7.....	54
3.4.1.2 Plasma.....	54
3.4.1.3 Preparação de eritrócitos.....	55
3.4.1.4 Evolução da atividade antiplasmodial .....	55
3.4.2 Ensaio Quantitativo frente a cepa W2 (resistente a cloroquina) de <i>Plasmódium falciparum</i> .....	55
3.4.2.1 Cultivo da <i>P. falciparum</i> cepa W2 e preparação dos eritrócitos.....	55
3.4.2.2 Evolução da atividade antiplasmodial frente a cepas W2 de <i>P. falciparum</i> .....	56
3.4.2.3 Ensaios de Captação Radioativa .....	57
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>59</b>
4.1.1 Revisão Bibliográfica Sobre Espécies Do Gênero <i>Piper</i> Produtoras De Óleo Essencial no Brasil.....	59
4.1.2 Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários .....	77
<b>4.2 ANALISE ESPECTROSCÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....</b>	<b>80</b>
4.2.1 Identificação dos compostos químicos presentes no óleo essencial de <i>P. hispidum</i> .....	80
4.2.2 Estudo Fitoquímico de OPHT– Determinação Estrutural de PHTO-1 (dilapiol).	92
<b>4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA DOS TALOS DE <i>P. hispidum</i>.....</b>	<b>98</b>
4.3.1 Determinação Estrutural de PHTAC-1 (Piplartina).....	98
4.3.2 Determinação Estrutural de PHTAC-2 (ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico)....	102
<b>4.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....</b>	<b>107</b>
4.4.1 Avaliação da Atividade leishmanicida de <i>P. hispidum</i> .....	107
4.4.1.1 Atividade inibitória do crescimento celular <i>in vitro</i> das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> frente aos óleos essenciais OEPHF e OEPHT.....	107

4.4.1.2 Avaliação do extrato dos talos de <i>P. hispidum</i> frente a <i>L. amazonensis</i> .....	111
4.4.2 Avaliação da atividade Antiplasmodial de <i>P. hispidum</i> .....	114
4.4.2.1 Ensaios Preliminares de Avaliação da Atividade Antiplasmodial dos Óleos Essenciais dos Talos e Folhas de <i>P. hispidum</i> Frente a <i>P. falciparum</i> cepas 3D7.....	114
4.4.2.2 Ensaios Preliminares de Avaliação da Atividade Antiplasmodial do Extrato de Acetato de Etila dos Talos e isolados Frente a <i>P. falciparum</i> cepa 3D7.....	117
4.4.2.3 Ensaios de Avaliação da Atividade Antiplasmodial dos Óleos Essenciais dos Talos e Folhas de <i>P. hispidum</i> e seus isolados PHTAC-1 e PHTAC-2 Frente a <i>P. falciparum</i> cepas W2 utilizando hipoxantina tritiada como marcador de crescimento.	120
<b>CONCLUSÃO</b> .....	125
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	127

## INTRODUÇÃO

### 1.1 PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE TERAPÊUTICO E BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA.

A utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica descende de tempos remotos, enquanto buscavam alimentação para sua sobrevivência, a humanidade foi descobrindo as propriedades curativas ou tóxicas das plantas (ALVES, 2001). Atualmente na região amazônica, a medicina tradicional a base de plantas medicinais, representa um importante ponto de encontro entre permanências e rupturas culturais estabelecidas desde os primeiros contatos entre tribos e outras etnias, que se consolida no encruzamento das principais matrizes presentes no processo de formação da cultura do povo brasileiro (SANTOS, 2000).

As plantas medicinais podem ser definidas, segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS, como sendo vegetais que possuem em um ou mais de seus órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Os vegetais são fontes importantes de moléculas biologicamente ativas, geralmente com grande potencial sinérgico a varias doenças que assolam a humanidade. A diversidade em termos de estruturas e propriedades químicas, na qual essas substâncias ocorrem na natureza podem servir, para o desenvolvimento de um grande número de fitofármacos (ALVES, 2001).

Historicamente os primeiros esforços relevantes na busca de novos fármacos naturais, se dão por volta do fim do século XIX inicio do século XX principalmente por fatores como o desenvolvimento da indústria química e inicio da expansão da síntese orgânica,

porém estava relegado ao segundo plano o uso de produtos vegetais na forma de fitoterápicos (CALIXTO, 2000; CALIXTO *et al*, 2003).

Mais recentemente por volta dos anos 80, os fitoterápicos ganharam mais destaque, o desenvolvimento da pesquisa científica e os avanços tecnológicos resultaram na identificação de 121 compostos de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas medicinais. Grande parte deles estão atualmente incluídos na terapêutica dos países ocidentais. No período 1983-1994, 6% dos medicamentos aprovados foram extraídos diretamente de espécies vegetais; outros 24% foram de produtos derivados e 9% foram desenvolvidos através de modelagem molecular, onde as estruturas moleculares dos compostos serviram como precursores nos processos de sínteses. Atualmente, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem sua origem em metabólitos secundários de origem vegetal. É importante salientar que atualmente a maior parte dos fármacos presentes no mercado, oriunda de derivados sintéticos de produtos naturais (CALIXTO, 2000; CALIXTO *et al*, 2003; ALVES, 2001; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

A utilização de produtos naturais ocorre em mais de 2/3 da população de países subdesenvolvidos, No Brasil para uma considerável parcela da população, este é o principal recurso terapêutico por ser mais acessível do ponto de vista econômico e cultural. Em todo o mundo este mercado vem atraindo a cada ano mais adeptos principalmente nos países desenvolvidos (PINTO *et al.*, 2002)

O conhecimento adquirido pelas populações tradicionais que fazem o uso de produtos vegetais é de um valor inestimável para o desenvolvimento científico dos fitoterápicos. Esse conhecimento etnofarmacológico construído ao longo de nossa evolução atingiu um alto grau de relevância com o desenvolvimento de fármacos de grande importância na terapêutica atual (ALVES, 2001). A grande quantidade de informações sobre o uso de centenas de plantas como “remédio” em todo o mundo leva à necessidade de se avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. Contudo, a perda da biodiversidade principalmente por interferências antrópicas e o acelerado processo de mudança cultural, acrescentam um censo de urgência em garantir o registro dessas informações, inclusive para uso científico (SIMÕES *et al.*, 2004).

O Brasil, conta com uma grande quantidade e diversidade de espécies vegetais que são empregadas pela população no tratamento dos mais diversos males. A Amazônia ganha

destaque neste cenário de riquezas naturais por possuir o maior ecossistema de florestas tropicais do mundo, e pelo potencial ainda pouco conhecido e explorado da sua biodiversidade. Diante da enorme abundância de espécies vegetais com poder terapêutico, a Amazônia é considerada a maior reserva de plantas medicinais do mundo. O número de estudos está cada vez mais intenso, porém o número de espécies que foram estudadas e comprovadas como fitoterápicos eficientes ainda é muito pequeno. (DI STASI, 1996). Milhares de plantas medicinais utilizadas no mundo todo, pela medicina tradicional, ainda não foram estudadas cientificamente, do ponto de vista farmacológico, biológico ou clínico.

A fitoquímica é a principal ferramenta de pesquisa destas plantas, associada a várias técnicas de extração e purificação de substâncias como, por exemplo, maceração e cromatografia em coluna de sílica respectivamente. A fitoquímica também está associada a eficientes técnicas de identificação estrutural como exemplo cromatografia em fase gasosa associada a espectrômetro de massas (CG/MS), espectroscopia no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) de  $H^1$  e  $C^{13}$ .

A fitoquímica também possibilita a realização da correlação entre estrutura química e atividade biológica através de modificações estruturais. As modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem atingir várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como: hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural e propriedades farmacocinéticas, entre outros, cuja análise poderá orientar as sínteses a serem seguidas (YUNES & CALIXTO, 2001; SIMÕES *et al.*, 2004).

O estudo fitoquímico de plantas medicinais constitui numa estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos, tanto o levantamento bibliográfico como o conhecimento popular serve de base para a identificação da atividade farmacológica de princípios ativos de plantas medicinais (PINTO *et al.*, 2002).

## 1.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DOS VEGETAIS

Tem como principal objetivo isolar e identificar os constituintes químicos de espécies biologicamente ativas. Geralmente os compostos responsáveis pela ação biológica destes vegetais fazem parte do metabolismo secundário destas plantas. Estas substâncias

são chamadas de “princípio ativo” e constituem nos alvos principais do estudo fitoquímico de espécies vegetais (SIMÕES *et al*, 2004).

Dentre os métodos de separação empregados no estudo fitoquímico para se isolar uma substância do metabolismo secundário, os métodos cromatográficos são os mais amplamente utilizados atualmente. A cromatografia acontece pela passagem de uma mistura de substâncias (amostra) através de duas fases, uma estacionária chamada de (fase fixa) e outra móvel (solvente). A grande variabilidade de combinações entre as fases fixa e móvel, faz com que a cromatografia apresente uma série de técnicas diferenciadas. A cromatografia não se limita apenas a separação de misturas mas também atua na identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas, neste caso chama-se cromatografia analítica, enquanto a cromatografia que visa o isolamento de compostos é dita cromatografia preparativa (DEGANI *et al.*, 1998)

A determinação estrutural é realizada através do cruzamento de informações obtidas de varias técnicas espectroscópicas como espectroscopia de massas, que provê informações a respeito do tamanho e da formula molecular. Espectroscopia na região do infravermelho que disponibiliza informações a respeito dos grupos funcionais da molécula. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), considerada a mais importante técnica espectroscópica, fornece um “mapa” do esqueleto de carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. Apesar de ser considerada a mais importante, a espectroscopia de RMN não substitui nenhuma das outras técnicas, em vez disso, ela as complementa e juntas a RMN, o IV, e a espectroscopia de massas possibilitam a determinação estrutural das estruturas de moléculas complexas (MCMURRY, 2005)

### 1.2.1 Metabólitos Secundários

A atividade metabólica é uma característica intrínseca dos seres vivos. O metabolismo nada mais é do que o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células, no caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário e secundário (SIMÕES *et al*, 2004).

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o

transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Esse é o caso dos aminoácidos, dos nucleotídeos, dos lipídios, carboidratos e da clorofila (SIMÕES *et al*, 2004).

Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas. Como consequência prática, esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos na elucidação da quimiosistemática de plantas medicinais e no desenvolvimeto de novos agentes terapêuticos no combate a patógenos e com efeitos curativos como cicatrizantes, anestésicos e outros (POST-BEITTENMILLER, 1996, YUNES & CALIXTO, 2001).

Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por compostos do metabolismo secundário são os fatores bióticos (BIESKI *et al*, 2004). Desse modo, produtos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiotes (SIMÕES *et al*, 2004).

Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais (BIESKI *et al*, 2004; GOBBO-NETO *et al*, 2007 ).

Ainda não se conhece com exatidão, como esses produtos são formados pelas células vegetais, e uma das questões que se busca responder é “como que as plantas regulam a produção destas substâncias”, e o resultado deste questionamento resultou na elucidação das três principais vias metabólicas conhecidas, representadas na Figura 01 (pag 23), a via do piruvato com acido fosfoglicérico (3-PGA), a via do Mevalonato e a via do ácido chiquimico. Atualmente estima-se que existam cerca de 10.000 metabólitos secundários conhecidos e supõe-se que este número ultrapasse 100.000 na natureza, em geral oriundos destas três vias metabólicas, o que evidencia o quão perfeita é a sua natureza (CARVALHO, 2004; SIMÕES *et al*., 2004; YUNES & CALIXTO, 2001).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides conforme exemplifica a Figura 01.

Os terpenos formam o maior grupo de metabólitos secundários, com cerca de 29.000 compostos conhecidos, incluindo os esteróides (POST-BEITTENMILLER, 1996). São estruturas que contêm esqueleto carbônico derivados da condensação de unidades de isoprenos, e que apresentam uma classificação de acordo com a quantidade de átomos na cadeia carbônica, monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ) (BIESKI *et al*, 2004).

Os fenóis são substâncias que tem pelo menos um grupo hidroxila ou derivado funcional ligado a um sistema aromático. O número e variedades dos fenóis fazem deles um importante grupo de substâncias das plantas, como por exemplo as cumarinas, ligninas, flavononas, flavonas, antocianidinas entre outras. As lignanas são dímeros encontradas na natureza, obtidas a partir do acoplamento fenólico oxidativo de monômeros derivados do ácido chiquímico que é o precursor de muitos metabolitos com unidades básica  $C_6-C_3$  (SIMÕES *et al*, 2004).

Os alcalóides são compostos azotados complexos, de natureza básica, capazes de produzir geralmente poderosos efeitos fisiológicos. São, na maior parte dos casos, venenos vegetais muito ativos, dotados de uma ação específica. A medicina emprega-os normalmente em estado puro e o seu verdadeiro valor apenas se releva quando usados adequadamente pelo médico. Segundo a sua composição química e, sobretudo, a sua estrutura molecular (POST-BEITTENMILLER, 1996; CARVALHO, 2004). Um exemplo de alcalóide utilizado na medicina é a efedrina, que age na prevenção dos efeitos hipotensores arteriais induzidos pela associação do propofol e do remifentanil em procedimentos de indução de anestesia em cirurgias (MORO *et al.*, 2007).



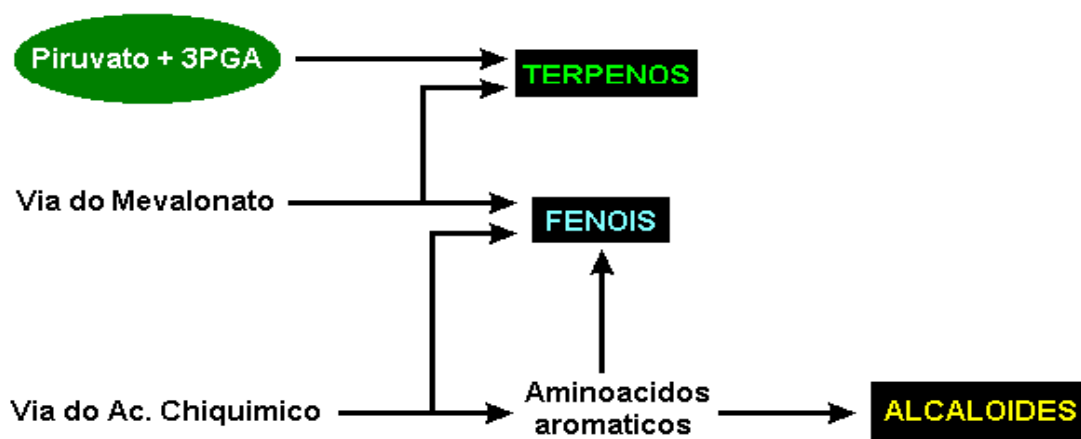
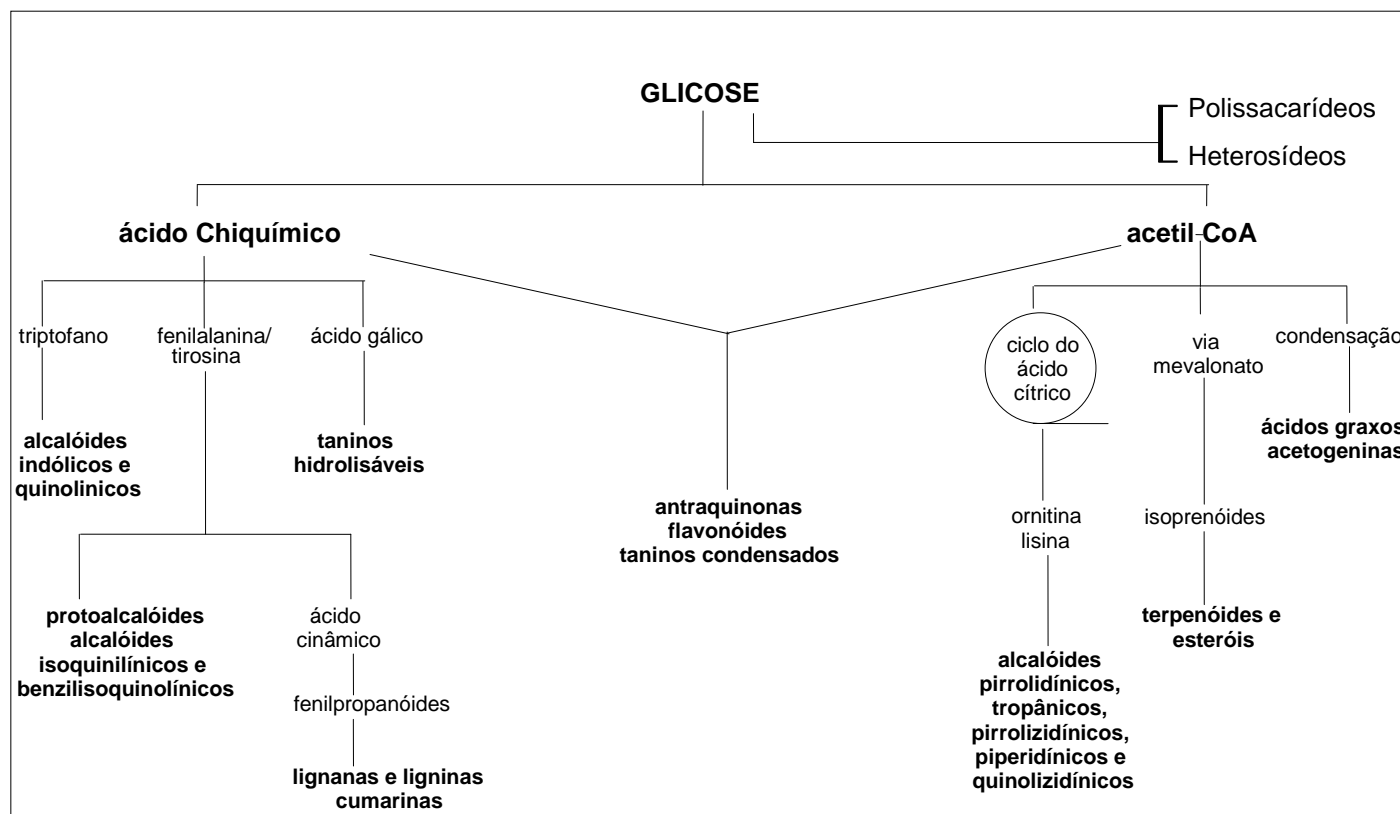


Figura 01 : Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações. Adaptado de Bieski *et al*, (2004).

A barreira que divide o metabolismo primário do secundário, ainda não é tão nítida. O metabolismo primário em sua essência é geral a todos os vegetais, contudo o metabolismo secundário apresenta rotas não tão gerais conforme esquema ilustrado na Figura 02. Também é possível que só sejam ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento, ou em períodos de estresse causados por fatores bióticos ou abióticos (SIMÕES *et al*, 2004; CARVALHO, 2004).



Fonte: (SIMÕES *et al*, 2004; p.411)

Figura 02: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

### 1.2.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem ser encontrados em várias partes das plantas (galhos, madeira, folhas, frutos, flores, raiz). Óleos essenciais podem ser conceituados como uma mistura de substâncias voláteis, lipofílica, geralmente odorífera, líquida com viscosidade oleosa e são extraídos das plantas, principalmente através de destilação por arraste com vapor d'água. Em água os óleos essenciais têm solubilidade limitada o suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são chamados hidrolatos.

Seus principais constituintes são os monoterpenos seguidos pelos sesquiterpenos além de compostos aromáticos de baixo peso molecular. Sua real finalidade, ainda é desconhecida, porém acredita-se que durante o seu desenvolvimento, as plantas superiores sintetizam terpenóides essenciais para o crescimento e desenvolvimento, como, por exemplo, reguladores de crescimento (giberelinas), pigmentos e esteroides. Contudo, a presença de outras classes de terpenos pode estar relacionada a funções ecológicas, tais como atração a polinizadores (LANGENHEIM, 1994).

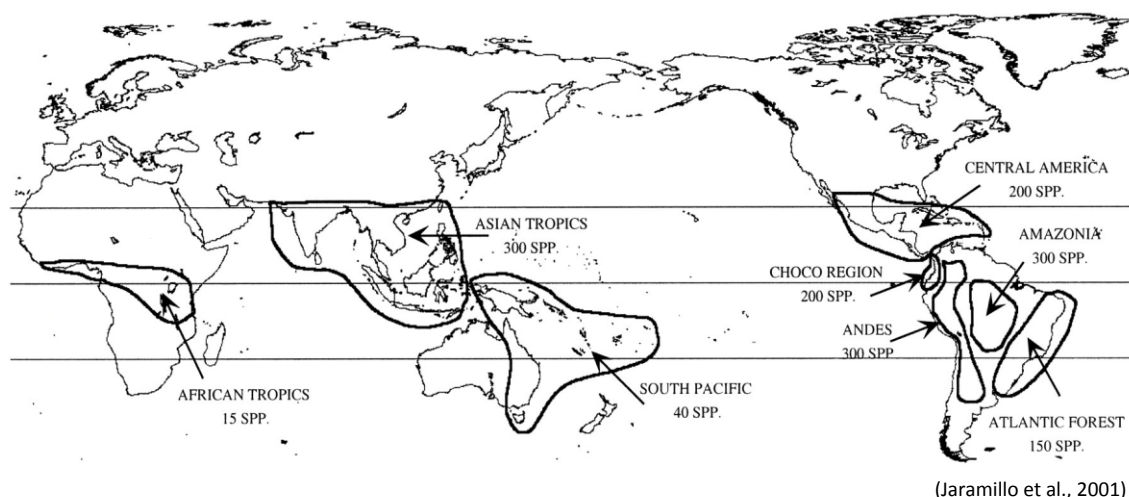
Normalmente, o óleo essencial das folhas e as resinas apresentam alguns constituintes em maior concentração e cerca de 30 a 40 compostos minoritários, em concentração inferior a 1% (TAKABAYASHI *et al*, 1994). Alterações nessa complexa mistura podem dificultar a capacidade de adaptação de herbívoros frente a problemas de intoxicação (JONES *et al*, 1991), ou ainda, podem estimular a presença de polinizadores (BERGESTRÖM, 1991). Outras atividades ecológicas, como proteção ao ataque de fungos (BERENBAUM & ZANGERL, 1992) e atividade bactericida, estão relacionadas com a presença dessas substâncias (LERDAU & PENUELAS, 1984).

### 1.2.3 O gênero Piper

A família Piperaceae compreende 14 gêneros e cerca de 1950 espécies (MABBELEY, 1997). São ervas, arbustos ou pequenas árvores, frequentemente epífitas ou lianas; folhas alternas, menos frequentemente opostas ou verticiladas, simples, com ou sem estípulas. Inflorescência geralmente do tipo espiga, raramente recemo (*Ottonia*), terminal, axilar ou oposta à folha (*Piper*); flores não vistosas, bissexuadas ou unissexuadas (plantas monóicas ou dióicas), aclamídeas, dispostas na axila brácteas geralmente peltadas; anteras rimosas;

ovário súpero, uni (*Peperomia*) a tetracarpelar, unilocular, placentação ereta, univulado, estigma geralmente séssil. Fruto: Braga ou durpa (SOUZA & LORENZI, 2005).

O gênero *Piper* possui cerca de 700 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo como ilustra a Figura 03. Podem apresentar hábitos arbustivos, arbóreos, escandentes ou herbáceos, crescendo geralmente no interior ou na margem de formações florestais. As folhas são sempre simples, com formas variadas e venação pinada ou palmada. As flores (brácteas) são pequenas, aperiartadas, reunidas em racemos ou mais comumente em espigas, solitárias ou fasciculadas. Os frutos são pequenas drupas dispersadas por pássaros e morcegos, mas principalmente pelo vento (PARMAR *et al.*, 1997; BARROSO *et al.*, 1986).



**Figura 03:** Distribuição geográfica do gênero *Piper* em regiões tropicais e subtropicais do mundo.

O gênero *Piper* tem demonstrado uma grande diversidade de metabólicos com várias atividades biológicas. Dentre estes, podem ser citados lignanas, neolignanas, terpenos, propenilfenóis, chalconas, flavonas, benzenopiranos e principalmente amidas (PARMAR *et al.*, 1997). Essas últimas constituem metabólicos característicos de Piperaceae e podem ser classificadas em isobutílica, pirrolidínicas, piridônicas e piperidínicas (SENGUPTA & RAY, 1987 *apud* NAVICKIENE *et al.*, 2000).

O uso de espécies do Gênero *Piper* para fins curativos é pratica comum em diversas culturas. O histórico do gênero *Piper* descrito por Parmar, V. S *et al.*,(1997), relata o uso de espécies para o tratamento de algumas enfermidades em diferentes povos. Na China, algumas

prescrições recomendam o uso de *P. futokasura* no tratamento de arritmias cardíacas e da asma. Na Jamaica dores estomacais são tratadas com uma infusão de *P. aduncum* e *P. hispidum*. No México e Brasil usa-se *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a diversas infecções.

No gênero *Piper*, os constituintes químicos mais comuns são as amidas, destacando-se as isobutilamidas, piperidina [53] e pirrolidina [54] (PARMAR *et al.*, 1997). Outro grupo de compostos potencialmente ativos e não menos importantes, que estão presentes em proporções consideráveis, são os fenilpropanóides, incluindo-se entre eles: monolignólides como o apiol, miristicina, eugenol, safrol, dímeros de fenilpropanóides e dilapiol (BERNARD *et al.* 1995). Bernard *et al.* (1995) compararam o extrato alcóolico de folhas de dezesseis espécies de *Piper* apontando *P. aduncum* como a de maior atividade inseticida, com 92% de eficiência no controle de larvas de segundo ínstar de *Aedes atropalpus* L., à concentração de 1 ppm. O dilapiol aparece como constituinte principal no óleo essencial de *P. aduncum* variando de 58% a 88,4% (GOTTLIEB *et al.* 1981).

No estudo comparativo realizado por Kiuchi *et al.* (1988) sobre a atividade larvicida de amidas isoladas dos frutos secos de *P. nigrum* foi evidenciada suas ações contra *Toxocara* sp, que habita o intestino delgado de cães e canídeos selvagens e é o agente etiológico da toxocaríase ou (*Larva migrans visceral humana*). Dentre as moléculas isoladas e testadas, duas piperamidas, pipericida [53] e pirronidina [54], revelaram acentuadas atividades, apresentando concentrações letais de 50 e 150 µg/ml após 24 horas de tratamento, respectivamente.

Dévéhat *et al.*, (2002), determinaram a atividade antiviral de algumas plantas medicinais utilizadas na medicina popular da Indonésia contra o poliovírus, agente etiológico da poliomielite, sendo observado que o extrato metanólico de *P. aduncum* foi o mais ativo, apresentando IC<sub>50</sub> de 22µg/ml.

A atividade antiinflamatória *in vivo* de *P. lenticelloseum* foi evidenciada em camundongos suíços que desenvolveram edema no coxim posterior após a injeção subcutânea de carregenina. Os animais foram tratados via oral 1 hora após a injeção com 1.25 g/Kg do extrato etanólico de *P. lenticelloseum* e o percentual de inibição do edema foi avaliado em relação ao controle. Os resultados obtidos revelaram que o extrato etanólico de *P.*

*lenticellosum* apresentou uma proeminente inibição de 43% do edema após três horas e de 54% após cinco horas de tratamento (HOLTEZ *et al*, 2002).

O efeito tóxico do extrato hidroalcoólico de 13 plantas usadas na medicina popular brasileira foi testado sobre bactérias de grande acuidade na área da saúde pública. *P. regnellii*, que é comumente utilizada na medicina popular brasileira na forma de extrato bruto para o tratamento de doenças infecciosas, apresentou uma estimável atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, apresentando uma concentração inibitória mínima de 7.8 para *S. aureus* e 15.6 µg/ml para *B. subtilis* (HOLTEZ *et al*, 2002).

A atividade antiplasmoidal do extrato lipofílico das folhas de *P. hispidum* e de três substâncias isoladas deste extrato caracterizadas como: dilapiol [45], asebogenina [51], e uma 2', 4', 6' trihidroxidihidrochalcona [52], foi corroborada sobre duas amostras de *Plasmodium falciparum*, uma resistente (Dd2) e outra sensível (poW) ao tratamento com Cloroquina, droga padrão utilizada no combate a malária. O extrato lipofílico apresentou um IC<sub>50</sub> de 7.6 e 13 µg/ml sobre as amostras poW e Dd2, respectivamente. Dentre as três moléculas isoladas e caracterizadas no extrato, asebogenina, foi a mais ativa, no entanto, o IC<sub>50</sub> apresentado por esta substância foi maior do que a do extrato, sugerindo que a atividade antiplasmoidal de *P. hispidum* não é exercida somente pela asebogenina, mas sim por um efeito sinérgico entre as três substâncias majoritárias (SIEMS *et al*, 1999).

O efeito reversível da infertilidade de camundongos tratados com o extrato alcoólico de *P. betle* foi demonstrado por Sarkar *et al*, (2000). Durante o tratamento, os animais apresentaram alterações morfológicas e estruturais de órgãos reprodutivos e uma redução em 78 e 100% na mobilidade de espermatozóides e da fertilidade, respectivamente. No entanto, após cessar a administração da droga os parâmetros alterados restituíram-se, sugerindo que o efeito contraceptivo de *P. betle* está envolvido com a maturação dos espermatozóides no epidídimo, não comprometendo o efeito androgênico, uma vez que o nível de testosterona no soro não foi alterado durante o tratamento (SARKAR *et al*, 2000).

Na Índia, uma mistura de *P. nigrum*, *P. longun* e *Zengiber officinalis* (gengibre), constitui o chamado "trikatu", uma formulação usada pelos povos indianos para o tratamento de várias doenças (JOHRI & ZUTSHI, 1992).

#### 1.2.4 *Piper hispidum* Sw. Var. *obliquum* Tr. Yunker

Esta espécie é conhecida como matico, apertajoão, matico-falso. As folhas, as raízes e os frutos são adstringentes, diuréticos e estimulantes, empregados como desobstruentes do fígado. Em Cuba é conhecida como “platanillo-de-cuba”, utilizada para deter hemorragias traumáticas (ROÍG & MESA, 1945). Peckolt & Peckolt (1888), informam que as folhas são utilizadas sob a forma de banhos contra as hemorróidas, reumatismos e disenterias; quando frescas são usadas como emplastos em hérnia de umbigo de crianças, tendo o mesmo uso no estado seco e reduzido a pó, sendo ainda consideradas hemostáticas.

É uma espécie arbustiva, facilmente confundida com *P. aduncum*, diferindo desta, porém pela consistência membranácea e pelo hábito arbustivo escandente, encontrada em regiões neotropicais (RIBEIRO, *et al* 1999).

*Piper hispidum* Sw. Figura 04 é um arbusto com 2-4 m de altura, com tricomas escabrosos nos ramos. Folhas com pecíolo de 0,5-1cm compr., hispido, bainha basal; lâmina elíptica ou ovado-elíptica, 10-16 x 5-8 cm, base assimétrica, um dos lados arredondados e diferindo do outro em 3-5 cm comprimento, quando simétrica aguda, ápice acuminado, cartáceas, escabrosas ou híspidas na face adaxial e hirsutas na



Foto: Aline R. Polli

**Figura 04.** *Piper hispidum* Sw. no local das coletas, (Campus da Universidade Federal de Rondônia).

abaxial, profundamente glandulosas; nervuras secundárias 4-5, ascendentes, dispostas abaixo ou pouco acima da porção mediana da lâmina. Espigas eretas, 8-14 cm comprimento, pedúnculo até 1 cm comprimento, hirtelo; bractéolas triangularpeltadas e franjadas na margem. Estames 4. Drupas oblongas ou lateralmente comprimidas, papiloso-puberulentas no ápice, com 3 estigmas persistentes sésseis (PECKOLT & PECKOLT, 1888).

### 1.3 PATOLOGIAS DE LEISHMANIOSE E MALÁRIA

#### 1.3.1 Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença infecciosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosa. É primariamente uma infecção zoonótica, ou seja, afeta outros animais e secundariamente o homem (BRASIL<sup>1</sup>, 2007).

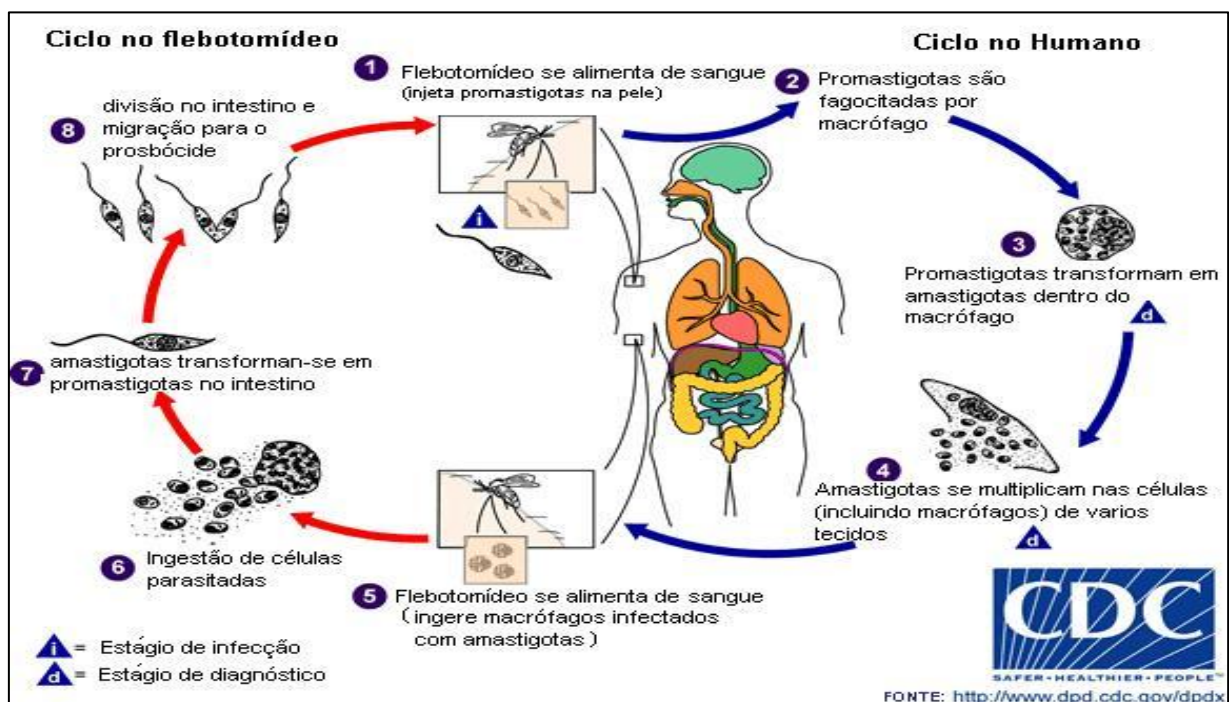
Existem duas categorias amplas de Leishmaniose; A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que inclui a Leishmaniose cutânea e a Leishmaniose mucocutânea; e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA), também conhecida como Calazar. A LTA é causada pelas espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. A LVA é causada por *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* (BRASIL<sup>1</sup>, 2007 apud MARZOCHI, 1989).

A LTA (leishmaniose tegumentar americana), também é conhecida como Leishmaniose mucocutânea, Úlcera de Bauru, ferida brava e etc., distribui-se amplamente, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, no Brasil, tem sido assinalados em praticamente todos os Estados com grande incidência principalmente na região norte e nordeste (LEMOS *et al.*, 2001; BRASIL<sup>1</sup>, 2007).

A LTA está entre uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido sua ampla distribuição pelo território nacional, a ocorrência de formas clínicas graves e pelas dificuldades referentes tanto ao diagnóstico como ao tratamento com drogas fortes e de uso prolongado sob supervisão integral (DORVAL *et al.*, 2006).

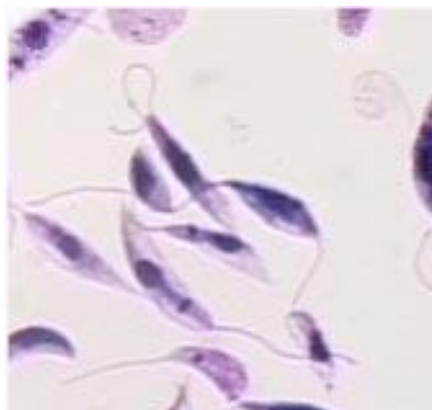
A manifestação cutânea da Leishmaniose caracteriza-se por lesões isoladas ou aglomeradas (forma única ou múltipla), a forma disseminada caracteriza-se por lesões numerosas em varias áreas do corpo e na forma difusa a principal característica é o grave comprometimento dérmico, de natureza crônica. A Leishmaniose mucosa é na maioria das vezes secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões de pele. As áreas de mucosa mais frequentemente acometidas são as cavidades nasais seguidas da faringe, laringe e cavidade oral (BRASIL<sup>1</sup>, 2007). A Leishmaniose visceral é caracterizada por lesões internas, principalmente nos órgãos (BRASIL<sup>1</sup>, 2007).

A *Leishmania* é um protozoário pertencente a família Trypanosomatidae, com duas formas principais, uma flagelada chamada de promastigota, apresentado na Figura 06, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, sempre fora da célula, e outra sem flagelo de forma arredondada, chamada de amastigota, apresentada na Figura 07, observada nas células dos hospedeiros vertebrados (macrófagos), a Figura 05 que representa o ciclo de vida do parasita se diferenciando entre as duas formas (BRASIL<sup>1</sup>, 2007).



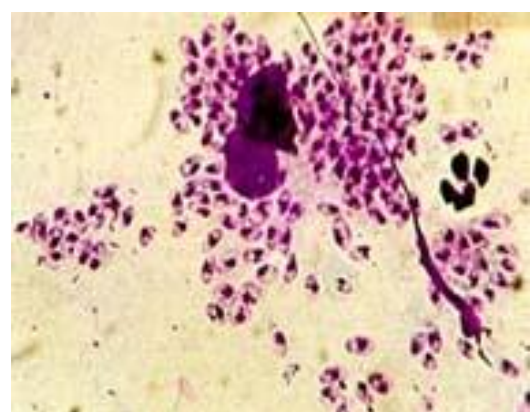
Fonte: Center of Diseases Control and Prevention (modificada) ( CDC<sup>1</sup>, 2009)

Figura 05 : Cilco de vida *Leishmania* ssp.



Fonte: <http://www.saudeemmovimento.com.br>

Figura 06 : Formas promastigotas de *Leishmania*



Fonte: <http://www.parasitologia.com/protozooses.htm>

Figura 07 : Formas amastigotas de *Leishmania*



Os principais vetores das Leishmanioses são flebótomos (mosquitos) pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* conforme Figura 08. São facilmente reconhecíveis pela posição em que se encontram quando estão em repouso, com as asas entreabertas e ligeiramente levantadas, em vez de se cruzarem sobre o dorso, por este motivo este mosquito também é conhecido como cangalha, cangalhinha, asa dura, orelha-de-veado, palha, birigüi, tatuíra, bererê, tatuquira, murutinga, escangalho e asa branca (LEMOS *et al.*,2001; BRASIL<sup>1</sup>, 2007).



fonte: BRASIL<sup>1</sup>, 2007

**Figura 08** : Fêmea de *Flebotoíneo*

Atualmente pode-se dizer que no Brasil, a doença apresenta três padrões epidemiológicos característicos segundo Ministério da Saúde (BRASIL<sup>1</sup>, 2007).

- **Silvestre** - Surtos epidêmicos associados à derrubada das florestas, perturbando o ecossistema local e favorecendo o descontrole dos principais vetores em áreas nativas. Neste caso a Leishmaniose Tegumentar é fundamentalmente, uma zoonose de animais silvestres, que pode atingir o homem quando entrar em contato direto com os focos zoonóticos; como por exemplo o Rato do Mato (*proechymis*) um dos principais reservatórios da *Leishmania amazonensis* no Brasil, outro exemplo é o Gambá (*didelphis*).
- **Ocupacional e Lazer** – Este padrão de Transmissão está associado a exploração desordenada de florestas, ao desmatamento para construção de estradas e usinas hidrelétricas, desenvolvimento de atividades agropecuária e ecoturismo.
- **Rural e Periurbano** - Leishmaniose em regiões de colonização antiga, relacionada ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados semi-urbanizados na periferia de centros urbanos. Neste novo cenário os principais vetores são cães, eqüinos e roedores que atuam como reservatórios do parasita.

Uma análise da evolução da LTA no Brasil, realizada pela Secretaria de vigilância em Saúde (BRASIL<sup>1</sup>, 2007), revelou uma expansão geográfica crescente, sendo que em 1994 foram registrados casos em 1861 municípios, representando 36,9% do total de municípios do país; e em 1998 houve uma expansão da doença para 2.055 municípios, cerca de quase 200 municípios infectados em apenas 4 anos. Em 2008 foram registrados pelo Ministério da Saúde através do **SINAN** (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), 20.522 casos de LTA em todo território nacional. Rondônia está em 8º lugar no número de casos com 976 registros, os 03 estados mais endêmicos são Pará (3.643 registros), Bahia (3.063 registros) e Mato Grosso (2.525 registros) (BRASIL<sup>2</sup>, 2009).

### 1.3.2 Tratamento de Leishmaniose.

O tratamento de Leishmaniose é relativamente demorado e as drogas utilizadas são relativamente fortes e com efeitos colaterais consideráveis. As drogas mais indicadas são os Antimoniais Pentavalentes, há dois tipos de Antimoniais Pentavalentes que podem ser utilizados, o Antimoniato N-metil glucamina (Glucantime®) e o Stibogluconato de Sódio, porém, este último não é comercializado no Brasil. Não havendo uma resposta satisfatória com o tratamento pelo Antimonial Pentavalente, as drogas de segunda escolha são a Anfotericina B e o Isotionato de Pentamidina (BRASIL<sup>1</sup>, 2007).

O Antimoniato N-metil glucamina tem ação descrita contra o parasita *Leishmania* na forma amastigota, que se encontra dentro do macrófago, não sendo eficiente contra a forma promastigota, a Pentamidina, que é uma droga de segunda escolha, se torna mais eficaz no tratamento por apresentar atividade contra as duas formas, porém, com efeitos colaterais mais fortes por se tratar de uma droga mais potente (CROFT & COOMBS, 2003).

Poucos estudos foram realizados quanto a utilização da Pentamidina no tratamento da Leishmaniose. A Pentamidina é acumulada pelo parasita, se liga ao ácido desoxirribonucléico - DNA do mesmo e inibe a replicação dos microorganismos. Ela não é bem absorvida oralmente e por isso é administrada intravenosa ou intramuscularmente. Classicamente a dose recomendada é de 4mg/kg/dia, por via intramuscular profunda, de 2 em 2 dias, recomendando-se não ultrapassar a dose total de 2g. Esta estimativa foi observada devido a alguns casos de sucesso no uso de Pentamidina no tratamento de leishmaniose cutânea com excelentes níveis de cura, na região Amazônica e em países da

América do Sul. Os efeitos colaterais ou reações adversas mais freqüentes são dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação além de náuseas, vômitos, tontura, adinamia, miaglias, cefaléias, hipotensão, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. O diabetes mellitus pode se manifestar a partir da administração da dose de 1g. O efeito diabetogênico pode ser cumulativo e dose dependente (BRASIL<sup>1</sup>, 2007; HANDMAN, 2000; HERWALDT, 1999).

### 1.3.3 Relação Entre Leishmaniose E Plantas Medicinais.

O uso empírico de plantas medicinais pela população tem revelado que desde a raiz até o caule, folhas, frutos, sementes e flores de plantas medicinais têm eficiência na cura de diversos males, suscitando assim grande interesse no estudo científico destas plantas, contudo, compostos presentes nestas plantas que estimulam o sistema imune são úteis quando usados como adjuvantes no tratamento de certas doenças causadas por fungos, bactérias e protozoários, como no exemplo da Leishmaniose (BERGMANN *et al.*, 1997)

Estudos químicos e imunofarmacológicos, da Leishmaniose, têm sido realizados com o intuito de encontrar novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis de efeito específico e que reverta a resistência do parasita às drogas utilizadas no tratamento (BERGMANN *et al.*, 1997). Existem várias plantas que apresentam potencial na modulação da resposta imune na leishmaniose, uma delas é a *Kalanchoe pinata*, que demonstra efeito sobre a redução das lesões em camundongos, pelo aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (BERGMANN *et al.*, 1997). Outra espécie apresentou a mesma atividade, a *Solanum lyratum* Thunb (SOLANACEAE), muito utilizada na medicina Coreana segundo (KIM, *et al.*, 1999).

A avaliação da atividade leishmanicida de compostos isolados de espécies vegetais, *in vitro* são realizadas com as duas formas do parasita a promastigota e a amastigota, dentre os vários compostos que apresentam atividade estão triterpenóides de *Artemisia annua* (YANG *et al.*, 1992), de *Peperomia galioides* (MAHAIO *et al.*, 1995), e de *Guarea rhopalocarpa* (CAMACHO *et al.*, 2000). Além dos terpenóides, tem os aminoglicosteróides e aminosteróides de *Holarrhena curtisii* (KAM *et al.*, 1997), naftoquinonas de *Pêra benensis* (FOURNET *et al.*, 1992.; KAYSER *et al.*, 2000), flavonóides de *Centrolobium sclerophyllum* (ARAÚJO *et al.*, 1998), neolignanais de *Virola surinamensis* (BARATA *et al.*, 2000). Além destes

compostos, os alcalóides também têm sido muito estudados quanto ao seu potencial leishmanicida. Muitos destes alcalóides são do tipo isoquinolínico isolados de espécies vegetais nativas bolivianas, utilizadas pelos indígenas quimane dentre elas: o *Cardiopetalum calophyllum*, a *Abuta rufescens* e a *Abuta pahni*, revisto por (FOURNET *et al.*, 1992).

#### 1.3.4 Malária

A malária é uma importante doença parasitária que perdura a séculos, é mundialmente um dos mais sérios problemas de saúde publica. É uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida para os humanos por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* conforme Figura 09. Quatro espécies de plasmódio podem causar a doença: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (BRASIL<sup>3</sup>, 2005).



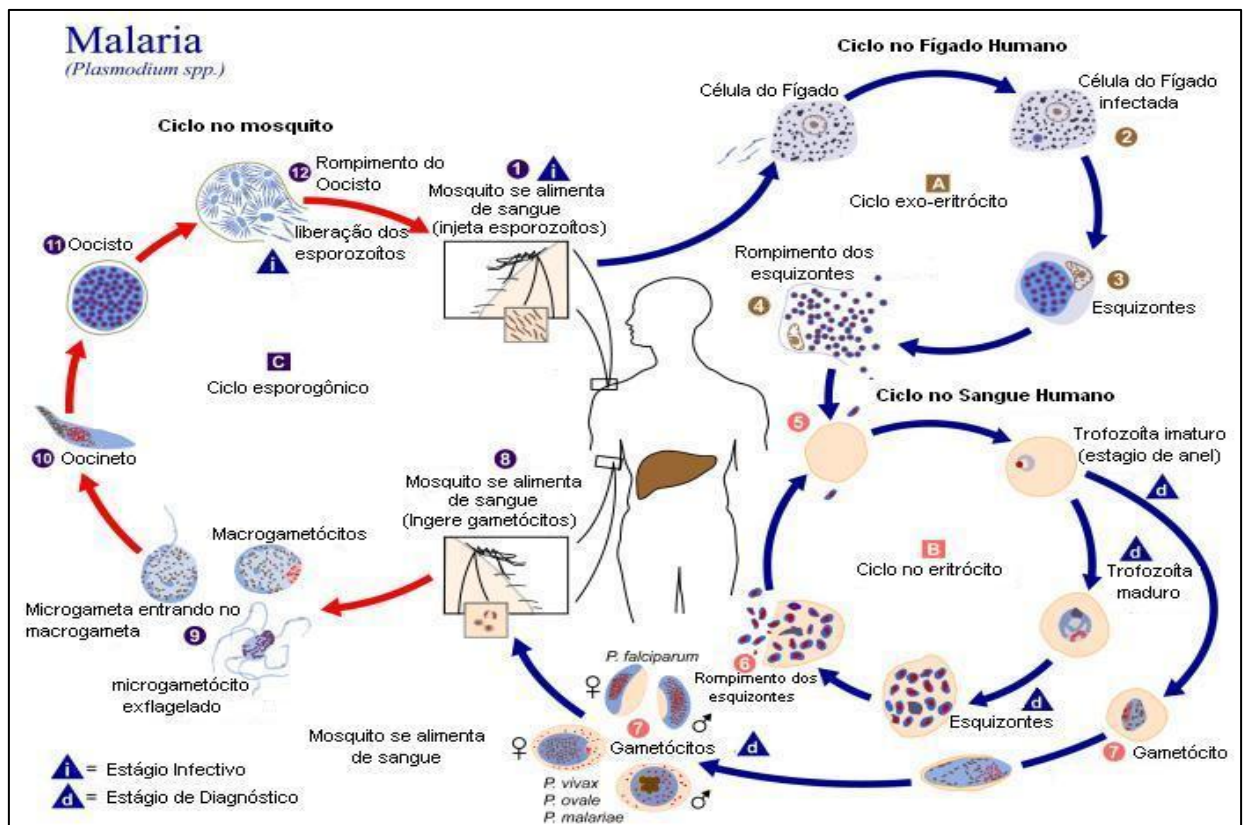
Fonte: (CRAVO e ROSÁRIO, s.n.t)

**Figura 09:** Mosquito Vetor de malária - *Anopheles*

O *Plasmodium* é um parasita humano unicelular protozoário, que infecta os eritrócitos, causando a malária. Apresentam diversas formas de acordo com as fases do ciclo de vida, possui cerca de 1 a 2 micrômetros de diâmetro, e tem duas fases de reprodução, nos seres humanos de forma assexual e no mosquito sexual conforme a Figura 10 (BRASIL<sup>5</sup> 2001).

O ciclo de vida do *Plasmodium*, ilustrado na Figura 10, inicia-se com a picada de uma pessoa por um mosquito *Anopheles* fêmea, durante a picada antes de sugar o sangue o mosquito injeta uma pequena quantidade de saliva, com substâncias anticoagulantes, rica em Plasmódios na corrente sanguínea, sendo que um mínimo de dez parasitas é o suficiente para causar a infecção. Os Plasmódios estão na fase de esporozoítos, e chegam ao fígado por volta de 30 minutos depois da picada, no fígado os esporozoítos invadem os hepatócitos e inicia-se o estágio exo-eritrócito {A}. Os esporozoítos dentro dos hepatócitos se desenvolvem a esquizontes maiores e multinucleares. Esses dividem-se por reprodução

assexuada e se desenvolvem até o rompimento dos esquizontes gerando centenas e milhares de novos merozoítos, uma fase que dura de 6 dias (*P. falciparum*) até algumas semanas (outras espécies) (BRASIL<sup>3</sup>, 2005).



Fonte: Center of Diseases Control and Prevention (modificada) ( CDC<sup>2</sup>, 2009)

Figura 10: Ciclo de vida *Plasmodium* spp

No interior dos eritrócitos os merozoítos se desenvolvem em trofozoítos e estes se dividem assexuadamente formando novos esquizontes, que rompem liberando novos merozoítos para novamente infectar eritrócitos e substâncias tóxicas como a hemozoína que causa febre na pessoa infectada. Alguns merozoítos se transformam em formas sexuais (gametócitos) após meiose. As formas sexuais (macrogametas e microgametas) são ingeridas pelo mosquito quando o mesmo pica a pele da pessoa infectada para se alimentar de sangue, dando início ao ciclo esporogônico {C} (BRASIL<sup>3</sup>, 2005; FRANÇA, et al., 2008).

No estômago do mosquito o microgameta sofre exflagelação e funde-se com o macrogameta, gerando um zigoto. Este se diferencia em oocineto, uma forma móvel que atravessa a parede do estômago e se aloja na membrana basal, e se diferencia em oocisto.

Os oocistos se desenvolvem e se dividem em milhares de esporozoítos estourando o oocisto e migrando para as glândulas salivares do inseto, estes irão invadir novamente um novo humano e iniciando um novo ciclo de infecção (BRASIL<sup>3</sup>, 2005; FRANÇA, et al., 2008).

### 1.3.5 Aspectos Clínicos da Malária

Os sintomas mais comuns relatados nos casos de malária são febre, calafrios, cefaléia, vômito, anorexia, fadiga, diarréia e anemia. O tratamento deve ser adequado e eficaz, caso contrário a doença pode levar o paciente a desenvolver outras complicações como edema pulmonar, complicações renais, icterícia e obstrução de vasos sanguíneos no cérebro nos casos mais graves da doença, podendo levar o indivíduo a óbito (BRASIL<sup>4</sup>, 2005; BRASIL<sup>5</sup>, 2001).

De acordo com a espécie do protozoário, pode-se observar variações nos quadros clínicos, na infecção por *Plasmodium falciparum* a doença é conhecida como malária *falciparum*, também chamada de malária grave ou maligna, tem um período de incubação de 1 a 3 semanas, pode apresentar sintomas adicionais mais graves como choque circulatório, síncope (desmaios), convulsões, delírios e crise vaso-oclusivo. Os casos de óbitos podem ocorrer quando eritrócitos infectados causam a oclusão de vasos sanguíneos no cérebro levando o indivíduo a déficits mentais, coma seguido de morte ou a déficits mentais irreversíveis. Danos Renais e hepáticos ocorrem pelo mesmo motivo, é a forma da doença mais grave, pois leva um número maior de pacientes a óbito (FRANÇA et al., 2008).

As Infecções causadas pelas outras espécies, apenas causam uma debilitação ocorrendo muito raramente a morte. A malária *vivax* também conhecida como ‘terçã’ ou benigna, caracteriza-se pela intermitência dos ataques paroxísticos provenientes da infecção eritrocítica que ocorre a cada três dias. É a forma de malária mais comum no Brasil e apresenta um período de incubação de 1 a 4 semanas, o *Plasmodium vivax* tem a capacidade de permanecer latente nos hepatócitos na forma de hipnozoítos permanecendo por um tempo variável podendo levar a uma recaída de até anos depois da infecção. A malária *malariae* é a forma ‘quartã’ da doença apresentando períodos de intermitência a cada quatro dias, o período de incubação é de 2 a 4 semanas. A malária *ovale* é considerada basicamente uma forma ‘terçã’ da doença que praticamente ocorre quase que

exclusivamente na África, apresenta um período de incubação de 9 a 18 dias (BRASIL<sup>4</sup>, 2005; BRASIL<sup>5</sup>, 2001; FRANÇA, et al., 2008).

### 1.3.6 Diagnóstico da Malária

O diagnóstico da malária compreende o diagnóstico clínico e o diagnóstico laboratorial. No diagnóstico clínico levam-se em consideração aspectos epidemiológicos como áreas endêmicas, tempo de permanência nestas áreas e incidência de casos na região, e aspectos clínicos como a presença de sintomas no paciente que evidenciem a presença da doença. O diagnóstico laboratorial é recomendado quando os aspectos clínicos evidenciam a infecção por *Plasmodium* e é o diagnóstico laboratorial que confirma com precisão se o caso se trata de malária ou não (BRASIL<sup>4</sup>, 2005; COSTA, et al., 2008).

Dentre as técnicas laboratoriais temos o “gota espessa” que é um método adotado oficialmente no Brasil para o diagnóstico de malária por ser simples, eficaz, de baixo custo e de fácil realização. Sua técnica baseia-se na visualização do parasita através de microscopia ótica, após coloração com corantes (Azul de metileno e Giemsa), permitindo a diferenciação específica dos parasitas a partir da análise da sua morfologia e dos seus estágios de desenvolvimento. O exame através da gota espessa deve ser de 100 campos microscópicos examinados com aumento de 600 a 700 vezes, a avaliação da parasitemia pode ser expressa semiquantitativamente em “cruzes” ou quantitativamente em mm<sup>3</sup> conforme apresenta a Tabela 01 (BRASIL<sup>4</sup>, 2005; BRASIL<sup>5</sup>, 2001; COSTA, et al., 2008).

**Tabela 01:** Avaliação semiquantitativa e quantitativa da densidade parasitária por plasmódio na gota espessa de sangue

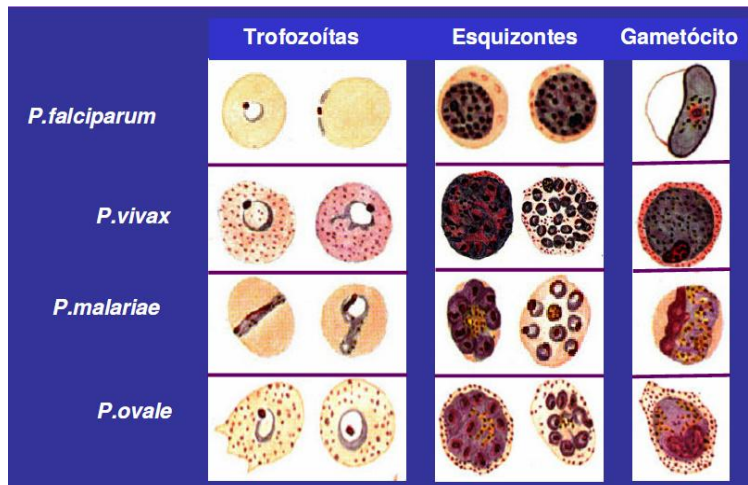
Número de parasitos contados / campo	Parasitemia semiquantitativa (cruzes)	Parasitemia quantitativa (por mm <sup>3</sup> )
40 a 60 por 100 campos	+/2	200 a 300
1 por campo	+	301 a 500
2 a 20 por campo	++	501 a 10.000
21 a 200 por campo	+++	10.001 a 100.000
200 ou mais por campo	++++	>100.000

Fonte: (BRASIL<sup>4</sup>, 2005), pag. 30

Obs: para exames com menos de 40 parasitas por 100 campos, expressar o resultado pelo número de parasitas contados

Outra técnica laboratorial é o “esfregaço delgado”, este possui baixa sensibilidade em baixas parasitemias, estima-se que a gota espessa seja cerca de 30 vezes mais eficiente. Porém o esfregaço delgado é o único método que permite, com facilidade e segurança, a diferenciação específica e detalhada dos parasitas, a partir da análise da sua morfologia e das alterações provocadas no eritrócito infectado (BRASIL<sup>4</sup>, 2005).

A identificação da forma do parasita ajuda a diagnosticar o estágio de desenvolvimento em que a doença se encontra. De acordo com a Figura 10, as formas do parasitas dependem do estágio de desenvolvimento dos mesmos dentro do hospedeiro, e de acordo com cada estágio o parasita se diferencia em uma forma diferente. Ainda no mosquito o parasita se encontra na forma de esporozoítos, assim que inoculado no hospedeiro ele se diferencia em esquizontes dentro das células hepáticas, e de acordo com a espécie do parasita as formas de esquizontes, e as outras formas também podem apresentar variações morfológicas conforme ilustra a Figura 11.



Fonte: (BRASIL<sup>3</sup>, 2005)

**Figura 11:** Morfologia dos Plasmódios dentro dos eritrócitos

Também Existem os testes imunocromatográficos, estes representam novos métodos de diagnóstico rápido de malária. São realizados em fitas de nitrocelulose contendo anticorpo monoclonal contra antígenos específicos do parasita. Em geral apresentam sensibilidade superior a 95% quando comparado a “gota espessa” e parasitemia superior a 100 parasitas/ $\mu$ L de sangue (BRASIL<sup>4</sup>, 2005; BRASIL<sup>5</sup>, 2001).



Existem ainda outros métodos que podem ser utilizados no diagnóstico da malária, como a Imunofluorescência Indireta, Elisa e PCR (Reação em cadeia de Polimerase) de grande importância na pesquisa em laboratórios de referência para malária, não usados rotineiramente para diagnóstico laboratorial (BRASIL<sup>4</sup>, 2005; COSTA, et al., 2008).

### 1.3.7 Tratamento da Malária

O tratamento dos casos de malária causados pela espécie *Plasmodium falciparum* são considerados uma emergência médica por haver risco de morte, e que requer atendimento médico imediato. A malária causada por outras espécies são consideradas doenças crônicas (BRASIL<sup>4</sup>, 2005).

Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados na estrutura de produtos naturais ou de compostos sintéticos desenvolvidos na década de 40. Estes fármacos são específicos para cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium* (FRANÇA, et al., 2008; BRASIL<sup>4</sup>, 2005;ALECRIM, 1981).

- **Fármacos eritrocíticos:** atuam nas formas presentes nos eritrócitos humanos.
- **Fármacos gametocíticos:** matam as formas sexuais do parasita (gametócitos) de um indivíduo infectado, evitando que o mesmo transmita a doença para o mosquito e conseqüentemente para outras pessoas.
- **Fármacos esporonticidas:** atuam contra esporozoítos e são capazes de matar os parasitas assim que eles entram na corrente sanguínea pela picada do mosquito ou assim que são liberados pelos esquizontes hepáticos ou sanguíneos.

Muitas vezes os fármacos antimaláricos podem atuar de forma eficaz para diversas formas do parasita, ser efetivos contra uma espécie e ineficazes para outras, agindo de maneira bem específica. Os principais antimaláricos são classificados em dois grandes grupos, de acordo com o seu modo de ação (BRASIL<sup>3</sup> 2005).

O primeiro grupo inclui alcalóides derivados da *cinchona* (planta nativa da América do Sul utilizada pelos índios no tratamento de malária) as aminoquinolinas e as acridinas. Acredita-se que estes fármacos podem interferir no metabolismo da glicose em diferentes pontos e também na habilidade do parasita de digerir a hemoglobina, impedindo assim que

ele se alimenta, eles podem agir ainda intoxicando-o com altos níveis de ferriprotoporfirina-IX, que é um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina (FRANÇA, et al., 2008).

O segundo grupo inclui as pirimidinas e biguanidas e estão envolvidas na interferência da síntese do ácido tetra-hidrofólico, um importante cofator no processo de síntese de DNA e de aminoácidos.

Dentre os principais antimaláricos podemos citar o princípio ativo das cascas de *cinchona*, um alcalóide conhecido como quinina descoberta pelos químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou em 1820, é considerado o primeiro fármaco antimalárico, logo após sua descoberta seu uso se espalhou pela Europa, Ásia e América do Norte. Até meados do século XX era o principal quimioterápico utilizado no tratamento da malária. Seu uso foi reduzido devido a alta toxicidade e devido ao aparecimento de cepas de *P. falciparum* resistentes, o que aumentou a necessidade de buscar novos agentes antimaláricos (FRANÇA, et al., 2008; BRASIL<sup>4</sup>, 2005; CALDERON, et al., 2009).

Dentre os principais antimaláricos existentes temos:

- A quinina faz parte da família das quinolinas que incluem as 4-aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos. Estes compostos são ativos contra as formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax*.
- A cloroquina (4-aminoquinolina) o droga mais eficaz dentre os fármacos desta família, atua como esquizonticida e raramente produz sérios efeitos colaterais no tratamento profilático da doença. Porém o uso profilático levou o *P. falciparum* a desenvolver resistência.
- A mefloquina é uma droga cerca de 10 vezes mais forte que a quinina, tem sido utilizada no tratamento de *P. falciparum* resistente a cloroquina, apesar de este fármaco ser relativamente novo já há relatos de resistência. Uma das desvantagens é que ele não é recomendado para pacientes com histórico de epilepsia ou desordens psiquiátricas, seus principais efeitos colaterais geralmente temporários são complicações gastrintestinais, tonturas e efeitos psicológicos.

- A amodiaquina e a hidroxi-cloroquina são duas alternativas para o tratamento de malária causada por cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina, entretanto são medicamentos menos efetivos do que os outros, e a amodiaquina é mais tóxica do que a cloroquina.
- A artemisinina é uma substância isolada em 1970 de uma erva chinesa conhecida como *Artemisia annua*. A partir dela já foram sintetizados vários análogos com atividades farmacocinéticas diversas como o artesunato de sódio, diidroartemisinina, arteéter e o arteméter. Estes compostos sesquiterpênicos apresentam atividade esquizotóxica e gametocida o que dificulta a transmissão para outros hospedeiros.

O crescente aumento da resistência do *Plasmodium falciparum* a vários antimaláricos constitui-se um dos maiores problemas no tratamento e nos programas de controle da malária. O crescente aumento da resistência a cloroquina levou a busca de novas alternativas e a introdução de novos antimaláricos bem como a modificação de esquemas terapêuticos na terapêutica da malária (FRANÇA, et al., 2008; BRASIL<sup>4</sup>, 2005).

A resistência aos fármacos antimaláricos é definida pela O.M.S (Organização Mundial de Saúde) como:

“ a capacidade que um parasita possui, para sobreviver e se multiplicar na presença de concentrações de fármaco que normalmente destruiriam parasitas da mesma espécie ou preveniriam a sua multiplicação.” (W.H.O., 1963 *apud* CRAVO & ROSÁRIO, s.n.t.)

A resistência a fármacos antimaláricos é consequência da associação de vários fatores tais como uso profilático, administração inadequada, propriedades intrínsecas do composto utilizado, níveis de imunidade do hospedeiro e farmacocinética. Em relação ao *P. falciparum* a resistência surge quando um ou mais indivíduos infectados que lhe proporcionam uma vantagem seletiva na presença de concentrações de fármaco que em condições normais inibiriam a proliferação da fração sensível da população parasitária. (FRANÇA, et al., 2008; CRAVO & ROSÁRIO, s.n.t.; ALECRIM, 1981)

### 1.3.8 Aspectos Epidemiológicos da Malária

Os dados disponíveis sobre a ocorrência de malária, em todo o mundo, são bastante imprecisos em vista da baixa qualidade dos sistemas de registro de informações em saúde, principalmente na África, onde se concentram aproximadamente 80% dos casos clínicos da doença e 90% das infecções, atualmente. Estima-se que a cada ano cerca de 110 milhões de casos novos de malária e um a dois milhões de óbitos ocorram em todo o mundo. As maiores taxas de incidências são observadas na África, na Ásia e nas Américas. O número de indivíduos infectados é avaliado em 270 milhões de pessoas e a transmissão autóctone continua ocorrendo em 100 países (WHO, 1991; BRASIL<sup>3</sup>, 2005).

No Brasil ocorre anualmente de 300mil a 500 mil casos por ano, após a realização da campanha de erradicação, durante a década de 60, o número de casos de malária atingiu o seu valor mais baixo: 52.469 casos, confinando-se a transmissão, praticamente, à região amazônica. A manutenção da transmissão, após a campanha, foi atribuída à baixa densidade e à dispersão populacional na Amazônia, que dificultam a execução das ações de controle; ao tipo de habitação predominante nessa área que facilita os contatos homem-mosquito e atrapalha a aplicação de DDT; e ao aumento progressivo das cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina, impedindo o esgotamento das fontes de infecção, com os recursos habitualmente utilizados (BRASIL<sup>3</sup>, 2005; BRASIL<sup>4</sup>, 2005).

Na Amazônia, a ocorrência da doença também não é homogênea, havendo diferentes situações epidemiológicas (BRASIL<sup>4</sup> 2005; BRASIL<sup>5</sup> 2001) em função das diferentes formas de ocupação do solo e das diversas modalidades de exploração econômica dos recursos naturais. Os **seringais**, por exemplo, são áreas de baixa densidade populacional, com ocupação estável e pequena mobilidade, favorecendo a dedetização domiciliar com DDT e o uso de mosquiteiros, tornando a transmissão estável com baixa incidência. As áreas de **pastagem**, também apresentam incidências muito baixas, dado que a mão-de-obra é utilizada em pequeno número e a ausência da mata diminui a densidade dos vetores. Os **acampamentos de construtoras** são geralmente livres da malária em função do controle do ingresso dos trabalhadores, evitando a presença de portadores, controle de vetores e diagnóstico e tratamento precoces das fontes de infecção.

Os **garimpos fechados** são praticamente livres de malária, dadas as condições ambientais desfavoráveis à transmissão. Os **garimpos abertos**, ao contrário, são áreas de alta incidência, dadas as facilidades de exposição, uma vez que os garimpeiros trabalham com pouca roupa e nos horários de maior atividade vetorial; há multiplicidade de criadouros decorrente da forma como o espaço é alterado pela presença do garimpo; e existência de muitos portadores assintomáticos.

As zonas **novas** de **colonização** têm incidências altíssimas, tendo em vista as condições favoráveis de transmissão, principalmente nas etapas iniciais em que a derrubada da mata é feita para o plantio, e a presença de inúmeros indivíduos suscetíveis provenientes de áreas onde não há transmissão natural da doença. Já nas zonas de **colonização antiga**, a incidência tende a estabilizar-se, em níveis baixos, em decorrência da melhoria nas habitações, da presença de animais domésticos, diversificando as fontes alimentares para os anofelinos e das ações de controle praticadas. Os **assentamentos espontâneos** têm alta incidência, face ao rápido crescimento populacional dos núcleos urbanos nas áreas de garimpo ou nos projetos agrícolas.

As áreas **periurbanas** de Manaus e Porto Velho apresentam incidências epidêmicas em função do constante afluxo de população. Face às dificuldades enfrentadas nas áreas de assentamento agrícola, essa população abandona suas terras e vem procurar emprego nas áreas urbanas. Acrescente-se a isto a multiplicação dos criadouros, provocada pela instalação das favelas.

Finalmente, as **aldeias indígenas** que apresentam situação variável na dependência do maior ou menor contato com o "homem branco" infectado (WHO, 1988; BRASIL<sup>4</sup> 2005; BRASIL<sup>5</sup> 2001).

Rondônia possui o terceiro maior índice de casos autóctones de malária, faz parte da Amazônia legal e ocupa 4,7% desta área. A Amazônia legal abrange nove estados brasileiros e é responsável por 99,6% dos casos nacionais. Em 2004 e 2005 Rondônia apresentou 22,2% e 18,7% dos casos respectivamente, caracterizando a região como endêmica. No ano de 2008 foram registrados 91 mil casos em Rondônia sendo que destes aproximadamente 29 mil casos foram registrados no município de Porto Velho. Os municípios mais endêmicos de

Rondônia são Porto Velho, Guajará-mirim, Ariquemes, Machadinho, Candeias, Nova Mamoré, Cujubim, Itapuã, Alto Paraíso, Campo Novo e Buritis. (KATSURAGAWA et al., 2008; BRASIL<sup>4</sup>, 2005).

## OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar fitoquímica e farmacologicamente as folhas e talos da espécie *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae) a fim de caracterizar e isolar os componentes fixos e voláteis para realização de ensaios biológicos, buscando uma possível ação leishmanicida ou antiplasmodial, além de realizar uma pesquisa bibliográfica com finalidade de caracterizar a distribuição de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* nas diferentes regiões do Brasil.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar um levantamento bibliográfico sobre a distribuição de terpenóides e fenilpropanóides nos óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* no Brasil;
- Extrair e identificar os constituintes voláteis das folhas e talos de *P.hispidum*;
- Isolar e caracterizar os constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas e talos da espécie em estudo;
- Isolar e caracterizar os constituintes fixos das folhas e talos de *P.hispidum*;
- Realizar ensaios para verificação da inibição do crescimento da *Leishmania amazonensis* quando tratada com os óleos essenciais e extratos de *P.hispidum*
- Realizar ensaios para verificação da atividade antiplasmodial dos óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas de *P.hispidum* frente a *Plasmodium falciparum* cepa 3D7 e W2.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO.

Obteve-se os artigos sobre a composição de óleos essenciais de plantas do gênero *Piper*, através de buscas em periódicos principalmente pertencentes a base de dados do Chemical Abstracts, com auxílio do software SciFinder Scholar fornecido pela biblioteca central da Universidade Federal de Rondônia.

Levantou-se as quantidades de óleo essencial extraídos de diversas partes da planta (folhas, talos e frutos) publicado nos artigos obtidos. Com estas informações elaborou-se a Tabela 03 que descreve a distribuição de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides em óleos essenciais de espécies do gênero *Piper* analisadas no Brasil.

Posteriormente agrupou-se estes dados de acordo com as regiões norte, nordeste, sudeste, centro-oeste e sul. De acordo com as partes da planta, realizou-se a média aritmética simples das quantidades de óleo essencial, sendo representada graficamente nas Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22.

### 3.2 ENSAIOS FITOQUÍMICOS – *Piper hispidum*

Os ensaios fitoquímico foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais – LPQPN da Universidade Federal de Rondônia – UNIR, em Porto Velho – RO.

#### 3.2.1 Material Botânico

Coletou-se cerca de 7,0 Kg de folhas e 7,3 Kg de Talos de *P. hispidum* nos arredores do campus da UNIR no município de Porto Velho - Rondônia (08° 50'14" de latitude sul, 63° 50'20" de longitude oeste) em agosto de 2008. Cinco exsicatas foram confeccionadas, sendo



que dois exemplares foram encaminhados ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), identificadas pelo Botânico J.F. Ramos e registradas com número 216630-INPA. Os demais exemplares encontram-se depositados no Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais da Fundação Universidade Federal de Rondônia (UNIR), sob os números 86, 87 e 88.

### 3.2.2 Obtenção do Óleo Essencial

O óleo essencial foi extraído como o auxílio de um sistema de arraste por vapor d'água que consiste em um método bastante simplificado, onde o material a ser extraído foi triturado e colocado em um recipiente por onde passa uma corrente de vapor d'água com pressão. O vapor d'água arrasta as substâncias voláteis existentes no material, a mistura de vapores é conduzida a um condensador, onde os vapores voltam ao estado líquido, e com o auxílio de um separador de óleo por densidade, obtém-se o óleo essencial concentrado.

Ambas as partes da planta, folha (4,5 Kg) e talos (5,0 Kg) foram submetidos à extração, obtendo-se dessa forma 2,5 mL de óleo das folhas e 0,8 mL de óleo dos talos, que em seguida foram submetidos a uma filtração em um funil de vidro provido de algodão e sulfato de sódio anidrido para remoção da unidade, e posteriormente os óleos foram armazenados em tubos devidamente vedados e conservados a -20 °C.

### 3.2.3 Materiais e Métodos Cromatográficos

Nas cromatografias de adsorções em colunas utilizou-se gel de sílica 60 da Merck e da Vetec ( $\phi$   $\mu$ m 63-230). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas. Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se placa cromatográfica de gel de sílica 60 ( $\phi$   $\mu$ m 2-25 sobre poliéster T – 6145 da Merck e da Sigma Chemical CO com indicador de fluorescência na faixa de 24  $\eta$ m). Os solventes utilizados nas eluições cromatográficas foram: éter de petróleo, hexano, acetona, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em gradiente crescente de polaridade.

A revelação das substâncias cromatográficas em CCD se deu por exposição das placas cromatográficas analíticas à luz ultravioleta (UV), reveladas em um comprimento de onda (254  $\eta$ m) e por pulverização com revelador universal (mistura de etanol: ácido acético:

ácido sulfúrico – 8:1:1), seguido de aquecimento em estufa a 100 °C por aproximadamente cinco minutos.

Os constituintes voláteis que compõem o óleo essencial das folhas e talos desta espécie foram extraídos e posteriormente analisados pelo processo de cromatografia gasosa acoplado a um detector de massas com interface controlada por um computador através do software X-Callibur – (Thermo Fisher Scientific Inc.).

#### 3.2.4 Materiais e Métodos Espectroscópicos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em aparelhos pertencentes a Central Analítica da Universidade Federal do Ceará e na Universidade Federal de Rondônia. Os modelos e condições dos aparelhos para a caracterização das substâncias isoladas estão descritas abaixo.

#### 3.2.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - $^1\text{H}$ e de carbono – $^{13}\text{C}$ .

Os espectros de RMN unidimensionais e bidimensionais foram registrados em espectrometros Bruker AC – 200 e 500, operando a 200 e 500 MHz para hidrogênio – 1 (RMN  $^1\text{H}$ ) e 50 e 125 MHz para carbono –  $^{13}\text{C}$  (RMN  $^{13}\text{C}$ ). As seqüências de pulsos utilizadas nas experiências bidimensionais estão contidas nos programas Bruker XH-CORREAU, para correlação heteronuclear de hidrogênio – 1 e carbono –  $^{13}\text{C}$  a uma ligação e a longa distância ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  – COSY,  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ ,  $n = 1, 2$  e  $3$ ) e COSY – UA, para correlação homonuclear ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  – COSY). Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram referenciados de acordo com o deslocamento químico do TMS e do  $\text{CDCl}_3$  respectivamente. Nos experimentos unidimensionais de DEPT UA (ângulo de mutação  $135^\circ$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as multiplicidades dos deslocamentos indicados segundo a convenção: s (singleto), Sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), q (quarteto) e m (multiplete).

#### 3.2.6 Análise do Óleo Essencial via análise em CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa)

Para a caracterização dos compostos, analisou-se os óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, equipamento da Thermoelectron modelo TRACE GC ULTRA - DSQ. Utilizou-se coluna capilar OV5-MS (30 m X

0,25 mm X 0,25 mL/min), tendo como gás carreador o hélio (1,0 mL/min). Para a separação das frações utilizou injetor a 250 °C no modo *split*, detector a 250 °C e temperaturas programadas: 50 °C por 1 min seguido de uma rampa de 5 °C/min até 290 °C. O modo de operação do espectrômetro de massas foi por impacto de elétrons a 70 eV. O escanamento das massas fez-se no modo *Full Scan* 43 – 650. Identificou-se os compostos através da comparação dos espectros de massas com o espectro do banco de dados da biblioteca de espectros “NIST” (National Institute of Standards and Technology). A análise dos espectros de massas e do índice de retenção (IR) foi calculado a partir do tempo de retenção dos hidrocarbonetos lineares presentes nas amostras.

$$IR = [100 \times \Delta N(TR_S - TR_{HA}) / (TR_{HD} - TR_{HA})] + 100 \times N, \text{ Onde:}$$

IR= Índice de Retenção.

$\Delta N$ = É a diferença de número de carbonos entre os hidrocarbonetos com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção da substância em análise e o hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior a mesma substância em análise.

$TR_S$  = Tempo de retenção da substância em análise.

$TR_{HA}$ = Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção da substância em análise.

$TR_{HD}$ = Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção da substância em análise.

$N$  = É o número de carbonos contido no hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção da substância em análise.

### 3.2.7 Isolamento e Purificação dos Constituintes Majoritários do Óleo Essencial dos Talos de *P.hispidum*

Para isolar os constituintes em maior concentração no óleo empregou-se a técnica de separação por cromatografia em coluna, onde utilizou-se como fase fixa os seguintes materiais: sílica gel ( $\phi = 0,05$  mm) e sílica previamente tratada, por uma noite, com solução aquosa de 10% de bicarbonato de sódio. E como fase móvel utilizou-se como solvente apenas o éter de petróleo. Os demais materiais e métodos utilizados foram os mesmo empregados para o isolamento dos constituintes fixos.

### 3.2.8 Obtenção do extrato das folhas e talos de *P. hispidum*

Cerca de 2,5 kg de folhas e 2,3 Kg de talos foram secos a 50 °C, em estufa com ventilação. Submeteu-se as folhas à extração via soxlet primeiramente com Hexano, posteriormente com acetato de etila e por ultimo com metanol. Cada solvente foi submetido a um período de 8 horas de extração. Também submeteu-se os talos a extração via soxlet com etanol por um período de 8 horas. A destilação dos solventes sob pressão reduzida forneceu 20 g de extrato bruto extraído com hexano das folhas denominado PHFHE, 18 g de extrato acetato de etila das folhas denominado PHFAC e 25 g de extrato metanólico das folhas denominado PHFME. O extrato etanólico dos talos denominado PHTET, rendeu 93 g de extrato .

### 3.2.9 Tratamento cromatográfico do Extrato Acetato de Etila dos Talos

Para separação das substâncias presentes no extrato utilizou-se cromatografia por adsorção em coluna. O procedimento envolveu a aplicação do extrato no topo de uma coluna adsorvente (fase estacionária) empacotada em um tubo de vidro e eluíu -se com misturas de solventes em ordem crescente de polaridade: hexano , acetato de etila e metanol (fase móvel).

Para realização do procedimento descrito no parágrafo anterior utilizou-se 47,5 g de extrato, que foi pulverizado em grau de porcelana, adsorvido em 120g de gel de sílica e devidamente acondicionado sobre 300 g de gel de sílica em uma coluna cromatográfica de 800 ml. Na eluição utilizou-se os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e metanol. Coletou-se frações de 50 ml e concentrou-se por destilação do solvente sob pressão

reduzida. Este procedimento rendeu 128 sub-frações, que foram coletadas e posteriormente analisadas por cromatografia em camada delgada. As frações 12 a 28 apresentaram o mesmo perfil cromatográfico e posteriormente reuniu-se e submeteu-se novamente a uma outra cromatografia em coluna, obtendo-se 55 mg de um cristal branco denominado, PHTAC – 1.

Reuniu-se as frações 42 a 50 e submeteu-se novamente à coluna de sílica gel e eluída com mistura de hexano/acetato de etila em polaridade crescente obtendo-se 60 mg de um sólido cristalino branco denominado PHTAC – 2.

### **3.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS FRENTE A *L. amazonensis* in vitro.**

Os testes a seguir foram realizados no Laboratório de Quimioterapia, no Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais (IPEPATRO) de Porto Velho, Rondônia com a colaboração dos estagiários Homero Gonçalves Neto e Delvânia Marta Ferreira Santos, sob orientação da Dr<sup>a</sup> Izaltina Silva Jardim, responsável pelo laboratório.

#### **3.3.1 Obtenção E Cultivo Dos Parasitas (*Leishmania amazonensis*).**

##### **3.3.1.1 Parasitas.**

Os parasitas utilizados no presente trabalho foram promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa IFLA/BR/67/PH8, cuja cultura original foi cedida pelo prof. Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

##### **3.3.1.2 Criopreservação do Parasita.**

Para preservação e posterior utilização, as promastigotas eram criopreservadas em meio de cultura de RPMI-1640 acrescidos de glicerina a 10% (v/v). A glicerina era adicionada gota a gota na cultura sob agitação manual constante. Após 30 min de agitação, alíquotas da cultura glicerinada eram distribuídas em tubos de criopreservação de 1,8 ml, mantidas por 24 horas a 20 °C em suporte de isopor, em seguida transferida para *deep-freezer* a – 80 °C, e finalmente conservadas em nitrogênio líquido. Para recuperação das promastigotas

criopreservadas, o material é retirado do nitrogênio líquido, degelado rapidamente em banho a 37 °C e inoculado em 5 mL de meio de cultura e mantidos a 23 °C em estufa BOD.

#### 3.3.1.3 Meio de Cultura.

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis* é o meio de RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino. O meio é preparado segundo as instruções do fabricante, e adicionado sulfato de gentamicina na concentração final de 50 µg/mL. O meio é esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose de poro 0,22 µm. O SFB, previamente inativado a 56 °C por 30 min é adicionado ao meio no momento do uso.

Como mencionado, para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. amazonensis*, Utiliza-se o inóculo de  $5 \times 10^5$  promastigotas por ml de meio de cultura, obtidas no 5º dia de crescimento (final da fase logarítmica). Avalia-se o crescimento dos parasitas mantidos a 23 °C, por contagens de alíquotas de 10 µl de cultura diluída 1:10 em PBS (NaCl 145 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 1mM, pH 7,6). Realiza-se a contagem em uma câmara hemocitométrica de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400 vezes, utiliza-se a formula abaixo para calcular o número de parasitas contidos em 1,0 ml de cultura.

$$n^{\circ} \text{ de parasitas} = \text{Número de parasitas} \times \text{fator de diluição da amostra} \times 10^4.$$

#### 3.3.1.4 Curva de Crescimento e ensaio da atividade leishmanicida.

Avaliou-se o crescimento dos parasitas no meio de cultura através de curvas de crescimento do parasita na forma promastigota *in vitro*. A concentração inicial de leishmania é de  $5 \times 10^5$  parasitas/mL. O grupo controle indica o final da fase logarítmica no quinto dia de experimento, a substância em estudo será avaliada em diferentes concentrações e será comparada com o grupo controle ao final do experimento. Realizou-se contagens diárias durante os cinco dias de experimento. Avaliou-se os óleos essenciais das folhas e talos nas seguintes concentrações (12,5µg/mL; 25µg/mL; 50µg/mL e 100µg/mL). Avaliou-se o extrato de acetato de etila dos talos nas seguintes concentrações (10µg/mL; 25µg/mL; 50µg/mL; 100µg/mL e 150µg/mL)

Para realização das contagens, diluiu-se alíquotas do meio de cultura em Eritrosina B diluído a 0,4% (p/v). Após 5 minutos no gelo contou-se as promastigotas em câmara de Neubauer. Considera-se os parasitas corados de vermelho como mortos e os birrefringentes e móveis como sendo os vivos. Para fins de calculo considera-se apenas o número de parasitas vivos.

### **3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM PLASMÓDIUM FALCIPARUM *IN VITRO***

3.4.1 Ensaio qualitativo frente a cepa 3D7 (sensível a cloroquina) de *Plasmódium Falciparum*.

No ensaio qualitativo utilizou-se o método do esfregaço delgado, onde a visualização do parasita se dá através de microscopia ótica, após coloração com corantes (Azul de metileno e Giemsa), permitindo a diferenciação específica dos parasitas a partir da análise da sua morfologia e dos seus estágios de desenvolvimento. A técnica do esfregaço delgado foi de 10 campos microscópicos examinados com aumento de 600 a 700 vezes, a avaliação da parasitemia pode ser expressa semiqualitativamente em percentual.

#### 3.4.1.1 Cultivo da *P. falciparum* cepa 3D7

*Cepas de P. falciparum* 3D7 cultivada de acordo com Trager e Jensen, 1976. Os parasitas foram cultivados em meio RPMI – 1640 suplementado com 25mM de HEPES, 21mM de bicarbonato de sódio, 300µM de hipoxantina, 11mM de glicose, 40µg/ml de gentamicina e 100% (v/v) de plasma humano. Eritrócitos foram adicionados à cultura provenientes de doadores voluntários, obtendo-se um hematócrito de 4%. As placas de 96 poços foram mantidas em estufa a 37 °C durante 48 horas sem trocas diárias de meio e adição de uma mistura gasosa composta por 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. A parasitemia foi monitorada mediante microscopia de esfregaços corados com Giemsa ou pelos componentes do Kit Panótico Rápido (Laborclin). Quando a parasitemia das culturas atingia acima de 5% até 10%, as culturas foram diluídas ou congeladas.

#### 3.4.1.2 Plasma

O Plasma humano foi gentilmente cedido pela FEMERON de Porto Velho, Cada lote de plasma foi desativado a 56 °C durante 30 minutos. As alíquotas foram criopreservadas

durante a noite a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , descongeladas e a fibrina precipitada foi eliminada por centrifugação a  $3000 \times g$ . durante 30 minutos, em temperatura ambiente. O plasma foi criopreservado em alíquotas de 15 ml a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.1.3 Preparação de eritrócitos:

Os eritrócitos humanos (Tipo A+ ou O+) foram doados por doadores voluntários do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPEM. Semanalmente, de 5-10ml de sangue total, foram centrifugadas, separadas e lavadas 3x com RPMI pH 7,2 (sem plasma). Os eritrócitos lavados foram mantidos em meio completo (RPMI pH 7,2, 10% de plasma) utilizados durante uma semana.

#### 3.4.1.4 Evolução da atividade antiplasmodial

As amostras foram preparadas em uma concentração de  $100\mu\text{g/mL}$ , realizou-se o experimento em placas de cultura com 24 poços e cada amostra foi incubadas em duplicatas com eritrócitos tipagem 0 positivo (4% de hematócrito), com parasitemia de 0,5%, em um volume final 500 microlitros, e mantidos numa temperatura e atmosfera de  $37^{\circ}\text{C}$ , a 5%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 90%  $\text{N}_2$ , contendo meio de cultura RPMI 1640, 25mM HEPES, pH 7.2, suplementado com soro humano durante 48 horas. Os controles foram mantidos na mesmas condições. A contagem dos parasitas se deu através da preparação de esfregaço delgado em lâminas de vidro para análise em microscópio ótico. Os esfregaços foram corados pelo método panótico rápido (laborclin), e observado em aumento de 1000X. Contou-se 10 campos de cada amostra classificando o parasita entre três grupos distintos: (anéis), (trofozoítos e esquizontes) e (mortos).

### 3.4.2 Ensaio Quantitativo frente a cepa W2 (resistente a cloroquina) de *Plasmodium falciparum*.

#### 3.4.2.1 Cultivo da *P. falciparum* cepa W2 e preparação dos eritrócitos.

A cepa padrão de *Plasmodium falciparum* utilizada para ensaios *in vitro* foi a W2 (CQR – cloroquina resistente) oriunda da Indochina (Cojean et al., 2006), mantida em cultura após o descongelamento com hematócrito 5%, de acordo com a técnica de Trager e Jansen 1976, modificada por Trager, 1990. O cultivo foi realizado em meio completo composto por



RPMI 1640 suplementado com 5% de plasma humano desfibrinado A+ ou O+ na concentração final de 1%; Hepes 22,8mM; glicose 11,1mM; hipoxantina 0,36 mM (50µg/ml); NaHCO<sub>3</sub> 23,8mM, gentamicina 40µg/ml.

Os parasitas foram mantidos em estufa a 37 °C, condicionados em garrafas plásticas de cultura de 25cm<sup>3</sup> sob uma tensão de gases (5% de O<sub>2</sub> + 5% de CO<sub>2</sub> + N<sub>2</sub> balanceado) ou no dissecador a vela segundo a técnica de Trager (“candle jar”).

O acompanhamento do desenvolvimento do plasmódio foi realizado por meio da preparação de esfregaço delgado em lâminas para análise em microscópio óptico. Os esfregaços foram corados pelo método panótico rápido (Laborclin), e observado em aumento de 1000X.

Para a contagem, os parasitas foram divididos em três classificações:

- **Anéis**: Parasitas na forma de anéis;
- **Trofozoítos/Esquizontes**: Parasitas nas formas de trofozoítos e esquizontes;
- **Mortos**: Parasitas que apresentavam morfologia anômala e que se destacavam pela coloração.

#### 3.4.2.2 Evolução da atividade antiplasmodial frente a cepas W2 de *P. falciparum*.

Para análise antiplasmodial de cada amostra obtida do vegetal, foram distribuídos em uma placa de 96 poços, 200 µL da suspensão de hemácias parasitadas, com parasitas sincronizados na fase de anéis maduros, em meio sem hipoxantina. Adicionou-se 25µL de substância a ser avaliada com as seguintes concentrações, 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. O experimento teve duração de 48 horas, realizou-se duplicatas repetitivas de cada amostra analisada. Realizou-se posteriormente mais dois experimentos idênticos totalizando um n amostral igual a 3 experimentos.

Utilizou-se amostras de ambos óleos essenciais, do ácido 3,4,5-trimetoxifenilpropanóico e da amida Piplartina para realização dos ensaios.

A placa foi incubada num dissecador à vela em estufa à 37°C e após 24h foi retirada para adição de 25µl de uma solução mãe de hipoxantina tritiada (20µCi/ml) em todos os poços, inclusive nos controles.

A placa retornou a estufa por mais 24h para em seguida ser retirada e congelada a -20 °C, promovendo a hemólise da suspensão de hemácias. A microcultura hemolizada foi coletada num filtro de fibra de vidro (Wallac) através do Cell Harvest da PerkinElmer (coletor de células), após a secagem do papel de filtro este foi embalado num saco plástico, e umedecido por um líquido de cintilação em seguida devidamente selado por um selador, a radioatividade incorporada (devido ao crescimento do DNA) foi avaliada usando um contador de líquido de cintilação, micro beta plate (Trilux da PerkinElmer), onde as contagens (cpm) correspondem as respostas do parasita a ação dos compostos.

#### 3.4.2.3 Ensaios de captação radioativa

A análise do crescimento do *Plasmodium falciparum* foi realizada através de medida de incorporação de hipoxantina tritiada seguindo o método descrito por (Pradines et al 2002).

A solução concentrada de hipoxantina tritiada (Amersham) corresponde a 1mCi/mL (ou seja 1µCi/µL). A partir desta solução preparou-se uma solução diluída 50x para o ensaio *in vitro*, onde 25 µL dessa diluição são adicionados à cada poço da placa de 96 wells. Cada poço recebe, portanto aproximadamente entre 100 a 300 c.p.m./minuto de hipoxantina tritiada para uma média de 10<sup>8</sup> parasitas por poço.

A hipoxantina é uma precursora da guanina, base púrica nitrogenada que compõe a molécula do DNA. A hipoxantina utilizada em testes de radio-marcação é complexada ao trítio H<sup>3</sup>, um isótopo do hidrogênio.

Durante o crescimento intraeritrocitário do parasita, anel a trofozoíto, ocorrem sucessivas divisões mitóticas, onde a guanina (agora marcada) se incorpora as novas moléculas de DNA, possibilitando a leitura radioativa do crescimento do parasita em unidades de cpm (crescimento por minuto). No caso de uma atividade antimalárica haverá o decréscimo desta incorporação no DNA demonstrando a intensidade da referida atividade.

Radioisótopos emissores beta e gama de baixa energia têm sido comumente utilizados em pesquisas nas ciências naturais e são manipulados na forma de fontes não seladas de atividade baixa, suficiente para garantir a eficiência na detecção direta ou indireta da mesma.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

4.1.1 Revisão Bibliográfica Sobre Espécies Do Gênero *Piper* Produtoras De Óleo Essencial no Brasil.

Com o objetivo de realizar uma comparação entre a distribuição dos constituintes químicos voláteis de espécies do gênero *Piper* analisadas por região no Brasil, foi realizada uma revisão bibliográfica observando o teor de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nas folhas, talos e frutos de plantas deste gênero. Na Tabela 02, encontra-se a relação das espécies analisadas nas cinco regiões do Brasil. Algumas espécies foram analisadas de acordo com as diferentes localidades e épocas de coletas. Na Tabela 03, encontra-se a relação da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies de *Piper*.

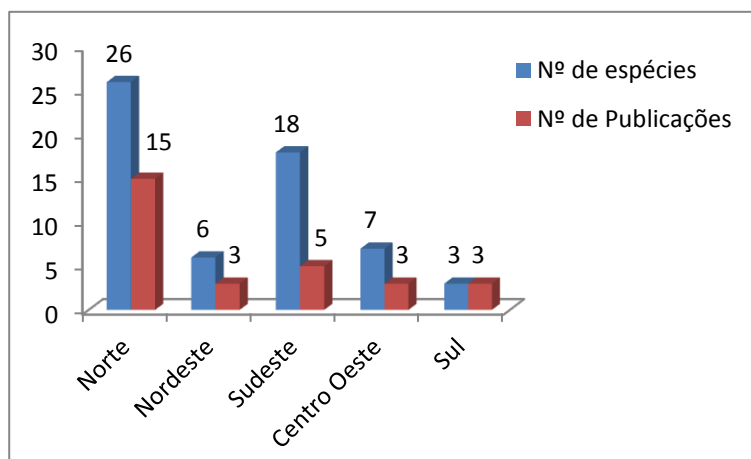
As distribuições geográficas de espécies do gênero *Piper* no continente Americano, se estendem desde a América Central, Antilhas e América do Sul. No Brasil, elas ocorrem nos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Pará, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Minas gerais, Paraná Santa Catarina, São Paulo, Distrito Federal e Mato Grosso (GUIMARÃES & GIORDANO, 2004; NAVICKIENE et al., 2000).

A Tabela 02 apresenta na coluna 01 as espécies do gênero *Piper* estudadas no Brasil, separadas por cada região, seguidas das informações do estado de origem da pesquisa na coluna 02 e do referido autor do trabalho na coluna 04. Na coluna 03 tem se o respectivo código de identificação que posteriormente será citado na tabela 03, onde estão descritos as quantificações dos teores de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nas folhas, talos e frutos das espécies pesquisadas.

Espécie	Estado	Abrev.	Referência
Região Norte			
<i>Piper amapaense</i> Yuncker	Amazonas	Pam	SANTOS (1998)
<i>Piper aduncum</i> L.	Amapá	Pad I	MAIA (1998)
<i>Piper aduncum</i> L.	Pará	Pad IIa-d	MAIA (1998)
<i>Piper aduncum</i> L.	Amazonas	Pad IIIe,f	MAIA (1998)
<i>Piper aduncum</i> L.	Acre	Pad IV	MAIA (1998)
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	Pará	Par I	MAIA (2000)
<i>Piper arboreum</i> Aubl. var. <i>latifolium</i> (C.DC.) Yuncker	Rondônia	Par II	MACHADO (1994)
<i>Piper bartlingianum</i> (Miq. ) C.DC.	Amazonas	Pba	SANTOS (1998)
<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	Amazonas	Pca	MAIA (1987)
<i>Piper crassinervium</i> Kunth	Acre	Pcr I	MAIA (2000)
<i>Piper dactylostigma</i> Yuncker	Amazonas	Pda	LUZ (2000)
<i>Piper divaricatum</i> G. Mey	Pará	Pdi	MAIA (2000)
<i>Piper duckei</i> C. DC.	Amazonas	Pdu	SANTOS (1998)
<i>Piper hispidinervium</i> C. DC.	Acre	Phi I	MAIA (1987)
<i>Piper hostmannianum</i> (Miq.) C. DC.	Amazonas	Pho I	MAIA (2000)
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	Amazonas	Pma I	RAMOS (1986)
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	Rondônia	Pma II	ALVES (2006)
<i>Piper plurinervosum</i> Yuncker	Amazonas	Ppl	LUZ (2000)
<i>Piper reticulatum</i> L.	Acre	Pre	MAIA (2000)
<i>Piper vitaceum</i> Yuncker	Amazonas	Pvi	LUZ (2000)
<i>Piper tuberculatum</i> var. <i>tuberculatum</i> (Miq.) C. DC.	Rondônia	Ptb I	FACUNDO (2005)
<i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	Rondônia	Ptb IV	FACUNDO (2008)
<i>Piper hispidum</i> Sw.	Rondônia	Phs I	MACHADO (1994)
<i>Piper renitens</i> (Miq.) Yuncker	Rondônia	Prn	SOLEANE (2007)
<i>Piper dumosum</i> Rudge	Rondônia	Pdm	FACUNDO (2007)
<i>Piper aleyreanum</i> C. DC.	Rondônia	Pal	FACUNDO (2007)
<i>Piper carniconnectivum</i>	Rondônia	Pcn	FACUNDO (2006)
<i>Piper alatabaccum</i>	Rondônia	Plt	PEREIRA (2003)
<i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth	Rondônia	Pga	MORAIS (2007)
<i>Piper humaytanum</i> Yuncker	Rondônia	Phu	MORAIS (2007)
<i>Piper permucronatum</i> (Miq.) C. DC.	Rondônia	Ppe I	MORAIS (2007)
<i>Piper hostmannianum</i> (Miq.) C. DC.	Rondônia	Pho II	MORAIS (2007)
Região Nordeste			
<i>Piper crassinervium</i> kunth	Ceará	Pcr II	CYSNE (2005)
<i>Piper dilatatum</i> L.C. Rich	Ceará	Pdl I	CYSNE (2005)
<i>Piper tuberculatum</i> Jacq.	Ceará	Ptb II	CYSNE (2005)
<i>Piper arboreum</i> Aubl.	Ceará	Par III	CYSNE (2005)
<i>Piper aduncum</i> L.	Pernambuco	Pad Va-f	OLIVEIRA <sup>2</sup> (2006)
<i>Piper marginatum</i> Jacq	Pernambuco	Pma III	OLIVEIRA <sup>1</sup> (2006)
Região Sudeste			
<i>Piper amplum</i> kunth	Rio de Janeiro	Pmp	SANTOS (2001)
<i>Piper arboreum</i> var. <i>arboreum</i> Yunck	Rio de Janeiro	Par IV	SANTOS (2001)
<i>Piper dilatatum</i> L.C. Rich	Rio de Janeiro	Pdl II	SANTOS (2001)
<i>Piper goesii</i> Yunck	Rio de Janeiro	Pgo	SANTOS (2001)
<i>Piper hispidum</i> var. <i>hispidum</i> Kunth	Rio de Janeiro	Phs II	SANTOS (2001)
<i>Piper hoffmanseggianum</i> Rocker & Sehulter	Rio de Janeiro	Phf	SANTOS (2001)
<i>Piper mallicomum</i> Kunth	Rio de Janeiro	Pmo	SANTOS (2001)
<i>Piper affinis hispidinervium</i> C.DC.	Rio de Janeiro	Phi II	BIZZO ( 2001)
<i>Piper solmsianum</i> C.DC.	Rio de Janeiro	Pso	SANTOS (2001)
<i>Piper aduncum</i> L.	São Paulo	Pad VI	NAVICKIENE (2006)

<i>Piper arboretum</i> H.B.K	São Paulo	Par V	NAVICKIENE (2006)
<i>Piper tuberculatum</i> Jaq.	São Paulo	Ptb III	NAVICKIENE (2006)
<i>Piper cernuum</i> Vell.	São Paulo	Pce I	CONSTANTIN (2001)
<i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC.	São Paulo	Prg I	CONSTANTIN (2001)
<i>Piper aduncum</i> L.	Minas Gerais	Pad VII	MESQUITA (2005)
<i>Piper amalago</i>	Minas Gerais	Pml Ia-c	MESQUITA (2005)
<i>Piper cernuum</i> Vell.	Minas Gerais	Pce IIa,b	MESQUITA (2005)
<i>Piper arboreum</i> Yunck	Minas Gerais	Par VIa-c	SANTOS (2001)
<i>Piper hispidum</i> Kunth	Minas Gerais	Phs IIIa-d	MESQUITA (2005)
<i>Piper regnellii</i> (Miq.) C.DC.	Minas Gerais	Prg II	MESQUITA (2005)
<i>Piper submarginatum</i>	Minas Gerais	Psm	MESQUITA (2005)
<i>Piper vicosannum</i>	Minas Gerais	Pvs Ia,b	MESQUITA (2005)
<b>Região Centro-Oeste</b>			
<i>Piper arboreum</i> subsp. <i>Arboreum</i> Aubl.	D. Federal	Par VIIa,b	POTZERNHEIM <sup>a,b</sup> 2006
<i>Piper dilatatum</i> Rich.	D. Federal	Pdl IIIa,b	POTZERNHEIM <sup>a,b</sup> 2006
<i>Piper hispidum</i> Sw.	D. Federal	Phs IVa,b	POTZERNHEIM <sup>a,b</sup> 2006
<i>Piper xylosteoides</i> (Kunth) Steud	D. Federal	Pxy Ia,b	POTZERNHEIM <sup>a,c</sup> 2006
<i>Piper amalago</i> L.	D. Federal	Pml II	POTZERNHEIM <sup>a</sup> 2006
<i>Piper ovatum</i> Vahl.	D. Federal	Pov	POTZERNHEIM <sup>a</sup> 2006
<i>Piper tectonifolium</i> Kunth	D. Federal	Pte	POTZERNHEIM <sup>a</sup> 2006
<b>Região Sul</b>			
<i>Piper cernuum</i> Vell.	Santa Catarina	Pce III	ABREU (2005)
<i>Piper mikanianum</i>	Paraná	Pmi	LEAL (2005)
<i>Piper regnellii</i> (Miq.) C. DC. var. <i>pallescens</i> (C. DC.) Yunck	Paraná	Prg III	PESSINI (2005)

O gráfico (Figura 12) ao lado mostra que os focos de pesquisas com espécies do gênero *Piper*, se concentram principalmente nas regiões norte e sudeste. Possivelmente isto se deve ao fato destas duas regiões apresentarem em seu perfil climático, condições favoráveis ao desenvolvimento de espécies deste



**Figura 12:** Representação gráfica da distribuição das publicações por região no Brasil

gênero. Comparando as regiões norte (floresta amazônica) e sudeste (mata atlântica), ambas apresentam características de florestas tropicais, destacando que no norte o índice pluviométrico e a temperatura são mais altos do que no sudeste.

As demais regiões Nordeste, Centro Oeste e Sul, apesar de apresentar baixa diversidade de espécies apresentam espécies específicas da respectiva região, como por

exemplo, a *Piper xylosteoides*, relatada apenas no Distrito Federal – região centro-oeste (POTZEMHEIN et al., 2006b) e a *Piper mikanianum* relatada apenas no estado do Paraná – região sul (LEAL et al., 2005). No nordeste aparecem as mesmas espécies encontradas em outras regiões, até o momento sem nenhuma exclusividade, porém encontra-se diferenças quanto a composição do óleo essencial, as plantas do nordeste apresentam um perfil de substâncias químicas bem característico com relação aos monoterpenos, como será apresentado mais adiante.

Na Tabela 03, encontra-se a relação da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de *Piper* analisados no Brasil. Para uma melhor apresentação dos dados codificou-se cada espécie de *Piper* estudada. o código identifica a espécie com as três letras iniciais, em seguida identifica o autor em números romanos e por ultimo a amostra de dois ou mais óleos de uma mesma planta de um mesmo autor com letras em seqüência alfabética. Todos os códigos listados na Tabela 03 estão descritos na Tabela 02, coluna 03.

**Tabela 03:** Distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides em óleos essenciais de espécies do gênero *Piper* analisadas no Brasil.

Espécie	Monoterpenos (teor)			Sesquiterpenos (teor)			Fenilpropanóides (teor)		
	folhas	Talos	frutos	folhas	talos	frutos	folhas	talos	frutos
Pad I	57,5	-	-	6,9	-	-	32,8	-	-
Pad IIa	42,8	-	-	2,8	-	-	51,1	-	-
Pad IIb	22,2	-	-	10,6	-	-	56,8	-	-
Pad IIc	7,00	-	-	8,5	-	-	84,6	-	-
Pad IId	3,3	-	-	7	-	-	89,2	-	-
Pad IIIe	3,6	-	-	3,6	-	-	92,3	-	-
Pad IIIf	1,6	-	-	0,4	-	-	97,7	-	-
Pad IV	2,7	-	-	4,2	-	-	90,7	-	-
Pam	-	-	-	93,1	-	-	-	-	-
Par I	69,5	-	-	28,2	-	-	-	-	-
Par II	5,48	-	-	88,26	-	-	-	-	-
Pba	9	-	-	84,3	-	-	-	-	-
Pca	31,7	2,5	-	-	-	-	67	-	-
Pcr I	4,4	-	-	62,8	-	-	0,6	-	-
Pda	-	-	-	93,7	-	-	-	-	-

Pdi	7,9	-	-	1,8	-	-	90,5	-	-
Pdu	-	-	-	88,7	-	-	-	-	-
Phi I	1	-	-	1,2	-	-	95,6	-	-
Pho I	48,3	-	-	34,9	-	-	0,6	-	-
Pho II	6,58	-	-	30,79	-	-	56,97	-	-
Pma I	13,37	10,15	-	17,36	12,86	-	13,28	25,21	-
Pma II	-	-	-	6,7	-	-	83,2	-	-
Ppl	49,6	-	-	49,5	-	-	-	-	-
Pre	18,5	-	-	66	-	-	2,1	-	-
Pvi	70,6	-	-	23,6	-	-	-	-	-
Ptb I	35,8	-	-	60,8	-	-	-	-	-
Ptb IV	-	15,2	19,4	-	77,5	71	-	-	-
Phs I	40,66	-	-	52,87	-	-	-	-	-
Prn	39,1	-	-	60,5	-	-	-	-	-
Pdm	36,5	-	-	58,7	-	-	-	-	-
Pal	3,6	-	-	60,2	-	-	-	-	-
Pcn	25,7	41,11	-	41	41,2	-	-	-	-
Plt	30,7	-	-	59,3	-	-	-	-	-
Ppe I	0,79	-	-	-	-	-	98,78	-	-
Pga	2,43	-	-	47,78	-	-	-	-	-
Phu	1,54	-	-	79,36	-	-	-	-	-
Pad Va	86,9	-	-	10,2	-	-	-	-	-
Pad Vb	90,1	-	-	7,8	-	-	-	-	-
Pad Vc	87	-	-	8,6	-	-	-	-	-
Pad Vd	80,2	-	-	17,9	-	-	-	-	-
Pad Ve	81,7	-	-	15	-	-	-	-	-
Pad Vf	83,4	-	-	16,3	-	-	-	-	-
Par III	-	-	-	88,49	-	-	-	-	-
Pcr II	74,55	-	-	23,07	-	-	-	-	-
Pma III	0,23	-	-	60,99	48,16	68,11	38,78	51,84	31,89
Ptb II	11	-	-	81,07	-	-	-	-	-
Pdl I	42,14	-	-	54,19	-	-	-	-	-
Pad VI	45,2	85,1	66,9	52	10,6	24,5	-	-	-
Pad VII	27,9	--	-	54,6	-	-	-	-	-
Barração	4,28	-	-	65,85	-	-	-	-	-
Par V	3	22,6	25,6	94,4	75,2	72,2	-	-	-
Par VIa	8,3			68,5	-	-	-	-	-
Par VIb	0,1			75,2	-	-	-	-	-
Par VIc	0,9			63,2	-	-	-	-	-



Phi II	0,8	-	-	3,9	-	-	94,2	-	-
Ptb III	36	82,3	62,1	63,1	15,4	33,33	-	-	-
Phs II	1,65	-	-	70,13	-	-	-	-	-
Phs IIIa	37	-	-	45,8	-	-	-	-	-
Phs IIIb	27,8	-	-	51	-	-	-	-	-
Phs IIIc	10,7	-	-	73,2	-	-	-	-	-
Phs III d	8,3	-	-	51	-	-	-	-	-
Pdl II	63,06	-	-	12,02	-	-	-	-	-
Pmp	22,48	-	-	34,89	-	-	-	-	-
Pgo	2,25	-	-	84,85	-	-	-	-	-
Phf	-	-	-	90,18	-	-	-	-	-
Pmo	-	-	-	60,33	-	-	-	-	-
Pso	30,23	-	-	0,92	-	-	-	-	-
Pce I	18,88	-	-	80,03	-	-	-	-	-
Pce IIa	7,2	-	-	81,9	-	-	-	-	-
Pce IIb	10,8	-	-	72,6	-	-	-	-	-
Prg I	78,9	-	-	19,9	-	-	-	-	-
Prg II	0,2	-	-	79,4	-	-	-	-	-
Pml-Ia	19,4	-	-	69,6	-	-	-	-	-
Pml-Ib	14,3	-	-	74,5	-	-	-	-	-
Pml-Ic	15,6	-	-	70,2	-	-	-	-	-
Psm	40,1	-	-	49,3	-	-	-	-	-
Pvs Ia	68,3	-	-	25	-	-	-	-	-
Pvs Ib	79,4	-	-	10,9	-	-	-	-	-
Par VIIa	2	-	-	68,2	-	-	-	-	-
Par VIIb	0,9	-	-	74,9	-	-	-	-	-
Phs IVa	49,2	-	-	24,7	-	-	-	-	-
Phs IVb	42,7	-	-	30,7	-	-	-	-	-
Pdl IIIa	30,4	-	-	65,1	-	-	-	-	-
Pdl IIIb	29	-	-	58,3	-	-	-	-	-
Pml-II	60,6	-	-	17,4	-	-	-	-	-
Pov	44,5	-	-	49,4	-	-	-	-	-
Pxy Ia	92,2	-	-	4,6	-	-	-	-	-
Pxy Ib	95,5	-	-	4,5	-	-	-	-	-
conv. de conv. de									
Pte	28,1	-	-	28,7	-	-	-	-	-
Pce III	7,1	-	-	83,5	-	-	-	-	-
Prg III	70	-	-	-	-	-	-	-	-
Pmi	0,9	-	-	98,6	-	-	-	-	-

Estas informações foram representadas graficamente e apresentadas a seguir.

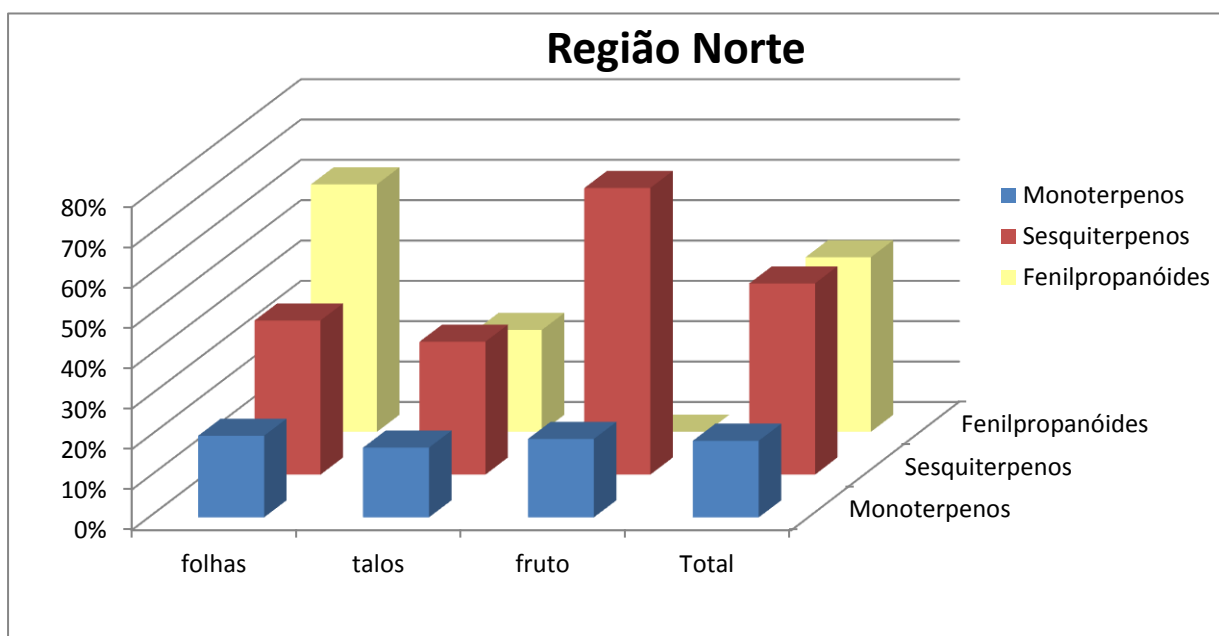
Existem variáveis limitantes á análise estatística destes valores e devido a este fato, este trabalho irá se restringir a representação gráfica da média dos valores apresentados acima diferenciados por região. A baixa diversidade de espécies pesquisadas e consequentemente o baixo número de estudos nas regiões nordeste, centro Oeste e Sul, são fatores que causam grande desvio na media final. Outro fator de relevância é que a maioria dos trabalhos não apresenta resultados de todas as partes das plantas, sendo que os estudos das folhas predominam na literatura em detrimento ao número reduzido de publicações de talos e frutos, trazendo consequências para a média final destas partes, porem não comprometeu uma análise de modo geral da observação da distribuição de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nas espécies do gênero *Piper* no Brasil.

Na região norte foram realizados 15 estudos de 26 espécies desde 1987 até 2008. O estado de Rondônia aparece com 13 das 26 espécies estudadas na região norte e se destaca no critério biodiversidade, pelo menos no número de espécies estudadas. A Amazônia nesta porção ocidental ainda é muito pouco conhecida e pouco estudada, sendo possível que o estado do Amazonas, que é tão grande, detenha uma variedade de plantas bem maior do que as outras regiões, apenas ainda não foram encontradas ou descobertas.

Dentre as plantas pesquisadas na região norte apenas três espécies tiveram seus talos estudados (*Piper callosum* – Amazonas; *Piper marginatum* – Amazonas; *Piper carniconnectivum* – Rondônia) e apenas uma teve os frutos estudados (*Piper tuberculatum* – Rondônia).

Este montante de estudos dos óleos essenciais dos talos e frutos é muito pequeno e possivelmente irá gerar desvios nas medias finais dos teores de substâncias que serão desconsiderados, pois este trabalho visa apenas uma análise geral da distribuição de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de plantas do gênero *Piper*, sendo assim as três espécies que tiveram seus talos estudados, irão representar a media da incidência destas substâncias nos talos, e a *Piper tuberculatum* (Ptb IV) irá representar nos frutos.

O gráfico da Figura 13 mostra que na região norte o perfil de distribuição de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides se caracteriza por apresentar nas folhas um alto teor de fenilpropanóides em relação as outras duas classes de substâncias, também pode-se observar que não foi detectado a presença de fenilpropanóides no óleo essencial dos frutos e que o teor nos talos caiu pela metade em relação as folhas, em contrapartida os frutos apresentam um alto teor de sesquiterpenos, nos talos e folhas este teor cai consideravelmente. Com relação ao teor de monoterpenos as espécies demonstram certa semelhança (teor padrão) em qualquer uma das partes (folhas, talos e frutos).



**Figura 13:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero *Piper* na região norte.

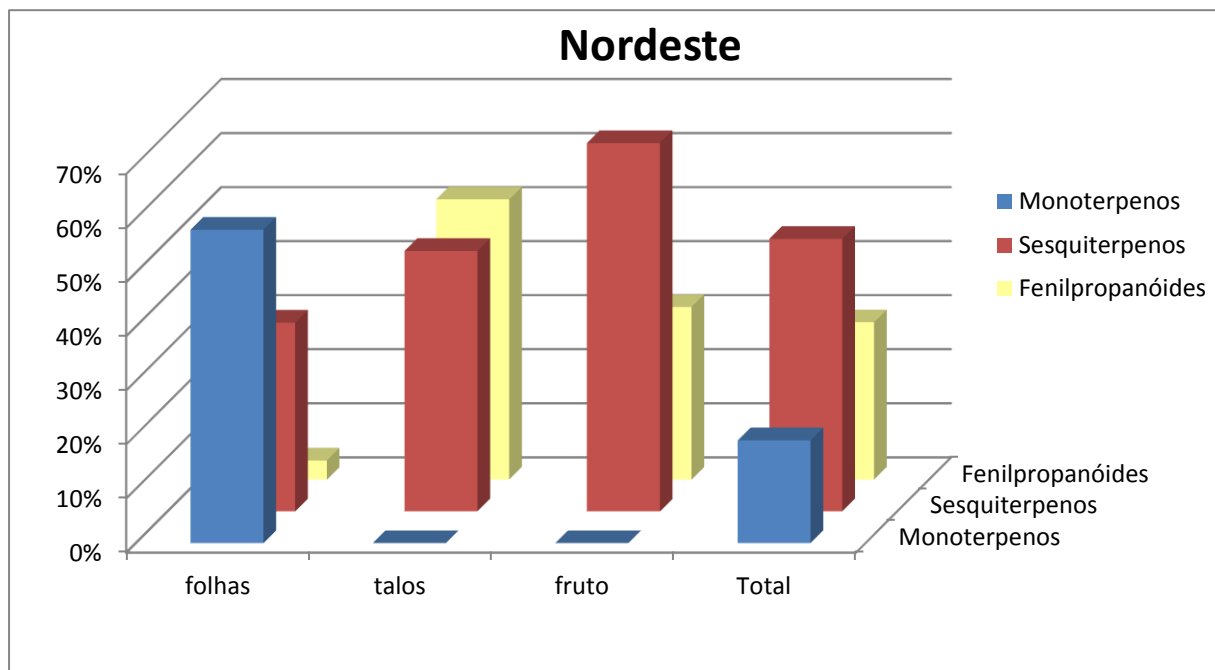
Pode-se observar que os teores de sesquiterpenos e fenilpropanóides são inversamente proporcionais nas folhas, talos e frutos, ou seja, quanto maior o teor de fenilpropanóides menor o teor de sesquiterpenos e vice-versa, porém ressalta-se que o teor de sesquiterpenos nas três partes é expressivo o que significa que estas substâncias ocorrem neste gênero independentemente dos fatores bióticos e abióticos, e isto expressa a importância desta classe de metabólitos neste gênero. No geral as plantas do gênero *Piper* oriundas da região norte produzem altos teores de sesquiterpenos e fenilpropanóides em seus óleos essenciais em relação a monoterpenos.

Na região nordeste foram realizados 3 estudos com 6 espécies de plantas do gênero *Piper*, sendo quatro espécies estudadas no Ceará e 2 espécies em Pernambuco. Este total de estudos é muito pequeno comparado com a dimensão da região nordeste, as possibilidades de ocorrência de outras espécies do gênero *Piper* são eminentes. Este estudo irá considerar que estes dois estados representem a região nordeste, fica evidente a necessidade de mais estudos para uma melhor representatividade da análise estatística dos dados. Das seis espécies estudadas apenas uma (*Piper marginatum* – Pernambuco) teve seus talos e frutos analisados além das folhas, e está irá representar a distribuição destas substâncias nos talos e frutos de espécies do gênero *Piper* na região nordeste.

A Figura 14 mostra que diferentemente da região norte, no nordeste as espécies estudadas apresentam um alto teor de monoterpenos nas folhas, os talos e frutos não exibem teor algum de monoterpenos.

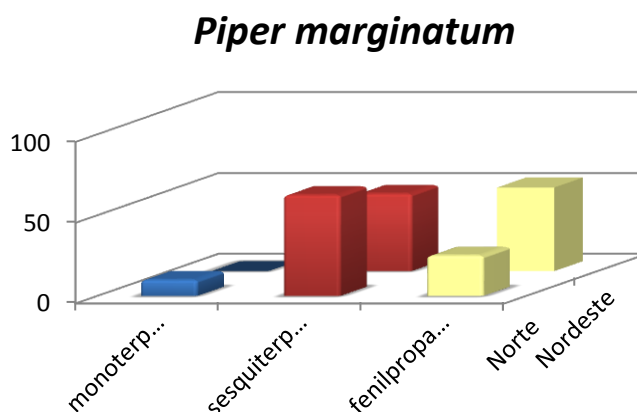
O nordeste apresenta um perfil de distribuição de sesquiterpenos nas diferentes partes da planta (folhas, talos e frutos) semelhante ao perfil da região norte, ou seja, o teor nas folhas e talos é expressivamente menor em relação aos frutos. Com relação ao teor de fenilpropanóides desta vez os talos se destacam mais abundantes, na sequência os frutos apresentam um teor intermediário e por último as folhas com o menor teor de fenilpropanóide, apresentando um perfil de distribuição contrário em relação a região norte. Para determinar quais seriam os fatores determinantes nesta relação de inversão entre o óleo essencial das folhas do norte e nordeste seriam necessárias mais informações além dos constituintes do óleo essencial.

informações sobre fatores bióticos e abióticos a qual as plantas estão submetidas, para assim comparar a variação destes aspectos entre si e possivelmente compreender esta dinâmica.



**Figura 14:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero *Piper* na região nordeste.

No geral as plantas do gênero *Piper* oriundas da região nordeste, apresentam um perfil de distribuição predominante em monoterpenos e sesquiterpenos. É interessante o fato de que a espécie *Piper marginatum* não apresenta monoterpenos na constituição do óleo essencial dos talos, conforme ilustra a Figura 15, visto que um estudo feito com a mesma espécie na região norte apresentou um teor com cerca de 10% mais de monoterpenos. O teor de sesquiterpenos nos frutos das plantas da região norte foi de (62,8 %), e é ligeiramente maior do que no nordeste (48,16 %). O teor de fenilpropanóides nos frutos é o que realmente chama



**Figura 15:** Representação grafica da comparação da composição do óleo essencial de *P. marginatum* nas regiões norte e nordeste.

atenção nas espécies residente no nordeste (51,84 %), o dobro em relação à região norte (25,21%).

Existe uma grande variedade de plantas do gênero *Piper* na região sudeste, subentende-se que seja porque as regiões de predominância de Mata Atlântica se assemelham muito com a Floresta Amazônica em alguns aspectos. Esses aspectos fazem relação com clima, solo e outros fatores, estabelecendo um habitat propício ao desenvolvimento destas espécies de caráter tropical.

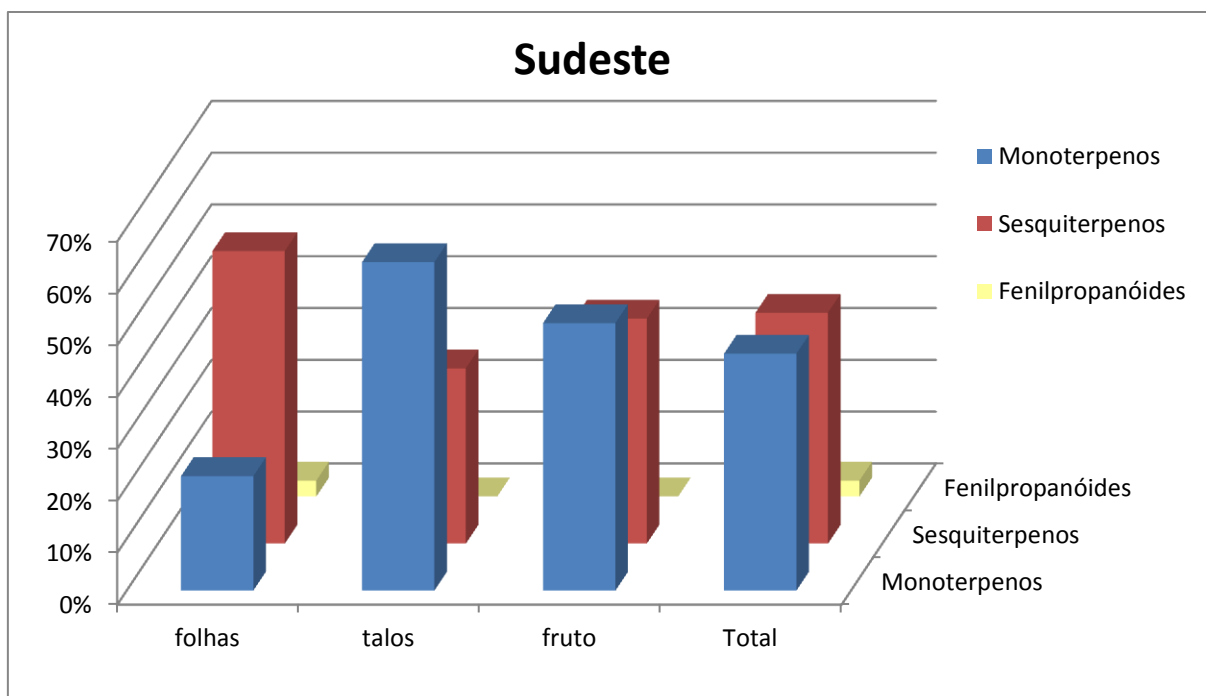
Foram publicados 05 trabalhos relacionados a 18 espécies incidentes na região sudeste. Estas espécies estão distribuídas entre os estados de São Paulo (05 espécies), Rio de Janeiro (10 espécies) e Minas Gerais (08 espécies), sendo que das cinco espécies do estado de São Paulo, 04 são incidentes em Minas Gerais. Ficando o Rio de Janeiro com a maior Biodiversidade de espécies do gênero *Piper* que tiveram seus óleos essenciais pesquisados desta região.

Os talos e frutos foram estudados em apenas três trabalhos com três espécies do estado de São Paulo (*Piper aduncum*, *Piper arboreum* e *Piper tuberculatum*), as médias dos percentuais de cada classe de substância das três espécies irão representar a distribuição destas substâncias em plantas do gênero *Piper* na região sudeste, conforme representa o gráfico 05. Ambas as partes apresentaram um alto teor de monoterpenos em relação às outras classes de substâncias.

As plantas do sudeste apresentaram um perfil na distribuição dos metabólitos dos óleos essenciais nos talos e frutos inverso em relação ao nordeste. A Figura 16 apresenta o perfil de distribuição de metabólitos. Algum fator pode estar associado ao fato de no sudeste as plantas preferirem produzir monoterpenos ao invés de fenilpropanóides como ocorre no nordeste.

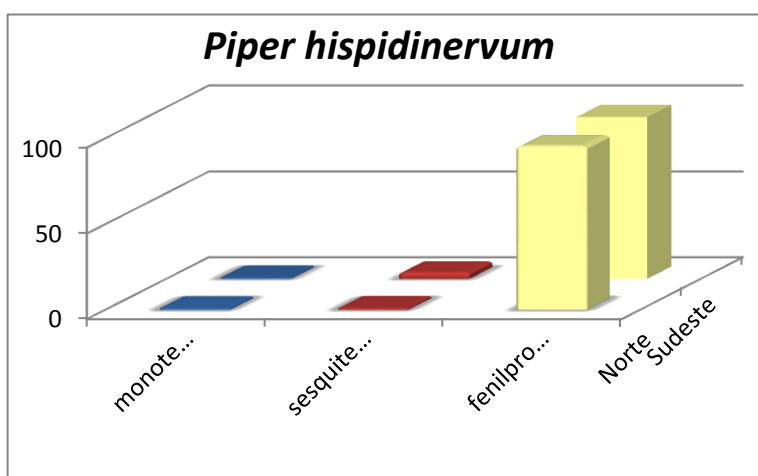
Nas folhas é evidente que a classe predominante é de sesquiterpenos, diferentemente dos talos e frutos, que apresentam maioria de monoterpenos. O teor de fenilpropanóides em espécies desta região está resumido a um pequeno percentual insignificante nas folhas, apenas uma das espécies estudadas (*Piper affinis hispidinervum* – Rio de Janeiro), apresentou um teor de 94,2% de fenilpropanóides nas folhas.

É interessante ressaltar que apesar da semelhança com clima tropical da floresta amazônica, as plantas desta região são pobres em fenilpropanóides



**Figura 16:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero *Piper* na região sudeste.

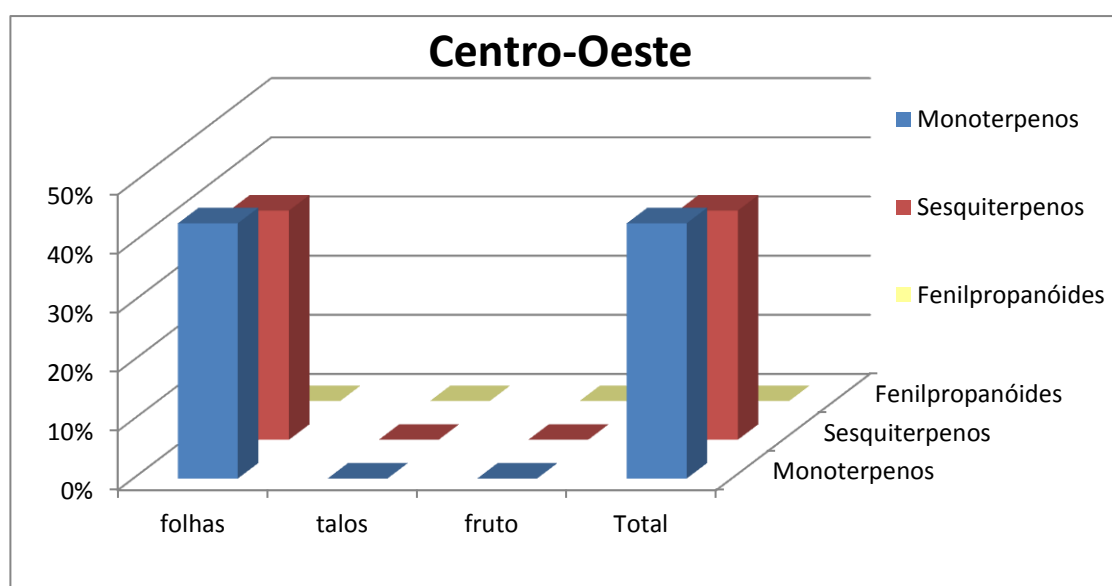
A espécie *Piper hispidinervum* foi estudada nas regiões norte e sudeste, e como mostra a Figura 17, a distribuição das três classes de substâncias é muito semelhante, praticamente são iguais nas duas regiões. Apresentam um perfil bem definido de um altíssimo teor de fenilpropanóides, com um percentual muito pequeno de sesquiterpenos e um percentual menor ainda (traços) de monoterpenos. Esta espécie é a exceção no perfil de distribuição de substâncias no sudeste, é de se esperar que a mesma mantenha este perfil em qualquer região em que for encontrada.



**Figura 17:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* nas regiões norte e sudeste.

O que chama atenção na Figura 16 é o teor de sesquiterpenos nos talos e frutos. Mesmo com a ausência de fenilpropanóides os teores de sesquiterpenos são menores do que os teores de monoterpenos, ficando, os sesquiterpenos, ligeiramente em desvantagem, e isto não ocorre nem no norte e nem no nordeste. O que destaca certa semelhança com o perfil das plantas do centro oeste como se pode ver a seguir na Figura 18. Dentre as espécies que tiveram seus talos e frutos estudados na região sudeste, nenhuma apresentou na constituição de seu óleo essencial a presença de fenilpropanóides.

Na região centro-oeste foi realizado 03 estudos com sete espécies diferentes, todas com origem no Distrito Federal. Das sete espécies estudadas três incidem somente nesta região (*Piper xylosteoides*; *Piper ovatum*; *Piper tectonifolium*). Nenhuma das espécies teve seus talos ou frutos pesquisados, somente as folhas foram investigadas, como mostra a Figura 18, sendo assim, não será possível estabelecer um perfil de distribuição nestas partes para região centro-oeste. Este total de estudos é muito pequeno comparado com a dimensão da região centro-oeste, as possibilidades de ocorrência de outras espécies do gênero *Piper* são eminentes, porém este estudo irá considerar que o Distrito Federal represente a região Centro-Oeste. Fica registrado a necessidade da realização de mais pesquisas para uma melhor representatividade dos dados, para assim definirem-se como estas classes de substâncias se distribuem nas espécies do centro-oeste.



**Figura 18:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero *Piper* na região centro-oeste.



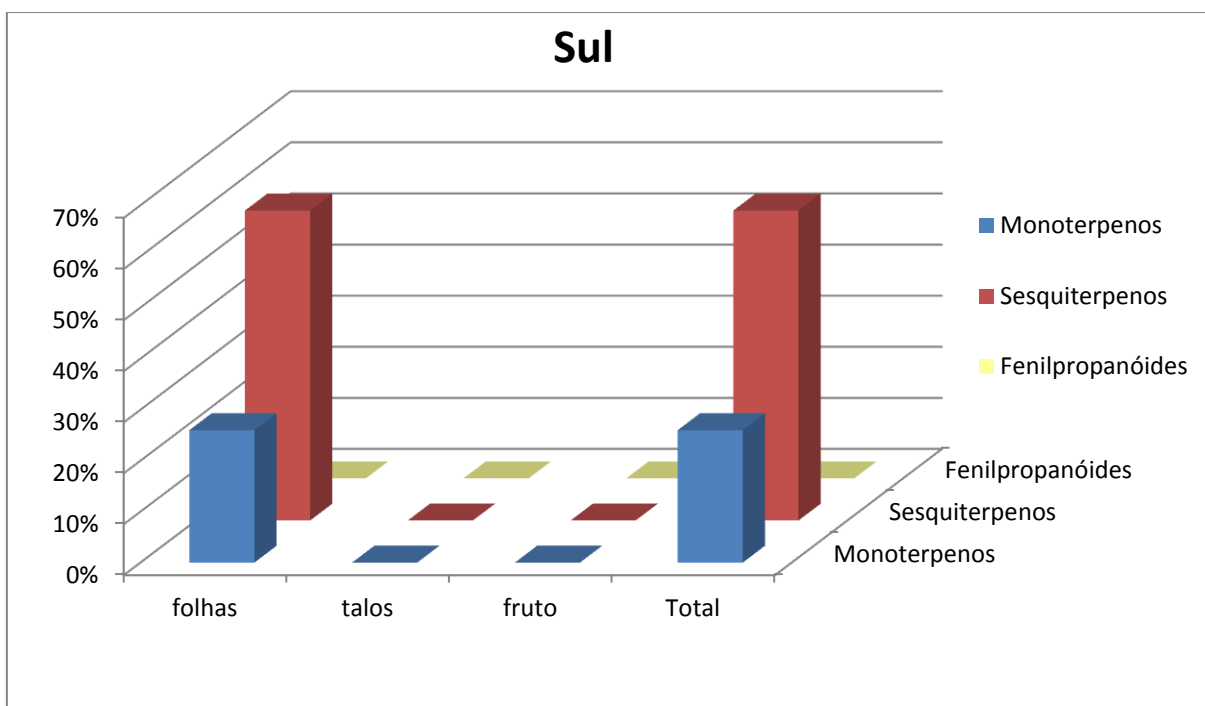
Na região centro-oeste as plantas produzem mais monoterpenos nas folhas do que em qualquer outra região do país, conforme ilustra a Figura 18, esta é uma característica muito parecida com as espécies do sudeste nos óleos dos talos e frutos. O teor de sesquiterpenos também é alto e quase se equipara com os monoterpenos, nenhuma das espécies apresentaram fenilpropanóides.

É possível que existam fatores associados a esta semelhança das plantas do centro-oeste e sudeste em produzir muito monoterpenos, mas para determiná-los é necessário conhecer as semelhanças e diferenças de ambas as regiões em relação ao habitat e as condições em que se encontra a planta. Porém os trabalhos apontam destaque somente para a constituição química do óleo essencial e não contemplam estas informações.

A região sul está representada por apenas três trabalhos referentes a três espécies, sendo que uma delas (*Piper mikanianum*) é citada somente nesta região. Nenhuma das espécies teve seus talos ou frutos pesquisados, somente as folhas foram investigadas, sendo assim, não será possível estabelecer um perfil de distribuição nestas partes. Estes três trabalhos sobre o óleo essencial das folhas destas espécies também não são suficientes para traçar o perfil da constituição destes óleos, devido a baixa representatividade estatística, porém para efeitos qualitativos este trabalho irá considerar estes três trabalhos como representantes da região sul.

Ao contrário da região centro-oeste, a região sul apresenta um teor de sesquiterpenos bem maior do que monoterpenos, como mostra a Figura 19. Para conseguir-se conhecer os fatores envolvidos que estariam favorecendo a planta a aumentar a produção de sesquiterpenos em relação a monoterpenos, seria necessário conhecer as semelhanças e diferenças de ambas as regiões em relação ao habitat e as condições em que se encontra a planta, porém os trabalhos apontam destaque somente para a constituição química do óleo essencial e não contemplam estas informações.

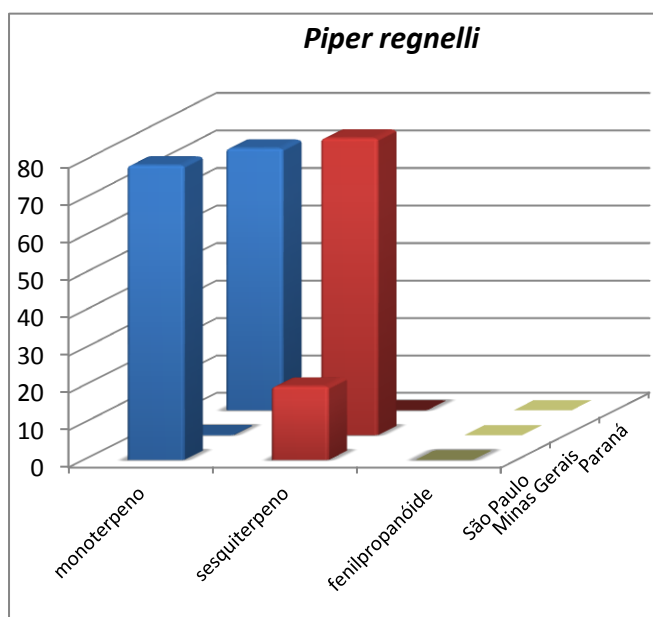
Supõe-se que ambas as regiões Centro-Oeste e Sul, apresentam baixa umidade relativa como fator de semelhança e como diferença o fator de destaque entre estas duas regiões é a temperatura, sendo assim, supõe-se que a temperatura seja um dos fatores que levaram as plantas do sul a preferir produzir mais sesquiterpenos do que monoterpenos.



**Figura 19:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das espécies do gênero *Piper* na região sul.

Das três espécies pesquisadas, a *Piper regnelli* apresentou somente monoterpenos em sua constituição. Estudos realizados com esta espécie na região sudeste, nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, ilustrados na Figura 20, mostraram que, em São Paulo ela mantém o mesmo perfil do Paraná

quanto ao teor de monoterpenos e apresenta também certo teor de sesquiterpenos. Entretanto, quando se observa esta espécie no estado de Minas Gerais depara-se com uma nova situação, agora a constituição do óleo essencial é concentrada somente em sesquiterpenos e em nenhum dos três estados ela apresentou fenilpropanóides. É interessante observar que São Paulo está exatamente entre os outros dois estados e por isso apresentou em seu

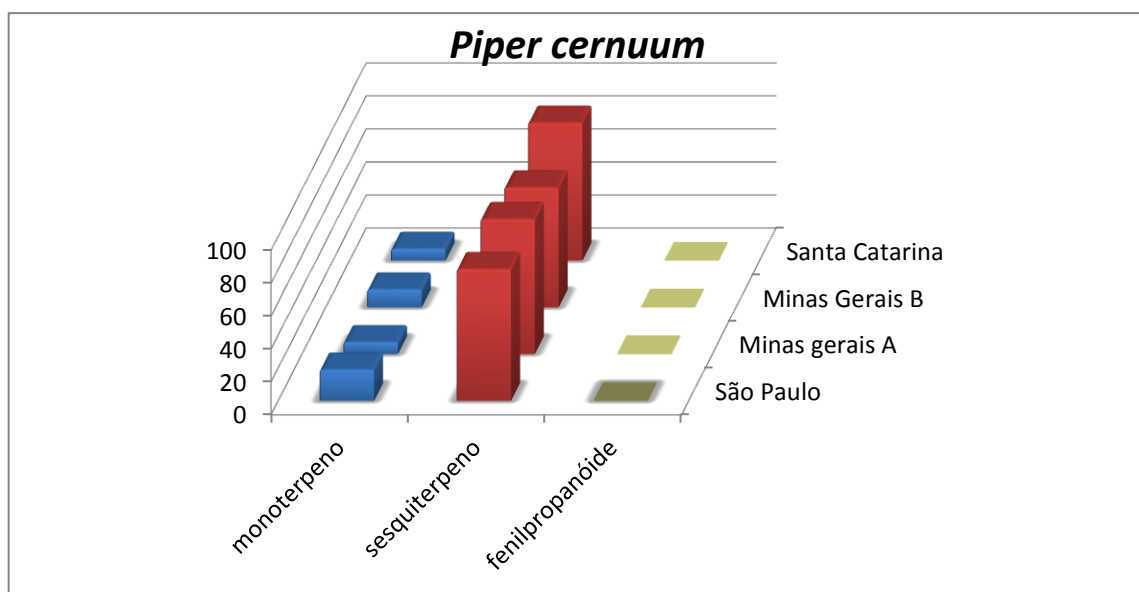


**Figura 20:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de *Piper regnelli* nas regiões sul e sudeste.

óleo essencial ambas as classes de substâncias, conforme descrito na Figura 20.

Possivelmente pode-se relacionar este fenômeno a adaptações climáticas e geológicas (temperatura, umidade, solo e outros) da planta visto que apesar dos três estados estarem inseridos no mesmo perfil climático subtropical, as diferenças na sazonalidade e no solo possivelmente pode ser os fatores que melhor justificam este fenômeno.

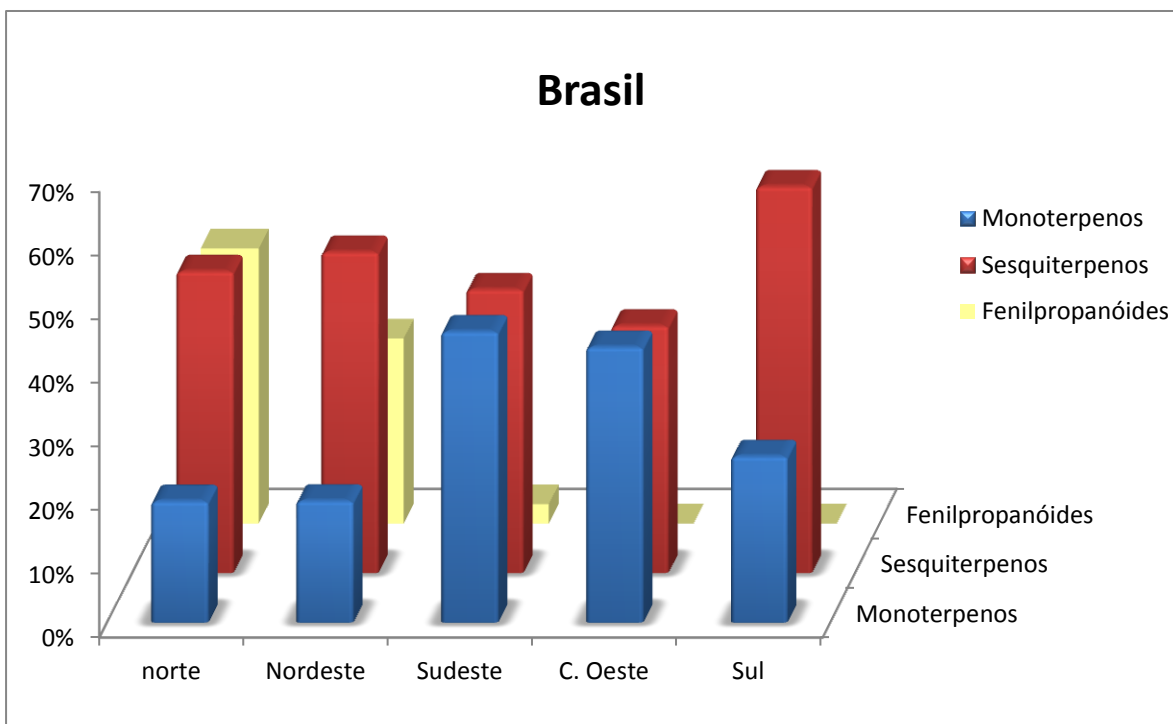
Porem isto não é um padrão geral aplicado a todas as espécies, visto que a *Piper cernuum*, estudada no estado de Santa Catarina, também foi estudada nos estados de Minas Gerais e de São Paulo. Porem desta vez manteve o seu perfil na distribuição das classes de substância em seus óleos essenciais nos três estados. Todas as classes se mantiveram constantes, com leves flutuações e é interessante evidenciar que não ocorreu o aparecimento de fenilpropanóides em nenhum dos locais pesquisados como se observa na Figura 21.



**Figura 21:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de *Piper cernuum* nas cidades de São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina.

A falta de uma padronização na publicação de estudos da composição química de óleos essenciais torna estes dados quase que obsoletos. Não adianta conhecer a composição química dos óleos essenciais sem conhecer as condições a qual a planta estava submetida para que ela produzisse tal composição. Pode ocorrer que uma planta produza determinado metabólito devido a interação dela com o meio a qual ela está inserida, e se não se conhece estas condições pode acontecer de não ser possível encontrar novamente determinado metabólito na composição do óleo essencial da planta.

A distribuição de monoterpenos, sesquiterpenos e monoterpenos nos óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* no Brasil é bem distinta de acordo com a região como apresenta a Figura 22. Pode-se notar que na região norte é onde se observa o maior teor de fenilpropanóides e o menor teor de monoterpenos respectivamente.



**Figura 22:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* nas cinco regiões do Brasil.

A Produção destes ocorre principalmente nas folhas diferentemente do nordeste que tem a produção de fenilpropanóides acentuado nos talos.

Na região nordeste é marcante a produção de monoterpenos, apesar disto os estudos com plantas do gênero *Piper* desta região dos talos e frutos não apresentaram a presença de monoterpenos, se concentrado praticamente nas folhas. Semelhante ao que ocorre no centro-oeste e que de certa forma possuem biomas bem semelhantes quanto aos fatores climáticos (predominantemente quente e seco) e vegetativos (característico de cerrado), sendo estas condições podem estar associadas de forma semelhante entre as duas regiões na produção de monoterpenos.

A região sudeste e o centro-oeste em termos de semelhança são os mais parecidos entre si, em relação os teores elevados de monoterpenos e sesquiterpenos. Das plantas

pesquisadas no sudeste apenas uma apresentou fenilpropanóides, e foi em teor relativamente elevado e equiparado ao teor da mesma no norte.

A região Sul destaca-se apenas pelo elevado teor de sesquiterpenos. O número de trabalhos na região sul é muito pequeno e isto dificulta qualquer previsão ou até mesmo comparação com outras situações.

Pode-se observar analisando a Figura 22 que com relação a distribuição de fenilpropanóides no Brasil, supõe-se que quanto mais quente e úmido maior é a produção destes metabólitos, regiões norte e nordeste confirmam esta evidencia, apesar do nordeste ter predominância do bioma de cerrado, o litoral é marcado por um clima de características tropicais (Mata Atlântica) e os estudos com plantas do nordeste foram realizados aparentemente com indivíduos inseridos em habitats próximo ao litoral.

Em relação a distribuição nacional de sesquiterpenos, estes metabólitos estão presentes de forma marcante em todas as regiões principalmente na região sul e possivelmente alguns metabólitos desta classe ajam como marcadores químico-taxonômico deste gênero.

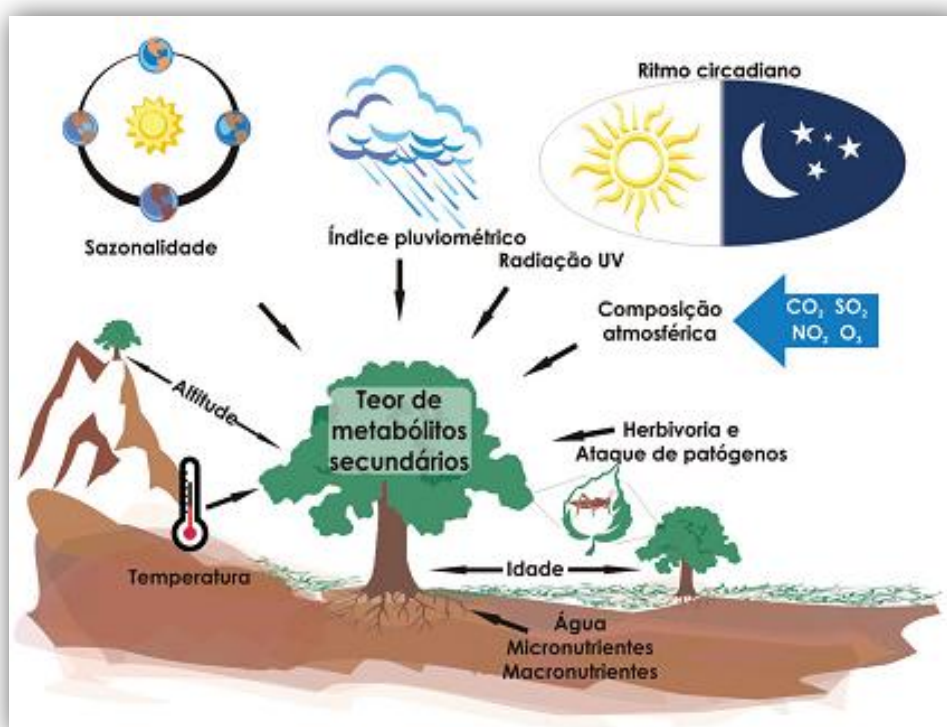
Os monoterpenos encontram-se bem distribuídos nas cinco regiões e sem a descrição das diferenças e semelhanças a qual as plantas estão submetidas, fica difícil e praticamente impossível associar estas variações a fatores de indução e inibição na produção destes metabólitos. Diante destas evidencias, sugere-se que aparentemente quanto mais seco e quente, maior a produção destes metabólitos, as regiões, sudeste e centro-oeste aparentemente representam esta evidência.

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

Estas variações na composição de óleos essenciais são geralmente norteadas por fatores resultantes da interação da planta com o meio a qual ela se desenvolve, estas interações possuem mecanismos de controle a níveis genéticos, estes mecanismos podem sofrer alterações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Sendo assim os metabólitos secundários presente na composição destes óleos essenciais representam uma interface química entre as plantas e o ambiente que a cerca,

deste modo sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2004).

Dentre os fatores existentes muitas vezes apresentam correlações entre si, e não atuam individualmente, influenciando em conjunto no metabolismo secundário como, por exemplo, temperatura e altitude, quanto maior a altitude é relativamente menor a temperatura (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Os fatores associados estão representados na Figura 23.



Fonte: (GOBBO-NETO & LOPES., 2007)

**Figura 23:** Principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários em plantas.

Para ser possível realizar previsões sobre quais fatores estariam envolvidos na variabilidade de metabólitos presente no óleo essencial em espécies do gênero *Piper*, seria necessário desenvolver um modelo padrão de requisitos destes fatores que fosse publicado juntamente com a composição do óleo essencial. Desta forma seria possível comparar a composição do óleo essencial com o perfil condicional dos fatores a qual a planta está sendo submetida, e isto facilitaria a busca pelo metabólito de interesse.

Durante a execução deste trabalho, pode-se observar que os artigos que publicam resultados sobre óleo essencial tanto sobre este gênero quanto sobre outros gêneros e

espécies, acabam enfocando muito os constituintes da planta e acabam por esquecer da planta em si, e fatores climáticos, geológicos e bióticos passam despercebidos, esquecendo eles que estas informações são cruciais para a elucidação de situações como a apresentada na Figura 20 da *Piper regnelli*, e isto é consequência da falta de uma padronização destes estudos tanto a nível nacional como a nível internacional, onde uma vez que todos os trabalhos apresentassem estes fatores que envolvem a planta no seu habitat, seria possível prever e elucidar quais fatores seriam responsáveis por ativar na planta o gene que regula a produção ou inibição da produção de determinados metabólitos presente em sua constituição.

É necessário realizar esta discussão da necessidade de uma padronização destes estudos, para num futuro ser possível cruzar estas informações com outras linhas de pesquisa, como por exemplo, utilizando de ferramentas da biologia molecular seria possível investigar o gene que estaria ativando ou desativando a produção destes metabólitos secundários de interesse, com o passar do tempo o conhecimento acumulado sobre a interação destes fatores (fatores de caráter multidisciplinar, climáticos, geológicos, bióticos, fisiológicos) com a planta de interesse, ajudariam a moldar e aperfeiçoar os modelos de cultivos a um nível muito mais elevado do que o atual, gerando possibilidades que hoje seriam muito cobiçadas principalmente na indústria farmacêutica, como por exemplo extrair em quantidade um fitofármaco 100% natural, que antes era produzido pela planta numa quantidade muito baixa, mas que com a evolução destes estudos seria possível induzir a produção deste fitofármaco a níveis consideráveis, resultaria em remédios mais baratos e saudáveis do que os produzidos com fármacos sintéticos.

A forma com que estão ocorrendo estes estudos sobre óleos essenciais atualmente, quando analisada de um ponto de vista individual possui suas contribuições no meio científico, porém quando analisadas no coletivo não possuem sentido algum, visto que não é possível concluir que fatores estão atuando e interagindo com a planta para que ela responda da forma como se observou no estudo.

Todos os fatores são importantes quando comparamos os trabalhos, fatores como possíveis insetos que de alguma forma sempre são encontrados em determinadas espécies, ou ainda espécies de plantas que sempre são encontradas onde a planta de interesse está ocorrendo, a incidência de luz sobre a planta, a pluviosidade local, ações antrópicas,

poluição local, tipo de água encontrada na região, variações geológicas podem interferir na retenção de água no solo, biodisponibilidade de minerais e uma série de outros fatores que quando alterados podem induzir determinados efeitos no metabolismo secundário das plantas.

## **4.2 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL**

4.2.1 Identificação dos compostos químicos presentes no óleo essencial de *P.hispidum*



A amostra de óleo essencial obtida das folhas foi chamada de **OEPHF**, significa a abreviação de (óleo essencial de *P. hispidum*; Folhas), obteve-se 2,2 g de óleo essencial de um total de 2,9 Kg de folhas frescas, isto é, um rendimento de extração 0,55 mL/Kg de óleo essencial.

O Cromatograma do óleo essencial das folhas Figura 24, apresenta uma boa variedade de substancias com uma considerável quantidade de picos, frente a esta variedade quatro picos apresentam destaque com relação a sua intensidade, com teores superiores a 5%, o pico mais intenso corresponde a 21,77% do total do óleo essencial com tempo de retenção de (TR 25,27 min), o segundo corresponde a 16,88% (TR 27,14 min), o terceiro 7,9% (TR 26,65 min) e o quarto com 5,33% (TR 24,23 min)

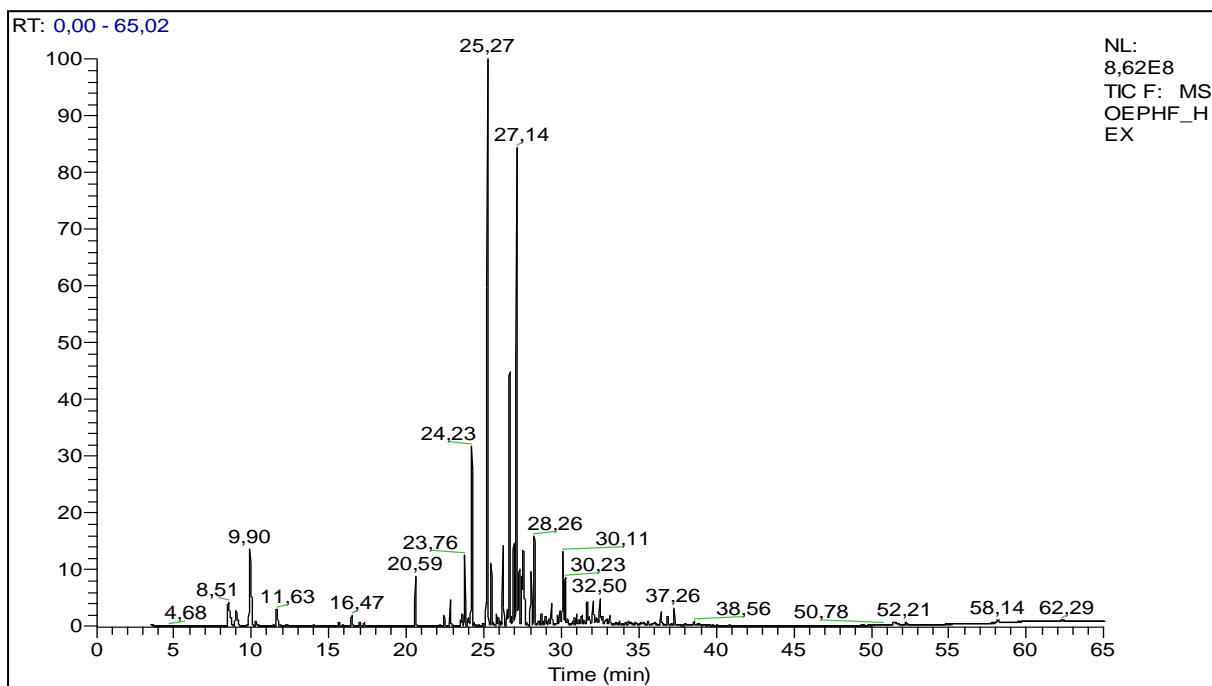
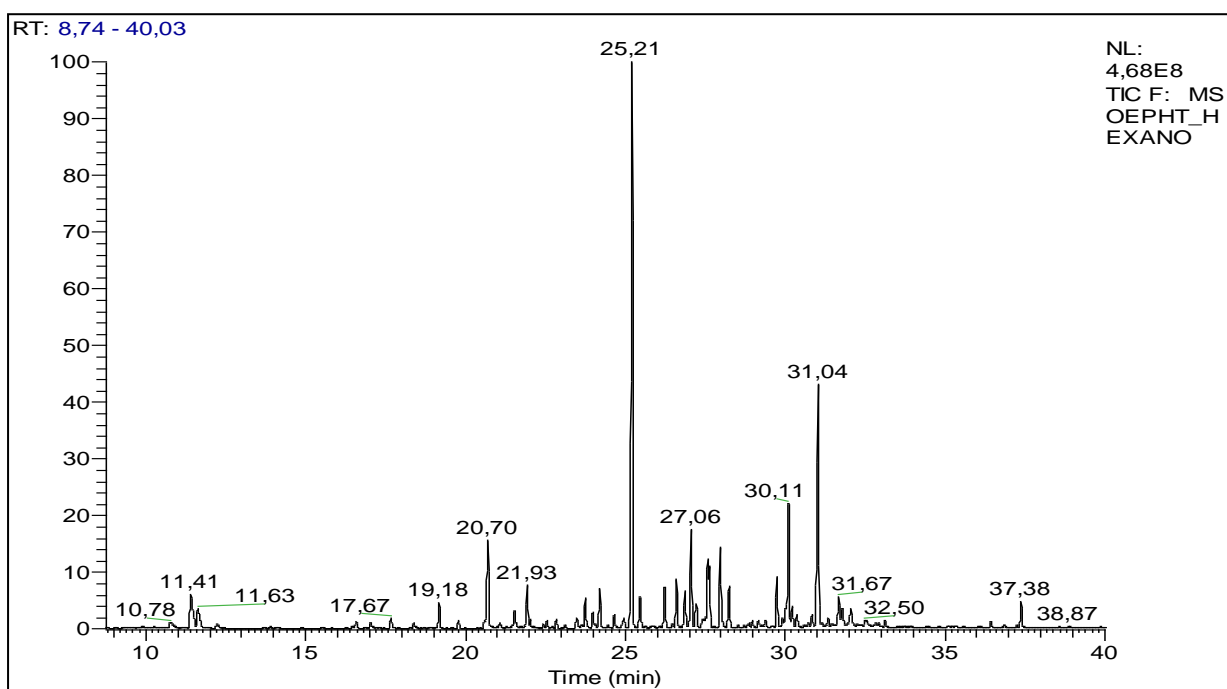


Figura 24 : Cromatograma de OEPHF

A identificação destes constituintes e dos componentes minoritários foi feita por comparação dos espectros de massa de cada substância com padrões arquivados no banco de espectros do computador. Também foram calculados os índices Kovats de cada um dos picos para observação e comparação visual dos espectros obtidos com espectros de catálogos (ADAMS, 2001). Desta forma identificou-se cerca de 82,12% dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas sendo 9,16% monoterpenos, 71,68% sesquiterpenos e 1,28% fenilpropanóides apresentados na Tabela 04 com seus respectivos percentuais. Os compostos majoritários identificados são (E)-cariofileno **[21]** (TR 25,27 min), germacreno D

[30] (TR 27,14 min), Ishwarano [27] (TR 26,65 min) e o  $\beta$ -elemeno [20] (TR 24,23 min). A amostra de óleo essencial obtida dos talos foi chamada de OEPHT (significa a abreviação de óleo essencial de *P. hispidum*; Talos), obteve-se 1,5 g de óleo essencial a partir de 2,5 Kg de talos frescos, isto é, um rendimento de extração 0,16 mL/Kg de óleo essencial.

O Cromatograma do óleo essencial dos Talos Figura 25, apresenta considerável quantidade de picos representando uma boa variedade de substancias, frente a esta variedade quatro picos apresentam destaque com relação a sua intensidade, com teores superiores a 5%, o pico mais intenso corresponde a 22,63% do total do óleo essencial com tempo de retenção de (TR 25,21 min), o segundo corresponde a 10,63% (TR 31,04 min), o terceiro 7,18% (TR 30,11 min) e o quarto com 5,43% (TR 27,59 min).



**Figura 25:** Cromatograma de OEPHT

Identificou-se cerca de 77,32% dos constituintes químicos do óleo essencial dos talos sendo 5,25% monoterpenos, 57,16% sesquiterpenos e 14,91% fenilpropanóides apresentados na Tabela 04 com seus respectivos percentuais. Os compostos majoritários identificados são (E)-cariofileno [21] (TR 25,21 min), dilapiol [45] (TR 31,04 min), óxido de cariofileno [43] (TR 30,11 min) e o  $\alpha$ -muuroлено [32] (TR 27,59 min). Verificou-se que estes resultados são inéditos, sendo esta a primeira vez que se relata a composição do óleo essencial dos talos de *P. hispidum*. Acarretando uma significativa contribuição no conhecimento químico desta espécie.

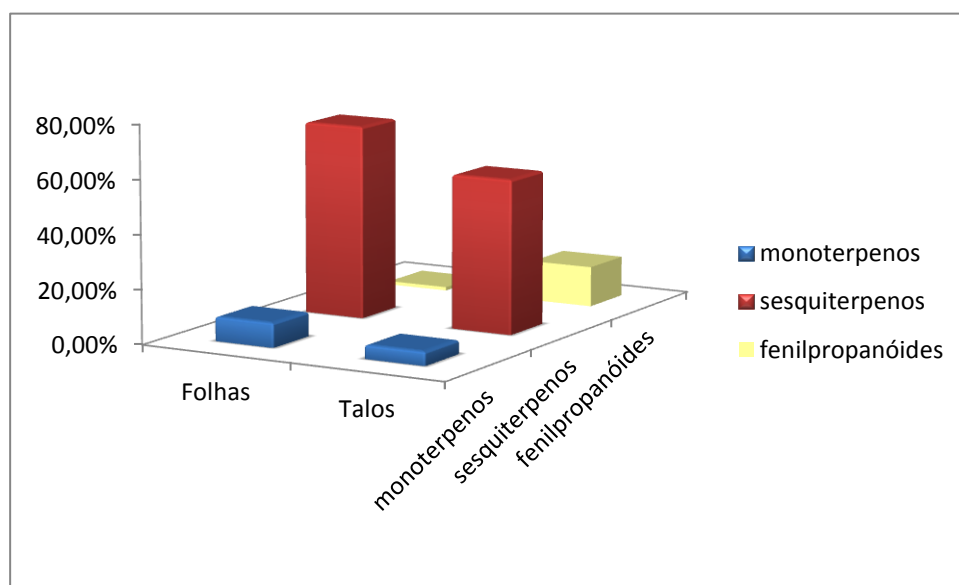
A Tabela 04 apresenta na primeira coluna os constituintes identificados nos óleos essenciais das folhas e talos, na segunda coluna tem-se o número correspondente a estrutura química do composto apresentada na Tabela 05. Na quarta e quinta colunas temos os respectivos teores das substâncias identificadas.

**Tabela 04:** Composição química (%) do óleo essencial das folhas e dos talos de *P. hispidum*

Constituintes	Índice Kovats	<i>P. hispidum</i>		
		Folhas	Talos	
$\alpha$ -pineno	[1]	939	1,73	0,21
Canfeno	[2]	954	1,13	-
$\beta$ -pineno	[3]	979	4,75	-
Mirceno	[4]	991	0,24	0,11
$\alpha$ -felandreno	[5]	1003	-	0,61
$\alpha$ -cimeno	[6]	1025	-	2,47
Limoneno	[7]	1029	0,78	-
$\delta$ -3-careno	[8]	1031	-	1,47
(E)- $\beta$ -ocimeno	[9]	1050	-	0,28
Cânfora	[10]	1146	0,17	-
Borneol	[11]	1169	0,36	-
$\alpha$ -terpineol	[12]	1189	-	0,1
Acetato de isobornila	[13]	1286	-	0,45
Acetato de bornila	[14]	1289	1,28	-
$\delta$ -elemeno	[15]	1338	0,3	0,17
$\alpha$ -cubebeno	[16]	1351	0,7	0,33
ciclosativeno	[17]	1371	-	0,53
Isoledeno	[18]	1376	0,53	-
$\alpha$ -copaeno	[19]	1377	1,79	1,42
$\beta$ -elemeno	[20]	1391	5,33	1,63
(E)-cariofileno	[21]	1419	21,77	22,63
$\beta$ -copaeno	[22]	1432	2,32	1,37
$\alpha$ -aromadendreno	[23]	1460	0,34	-
$\alpha$ -humuleno	[24]	1455	2,58	1,72
(E)- $\beta$ -farneseno	[25]	1457	-	0,1
9- <i>epi</i> -(E)-cariofileno	[26]	1466	-	0,18
isovalerano	[27]	1467	7,9	1,85
$\gamma$ -muuroleno	[28]	1480	-	1,52
Germacreno-D	[29]	1485	16,88	3,82
$\gamma$ -amorfeno	[30]	1496	2,83	0,53
$\alpha$ -selineno	[31]	1498	-	0,95
$\alpha$ -muuroleno	[32]	1500	-	5,43
miristicina	[33]	1519	-	3,52
$\gamma$ -cadineno	[34]	1514	1,92	-
$\delta$ -cadineno	[35]	1523	2,76	1,84
$\alpha$ -cadineno	[36]	1539	0,26	0,14
<i>trans</i> -cadinina-1(2),4-dieno	[37]	1535	-	0,18

Elemol	[38]	1550	0,22	0,28
Elemicina	[39]	1557	-	0,31
<E>-nerolidol	[40]	1563	0,14	0,38
germacreno-B	[41]	1561	0,71	0,58
Espatulenol	[42]	1578	-	0,8
óxido de cariofileno	[43]	1583	2,23	7,18
Epóxido de humuleno II	[44]	1608	0,17	-
dilapiol	[45]	1621	-	10,63
1- <i>epi</i> -cubenol	[46]	1629	-	0,4
$\alpha$ -cadinol	[47]	1654	-	1,2

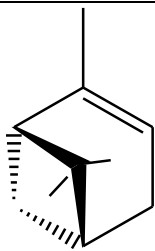
Quando se compara a composição do óleo essencial das folhas com óleo essencial dos talos, percebe-se que o teor de fenilpropanóides nos talos é relativamente maior do que nas folhas. Enquanto que os teores de monoterpenos e sesquiterpenos nas folhas superam ligeiramente os teores dos talos como representa o gráfico 12. Em ambas as partes o componente majoritário foi o sesquiterpeno (E)-cariofileno [21](Folhas 21,77% e Talos 22,63%).



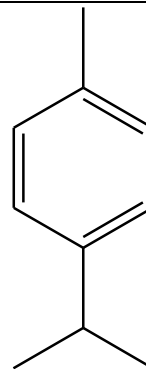
**Figura 26:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides nos óleos essenciais das folhas e talos de *Piper hispidum*.

**Tabela 05:** Estruturas químicas dos componentes presentes nos óleos essenciais e de substâncias deste gênero

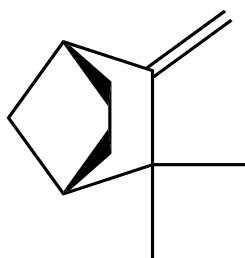
[1]



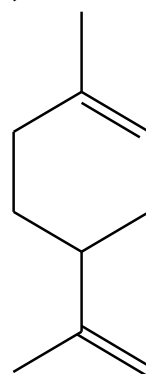
[6]



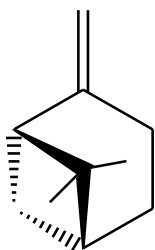
[2]



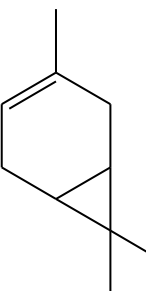
[7]



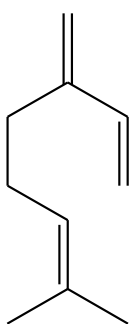
[3]



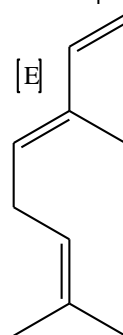
[8]



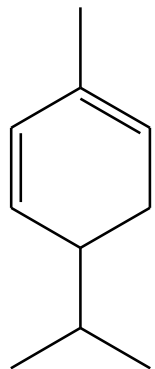
[4]



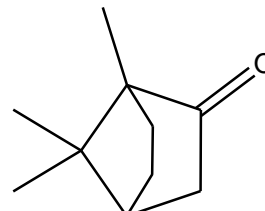
[9]



[5]

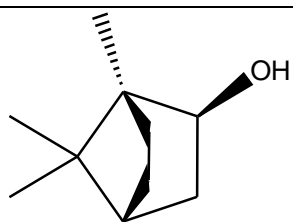


[10]

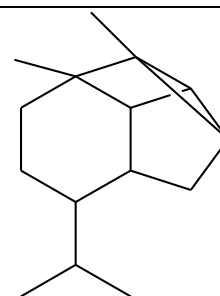


continuação

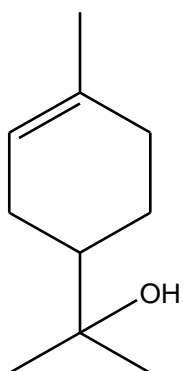
[11]



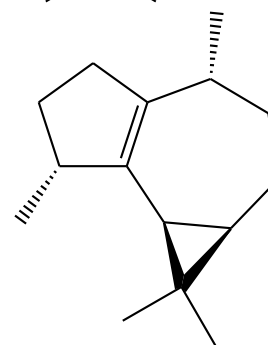
[17]



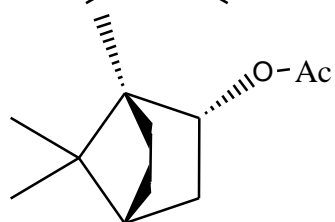
[12]



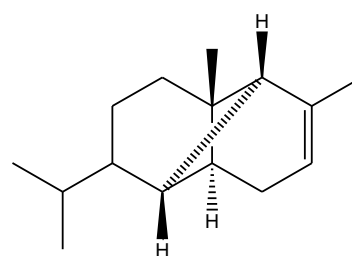
[18]



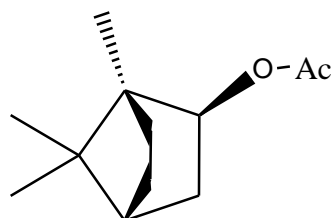
[13]



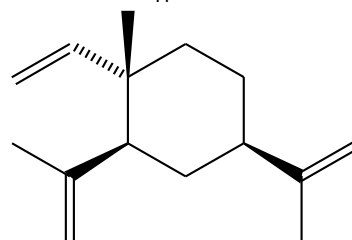
[19]



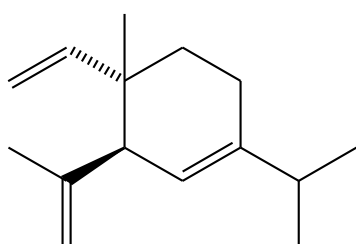
[14]



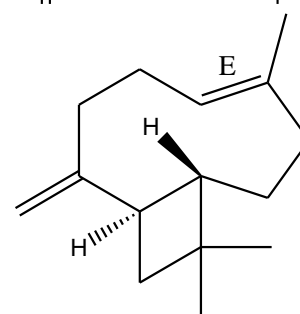
[20]



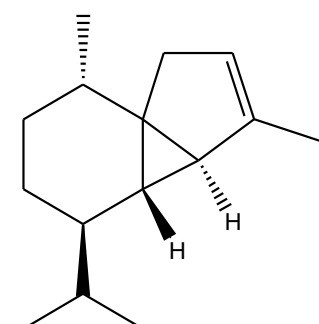
[15]



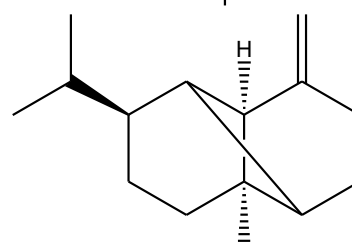
[21]



[16]

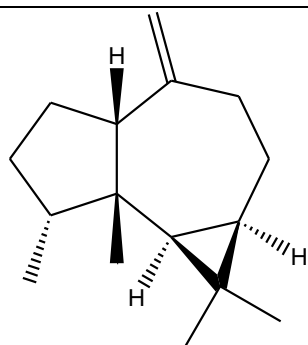


[22]

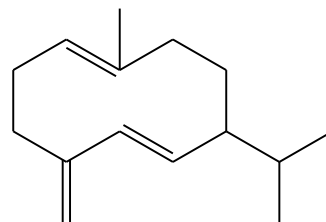


continuação

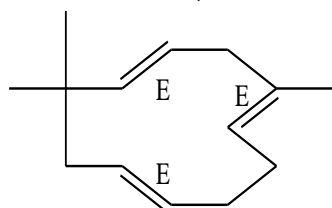
[23]



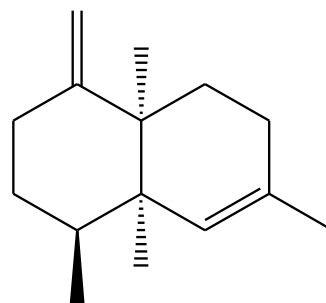
[29]



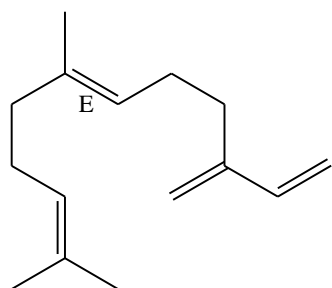
[24]



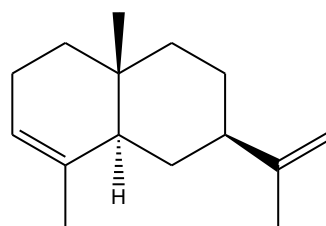
[30]



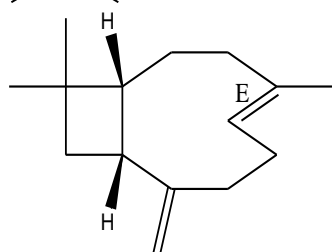
[25]



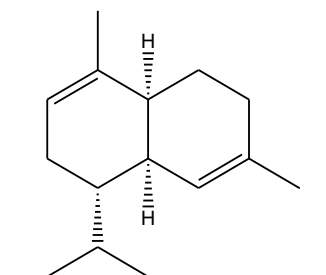
[31]



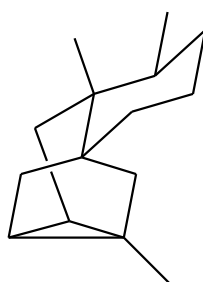
[26]



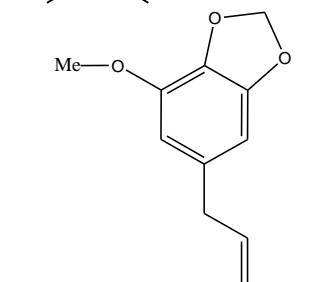
[32]



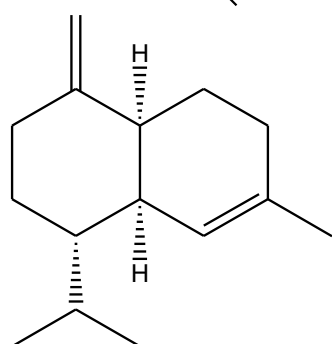
[27]



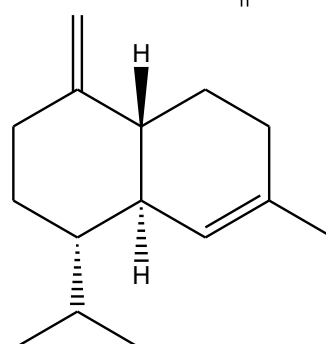
[33]



[28]

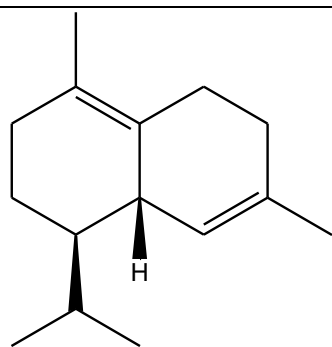


[34]

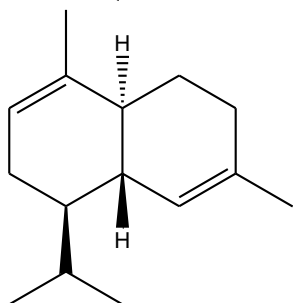


continuação

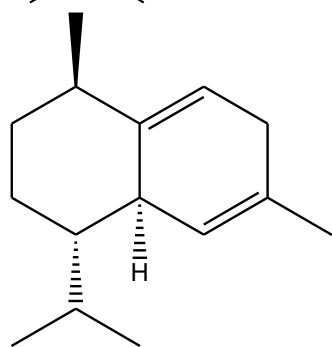
[35]



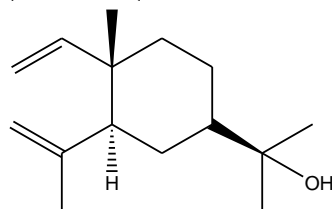
[36]



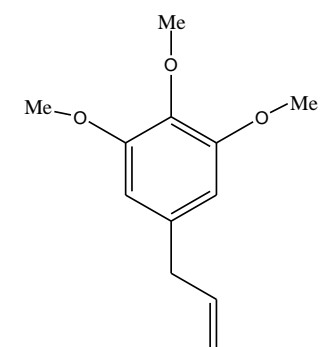
[37]



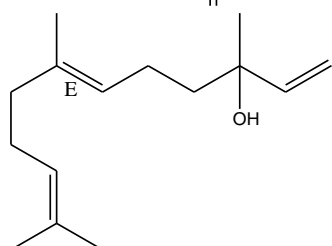
[38]



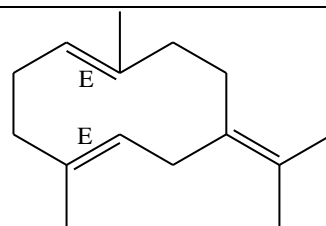
[39]



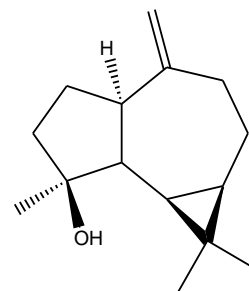
[40]



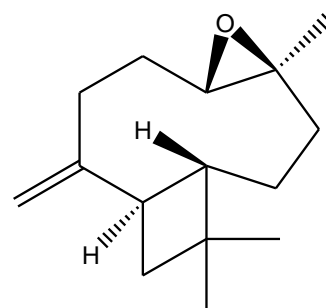
[41]



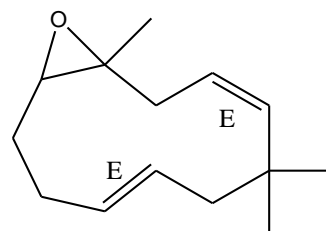
[42]



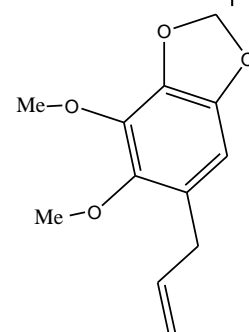
[43]



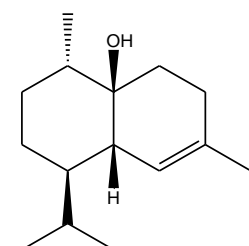
[44]



[45]

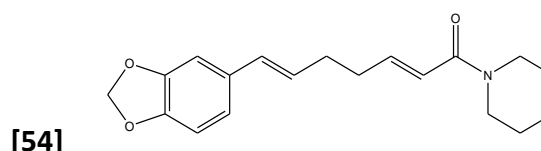
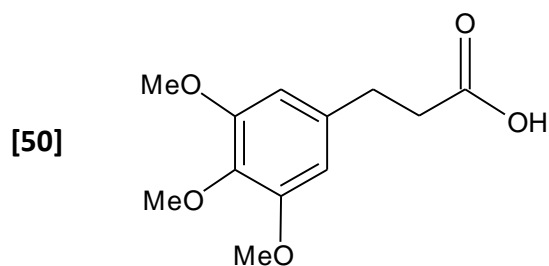
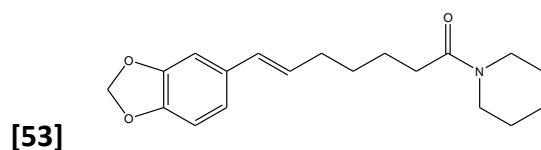
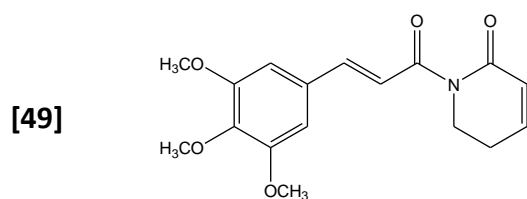
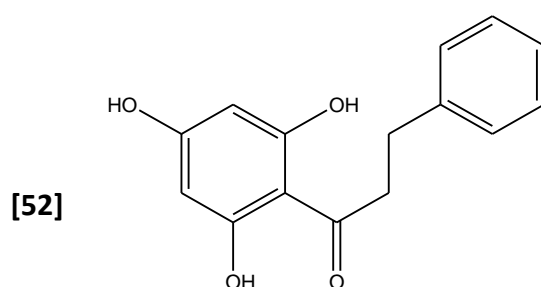
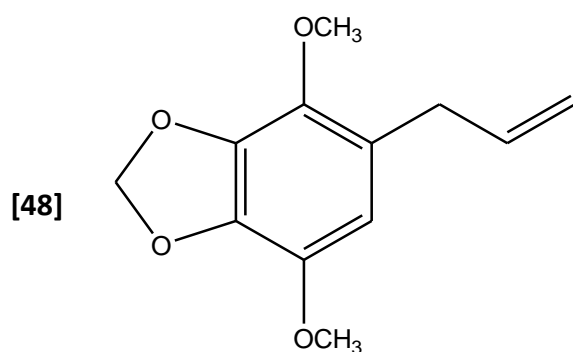
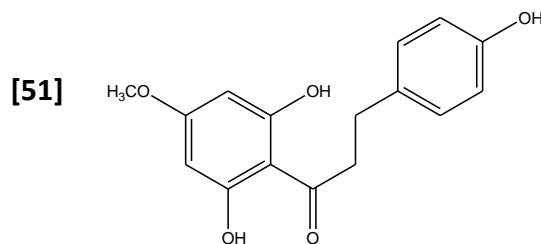
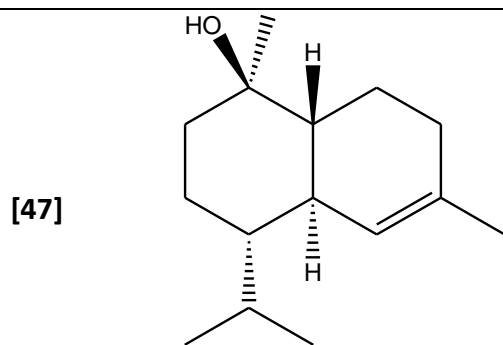


[46]



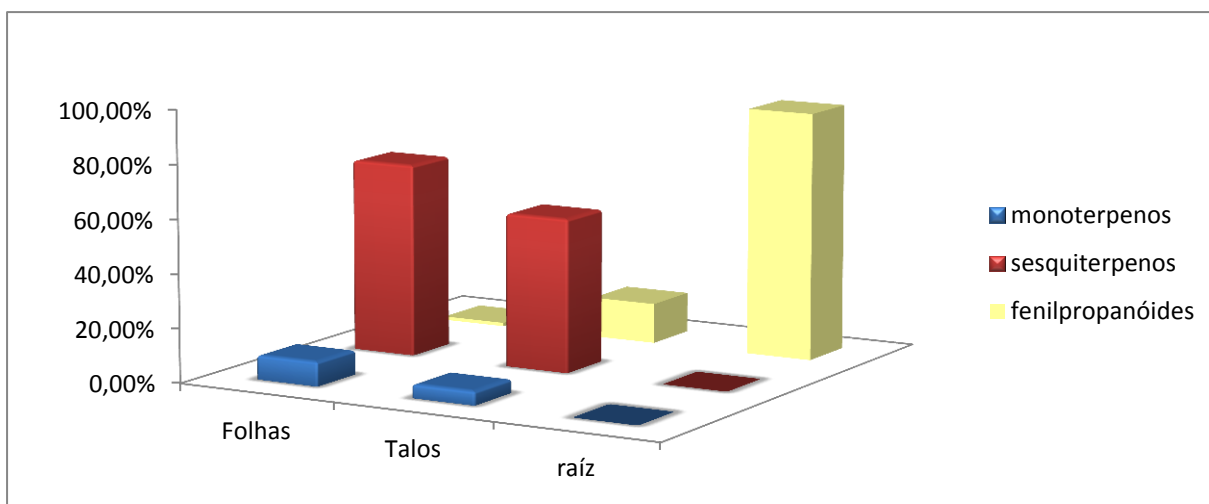


continuação



Obs: Figuras de **[01 a 47]**. Estruturas dos constituintes químicos identificados no óleo essencial das folhas e talos de *P. hispidum*. Figuras de **[48 a 54]** são demais figuras de estruturas químicas citadas.

Um estudo do óleo essencial da raiz desta planta foi realizado por FACUNDO et al., (2008), demonstrou que a composição do óleo é cerca de 92,2% de fenilpropanóides conforme comparação da Figura 27, correspondendo a três componentes majoritários (dilapiol **[45]** 57,5%, elemicina **[39]** 24,5% e apiol **[48]** 10,2%). O dilapiol e a elemicina presente na raiz desta planta, também se encontra presente nos talos da mesma em menor concentração.



**Figura 27:** Representação gráfica da comparação dos óleos essenciais de diferentes partes de *P. hispidum*.

O óleo essencial das folhas de *P. hispidum* também foi estudado por Mesquita et al. (2005) no estado de Minas Gerais (Phs III), por Santos et al. (2001) no estado do Rio de Janeiro (Phs II), e por Facundo et. al. (1994) em Rondônia (Phs I), a Tabela 06 apresenta os teores dos constituintes presente nos óleos estudados por cada um dos autores.

**Tabela 06:** Comparação da composição química (%) do óleo essencial das folhas *P. hispidum* com a composição de outros autores.

Constituintes	Índice Kovats	<i>P.</i>	Phs III	Phs II	Phs I
		Folhas	Folhas	Folhas	Folhas
$\alpha$ -pineno	939	1,73	4,6	1,37	5,21
Canfeno	954	1,13	-	-	15,61
$\beta$ -pineno	979	4,75	14	0,28	3,49
Mirceno	991	0,24	-	-	1,29
$\alpha$ -felandreno	1003	-	-	-	1,29
$\beta$ -felandreno	1009	-	-	-	9,66
Limoneno	1029	0,78	5,8	-	-
Linalol	1097	-	0,6	-	-
Cânfora	1146	0,17	-	-	-
Borneol	1169	0,36	-	-	-
Acetato de bornila	1289	1,28	-	-	4,11
$\delta$ -elemeno	1338	0,3	-	-	-
$\alpha$ -cubebeno	1351	0,7	-	0,42	-
Isoledeno	1376	0,53	-	-	-
$\alpha$ -copaeno	1377	1,79	-	2,50	-

continuação					
$\beta$ -elemeno	1391	5,33	-	-	-
B-cariofileno	1405	-	-	-	5,39
(E)-cariofileno	1419	21,77	5,2	6,30	-
$\beta$ -copaeno	1432	2,32	-	-	-
$\beta$ -gurjuneno	1432	-	-	1,31	-
<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno	1436	-	-	2,11	-
$\alpha$ -cariofileno	1454	-	-	9,21	-
<allo>-aromadendreno	1460	0,34	-	-	-
$\alpha$ -guaieno	1452	-	-	-	11,47
$\alpha$ -humuleno	1455	2,58	-	-	-
9- <i>epi</i> -(E)-cariofileno	1466	-	-	1,31	-
Ishwarano	1467	7,9	-	-	-
$\gamma$ -gurjuneno	1473	-	-	4,27	-
Germacreno-D	1485	16,88	6,9	7,11	-
$\gamma$ -elemeno	1488	-	-	-	10,88
guaieno	1490	-	-	3,36	-
$\gamma$ -amorfenol	1496	2,83	-	-	-
biciclogermacreno	1500	-	5,0	-	-
(E,E)- $\alpha$ -farneseno	1508	-	-	5,62	-
$\gamma$ -cadineno	1514	1,92	-	3,03	25,13
$\delta$ -cadineno	1523	2,76	1,3	3,95	-
$\alpha$ -cadineno	1539	0,26	-	-	-
<i>trans</i> -dihidroagarofurano	1520	-	7,4	-	-
elemol	1550	0,22	2,4	-	-
<E>-nerolidol	1563	0,14	1,2	2,5	-
germacreno-B	1561	0,71	-	1,56	-
espatulenol	1578	-	7,0	4,05	-
óxido de cariofileno	1583	2,23	6,4	5,03	-
globulol	1583	-	-	0,75	-
Epóxido de humuleno II	1608	0,17	-	3,62	-
1-10-di- <i>epi</i> -cubenol	1619	-	-	1,09	-
10- <i>epi</i> - $\gamma$ -eudesmol	1624	-	2,2	-	-
$\alpha$ - <i>epi</i> -muurolol	1641	-	-	1,03	-
$\beta$ -eudesmol	1651	-	3,1	-	-

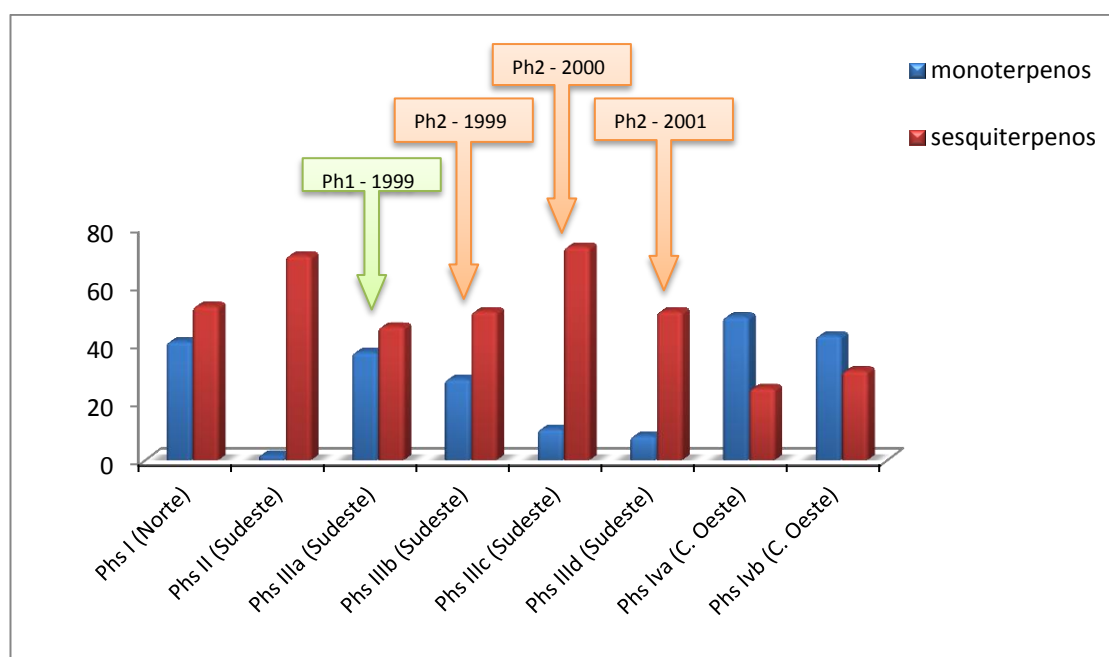
Nenhum dos estudos apresentados dos óleos essenciais das folhas - Phs III, Phs II e Phs I, apresentaram fenilpropanóides em sua constituição, no entanto o óleo das folhas OEPHF apresentou em sua constituição um pequeno teor (1,28%) de um fenilpropanóide

conhecido como acetato de bornila [14], cujo um isômero conhecido como acetato de isoborniila [13] (0,45%) também foi encontrado nos talos em menor percentual.

Pode-se observar outras variações na composição também, observando a distribuição de monoterpenos. Sesquiterpenos e fenilpropanóides nesta espécie de acordo com a região pesquisada e de acordo com o ano da coleta como representa a Figura 28.

A única semelhança entre os estudos apresentados é a ausência de fenilpropanóides em sua constituição, com relação a espécie estudada na região norte, a predominância de sesquiterpenos é muito semelhante a região sudeste e completamente oposta a região centro-oeste onde apresenta predominância de monoterpenos em sua composição.

Com relação a região sudeste o estudo feito por Mesquita et al., (2005) relata a variação da composição do óleo essencial de *P. hispidum* das folhas por três anos (1999, 2000 e 2001), no primeiro ano foram analisadas duas amostras de *P. hispidum* da mesma região (Phs IIIa e Phs IIIb) e ambas apresentaram um perfil semelhante quanto ao teor de monoterpenos e sesquiterpenos, a amostra Phs IIIb foi analisada um ano depois (Phs IIIc) e apresentou uma significativa variação em sua composição, elevando o teor de sesquiterpenos e reduzindo o de monoterpenos consideravelmente, mantendo o mesmo perfil no ano de 2001 (Phs IIId).



**Figura 28:** Representação gráfica da distribuição dos monoterpenos, sesquiterpenos nos óleos essenciais das folhas *P. hispidum*. das regiões norte, sudeste e centro-oeste.

Os fatores que induzem a planta a produzir determinada classe de compostos, quando alterados passam a induzir a produção de outras classes, como no caso da espécie estudada no sudeste (Phs IIIa – d), conforme passam-se os anos o percentual de sesquiterpenos sobrepõe o de monoterpenos, isto ocorre em consequência das alterações no habitat da planta. Possivelmente o habitat inicial era muito semelhante ao de plantas da região norte, posteriormente o habitat passou a ser semelhante ao da região centro-oeste que possui um clima de cerrado mais quente e mais seco apresentando maioria de monoterpenos em sua composição. Para que estes dados corroborem com esta verdade seria necessário registros climáticos e informações a respeito de ações antrópicas no habitat da planta em estudo, porém estas informações não estão disponíveis e não constam nos trabalhos consultados.

A grosso modo de acordo com as observações deste exemplo e dos exemplos anteriores, fica evidente que quanto mais tropical for o clima, maior a incidência de sesquiterpenos e fenilpropanóides na composição, e quanto mais quente e seco maior o índice de monoterpenos.

#### 4.2.2 Estudo Fitoquímico de OPHT– Determinação Estrutural de PHTO-1 (dilapiol).

O óleo essencial dos talos foi submetido a uma coluna cromatográfica de sílica, eluída com gradiente de polaridade crescente (éter de petróleo / hexano / acetato de etila) resultando no isolamento de 100 mg de um composto codificado como PHTO-1.

PHTO-1 apresentou-se na forma de um óleo viscoso incolor e solúvel em clorofórmio, o espectro de massas Figura 29, demonstra o pico do íon molecular  $m/z$  222 u.m.a., compatível com a fórmula molecular  $C_{12}H_{14}O_4$ .

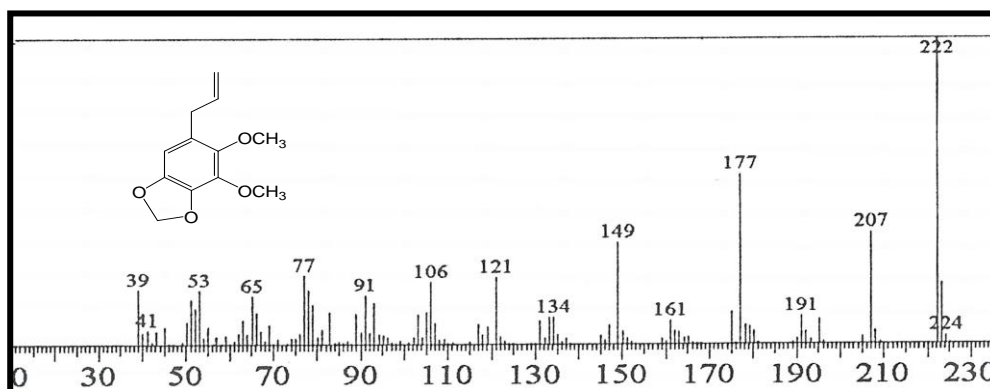
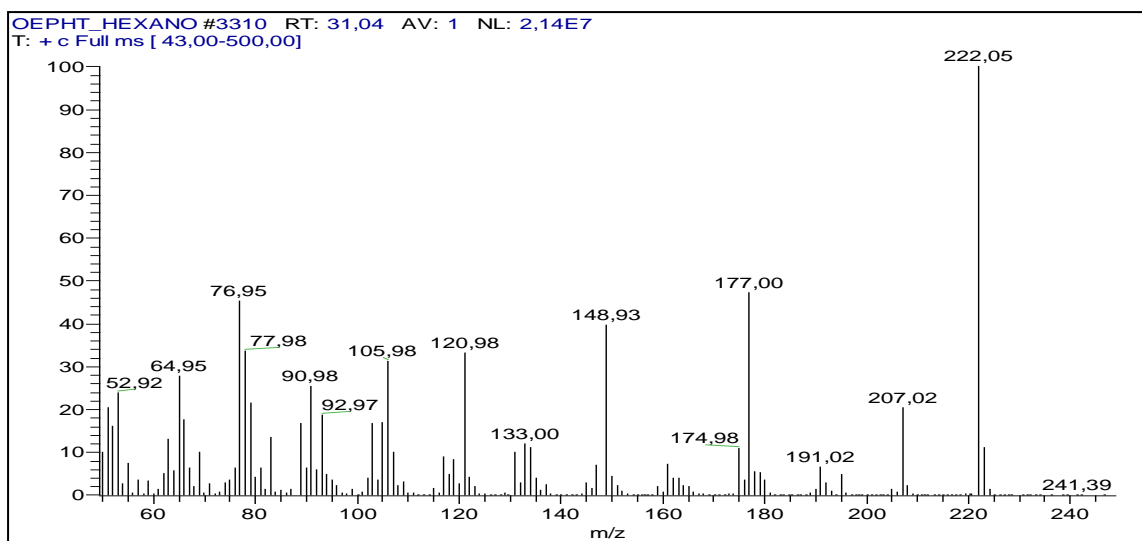


Figura 29: Espectro de massas do dilapiol [45] na literatura (ADAMS, 2001)



**Figura 30:** Espectro de massas de PHTO-1

Comparando o espectro de massas de PHTO-1 Figura 30, com o espectro de massas do dilapiol na literatura Figura 29, pode-se observar que o mesmo possui grande semelhança nos fragmentos apresentados. O que indica que se trata da mesma substância.

Através dos dados espectroscópicos de Ressonância Magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pode-se chegar a uma conclusão sobre a estrutura de PHTO-1. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PHTO-1 Figura 31, apresentou as seguintes absorções:

Um singleto em  $\delta$  6,37 (1H), compatível com um hidrogênio de anel aromático penta-substituído, três sinais em  $\delta$  5,01 (dd,  $J=5,02; 10,87\text{Hz}$ ),  $\delta$  5,03 (dd,  $J=5,02; 14,97\text{Hz}$ ) (ver região expandida Figura 32) e  $\delta$  5,04 (1H, m) de três hidrogênios olefinicos de uma ligação dupla terminal carbono-carbono trissubstituída, um singleto intenso em  $\delta$  5,88 (2H) que pode ser relacionado a dois hidrogênios de um grupamento metilenodióxido, dois singletos intensos em  $\delta$  4,03 (3H) e  $\delta$  3,77 (3H) de grupamentos metoxilas e em  $\delta$  3,32 de hidrogênios alílicos.

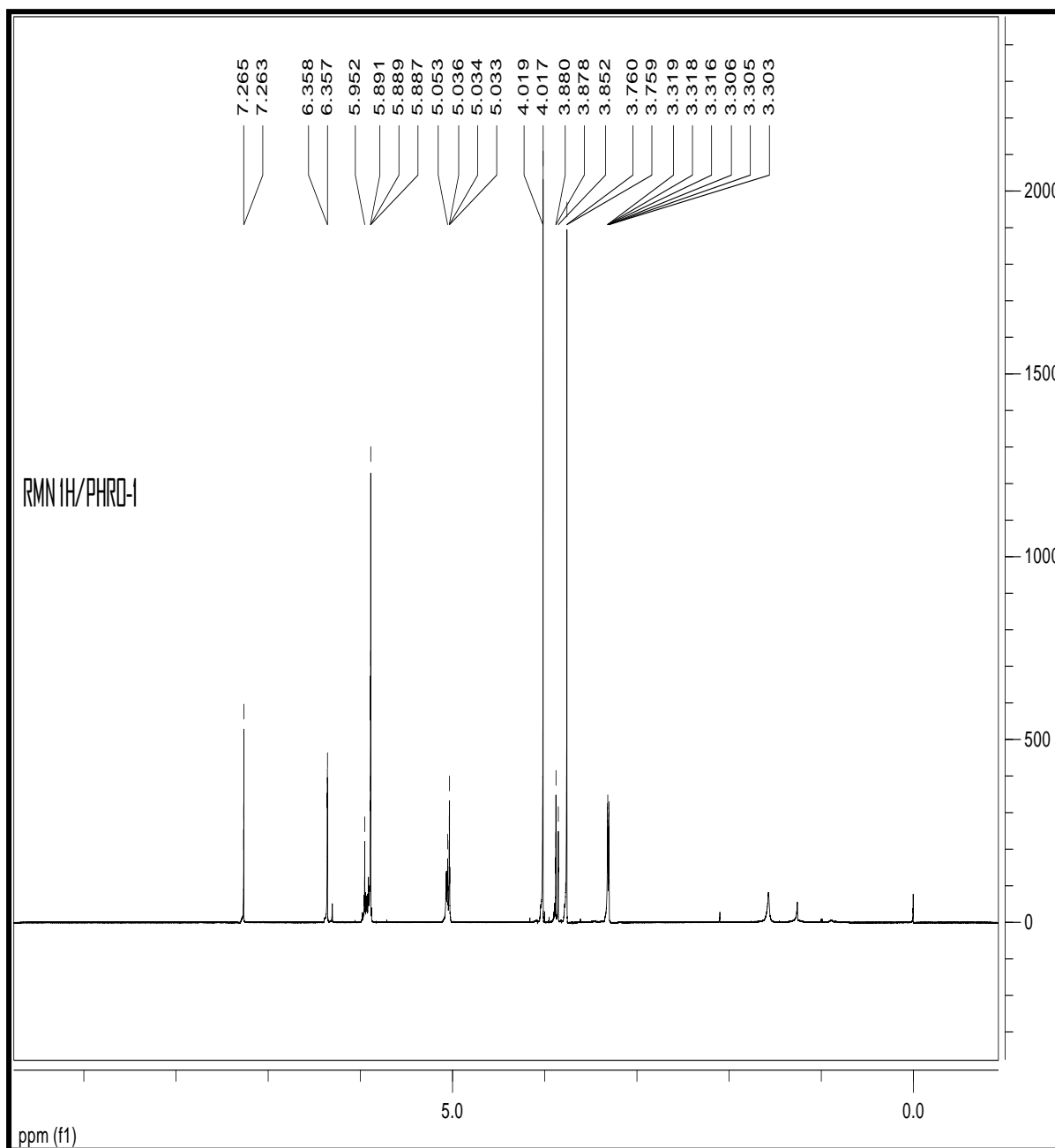
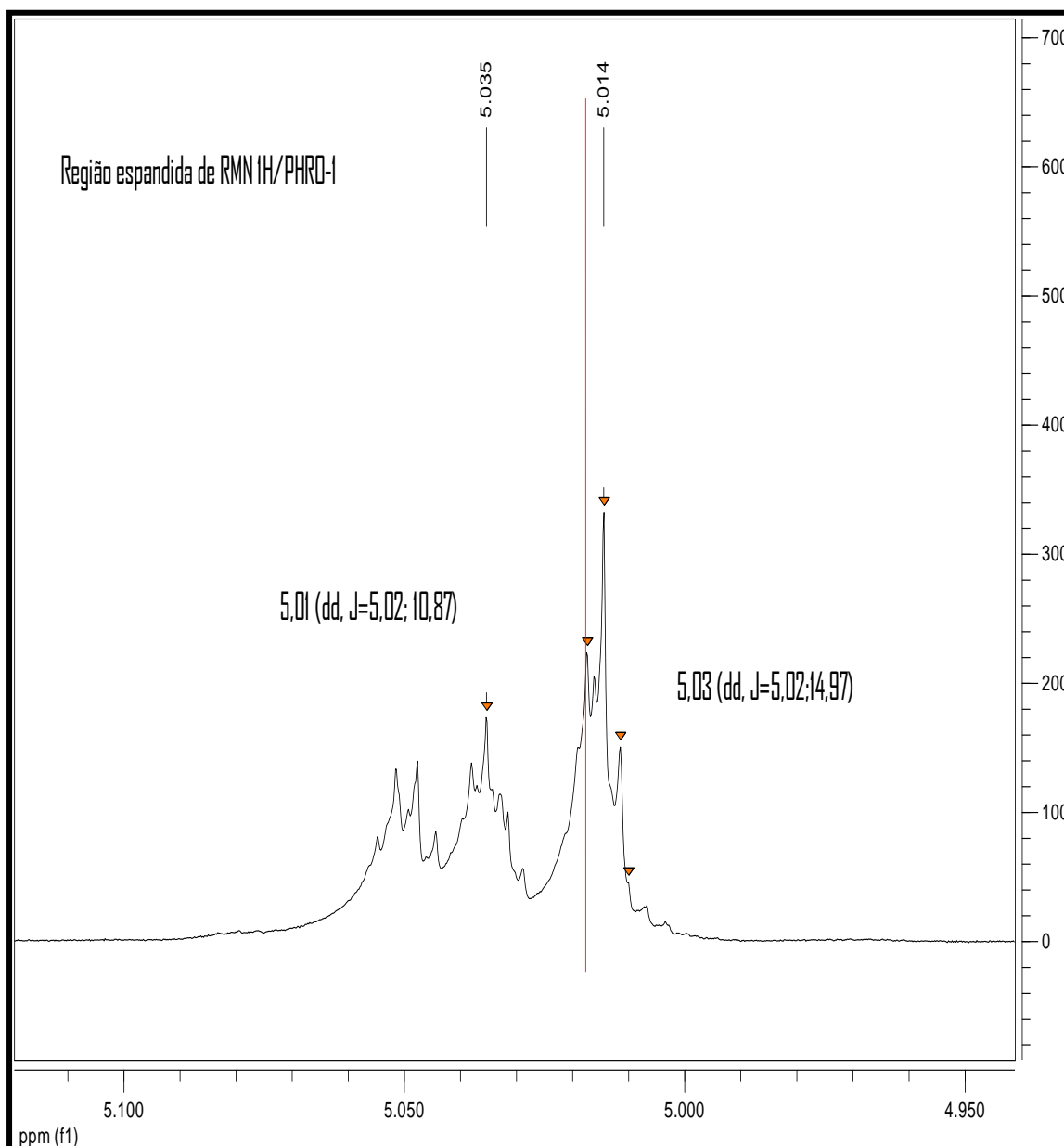


Figura 31: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de PHTO-1

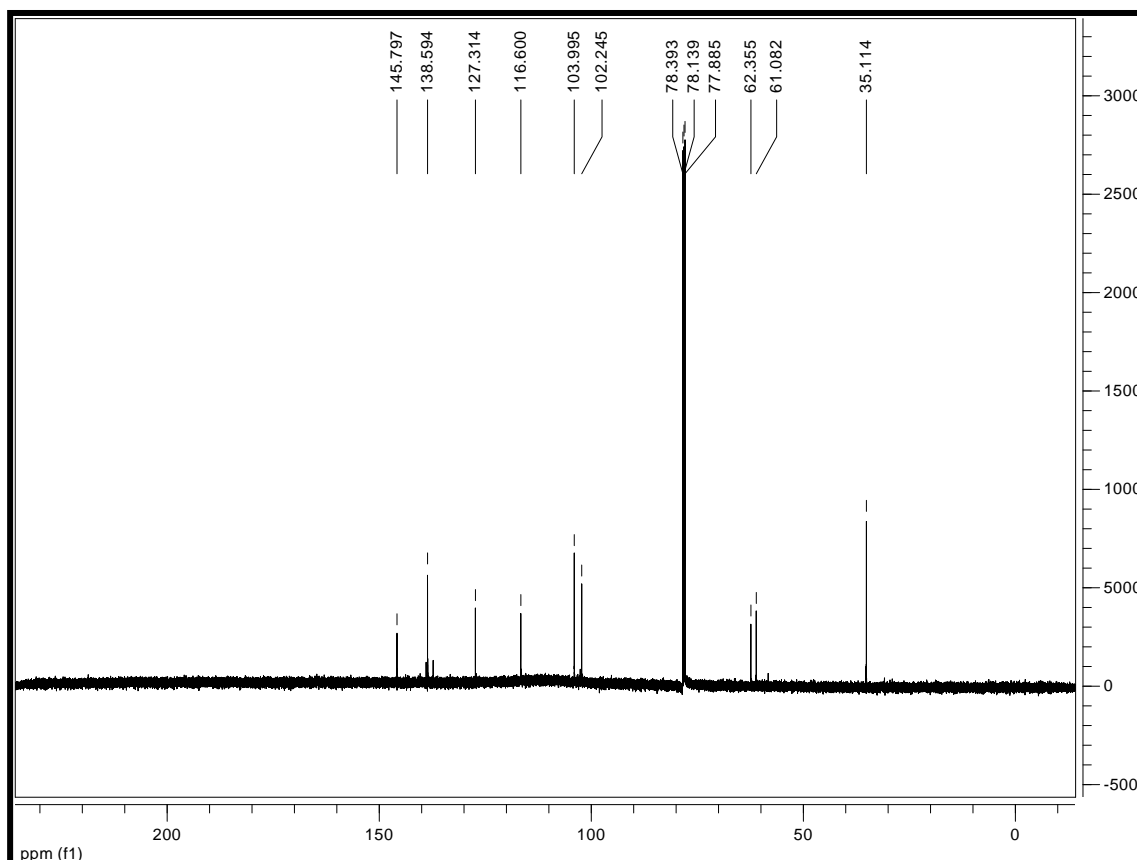


**Figura 32:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PHTO-1.

O espectro de RMN –  $^{13}\text{C}$  de PHTO-1 Figura 33, apresentou absorções na região de átomos de carbonos de anéis aromáticos na região que compreende  $\delta$  145,0 – 101,5, sendo



que a absorção em  $\delta$  101,5 pode ser relacionada a um átomo de carbono alifático, confirmando assim a presença do grupamento metileno. As absorções em  $\delta$  60,9 e  $\delta$  59,6 confirmaram a presença de dois grupamentos metoxilas, e em  $\delta$  33,7 confirma a presença de um átomo de carbono alílico.



**Figura 33:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) de PHTO-1.

Os dados apresentados pelos espectros de RMN –  $^1\text{H}$  e RMN –  $^{13}\text{C}$  de PHTO-1, juntamente com a comparação dos dados RMN –  $^1\text{H}$  e RMN –  $^{13}\text{C}$  da literatura (BENEVIDES *et al*, 1999) para o composto dilapiol [45] Tabela 07, permitiram propor tratar-se da mesma substância.

**Tabela 07.** Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de PHRO-1 e do Dilapiol

PHTO-1

Dilapiol

C	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	126,6	-	126,0	-
2	136,5	-	135,1	-
3	137,8	-	137,6	-
4	145,0	-	144,6	-
5	145,0	-	144,3	-
6	103,2	6,33 (1H, H-6)	102,7	6,23 (1H, H-6)
7	33,8	3,32 (2H, dd, J= 1,8; 7,2 Hz)	33,9	3,24 (2H, dd, J=1,5; 6,6, H-7)
8	137,8	5,87 (1H, m, H-8)	137,4	5,81 (1H, m, H-8)
9	115,8	4,68 (dd, J=5,02; 10,87)	115,5	4,96 (1H, dd, J=1,5; 9,0, H-9a)
		4,71 (dd, J=5,02;14,97)		4,97 (1H, dd, J=1,5, 15,4, H-9b)
OCH <sub>2</sub> O	101,5	5,81 (2H)	101,1	5,88 (2H)
OMe-2	61,6	4,03 (3H)	61,3	3,78, 3,80 (3H, s)
OMe-3	69,3	3,77 (3H)	59,3	3,78, 3,80 (3H, s)

O Dilapiol [45] destaca-se por ser uma substância reconhecida como sinergista, e vários derivativos têm sido preparados a partir desta com o objetivo de potencializar esse efeito sobre larvas de *Aedes aegypti*. Nesse caso o efeito sinérgico foi associado à cadeia alila ligado ao anel benzênico de Dilapiol (CARVALHO, 2004). Entretanto, outros autores atribuem a atividade sinérgica de compostos com estrutura do tipo metilenodioxifenil através de um mecanismo inibitório do citocromo P450 pelo grupo metilenodioxido (HODGSON, 1995).

#### 4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO DE ACETATO DE ETILA DOS TALOS DE *P. hispidum*.

O estudo fitoquímico do extrato acetato de etila dos talos de *P. hispidum* (PHTAC – *P. hispidum*; talos; extrato acetato de etila) levou ao isolamento de duas substâncias denominadas PHTAC-1 e PHTAC-2.

#### 4.3.1 Determinação Estrutural de PHTAC-1 (Piplartina)

O composto codificado como PHTAC-1 apresentou-se como um sólido branco amorfo, com ponto de fusão 106<sup>o</sup> C e solúvel em clorofórmio.

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (Figura 34) apresentou um sistema de anel aromático tetra substituído, semelhante ao apresentado pelo espectro de RMN<sup>1</sup>H da PHTAC-2 (Figura 37). Duas absorções em  $\delta$  168,85 e  $\delta$  165,83 podem ser relacionadas a dois grupamentos carbonílicos,  $\alpha$  e  $\beta$ -conjugados. Outras duas absorções em  $\delta$  6,05 (dd, 1 H, J = 9,9; 1,8 Hz) e 6,95 (td, 1H, 9,9; 4,0 Hz) podem justificar uma das conjugações de uma das duas carbonilas. A outra conjugação da carbonila pode ser relacionada às absorções em  $\delta$  7,68 (1H, d, J=15=8 Hz) e  $\delta$  7,48 (1H, d, J = 15,8 Hz) de uma ligação dupla dissubstituída carbono-carbono, com uma estereoquímica *trans*. Um sistema -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- ligado a um átomo de nitrogênio e a um átomo de carbono olefínico pode ser proposto através das absorções em  $\delta$  2,48 (2 H, *m*) e  $\delta$  4,04 (2H, t, J= 6,2 Hz).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 35) de PHTAC-1 confirma o sistema de anel aromático semelhante ao de PHTAC-2, através das absorções em  $\delta$  56,14 e  $\delta$  60,93, dos três grupamentos metoxilas e dos carbonos hidrogenados absorvendo em  $\delta$ 105,46 (ver Tabela 08). A presença das duas carbonilas foram confirmadas pelas absorções em  $\delta$  168,85 e  $\delta$  165,83. Os sistemas olefínicos conjugados as duas carbonilas também foram observados através das absorções em  $\delta$ 143,73; 145,50; 125,79 e 121,05. O sistema -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, absorvem em  $\delta$ 24,71 e 41,61.

O espectro de massas (Figura 36) de PHTAC-1, exibiu o pico íon molecular em m/z 317 u.m.a. compatível com a fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>. Esta fórmula é compatível com uma molécula contendo um grau de insaturação nove, onde comporta um sistema de anel aromático, um anel heterocíclico com duas insaturações e um sistema C<sub>3</sub> com uma carbonila conjugada.

A combinação de todos os dados apresentados para PHTAC-1 possibilitaram propor a estrutura [49], tratando-se da substância descrita na literatura como Piplartina.

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de PHTAC – 1 encontram-se resumidos na tabela 08.

**Tabela 08.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de PHTAC-1.

	$\delta$ C	$\delta$ H
C		
1	130,62	-
3/5	153,30	-
4	140,08	-
9	168,85	-
1'	165,83	-
CH		
2/6	105,46	6,81 (2H, s)
7	143,73	7,68 (1H, d, $J = 15,8$ Hz)
8	121,05	7,48 (1H, d, $J = 15,8$ Hz)
2'	125,79	6,05 (1H, dd, $J = 99; 1,8$ Hz)
CH <sub>2</sub>		
4'	24,71	2,48 (2H, <i>m</i> )
5'	41,61	4,04 (2H, <i>m</i> )
CH <sub>3</sub>		
CH <sub>3</sub> O-3	56,14	3,89 (3H, s)
CH <sub>3</sub> O-4	60,93	3,89 (3H, s)
CH <sub>3</sub> O-5	56,14	3,89 (3H, s)

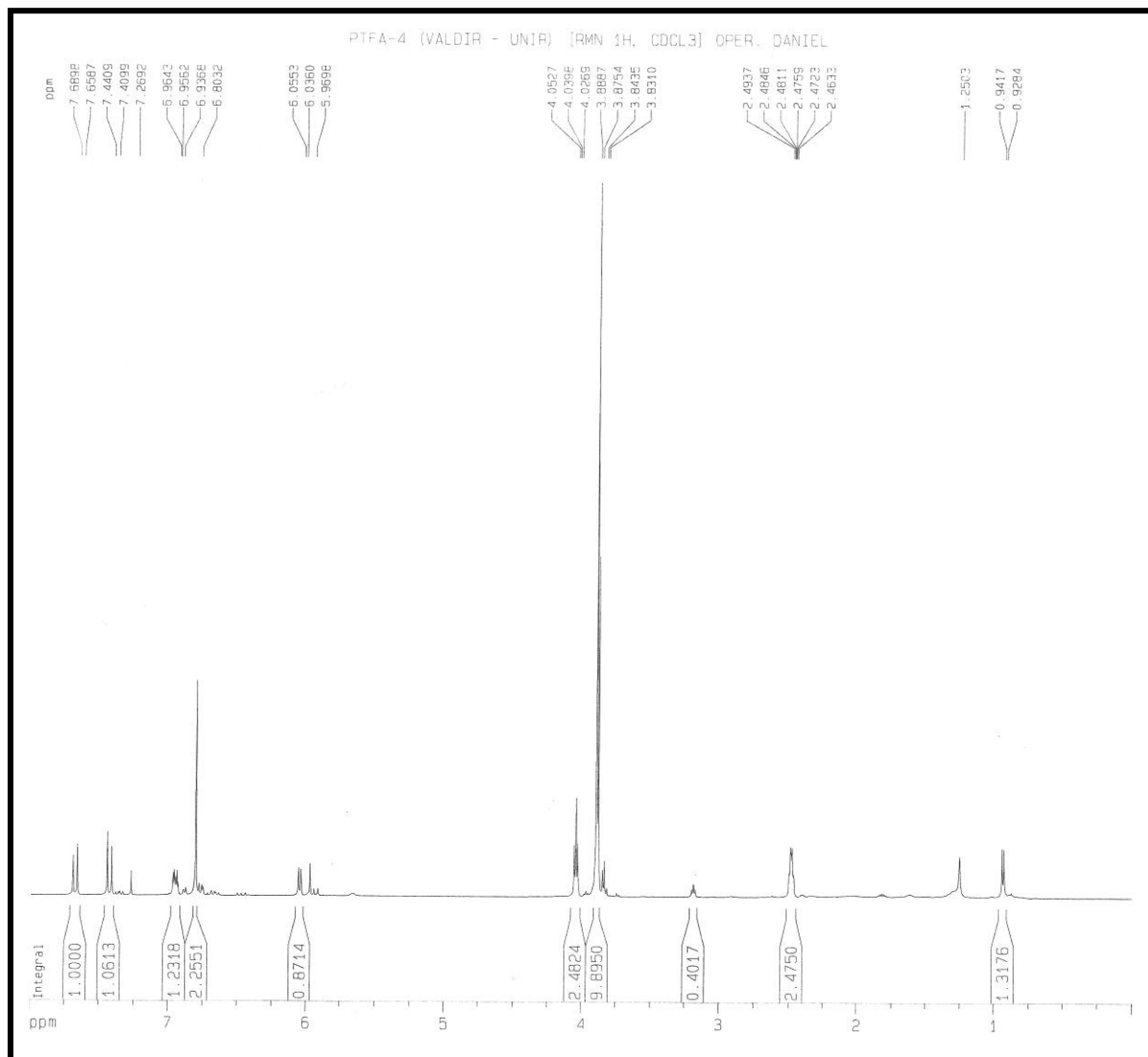


Figura 34. Espectro de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de PHTAC-1.

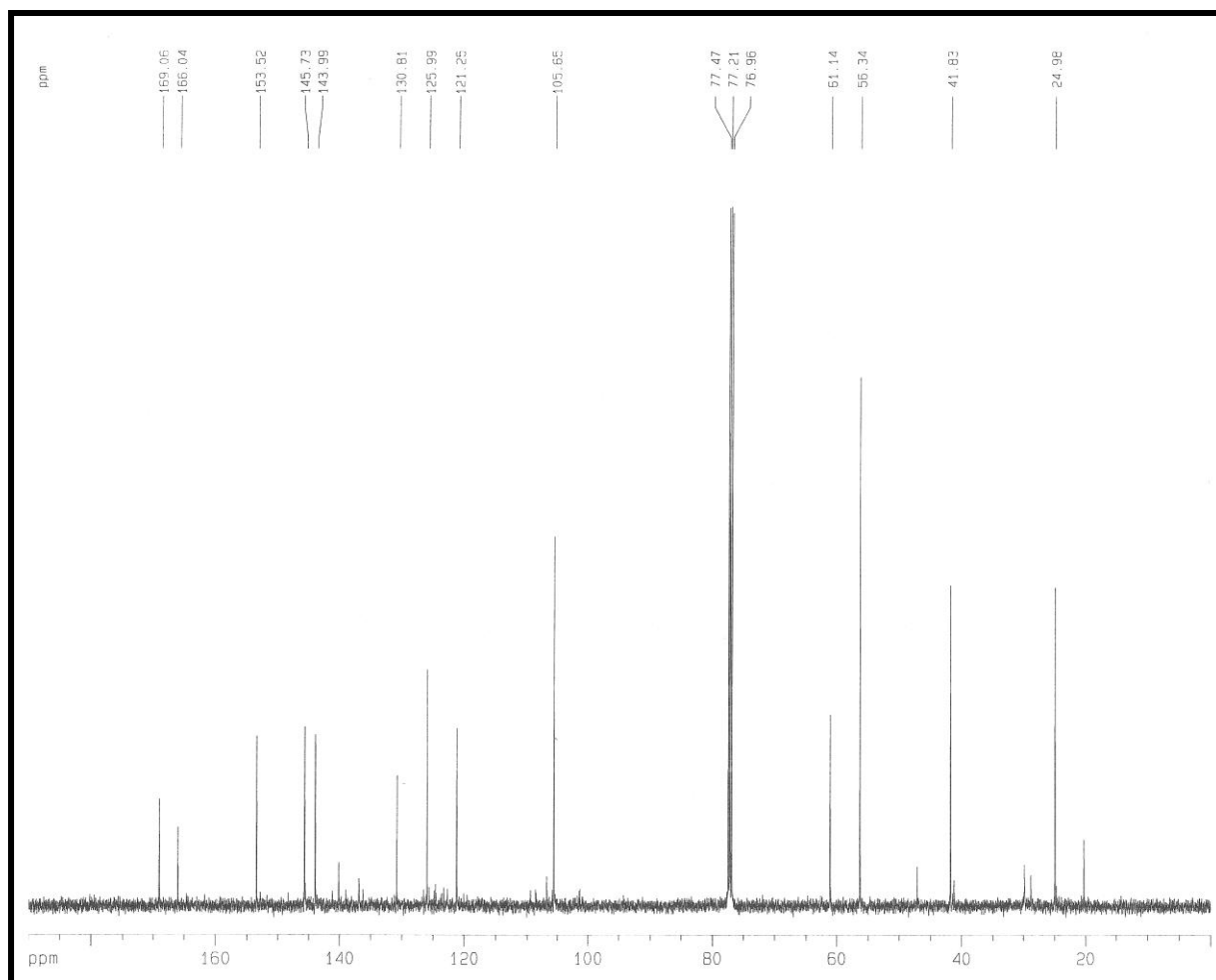


Figura 35. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  50 MHz) de PHTAC-1.

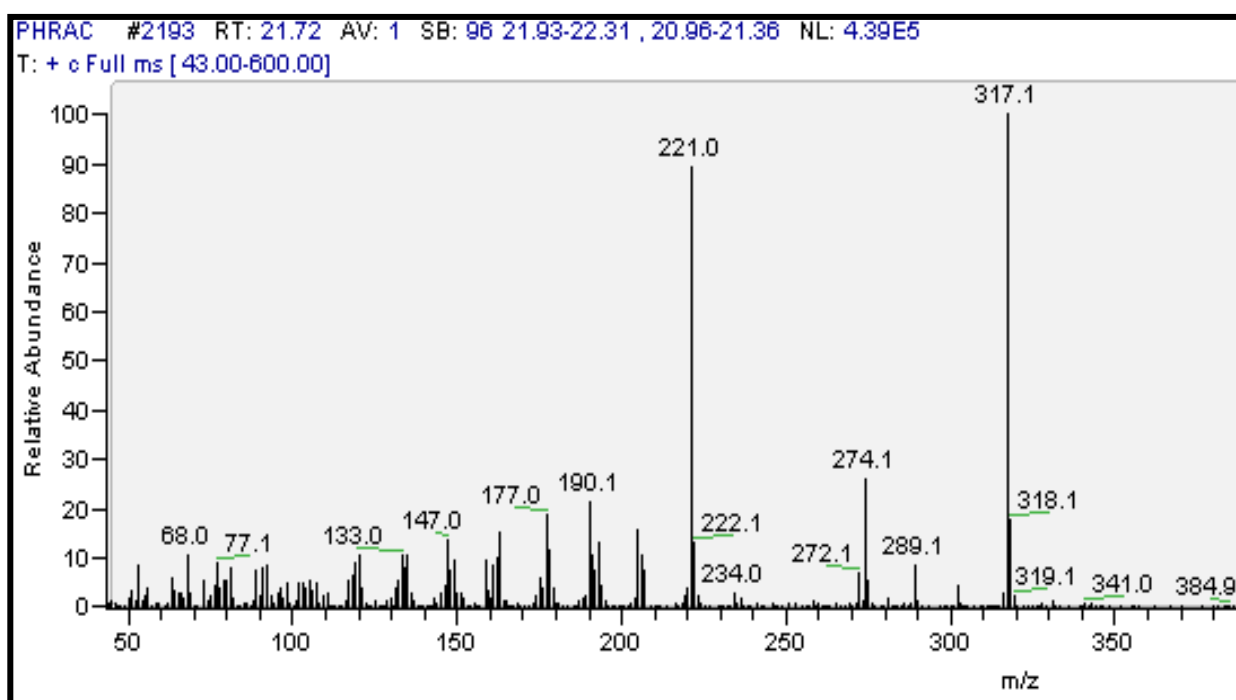


Figura 36. Espectro de Masas ( $\text{CDCl}_3$  50 MHz) de PHTAC-1.

A pipartina já foi isolada de outras espécies do gênero *Piper* (PARMAR *et al.*, 1997; BEZERRA, 2000). Os ensaios farmacológicos realizados por (OLIVEIRA<sup>3</sup>, 2008) com pipartina em músculo liso mostrou que a alcaloide apresentou atividade espasmolítica em útero isolado de rato e aorta isolada de rato. Como outras alcaloides isoladas de *P. tuberculatum* haviam apresentado efeito sobre o sistema cardiovascular, o autor decidiu investigar o mecanismo de ação espasmolítica de pipartina em aorta de rato.

Pipartina relaxou de maneira concentração-dependente a aorta pré-contraída com 10-6M de fenilefrina. Este efeito foi independente do endotélio funcional e da participação das protaciclina. Pipartina administrada cumulativamente sobre a fase tônica da contração, inibiu de maneira concentração-dependente as contrações induzidas, sugerindo um efeito sobre os canais de cálcio dependentes de voltagem. Esta hipótese foi confirmada pelo fato de pipartina ter bloqueado ( $Cl_{50}=1,2 \times 10^{-5}M$ ) de maneira não competitiva as contrações induzidas por  $CaCl_2$  em meio despolarizante nominalmente sem cálcio em aorta de rato (OLIVEIRA<sup>3</sup>, 2008).

A Pipartina também inibiu ( $Cl_{50}=6,7 \times 10^{-6}M$ ) as contrações fásicas induzidas por fenilefrina (10-6M) em meio livre de cálcio, porém não apresentou nenhum efeito sobre as contrações fásicas induzidas por cafeína (20 mM) nas mesmas condições experimentais. Com base nestes resultados, foi sugerido que a pipartina induz o relaxamento em aorta de rato, provavelmente, por bloquear o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio dependentes de voltagem e por interferir na mobilização de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares sensíveis ao 1,4,5-trifosfato de inositol (mobilização de  $Ca^{2+}$  mediada por receptor) (OLIVEIRA<sup>3</sup>, 2008).

#### 4.3.2 Determinação Estrutural de PHTAC-2 (ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico).

O composto codificado como PHTAC-2, isolado do extrato de acetato de etila dos talos de *P. hispidum*, apresentou-se como um sólido branco amorfo, com ponto de fusão em 10 °C, solúvel em clorofórmio.

O espectro de RMN <sup>1</sup> H (Figura 37) de PHTAC-2 absorções em  $\delta$  6,43 9 (sl), relacionado, levando em consideração a integração, dois átomos de hidrogênio ligados a um anel aromático, tetrasubstituído. As absorções em  $\delta$  3,84 e 3,083, relativas a nove átomos de hidrogênio, podem ser relacionados a três grupamentos metoxilas como parte de três das

quatro substituições do anel aromático. Duas absorções em  $\delta$ 2,90 (2H, t,  $J = 7,0$  Hz) e 2,68 (2H,  $J = 7,0$  Hz), justificam um sistema  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  como parte do quarto grupamento ligado ao anel aromático. Uma absorção em  $\delta$ 12 (sl, 1H) justifica um grupamento carboxílico na molécula.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 38) de PHTAC-2, através das absorções em  $\delta$ 56,71 e 60,82 justificam os três grupamentos metoxilas ligados ao anel aromático. A absorção em  $\delta$ 180 confirma a presença do grupamento carboxila.

O espectro de massas (Figura 39) de PHTAC-2 exhibe o pico do íon molecular  $m/z$  240 u.m.a., sugerindo uma fórmula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5$ . Esta fórmula é compatível com uma molécula contendo as propostas citadas acima: um anel aromático tetrasubstituído, sendo os substituintes relacionados a três grupamentos metoxilas, um sistema  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  ligadas ao anel aromático e um grupamento carboxila.

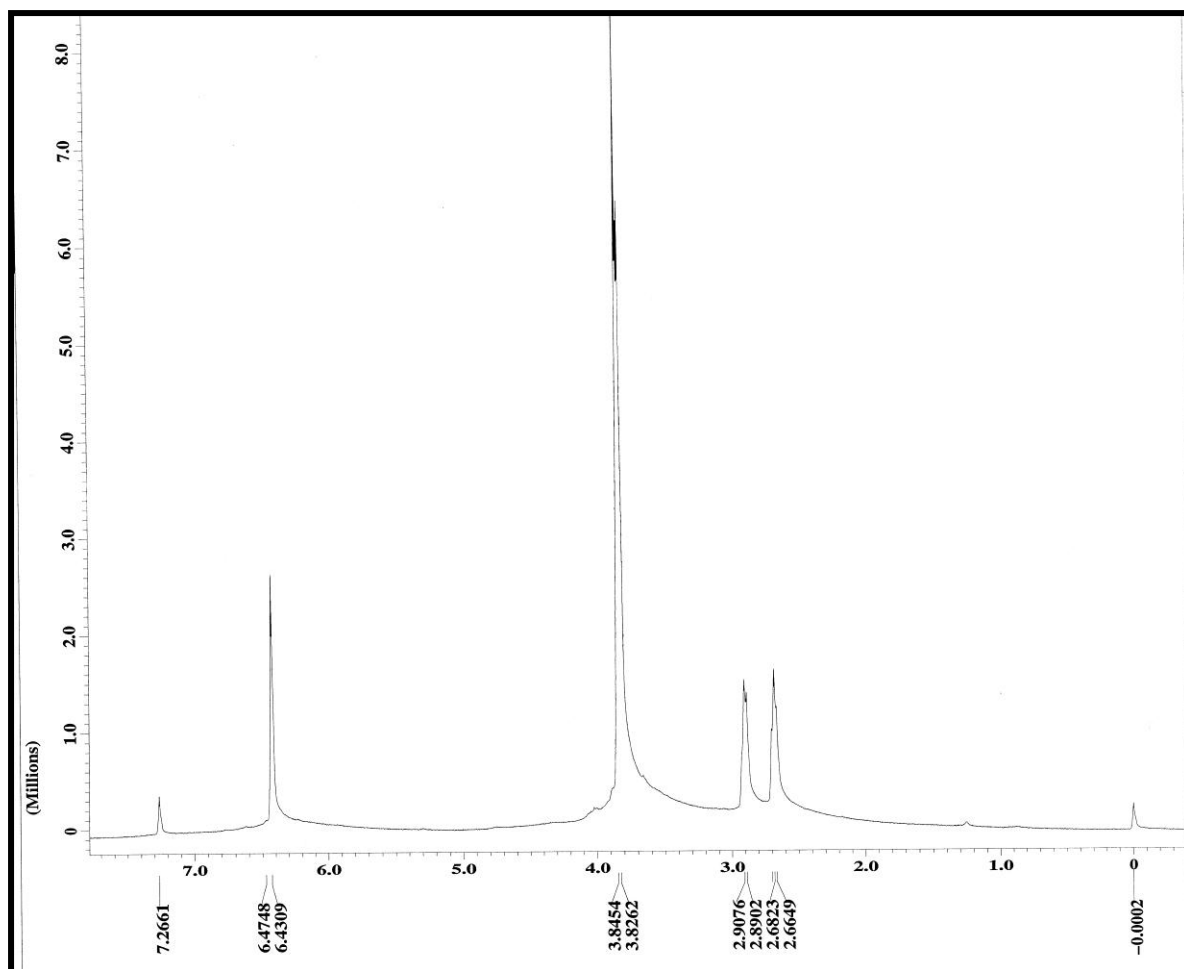


Figura 37. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}$  500 MHz) do PHTAC-2



Utilizando-se dos dados espectroscópicos citados até aqui, foi possível propor a estrutura [50], para PHTAC-2, tratando-se da substância descrita na literatura como o ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico. Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de PHTAC-2, atribuídos aos átomos de hidrogênios e aos átomos de carbonos, encontram-se resumidos na tabela 09.

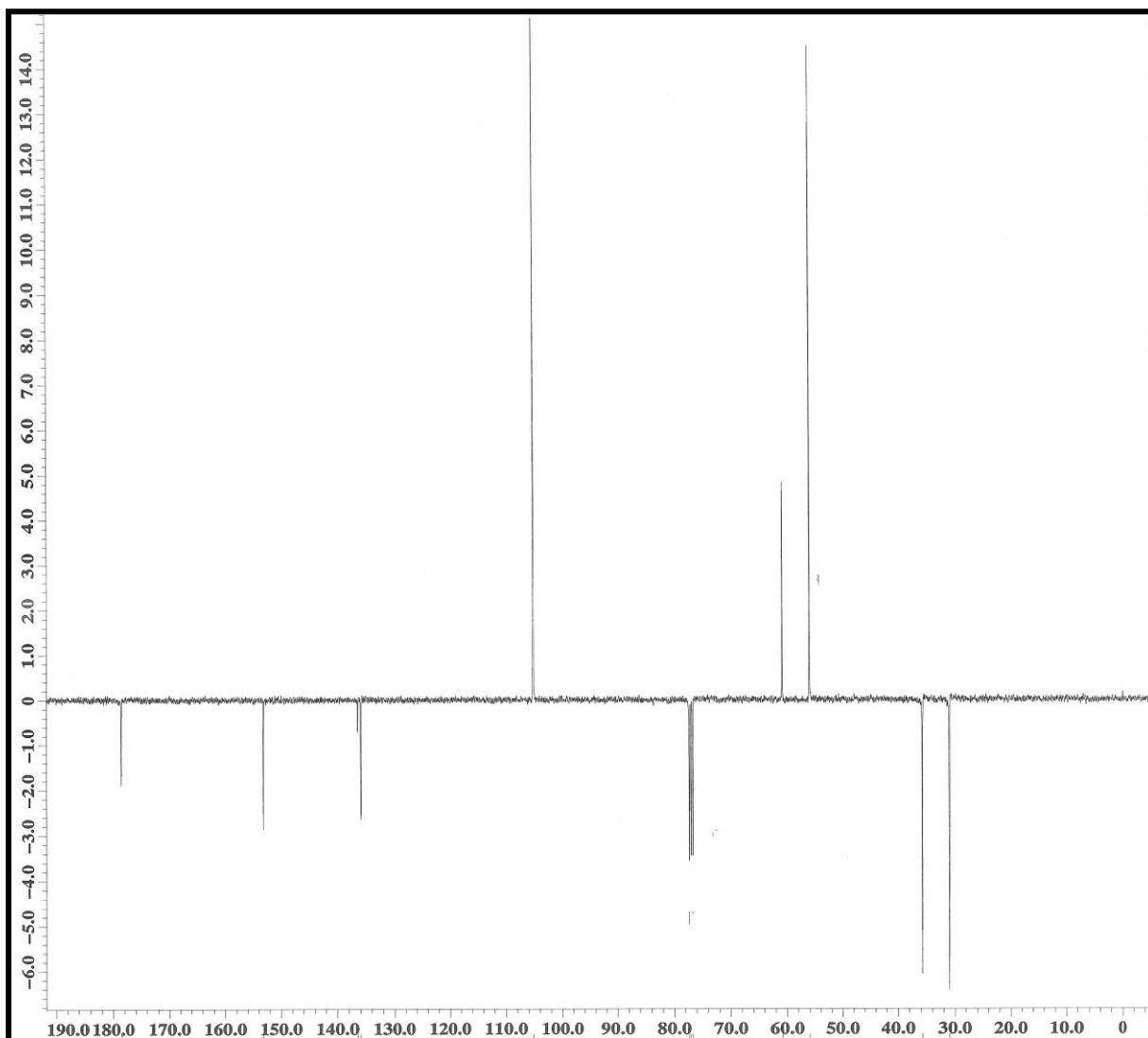


Figura 38. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  126 MHz) do PHTAC-2, utilizando a técnica DEPT 135.

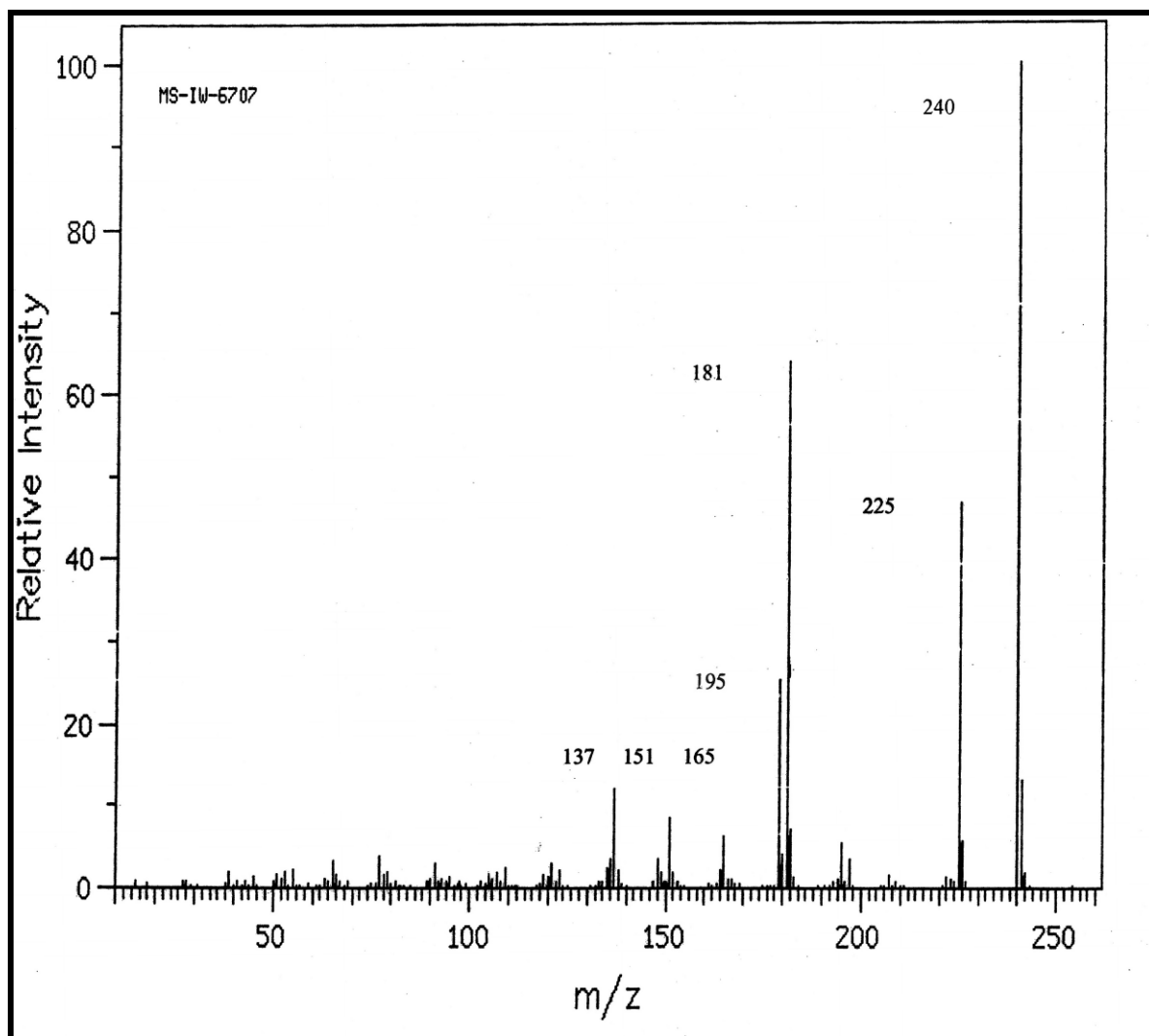


Figura 39. Espectro de massas (I. E. 75 e V) do PHTAC-2

Tabela 09. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de PHTAC-2

	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$
C		
1	135,92	-
3/5	153,21	-
4	136,47	-
9	178,59	-
CH		

continuação		
2/6	105,21	6,43 (s)
CH <sub>2</sub>		
7	35,71	2,90 ( t, J = 7,0 Hz)
8	30,99	2,68 ( t = 7,0 Hz)
CH <sub>3</sub>		
CH <sub>3</sub> O-3	56,71	3,84 ( s)
CH <sub>3</sub> O-4	60,82	3,83 (s)
CH <sub>3</sub> O-5	56,71	3,84 (s)

O ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico **[50]** já foi isolado de *P. retrofractum* e também sintetizado a partir do composto etil 3',4',5' – trimetoxicinamante isolado do extrato hexânico de *P. longum* (PARMAR *et al.*,1997; KUMAR *et al.*, 2005) onde recebeu o nome de ácido 3,4,5- trimetoxidihidrocinamico. Os autores relatam atividade antiinflamatória contra a ação do TNF –  $\alpha$  sobre a liberação de ICAM-1 pelas células.

Esta é a primeira vez que esta substância está sendo relatada nos talos de *Piper hispidum*.

#### 4.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

##### 4.4.1 Avaliação da Atividade leishmanicida de *P. hispidum*.

Os ensaios farmacológicos com *Leishmania amazonensis* utilizando os óleos essenciais das folhas e talos de *P. hispidum* e os extratos de acetato de etila e hexano das folhas, avaliaram o potencial dos metabólitos frente a este parasita. Para maior confiabilidade dos resultados todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Antes de prosseguir com os testes realizou-se um teste de viabilidade a fim de observar o comportamento das *L. amazonensis* frente ao etanol. Observa-se na Figura 40, que a partir de 50µL (10%) de etanol as *L. amazonensis* morrem consideravelmente indicando que a 10% o etanol começa a ser tóxico. Nos testes realizados utilizando etanol para solubilizar os óleos e o extrato a quantidade de álcool não ultrapassa 5% ficando evidente que o etanol não interferiu nos resultados.

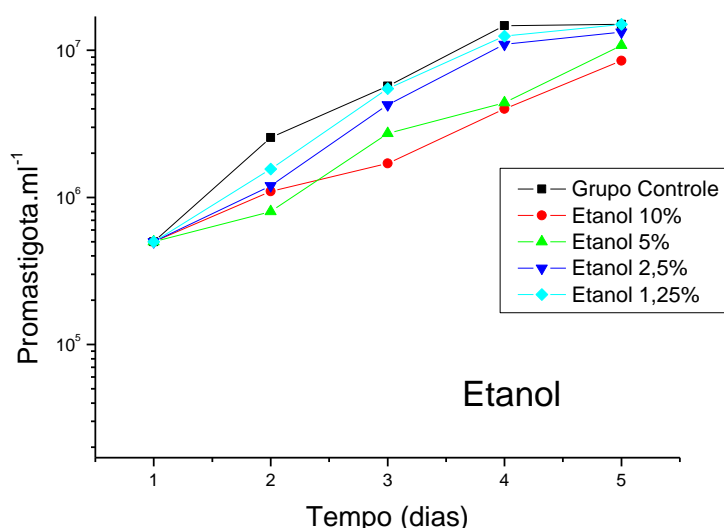
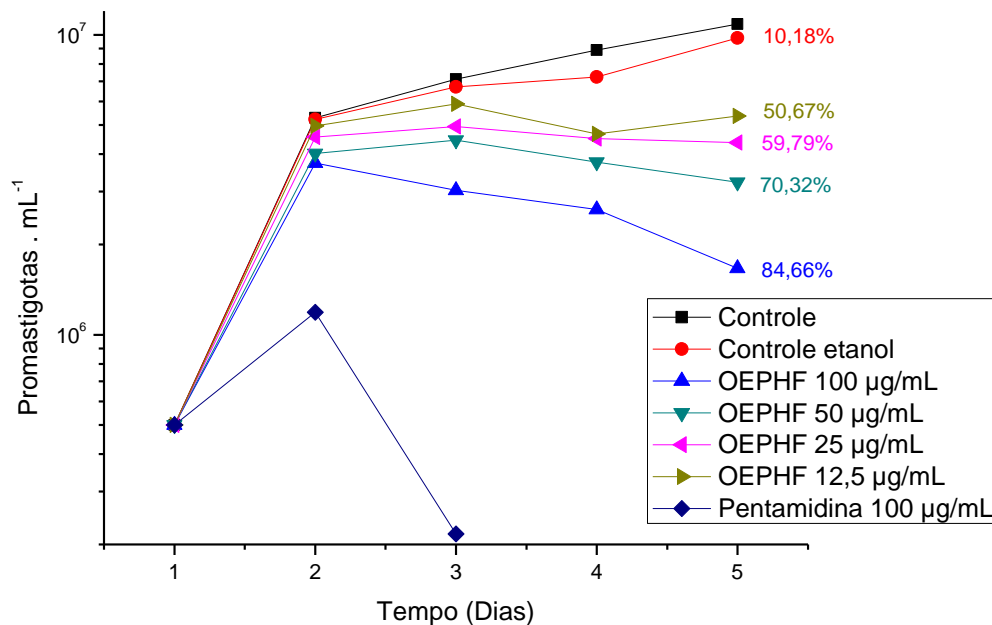


Figura 40: Curva de crescimento de *L. amazonensis* na presença de etanol.

##### 4.4.1.1 Atividade inibitória do crescimento celular *in vitro* das formas promastigotas de *L. amazonensis* frente aos óleos essenciais OEPHF e OEPHT.

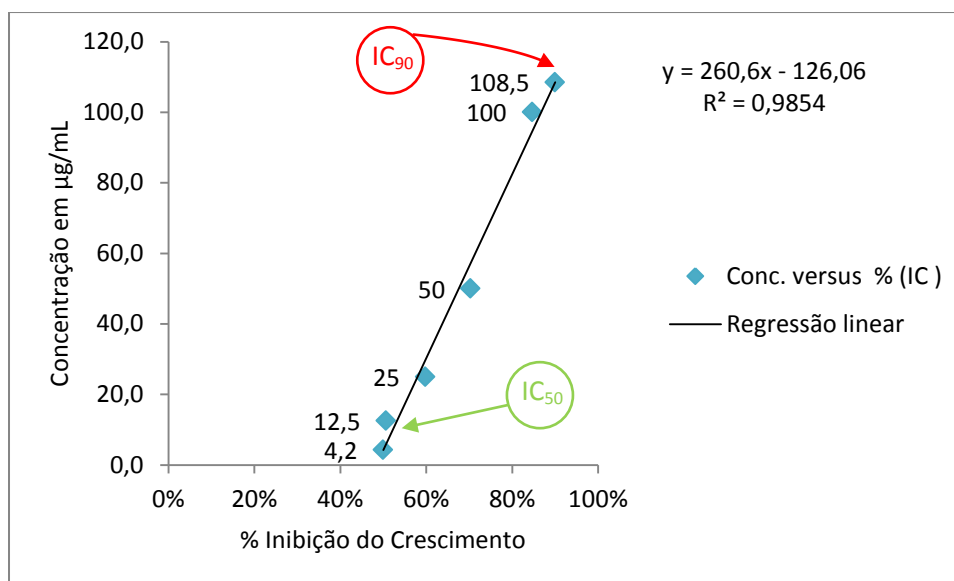
Testou-se o óleo essencial das folhas de *P. hispidum* - OEPHF nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL e 12,5µg/mL comparados a um controle de Pentamidina a 100µg/mL que representa a concentração máxima do OEPHF no ensaio. Os resultados expressos na Figura 41 apresentam a média de três ensaios (n=3) do número de promastigotas (x 10<sup>5</sup>) encontrados vivos durante os cinco dias do ensaio.

A Figura 41 mostra que o óleo essencial das folhas inibiu o crescimento das promastigotas em 50,67% numa concentração de 12,5µg/mL, na concentração de 25µg/mL a inibição foi de 59,79%, na concentração de 50µg/mL inibiu 70,32% e na concentração de 100µg/mL inibiu cerca de 84,66%.



**Figura 41:** Curva de crescimento de *L. amazonensis* na presença de OEPHF.

Os resultados foram analisados a partir de um modelo de regressão linear com o objetivo de descrever a relação existente entre as variáveis de concentração e inibição do crescimento (IC). Desde que o valor médio da variável IC seja uma função linear da concentração utilizada no experimento pode-se prever a inibição do crescimento médio (IC<sub>50</sub>), inibição do crescimento eficaz (IC<sub>90</sub>) a partir deste modelo interpolando os valores de concentração *versus* percentual da inibição do crescimento em um gráfico obtendo desta forma um modelo de previsão. Esta previsão é uma estimativa baseada nas variáveis de concentração e percentual de inibição.



**Figura 42:** Regressão linear dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas *L. amazonensis* frente a OEPHF.

A previsão estatística expressa na Figura 42 sugere que o IC<sub>50</sub> do óleo essencial das folhas de *P. hispidum* corresponda a uma concentração de 4,2µg/mL, e o IC<sub>90</sub> corresponda a 108,5µg/mL.

Testou-se o óleo essencial dos talos de *P. hispidum* - OEPHT nas concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL e 12,5µg/mL comparados a um controle de Pentamidina a 100µg/mL que representa a concentração máxima do OEPHT no ensaio. Os resultados expressos na Figura 43 apresentam a média de três ensaios (n=3) do número de promastigotas ( $\times 10^5$ ) encontrados vivos durante os cinco dias de ensaio.

A Figura 43 mostra que o óleo essencial dos talos inibiu o crescimento das promastigotas em 48,15% numa concentração de 12,5µg/mL, na concentração de 25µg/mL a inibição foi de 60,69%, na concentração de 50µg/mL inibiu 69,80% e na concentração de 100µg/mL inibiu cerca 80,87%.

Ambos os óleos essenciais apresentaram valores de inibição do crescimento muito próximos com variações muito pequenas, mesmo apresentando diferenças nas composições químicas.

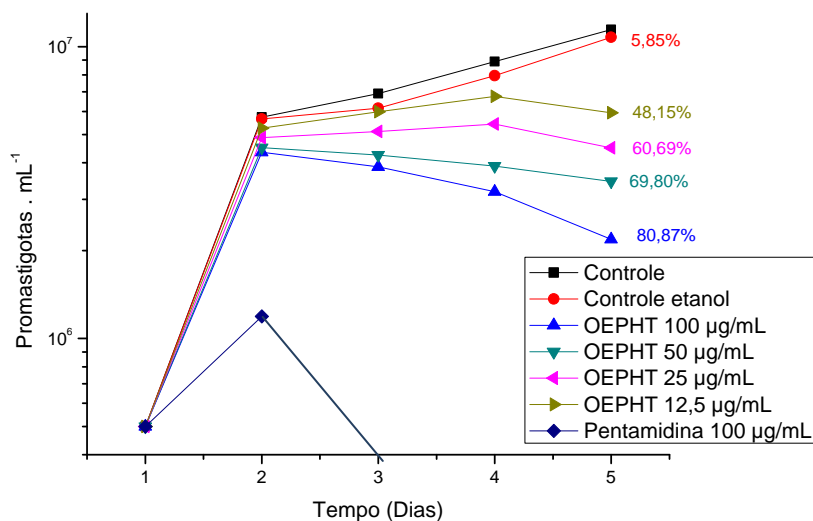


Figura 43: Curva de crescimento de *L. amazonensis* na presença de OEPHT.

A previsão estatística expressa na Figura 44 sugere que o IC<sub>50</sub> do óleo essencial dos talos de *P. hispidum* corresponda a uma concentração de 7,4µg/mL, e o IC<sub>90</sub> corresponda a 113,5µg/mL.

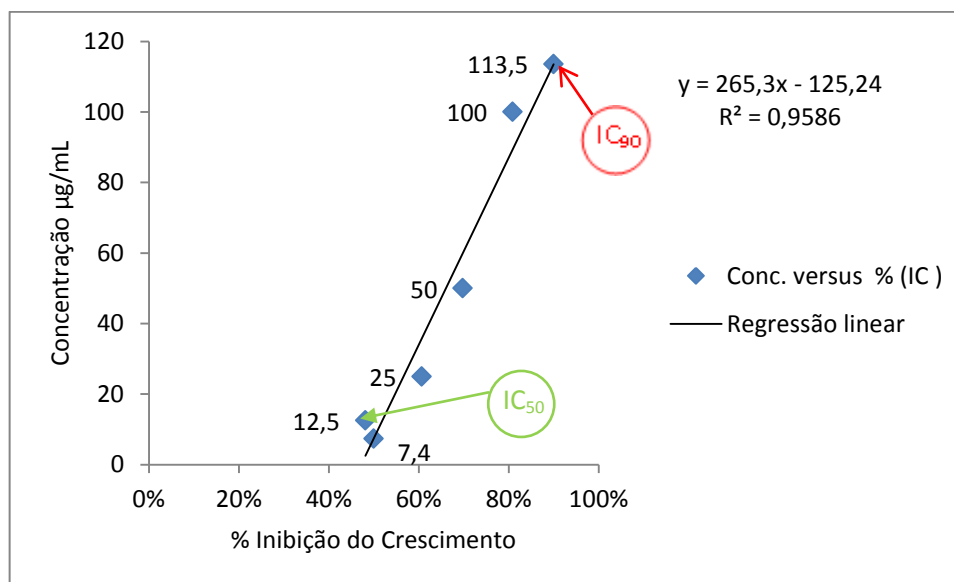


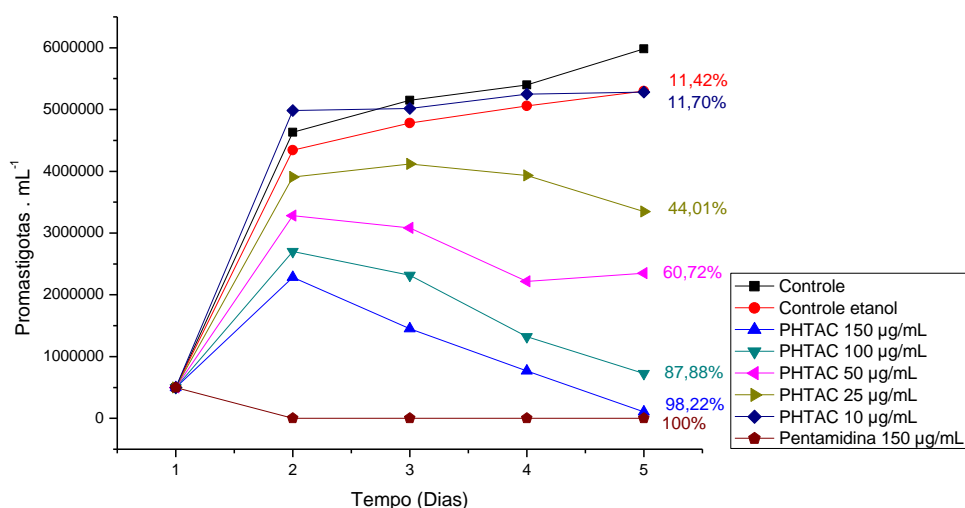
Figura 44: Regressão linear dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas *L. amazonensis* frente a OEPHT.

Está é a primeira vez que se relata a atividade leishmanicida dos óleos essenciais das folhas e dos talos de *P. hispidum*. Ambos os óleos essenciais apresentaram bons resultados de inibição do crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

#### 4.4.1.2 Avaliação do extrato dos talos de *P. hispidum* frente a *L. amazonensis*

O extrato de acetato de etila dos talos de *P. hispidum* – PHTAC foi avaliado nas concentrações de 150µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL e 10µg/mL comparados a um controle de Pentamidina a 150µg/mL que representa a concentração máxima de PHTAC neste experimento. Os resultados expressos na Figura 45 apresentam a média de três ensaios (n=3) do número de promastigotas ( $\times 10^5$ ) encontrados vivos durante os cinco dias do experimento.

A Figura 45 mostra que o extrato de acetato de etila dos talos inibiu o crescimento das promastigotas em 11,70% numa concentração de 10µg/mL, na concentração de 25µg/mL a inibição foi de 44,01%, na concentração de 50µg/mL inibiu 60,72%, em 100µg/mL inibiu cerca 80,87% e em 150µg/mL chegou a inibir 98,22%.

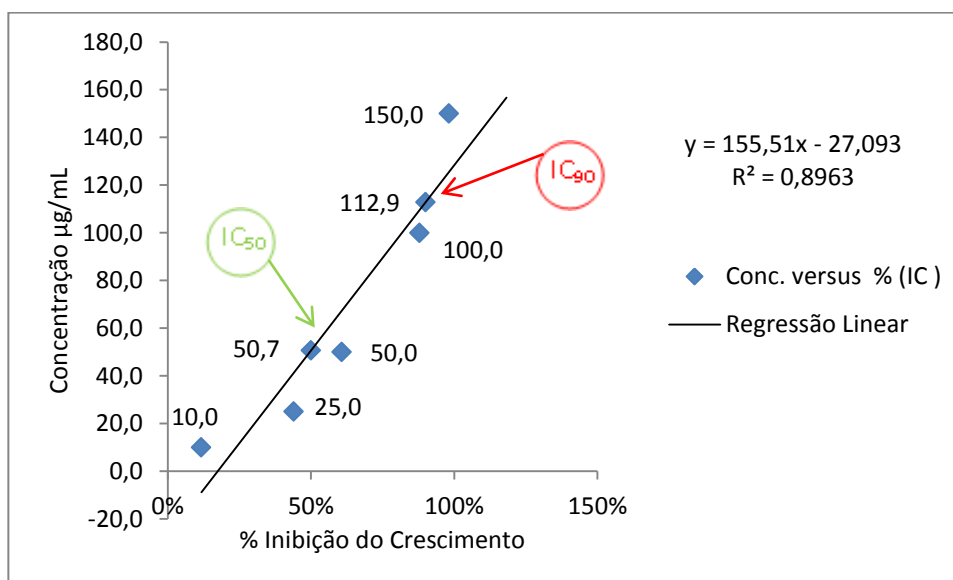


**Figura 45:** Curva de crescimento de *L. amazonensis* na presença de PHTAC.

Um estudo realizado por Esteves et al., (2007), avaliou a atividade leishmanicida do extrato etanólico das folhas de *P. hispidum* frente a *Leishmania amazonensis*, e relatou um bom resultado de inibição com  $IC_{50}$  menor do que 10µg/mL, se comparado com o extrato de acetato de etila dos talos, o mesmo possui uma ação mais potente pois os talos na concentração de 10µg/mL inibiu apenas 11,70%. O autor não faz menção sobre os possíveis metabolitos responsáveis pela eficiente ação do extrato das folhas.



A previsão estatística expressa na Figura 46 sugere que o IC<sub>50</sub> do extrato acetato de etila dos talos de *P. hispidum* corresponda a uma concentração de 50,7µg/mL de extrato, e o IC<sub>90</sub> corresponde a 112,9µg/mL.

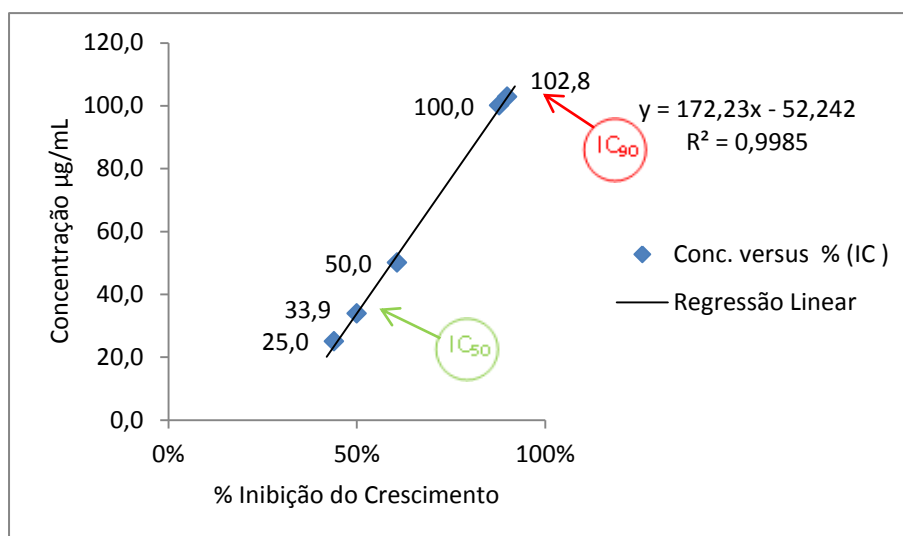


**Figura 46:** Regressão linear dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas *L. amazonensis* frente a PHTAC.

Porém é nítido que as conc. de 10µg/mL (sem efeito inibitório) e 150µg/mL (efeito inibitório mais eficaz) estão causando um desvio a linha de tendência do gráfico, e consequentemente causando flutuações nas estimativas estatísticas de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub>. Desta forma optou-se por não incluir estes valores com a finalidade de eliminar estas flutuações.

A revisão da previsão estatística (gráfico 47) sugere que o IC<sub>50</sub> do extrato acetato de etila de *P. hispidum* corresponda a uma concentração de 33,9µg/mL de extrato, e o IC<sub>90</sub> corresponde a 102,8µg/mL.

É fato que na condição de extrato os princípios ativos estão em concentrações bem diluídas, e quando isolados podem exercer uma ação mais acentuada. Visto desta maneira este extrato apresenta-se com grande potencial na busca de fármacos com atividade leishmanicida.



**Figura 47:** Regressão linear redefinida dos resultados do teste de inibição do crescimento de promastigotas *L. amazonensis* frente a PHTAC.

Estes resultados indiciam a necessidade de mais estudos sobre estes componentes com a finalidade de elucidar quais os possíveis metabolitos que estejam exercendo esta atividade, diante deste quadro de potencialidade para atividade leishmanicida, também se faz necessário avaliar a toxicidade destes óleos essenciais e do extrato de acetato de etila.

#### 4.4.2 Avaliação da atividade Antiplasmodial de *P. hispidum*

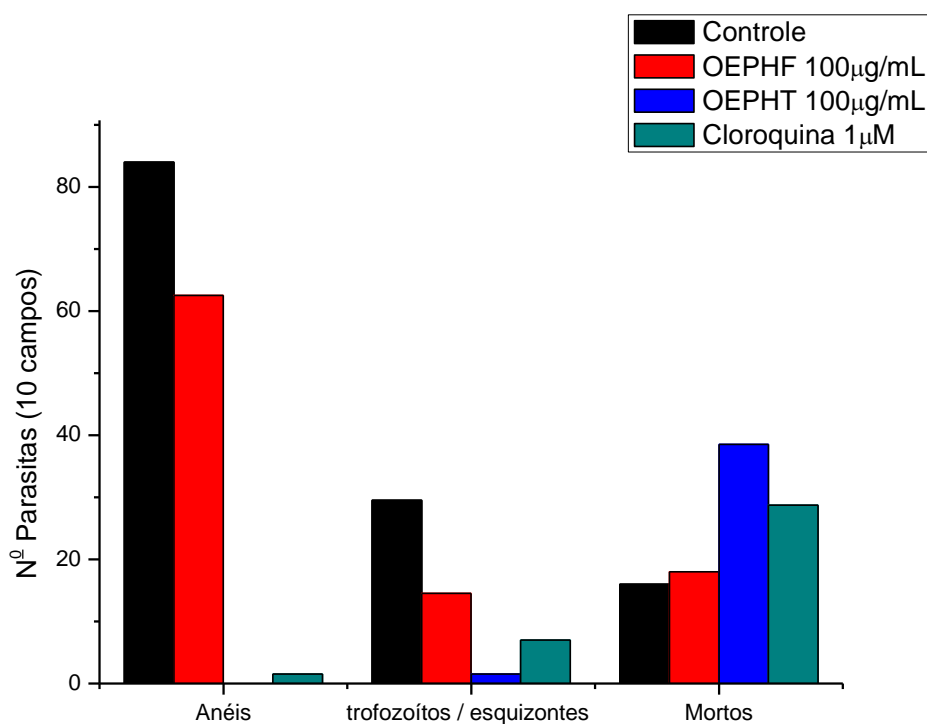
Os ensaios farmacológicos frente a *Plasmodium falciparum* utilizando os óleos essenciais das folhas e talos de *P. hispidum* e os extratos de acetato de etila e hexano das folhas, avaliaram o potencial dos metabólitos desta espécie frente a este parasita. Para maior confiabilidade dos resultados todos os ensaios foram realizados em duplicatas repetitivas.

Foram realizados 02 ensaios preliminares inicialmente partindo de culturas assincrônicas e avaliação do efeito antiplasmodial feita através da contagem em microscópio de 10 campos da lamina após o esfregaço delgado. Posteriormente realizou-se ensaios mais complementares partindo de culturas sincronizadas e desta vez a contagem foi realizada utilizando um marcador de hipoxantina tritiada.

#### 4.4.2.1 Ensaios Preliminares de Avaliação da Atividade Antiplasmodial dos Óleos Essenciais dos Talos e Folhas de *P. hispidum* Frente a *P. falciparum* cepas 3D7.

Os óleos essenciais das folhas e talos de *P. hispidum*, apresentaram distintos potenciais de atividade antiplasmodial. A avaliação preliminar da atividade antiplasmodial dos óleos essenciais das folhas e talos partiu de uma concentração de 100µg/mL, e de uma cultura com parasitemia assincrônica de maioria trofozoíto-esquizonte (0,5%), onde após 48hs os mesmos evoluíram para uma parasitemia de maioria anéis - maduros, como se observa no grupo controle da figura 48.

Escolheu-se 48hs de experimento, pois é neste tempo em que o mesmo completa um ciclo no hospedeiro (Figura 10, pag. 36). O metabolismo do parasita *in vitro* é mais lento, possivelmente por não reproduzir na totalidade o ambiente do hospedeiro. É por este motivo que a cultura *in vitro* partiu de maioria trofozoíto e esquizonte para anéis maduros ao invés de voltar para maioria de trofozoíto esquizonte. Este também é o limite em que se pode levar a cultura sem renovar o meio de cultura.

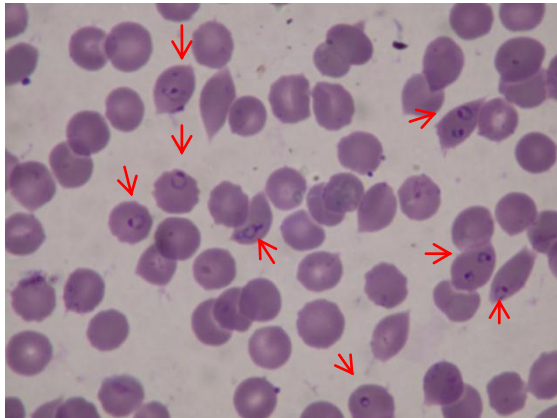


**Figura 48:** Ensaio com OEPHF e OEPHT - 100µg/mL frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Evolução após 48hs. (n=2)

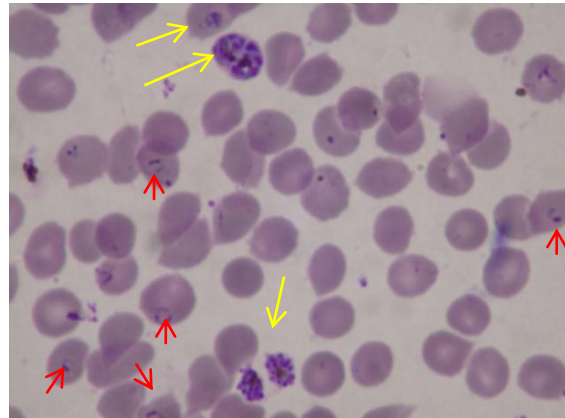
Pode-se observar na Figura 48 que o grupo controle apresentou certo número de parasitas mortos, isto se deve possivelmente pelo fato de não ter sido trocado o meio de cultura durante o decorrer do experimento, para evitar alterar a concentração do óleo essencial no meio. Com o passar do tempo é inevitável que os nutrientes diminuam e aumente a taxa de algumas toxinas liberadas pelo parasita ocasionando a morte de alguns.

Desta forma avaliou-se ao fim do experimento (48hs), o número de parasitas na forma de anéis, na forma de trofozoítos e esquizontes e o número de parasitas mortos. Observa-se que o óleo OEPHF (100µg/mL) inibiu cerca de 25,6% o número de anéis formados, assim como inibiu em cerca de 50% o desenvolvimento das formas de trofozoítos e esquizontes. As Figuras 49 e 50 ilustram as condições acima citadas. As setas vermelhas em ambas imagens indicam a alta incidência de parasitas na forma de anéis, e as setas amarelas indicam a presença de esquizontes maduros.

Estes Dados demonstram que o óleo essencial das folhas (OEPHF) de *P. hispidum*, apresenta baixo potencial antiplasmodial, pois obteve uma baixa resposta numa concentração considerada alta (100µg/mL), ao contrario do óleo essencial dos talos (OEPHT).



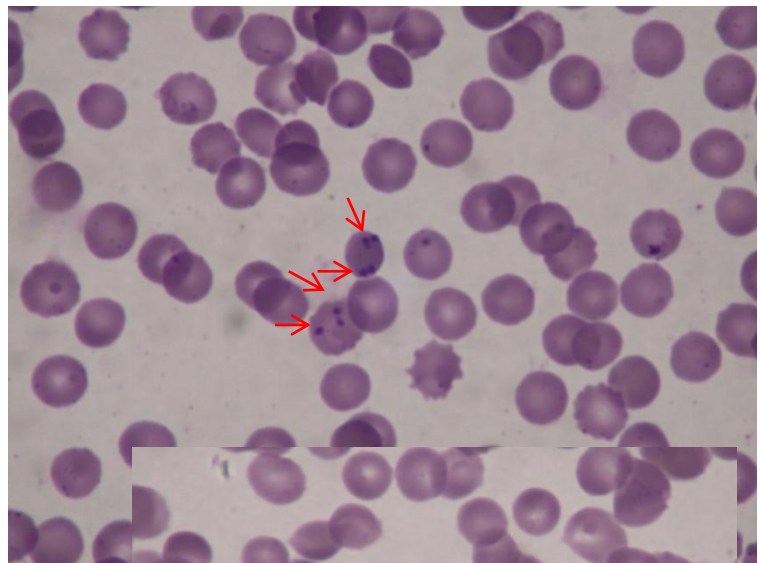
**Figura 49:** Ensaio de OEPHF (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*, evolução após 48hs .



**Figura 50:** Ensaio de OEPHF (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*, evolução após 48hs, destacando trofozoítos e esquizontes

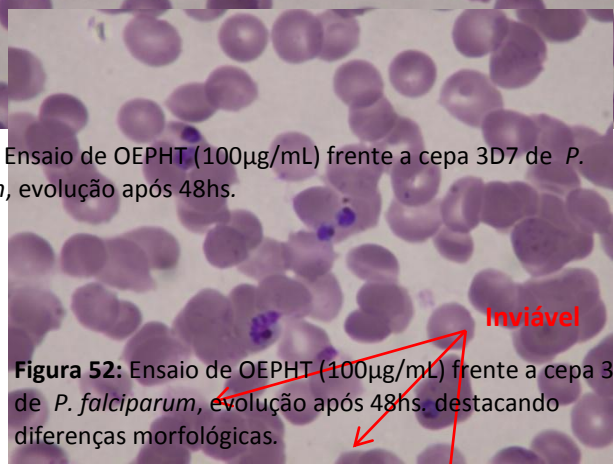
Com relação ao número de parasitas considerados mortos (com morfologia alterada) pode-se observar que o óleo essencial das folhas apresentou uma pequena mortalidade comparada ao grupo controle, cerca de 12,5% maior do que o grupo controle. O OEPHF apresentou uma atividade antiplasmodial muito baixa levando em consideração a sua concentração (100µg/mL).

O óleo essencial dos talos OEPHT ao contrario do óleo das folhas OEPHF, apresentou uma excelente atividade antiplasmodial a 100µg/mL, pode-se observar na Figura 48 que praticamente não foram encontrados parasitas na forma de anéis, o mesmo pode ser visto ilustrado na Figura 51. A maioria das células não foi parasitada e as poucas células que foram, apresentam parasitas com a morfologia alterada e foram classificados como mortos “inviáveis” (não iriam se desenvolver) destacado pelas setas vermelhas na Figura 51.



**Figura 51:** Ensaio de OEPHT (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*, evolução após 48hs.

Quanto a presença de trofozoítos



**Figura 52:** Ensaio de OEPHT (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*, evolução após 48hs. destacando diferenças morfológicas.

e esquizontes a maior parte também se encontra morto “inviáveis” indicados pelas setas vermelhas, porém foram encontrados alguns poucos que ainda tinham um aspecto morfológico que indicavam certa viabilidade, indicados pela seta azul, apenas 5% em relação ao total de parasitas do grupo controle, conforme representado no esquema da Figura 52.

Em relação ao número de parasitas mortos OEPHT apresenta um total de 140% mais parasitas mortos em relação ao total de mortos do grupo controle, superando até mesmo a cloroquina, droga comercial utilizada no tratamento da malária. Demonstrando que possivelmente o OEPHT (100µg/mL) possui uma significativa e potente ação antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum*, cepas 3d7 sensível a cloroquina.

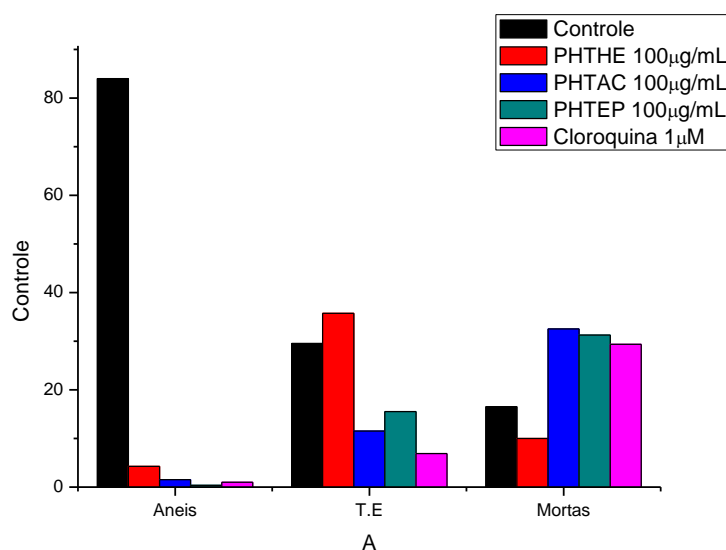
#### 4.4.2.2 Ensaios Preliminares de Avaliação da Atividade Antiplasmodial do Extrato de Acetato de Etila dos Talos e isolados Frente a *P. falciparum* cepa 3D7.

Foi investigado o potencial da atividade antiplasmodial dos extratos brutos dos talos de *P. hispidum*, e uma das substâncias isolada (PHTAC-2) do extrato de acetato de etila dos talos, a outra substância isolada não foi avaliada preliminarmente devido a pouca quantidade da mesma, decidiu-se então avaliar o potencial antiplasmodial de PHTAC-1 somente no ensaio com hipoxantina tritiada.

Os extratos investigados foram extrato de éter de petróleo (PHTEP), extrato hexânico (PHTHE) e extrato acetato de etila (PHTAC) dos talos de *P. hispidum*. A avaliação preliminar da atividade antiplasmodial dos óleos essenciais das folhas e talos partiu de uma concentração de 100µg/mL, e de uma cultura com parasitemia assincrônica de maioria trofozoíto-esquizonte 0,5%, onde após 48hs os mesmos evoluíram para uma parasitemia de

maioria anéis -  
maduros, como  
observa no  
controle da  
Fig. 53.

se  
grupo  
Figura

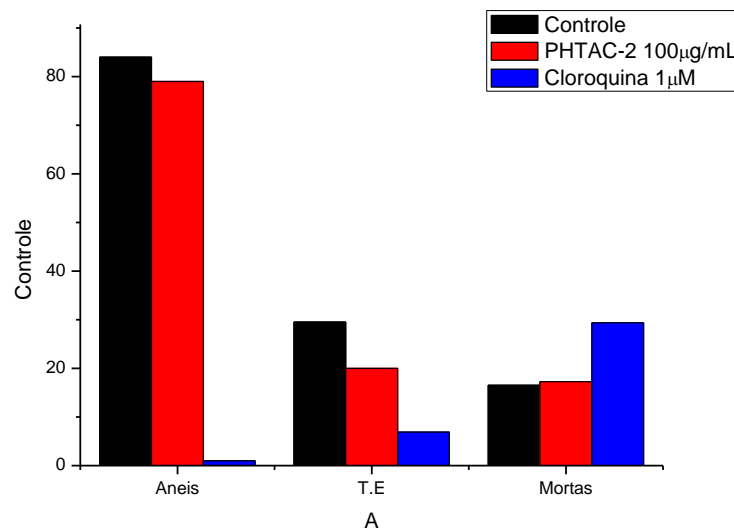


**Figura 53:** Ensaio com extratos de *P. hispidum* - 100µg/mL frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Evolução após 48hs. (n=2).

A Figura 53 mostra três extratos onde não apresentaram parasitas na forma de anéis, porém o extrato hexânico apresentou mais parasitas na forma de trofozoítos e esquizontes do que o grupo controle. Enquanto os outros dois extratos continuaram apresentando indícios de que possuem uma atividade antiplasmodial ligeiramente mais acentuada. Dentre os três extratos, o que se destaca é o PHTAC, com menos parasitas viáveis e com mais parasitas mortos, apresentando um perfil semelhante ao da cloroquina. O extrato PHTEP também merece destaque, pois se apresenta ligeiramente em desvantagem com PHTAC, mas com bons índices de parasitas mortos.

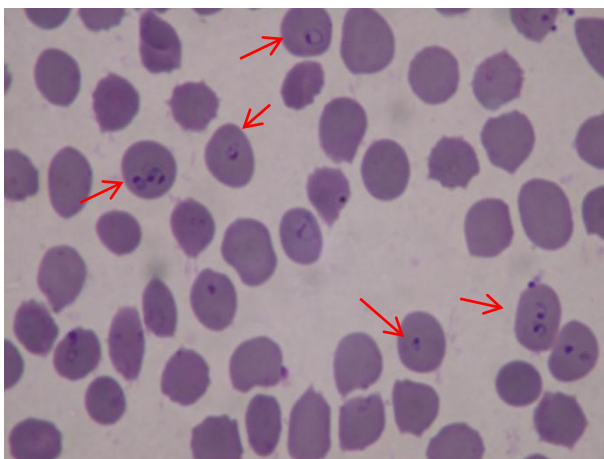
A substância PHTAC-2 (ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico) isolada do extrato de acetato de atila dos talos, praticamente não apresentou níveis significativos de atividade antiplasmodial como pode-se observar na Figura 54.

Houve uma boa evolução de anéis no ensaio com PHTAC, quase comparado ao grupo controle, assim também foi com trofozoítos e esquizontes, indicando que esta substância não possui propriedades antiplasmodial.

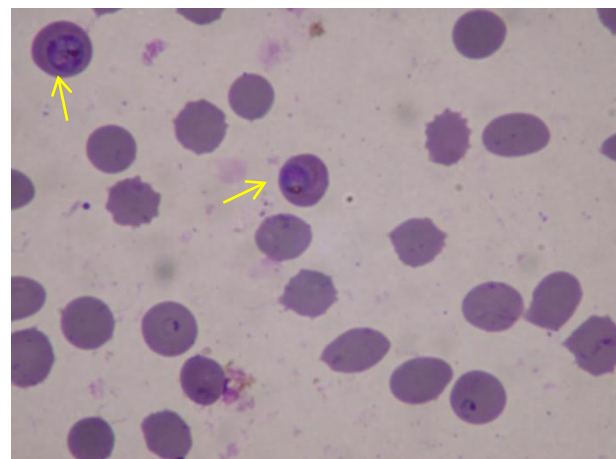


**Figura 54:** Ensaio de PHTAC-2 100µg/mL frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*. Evolução após 48hs.

A morfologia dos parasitas era praticamente igual as do grupo controle, com raras exceções de parasitas inviáveis. Nas Figuras 55 e 56 pode-se observar os parasitas na forma de anéis bem formados, indicados pelas setas vermelhas, trofozoítos e esquizontes maduros e desenvolvidos indicados pelas setas amarelas. Evidenciando que a substância não apresenta uma propriedade Antiplasmodial, sendo a primeira vez que esta atividade é avaliada para esta substância.



**Figura 55:** Ensaio de PHTAC-2 (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*, evolução após 48hs, destacando parasitas na forma de anéis.



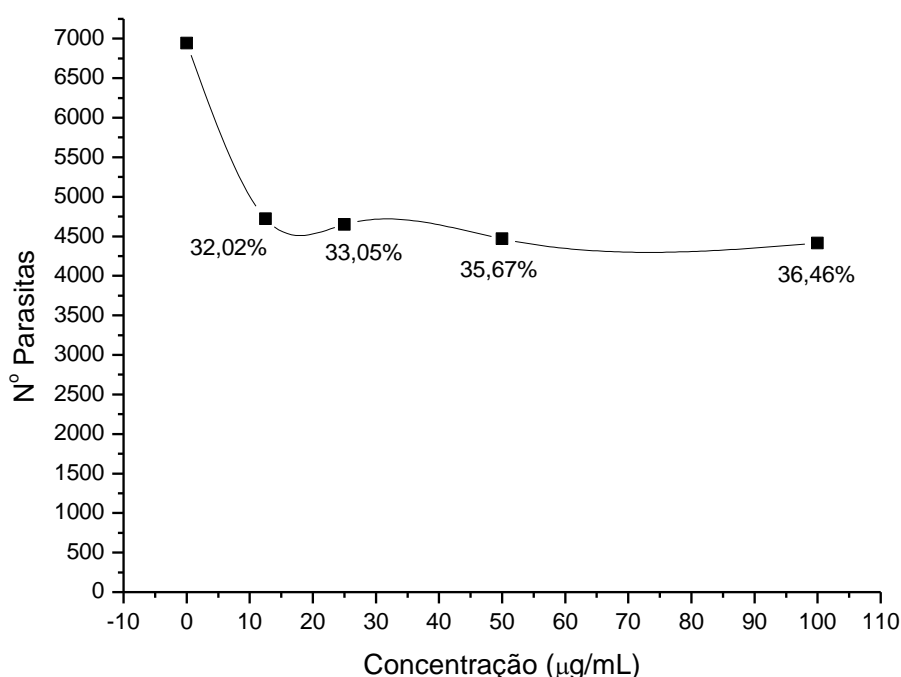
**Figura 56:** Ensaio de PHTAC-2 (100µg/mL) frente a cepa 3D7 de *P. falciparum*, evolução após 48hs, destacando as formas trofozoítos e esquizontes.



4.4.2.3 Ensaio de Avaliação da Atividade Antiplasmodial dos Óleos Essenciais dos Talos e Folhas de *P. hispidum* e seus isolados PHTAC-1 e PHTAC-2 Frente a *P. falciparum* cepas W2 utilizando hipoxantina tritiada como marcador de crescimento.

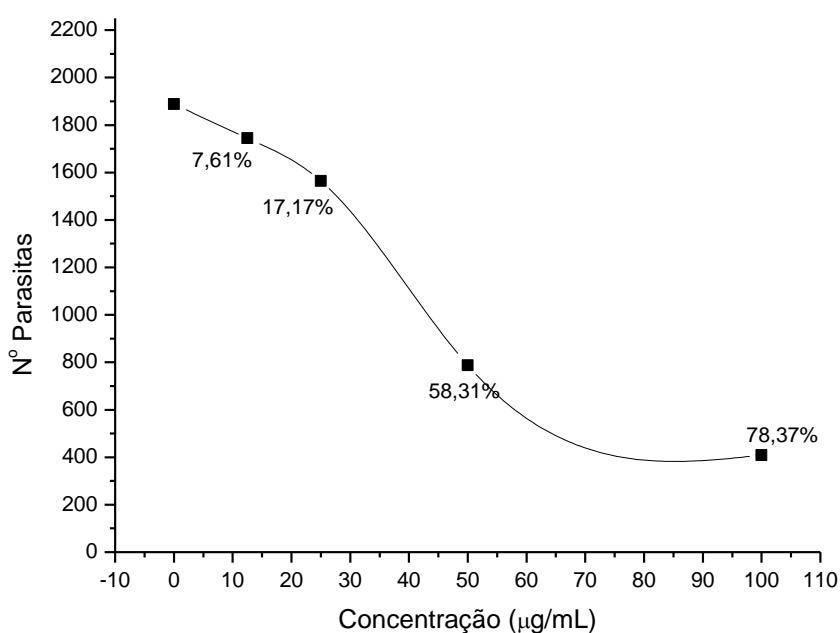
Com o objetivo de avaliar mais precisamente o potencial antiplasmodial dos óleos essenciais e das substâncias isoladas PHTAC-1 e PHTAC-2, realizaram-se ensaios utilizando cepas W2 cloroquina resistente de *Plasmodium falciparum*, utilizando [<sup>3</sup>H] hipoxantina como marcador de crescimento dos parasitas *in vitro*. Os ensaios foram realizados em duplicatas repetitivas e os gráficos das Figuras 57, 58, 59 e 60 são representativos de um experimento. Foram testados varias concentrações das substâncias em teste, 12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL respectivamente.

A Figura 57 reproduz a resposta do óleo essencial das folhas – OEPHF, onde pode-se observar que independente da concentração a inibição não altera se significativamente, entre a menor concentração e a maior a atividade evolui apenas 4%, o que reproduz o perfil observado no ensaio anterior, evidenciando que OEPHF não apresenta uma considerável atividade antiplasmodial.



**Figura 57:** Ensaio de OEPHF frente a cepa W2 de *P. falciparum*. Evolução após 48hs.

óleo essencial dos talos de *Piper hispidum* apresenta uma atividade antiplasmodial muito relevante conforme representa a Figura 58. O OEPHT inibiu o desenvolvimento dos parasitas em cerca 7,61% na concentração de 12,5 µg/mL, quando dobra-se a dose para 25µg/mL a inibição sobe para 17,17%, um aumento de 10%. Quando a concentração atinge 50µg/mL o percentual de inibição sobre para 58,31%, um aumento de 40%. Isto caracteriza um crescimento exponencial da atividade, quando se dobra a concentração para 100µg/mL a inibição sobe para 78,37% já demonstrando certa queda no aumento da atividade com relação ao aumento da concentração como mostra o gráfico 26. O IC<sub>50</sub> deste óleo essencial está próximo a concentração de 50µg/ml. Este experimento reproduz os resultados do primeiro ensaio, confirmando a presença da atividade antiplasmodial em OEPHT.



**Figura 58:** Ensaio de OEPHT frente a cepa W2 de *P. falciparum*. Evolução após 48hs.

Janett-Siems et al., (1999) realizou um estudo avaliando a atividade antiplasmodial frente a parasitas sensíveis e resistentes a cloroquina, de substâncias isoladas de *P. hispidum*, foram testadas três substâncias isoladas do extrato lipofílico de *P. hispidum*, o dilapiol [45], e duas dihidrochalconas, asebogenina [51] e 2', 4', 6' trihidroxidihidrochalcona [52]. A asebogenina apresentou um IC<sub>50</sub> na concentração de 16,9µg/mL para parasitas resistentes a cloroquina e 10,4µg/mL para parasitas sensíveis a cloroquina. A segunda

dihidrochalcona e o dilapiol foram considerados com baixa atividade apresentando IC<sub>50</sub> acima de 50µg/mL para ambas cepas.

O óleo essencial dos talos OEPHT, apresenta em sua composição o dilapiol como um dos componentes majoritários, e este possivelmente pode estar exercendo parte da atividade antiplasmodial de OEPHT. É interessante enfatizar que se o IC<sub>50</sub> de OEPHT está abaixo de 50µg/mL, possivelmente deve haver uma ou mais substância presente na constituição do OEPHT com atividade antiplasmodial, fazendo com que haja sinergismo entre elas fazendo com que apresente este potencial antiplasmodial. A atividade antiplasmodial dos óleos essenciais dos talos e folhas de *P. hispidum* nunca tinha sido elucidada, está é a primeira vez que se reporta o potencial antiplasmodial destes óleos.

A substância isolada do extrato de acetato de etila PHRAC-1 identificada como piplartina apresentou uma excelente atividade antiplasmodial, como ilustra a Figura 59. Inibindo o desenvolvimento dos parasitas em 29,02% numa concentração de 12,5µg/mL, ao dobrar a concentração para 25µg/mL a inibição praticamente dobrou também, aumentando para 65,35%. Evidenciando que o IC<sub>50</sub> desta substância está entre 12,5µg/mL e 25µg/mL.

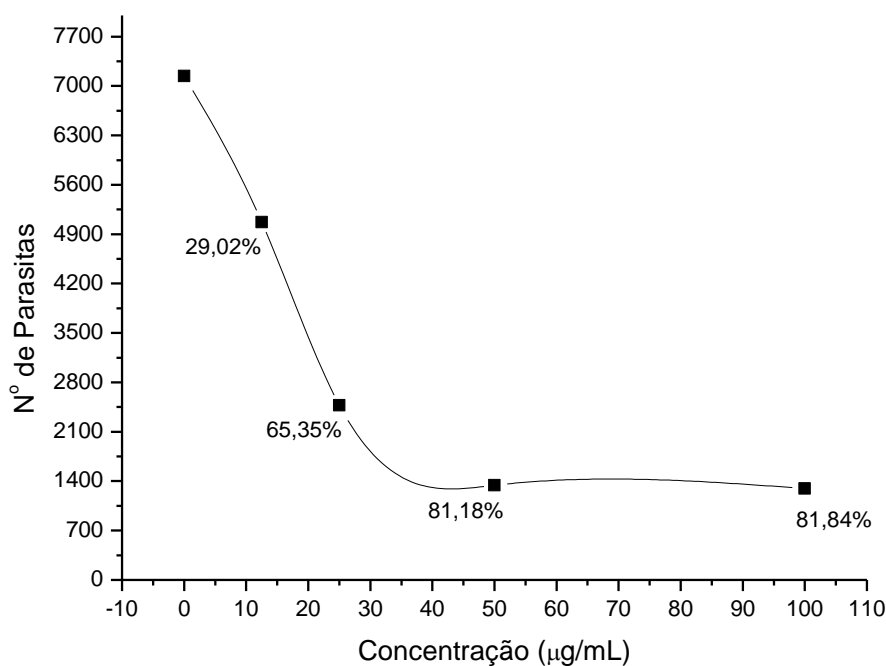


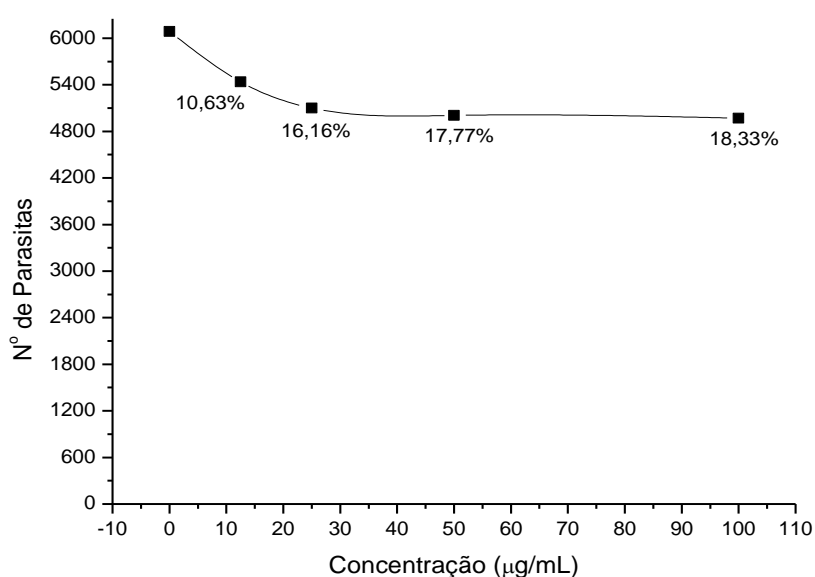
Figura 59: Ensaio de Piplartina frente a cepa W2 de *P. falciparum*. Evolução após 48hs. (n=3)

Nas concentrações de 50µg/mL e 100µg/mL a inibição atingiu 81,18% e 81,84% respectivamente, o que pode estar ocorrendo nesta situação é a expressão da [<sup>3</sup>H] hipoxantina em outras células, que são contadas no equipamento, e possivelmente a ação antiplasmodial da Piplartina chegue a atingir 100% antes mesmo de chegar a concentração de 100µg/mL. Demonstrando uma potente ação antiplasmodial, que pode estar associada a eficiente ação do extrato de acetato de etila testado anteriormente.

A atividade antiplasmodial da pipartina nunca tinha sido elucidada anteriormente, esta é a primeira vez que se reporta o potencial antiplasmodial desta substância.

A substância isolada PHTAC-2, identificada como ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico, não apresentou atividade antiplasmodial, inibiu cerca de 18% o crescimento dos parasitas na concentração máxima de 100µg/mL, confirmando os resultados do experimento anterior, evidenciando que esta substância não apresenta atividade antiplasmodial frente a *P. falciparum*, como representa a Figura 60.

A atividade antiplasmodial do ácido 3,4,5-trimetoxifenil-propanóico nunca tinha sido elucidada anteriormente, esta é a primeira vez que se reporta o potencial antiplasmodial desta substância.



**Figura 60:** Ensaio do ácido 3,4,5-trimetoxi-propanóico frente a cepa W2 de *P. falciparum*. Entre as substâncias testadas frente a *Plasmodium falciparum*, as mais significativas foram o óleo essencial dos talos OEPHT com IC<sub>50</sub> abaixo de 50µg/mL, e a

---

piplartina com  $IC_{50}$  abaixo de  $25\mu\text{g/mL}$ , com os melhores índices de inibição do crescimento de *P. falciparum* cepa 3D7 sensível a cloroquina e W2 resistente a cloroquina.

## CONCLUSÃO

No óleo essencial das folhas, identificou-se cerca de 82,12% dos constituintes químicos do óleo essencial das folhas sendo 9,16% monoterpenos, 71,68% sesquiterpenos e 1,28% fenilpropanóides. Os compostos majoritários identificados são (E)-cariofileno [21], germacreno D [30], Ishwarano [27] e o  $\beta$ -elemeno [20].

Foram identificados cerca de 77,32% dos constituintes químicos do óleo essencial dos talos sendo 5,25% monoterpenos, 57,16% sesquiterpenos e 14,91% fenilpropanóides. Os compostos majoritários identificados são (E)-cariofileno [21], dilapiol [45], óxido de cariofileno [43] e o  $\alpha$ -muuroleno [32]. Sendo que desses constituintes foi possível o isolamento através de cromatografia do dilapiol. Esta é a primeira vez que se apresenta a constituição do óleo essencial dos talos de *P. hispidum*.

Quanto aos constituintes fixos foi possível isolar duas substâncias do extrato de acetato de etila dos talos. Uma amida do tipo piperidina conhecida como Piplartina e um ácido carboxílico derivado do ácido cinâmico. Sendo que este é o primeiro registro destas substâncias nos talos desta espécie.

Avaliou-se a atividade inibitória do crescimento celular *in vitro* das formas Promastigotas de *Leishmania amazonensis* frente aos óleos essenciais das folhas e talos, conclui-se que ambos apresentam um significativo potencial leishmanicida onde na menor concentração de 12,5 $\mu$ g/mL, inibiram o crescimento das *leishmanias* em 50,67% e 48,15% respectivamente, sendo este um bom resultado. Estes resultados são os primeiros registros do potencial leishmanicida dos óleos essenciais de *P. hispidum*.

O extrato de acetato de etila apresentou resultados interessantes onde na concentração de 25µg/mL, inibiu o crescimento das *leishmanias* em 44,01%, considerando que se trata de um extrato, este resultado é muito significativo.

Quanto à avaliação da atividade antiplasmodial dos óleos essenciais, dos extratos e dos metabolitos isolados Piplartina e ácido cinâmico, o óleo essencial dos talos, o extrato PHTAC e a piplartina apresentam uma expressiva e promissora atividade antiplasmodial, o que os torna, alvos potenciais na busca ferramentas farmacológicas para o controle de doenças como a malária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, ALUÍZIO M.; BRIGHENTE, INÊS MA COSTA; AGUIAR, ELIANE M.; REBELO, RICARDO A. Volatile Constituents of Piperaceae from Santa Catarina, Brazil – Essential Oil Composition of *Piper cernuum* Vell. and *Peperomia emarginella* (Sw.) C. DC. **Journal of Essential Oil Research**. Vol. 17, pag. 286-288, 2005
- ADAMS, ROBERT P. **Identification of Essential oil Components By Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy**. Editora Allured Publishing Corporation. 3<sup>o</sup> Ed. United States. 2001
- ALECRIM, MARIA DAS GRAÇAS COSTA. **Estudo da Resistência do *Plasmodium falciparum* aos antimaláricos**. Dissertação apresentada a Universidade de Brasília UNB, Faculdade de Ciências da Saúde para obtenção do grau de Mestrado em Medicina Tropical, 116 pag. 1981
- ALVES, HELIO DE MATOS. A diversidade química das plantas como fonte de fitofarmacos. **Química Nova na Escola**. Nº 3. pag. 10-15. Maio de 2001.
- ALVES, A.; FENANDES, C. F.; SANTOS, M. R. A.; FACUNDO, V. A.; Atividade Antifúngica do óleo essencial de *Piper marginatum* sobre *Thanatephorus cucumeris* e *Fusarium oxysporum* *in vitro*. **ANAIS do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**. Distrito federal. Vol. 31, pag. 211-212, 2006
- ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. Antileishmanial Activity of Compounds Extracted and Characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**. vol. 49. pág 751 – 754. 1998.
- BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**. vol. 55. pág 589 – 595. 2000.
- BENEVIDES, P. J. C. ; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. **Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii***. *Phytochemistry*. Vol. 52, p. 339-343, 1999.
- BERENBAUM, M. R.; ZANGERL, B. **Herbivores – Their Interactions with Secondary Plant Metabolites**. New York: Ed. Academic Press., p.415, 1992.
- BERGESTRÖM, G. **Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids**. Ed. Claredon Press. Oxford, pag.287. 1991.



BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S. & MORAES, V.L.G. Brazilian Medicinal Plants: A Rich Source of Immunomodulatory Substances. **Brazilian Journal Association for the Advanced of Science**. vol. 49. pág 395 – 402. 1997.

BERNARD A.B. **Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics**. **Journal of Chemical Ecology**. Publisher Springer Netherlands ISSN 0098-0331 (Print) 1 Volume 21, Number 6, p. 801-814 June, 1995.

BEZERRA, D. P. **Potencial anticâncer da Piplartina e da Piperina, amidas isoladas de plantas do gênero Piper**. Fortaleza:UFCE, 2000. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Universidade Federal do Ceará, 2000.

BIESKI, I. G. C. **Marketing das plantas medicinais na saúde pública**. Especialização. Centro Amazônico de ensino pesquisa e extensão - CAEPE. p. 3, Cuiabá-MT, Novembro de 2004.

BIZZO, HUMBERTO R.; LOPES, DAÍSE; ABDALA, RODRIGO V.; PIMENTEL, FLAVIO A.; SOUZA, JOÃO A.; PEREIRA, MARCOS V. G.; BERGTER, LOTHAR.; GUIMARÃES, ELSIE F. Sarisan from Leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (long peper). **FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL**. Vol. 16, pag 113-115, 2001

BRASIL<sup>1</sup>. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª Ed. Editora do Ministério da Saúde. 2007.

BRASIL<sup>2</sup>. Ministério da Saúde. **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Acessado em 02/08/2009. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet?sinannet/Ita/bases/Itabrnet.def>>

BRASIL<sup>3</sup>. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília, 1ª Ed. 112 p. 2005

BRASIL<sup>4</sup>. Ministério da Saúde. **Ações de Controle da Malária: Manual para Profissionais de Saúde na Atenção Básica**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. – Brasília, (Série A. Normas e Manuais Técnicos). 56 p. 2005

BRASIL<sup>5</sup>. Ministério da Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. Colaboração de Agostinho Cruz Marques [et al]. Fundação Nacional da Saúde – FUNASA, Brasília, 6ª Ed. Revisada, 104 p. 2001

CALDERON, LEONARDO DE A.; SILVA-JARDIM, IZALTINA; ZULIANI, JULIANA P.; SILVA, ALEXANDRE DE ALMEIDA; CIANCAGLINI, PIETRO; PEREIRA DA SILVA, LUIZ HILDEBRANDO; STÁBELI, RODRIGO G. Amazonian Biodiversity: A view of drug development for leishmaniasis and malaria. **J. Braz. Chemical Society**. Vol. 20, Nº 6, pag. 1011-1023, 2009

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.** pag. 33: 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A. R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NFkB). **Planta Med** **69**. pag. 973-983. 2003.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; SOLIS, P.N. Terpenóides from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry**. vol. 56. pág 203 – 210. 2000.

CARVALHO, JOSÉ CARLOS TAVARES. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios: Aspectos Químicos, Farmacológicos e Aplicações Terapêuticas**. 1ª Edição. Editora TecMedd. Ribeirão Preto – SP, 2004.

CDC<sup>1</sup>. Centers for Disease Control and Prevention – Washington, United States. Figura ciclo de vida leishmania ssp. Acessado em 15/08/2009. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>>

CDC<sup>2</sup>. Centers for Disease Control and Prevention – Washington, United States. Figura ciclo de vida *Plasmodium spp.* Acessado em 02/08/2009. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>>

CONSTANTIN, MARIA B.; SARTORELLI, PATRÍCIA; LIMBERGER, RENATA; HENRIQUES, AMÉLIA T.; STEPPE, MARTIN; FERREIRA, MARCELO J. P.; OHARA, MITSUKO T.; EMERENCIANO, VICENTE P.; KATO, MASSUO J. Essential Oils from *Piper cernuum* and *Piper regnelli*: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and <sup>13</sup>C-NMR. **Planta Med**. Vol. 67, Pag. 771-773, 2001

COSTA, MÔNICA R. F.; VIEIRA, PEDRO P.R.; FERREIRA, CYNTHIA O.; LACERDA, MARCUS V. G.; ALECRIM, WILSON D.; ALECRIM, MARIA DAS GRAÇAS C. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira. **Rev. Soc. Brasileira Medicina Tropical**. Vol. 41, Nº 4, Uberaba – SP, 2008

CRAVO, PEDRO; ROSÁRIO, VIRGILIO E. DO. Aspectos de Genética Molecular da Resistência aos Fármacos Antimaláricos. **Bio-medicina e Saúde Pública**. Lisboa, (s.n.t)

CROFT, S.L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis : current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**. vol. 19. pág 502 – 508. 2003.

CYSNE, J. B.; CANUTO, KIRLEY M.; PESSOA, O. D. L.; NUNES, E. P.; SILVEIRA, E. R. Leaf Essential Oils of Four *Piper* Species from the State of Ceará – Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Vol. 16, Nº 6B, pag. 1378-1381, 2005

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: arte e ciências – Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Unesp. 1996.

DÉVÉHAT, LOHÉZIC-LE F.; BAKHTIAR, A.; BÉZIVIN, C.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and Cytotoxic Activities of Some Indonesian Plants. **FITOTERAPIA**. Vol. 73. Nº 5. pag. 400 – 4005. 2002.

DEGANI, ANA LUIZA G.; CASS, QUEZIA B.; VIEIRA, PAULO C. Cromatografia – Um Breve Ensaio. **Química Nova na Escola**. Nº07, Maio 1998.

DORVAL, M.E.M.C.; OSHIRO, E.T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A.C.C.; ALVES, T.P. Ocorrência de Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Mato Grosso do Sul Associada à Infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. vol. 39. (01). pág 43 – 46. jan-fev. 2006.

FACUNDO, V. A.; MORAIS, S. M. Essential Oil *Piper tuberculatum* var. *tuberculatum* (Miq) CDC Leaves. **Journal of Essential Oil Research**. Vol. 17, Nº 3, pag. 304-305, 2005

FACUNDO, V. A.; REZENDE, C. M.; PINTO A. C. Essential Oil of *Piper carnconnectivum* C. DC. Leaves and Stems. **Journal of Essential Oil Research**. Vol. 18, pag. 296-297, 2006

FACUNDO, V. A.; FERREIRA, S. A.; MORAIS, S. M. Essential Oils of *Piper dumosum* Rudge and *Piper aleyreanum* C.DC (Piperaceae) from brazilian Amazonian Forest. **Journal of Essential Oil Research**. Vol. 19, pag 165-166, 2007

FACUNDO, V. A.; POLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes Químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazonica**. Vol 38, Nº 4, pag 733-742, 2008

FOURNET, A.; BARRIOS A.A.; MUNÓZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ A. Effects of Natural Naphtoquinones in BALB/c mice Infected With *Leishmania amazonensis* and *L. Venezuelensis*. **Anais Tropical Medicine Parasitology**. vol. 43. pág. 219-222. 1992.

FRANÇA, TANOS C. C.; SANTOS, MARTA G. DOS; FIGUEROA-VILLAR, JOSÉ D. Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**. Vol. 31, Nº 5, pag. 1271-1278, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**. Vol. 30. Nº 2. pag. 374-381, 2007.

GOTTLIEB, O. R. **Óleos essenciais da Amazônia**. VII. Acta Amazonica, Vol. 11, p. 143-148, 1981

HANDMAN, E. **Advances in Parasitology : Cell Biology of Leishmania.**; The Walter and Eliza Hall of Medical Rsearch, Post Office Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia; Editora Academic. Vol. 44, pág 03 – 39Press. 2000.

HERWALDT, L.B.; Leishmaniasis. (Seminário); **The Lancet.**; Vol. 354. pág 1191 – 1199. outubro de 1999.

HODGSON, E. **Biphasic responses in synergistic interactions**. Toxicology. Vol. 105, p. 211-216, 1995.

HOLETZ F. B.I; PESSINI G. L.; SANCHES N. R.; CORTEZ D. A. G.; NAKAMURA C. V.; FILHO B. P. D.. **Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases**. Programa de Pos-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97(7), 1027-31. 2002.

JANETT-SIEMS, KRISTINA.; MOCKENHAUPT, FRANK P.; BIENZLE, ULRICH.; GUPTA, MAHABIR P.; EICH, ECKART. *In vitro* Antiplasmodial Activity of Central American Medicinal Plants. **Tropical Medicine and International Health**. Vol. 4. Nº 9. pag. 611-615. September 1999.

JOHRI R K; THUSU N; KHAJURIA A; ZUTSHI U. **Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial cells. The status of gamma-glutamyl transpeptidase activity, uptake of amino acids and lipid peroxidation.** Regional Research Laboratory (CSIR), Jammu-Tawi, India *Biochemical pharmacology* ,43(7), 1401-7. 1992.

JONES, C. G., AND R. D. FIRN. On the evolution of plant secondary chemical diversity. **Phil. Trans. Royal Society, London, UK**. pag. 333-273. 1991

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANA, T., TOYOSHIMA, M.; HAYASH, M.; KOMIYAMA, K. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal of Natural Products**. vol. 61. pág 1332 – 1336. 1997.

KATSURAGAWA, TONY HIROSHI; GIL, LUIZ HERMAN SOARES; TADA, MAURO SHUGIRO, PEREIRA-DA-SILVA, LUIZ HILDEBRANDO. Endemias e epidemias na Amazônia – Malária e doenças emergentes em áreas ribeirinhas do Rio Madeira – Um caso de escola. **Estudos Avançados**. Vol. 22, Nº 64, pag. 111-141. 2008

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H; CROFT, S.L. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**. vol. 77. pág. 307 – 314. 2000.

KIM, H.M.; KIM, M.J.; LI, E.; LYU, Y.S.; HWANG, C.Y.; A.N.; N.H. The Nitric Oxide Production properties of *Solanum lyratum*. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 67. pág. 163 – 169. 1999.

KIUCHI, FUMIYUKI; NAKAMURA, NORIO; TSUDA, YOSHISUKE; KONDO, KAORU; YOSHIMURA, HIROYUKI. **Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. IV. Isolation and identification of larvicidal principles in pepper.** Fac. Pharm. Sci., Kanazawa Univ., Kanazawa, Japan. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 36(7), 2452-65. 1988.

KUMAR, S.; ARYA, P; MUKHERJEE, C.; SINGH, B.; BRANJENDRA, J.; SINGH, N.; PARMAR, V.S. **Novel Aromatic Ester from *Piper longum* and its analogues inhibit Expression of cell adhesion molecules on endothelial cells.** *Biochemistry*, 44, 15944-15952, 2005.

LANGENHEIM, J.H. Higher Plant Terpenoids: Phytocentric overview of their ecological roles. **Journal of Chemical Ecology**. Vol. 20. pag. 1223-1280. 1994

LEAL, LOURDES F.; MIGUEL, OBDULIO G.; SILVA, ROSI Z.; YUNES, ROSENDO A.; SANTOS, ALBERDAN S.; CECHINEL-FILHO, VALDIR. Chemical Composition of *Piper mikanianum* Essential Oil. **Journal of Essential Oil Reserach**. Vol. 17. Pag. 316-317, 2005

LEMOS, J.C.; LIMA, S.C.; COSTA, M.B.; MAGALHÃES, M.J. Leishmaniose Tegumentar Americana: Fauna Flebotomínica em Áreas de Transmissão no Município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Caminhos de Geografia – revista on line**. Programa De Pós-Graduação em Geografia.; Instituto de Geografia UFU (Universidade Federal de Uberlândia). Vol. 02. (03). pág 57 – 73. março de 2001

LERDAU, M. T.; PENUELAS, J. **Mund. Cient.** v.13, p.60, 1984.

LUZ, A. I. R.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Essential Oil Composition of *Piper dactylostigmum*, *P. plurinervosum* and *P. vitaceum*. **Journal of Essential Oil Research.** Nº 12. Pag. 94-96. 2000.

MACHADO, SAMÍSIA M. F.; MILITÃO, JÚLIO S. L. T.; FACUNDO, VALDIR A.; RIBEIRO, ADAUTO.; MORAIS, SELENE M.; MACHADO, MARIA I. L.; Leaf Oils of Two Brazilian *Piper* Species: *Piper arboreum* Aublet var. *latifolium* (C.DC) Yunker and *Piper hispidum* SW. **Journal of Essential Oil Research.** Nº 6. pag. 643-644. 1994

MAHAIO, U.V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **Journal of Natural Products.** vol. 58. pág. 324 – 328. 1995.

MAIA, JOSÉ. G. S.; SILVA, M. H. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, Nº10. pag 200-204. 1987

MAIA, JOSÉ G. S.; ZOGHBI, MARIA DAS GRAÇAS B.; ANDRADE, ELOISA H. A.; SANTOS, ALBERDAN S.; SILVA, MILTON H. L. da.; LUZ, ARNALDO I. R.; BASTOS, CLEBER N.; Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL.** Nº 13. pag. 269-272. 1998

MAIA, JOSÉ G. S.; ZOGHBI, MARIA DAS GRAÇAS B.; ANDRADE, ELOISA H. A. **Plantas Aromáticas na Amazônia e Seus Óleos Essenciais.** Museu Paraense Emílio Goeldi (série Adolpho Ducke): Belém – PA. 2000

MARZOCHI, M.C.A. **A Leishmaniose Tegumentar no Brasil. In: Grandes Endemias Brasileiras.** Brasília: Editora Universitária de Brasília, 1989

MCMURRY, JOHN. **Química Orgânica.** Vol 1, tradução técnica Ana Flávia Nogueira e Izilda Aparecida Bagatin. São Paulo – SP. Pioneira Thomson Learning. 2005

MESQUITA, J. M. O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A. P.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Estudo Comparativo dos Óleos Voláteis de Algumas espécies de Piperaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** Vol. 15, Nº 1, pag. 6-12, 2005

MORAIS, S. M.; FACUNDO, V. A.; BERTINI, L. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; ANJOS JUNIOR, J. F.; FERREIRA, S. A.; BRITO, E. S.; NETO, M. A. S. Chemical composition and Larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. **Biochemical Systematics and Ecology.** Vol. 35, Nº 10, pag. 670-675, 2007

MORO, EDUARDO T.; NAKAMURA, GIANE.; MARTINO, RODOLFO S.; NAKAMOTO, MARCIO LUIZ.; JÚNIOR, GERALDO R. R.; GANEM, ELIANA MARISA.; MODÓLO, NORMA S. P. Efeito do propofol associado a efedrina no tempo de latência do cisatracúrio. **Rev. Associação Médica Brasileira.** Nº53, Vol 3, pag 272-275. 2007

NAVICKIENE, H.M.D.; ALÉCIO, A.C.; KATO, M.J. BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. **Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum***. *Phytochemistry*, 55, 621-622, 2000.

NAVICKIENE, H.M.D.; MORANDIM, ANDREA DE A.; ALÉCIO, ALBERTO C.; REGASINI, LUÍZ O.; BERGAMO, DEBORA C. B.; TELASCREA, MARCELO; CAVALHEIRO, ALBERTO J.; LOPES, MÁRCIA N.; BOLZANI, VANDERLAN DA S.; FURLAN, MAYSA; MARQUES, MARCIA O. M.; YOUNG, MARIA C. M.; KATO, MASSUO J. Composition and Antifungal Activity of Essential Oils From:*Piper aduncum*, *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**. Vol. 29, Nº 3, pag. 467-470, 2006

OLIVEIRA<sup>1</sup>, J. C. S.; NEVES, I. A.; SCHWARTZ, M. O. E.; SILVA, L. L. D.; CÂMARA, C. A. G. Composição Química do Óleo Essencial de *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**.

OLIVEIRA<sup>2</sup>, J. C. S.; DIAS, I. J. M.; CÂMARA, C. A. G. Volatile Constituents of the Leaf Oils of *Piper aduncum* L. from Different Regions of Pernambuco (Northeast of Brazil). **Journal of Essential Oil Research**. Nº 18, pag. 557-559, 2006

OLIVEIRA<sup>3</sup>, EVANEIDE DINIZ. **Mecanismo de Ação Vasorelaxante de Piplartina, uma Alcamida Isolada das Raízes e do Caule de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae), em Aorta de Rato**. Dissertação – Universidade Federal da Paraíba. 2000.

PARMAR, V. S.; JAIN, S.C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A .; TYAGI, O. D.; PRASAD, A . K.; Wengel, J.; Olesen, C.E; Boll, P.M. **Phytochemistry of the Genus *Piper***. *Phytochemistry*, 46,4,597-673, 1997.

PECKOLT, T. & PECKOLT, G. **História das plantas medicinais e úteis do Brazil**. Rio de Janeiro, Laemmert, 1369 p. 1888.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA A. G.; CORTEZ, D. A. G. Neolignanas e Análise do Óleo Essencial das Folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Vol. 13, Nº 3, pag. 199-204, 2005.

PEREIRA, K. L.; FACUNDO, V. A.; **Estudo Dos Constituintes Fixos E Voláteis De *Piper alatabaccum* – Trih & Yuncker**. Monografia – Univ. Federal de Rondônia – UNIR. 2003

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P. EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. Vol. 25. Supl. 1. pág. 45-61. 2002.

POST-BEITTENMILLER, D. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, pag. 47:405-430, 1996.

POTZERNHEIM<sup>3</sup>, M. C. L.; BIZZO, H. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; VIEIRA, R. F.; CARVALHO-SILVA, M; GRACINDO, L. A. M. B. Chemical characterization of seven *Piper* species (PIPERACEAE) from Federal District Brazil, based on volatile oil constituents. **Ver. Bras. Pl. Med.** Botucatu, Vol. 8, Nº esp. pag. 10-12. 2006

POTZERNHEIM<sup>b</sup>, M. C. L.; BIZZO, H. R.; VIEIRA, R. F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Vol. 16, Nº 2, pag. 246-251. 2006

POTZERNHEIM<sup>c</sup>, M. C. L.; COSTA, ALEXANDRE C.; BIZZO, H. R.; CARVALHO-SILVA, M; VIEIRA, R. F. Essential Oil of *Piper xylosteoides* (Kunt) Steud. from Federal District, Brazil. **J. Essential Oil Research**. Vol. 18, pag. 523-524, 2006

RAMOS, L. S.; SILVA, M. L. da; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S.; Essential Oil Of *Piper marginatum*. **Journal Of Natural Products**. Vol. 49, Nº 4, pag 712-741, 1986

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M,A,S,; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P. LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke**. Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-ferme da Amazônia Central, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, p. 186. 1999.

ROÍG & MESA, J. T. **Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba**. Habana, Ministerio de Agricultura, partes I/II, 872 p. 1945.

SANTOS, ALBERDAN S.; ANDRADE, ELOISA H. A.; ZOGHBI, MARIA DAS GRAÇAS B.; LUZ, ARNALDO I. R.; MAIA, JOSÉ G. S. Sesquiterpenes of Amazonian *Piper* Species. **Acta Amazonica**. Vol. 28. Nº 2. pag. 127-130. 1998

SANTOS, F. S. D. dos. Tradições populares de uso de plantas medicinais na Amazônia. **História, Ciências, Saúde**. Vol. IV (suplemento). pag. 919-939. Setembro de 2000.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C.; Essential Oil analysis of Piperaceae Species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**. Nº 58, pag 547-551. 2001

SARKAR, M. GANGOPADHYAY, P., BASAK, B., CHAKRABARTY, K., BANERJI, J., ADHIKARY, P., CHATTERJEE A. **The reversible antifertility effect of *Piper betle* Linn. on Swiss albino male mice**. *Contraception* 62 ,271–274. 2000.

SIEMS, K., MOCKENHAUPT, F., BIENZLE, U., GUPTA, M., EICH, M., **In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants**. *Tropical Medicine and International Health*. volume 4 nº 9 pp 611–615 september 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª.ed. rev. Ampl; primeira reimpressão. pag. 13-29, 45-75, 107-123. (1002 pg). Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/ Editora da UFRGS. 2004.

SOLEANE, HELIDA.; SOARES DE AZEVEDO, MARIANGELA,; FACUNDO, VALDIR ALVES.; ROVER, MARCIA.; ANJOS SANTOS, OTILENE.; SLANA, GLAUCIA B. C. A.; BARRETO, ALAÍDE SÁ. Essential Oil of *Piper renitens* (Miq.) Yunck leaves and stems (piperaceae) from Brazilian Amazonian Forest. **Journal of Essential Oil Research**. Vol. 19, Nº 6, pag. 557-558, 2007

---

TAKABAYASHI, J., DICKE, M. AND POSTHUMUS, M. A. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: variation caused by biotic and abiotic factors. **Journal of Chemical Ecology**. Vol. 20. pag. 1324-1354. 1994

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, ANGELO C.; MACIEL, MARIA APARECIDA M. Plantas Mediciniais: Cura Segura?. **Química Nova**. Vol. 28, Nº 3, pag. 519-528, 2005.

YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. **Plantas Mediciniais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. pág. 13 - 146. (500 pág). Chapecó – Santa Catarina: editora ARGOS (editora universitária). 2001.

YANG, D.M.; LIEW, F.Y. Effects of qinghaosu (artemisin) and its Derivates on Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Parasitology**. vol. 106.. pág 07 – 11. 1992.

WHO (World Health Organization). Report on a Technical Consultation on Research in Support of Malaria Control in the Amazon Basin. TDR/ FIELD MAL/SC/AMAI 88.3. Genebra. 1988.