

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Contribuição ao estudo botânico, químico e farmacológico de plantas  
medicinais da Amazônia contra *leishmania sp.***

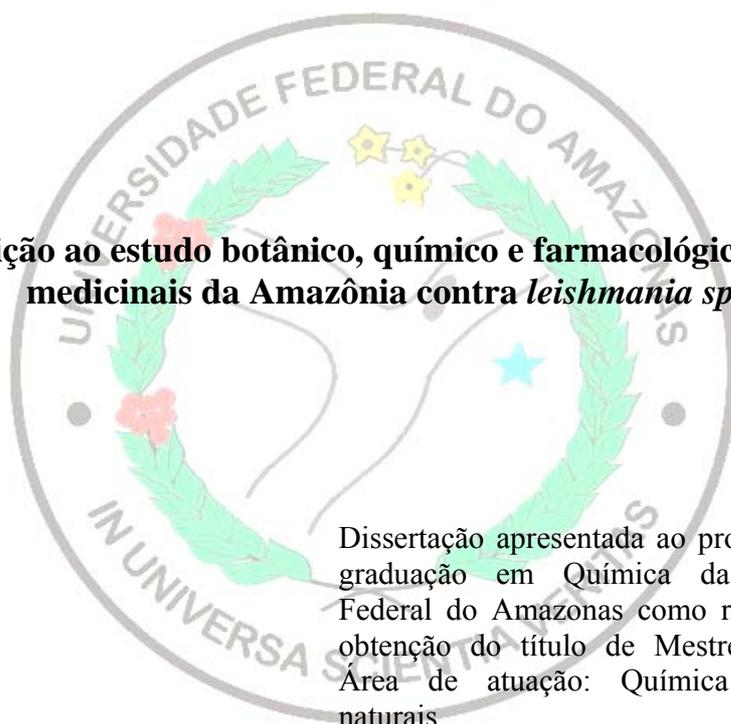


**DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA**

MANAUS – AM  
Março/ 2008

**DOMINIQUE FERNANDES DE MOURA**

**Contribuição ao estudo botânico, químico e farmacológico de plantas  
medicinais da Amazônia contra *leishmania sp.***



Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do título de Mestre em química. Área de atuação: Química de produtos naturais.

Orientador: Dr. Jefferson Rocha de Andrade e Silva.

Co - Orientadora: Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Fernandes Amaral.

MANAUS – AM  
Março/ 2008

À minha mãe, Maria das Graças  
Fernandes de Moura, que me incentivou  
e apoiou concretamente na realização  
deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

- À **Deus**, autor da minha vida, Aquele que me concedeu forças para realização deste trabalho.
- À minha mãe **Maria das Graças**, minhas irmãs **Danielle** e **Débora**, meu pai **José Galdino**, e toda família (**Tita**, **Maria Beatriz** e a esperada **Maria Júlia**) por seu amor, afeto e incentivos constantes que nunca me abandonaram.
- Ao meu noivo **Eclesiaste Amazonas** pela paciência, acolhida e carinho nos momentos difíceis.
- A meu orientador **Prof. Dr. Jefferson Rocha de Andrade Silva** pela confiança em mim depositada e acima de tudo pelo rigor científico em conduzir a realização deste trabalho.
- À minha co-orientadora **Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Fernandes Amaral** pela valiosa orientação, determinação e por todos os ensinamentos transferidos com precisão, com o único ideal de se fazer ciência.
- Aos companheiros da turma de 2006: **Aline**, **Lívia**, **Júnior**, **Vera Lúcia Imbiriba** e **Radamés** pela amizade, carinho, apoio e companheirismo.
- Aos meus companheiros do laboratório **B08**, **Lívia**, **Edinilze**, **Júnior**, **Geone**, **Fátima**, **Daisymara**, **Aimée**, **Érika**, **Reníee**, **Dácio**, **Socorro**, **Héctor** e a **Lidiam (B09)**, pelas ajudas nas “plaquinhas” e nas “colunas”, aprendizado mútuo e pelos momentos de diversão.
- Aos novos amigos cariocas **Gisele**, **Desirée**, **Valter**, **Vanessa**, **Rosa**, **Tati**, **Solange**, **Raquel**, **Dani**, **Karla** e **Rômulo**, pela acolhida, incentivo e amizade.

- A todos da Casa Amarela (FIOCRUZ/RJ), D. Helena, Eliete e Telma, pela simpatia e agrado nas horas de refeição. E a todos deste Brasil e de outros países que tiveram a oportunidade de conhecer e partilhar da história desta dissertação.
- As colegas Adriane e Fátima por muitas vezes me auxiliarem na interpretação dos espectros.
- A **Gérzia** e a **Rosa** do laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, do departamento de Imunologia da (FIOCRUZ-RJ) por terem dedicado tanto tempo me orientando na execução dos ensaios biológicos de atividade leishmanicida que em muito engrandeceram este trabalho, pela amizade demonstrada e pela pessoa que são.
- Ao Laboratório Instituto de Controle de Qualidade em saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRZ - RJ) na pessoa de **Eloísa Nunes Alves** e **Rosauro Farias Presgrave** por tão gentilmente terem cedido espaço para a realização do ensaio de HET-CAM.
- Ao Departamento de produtos naturais, Farmanguinhos por tornar possível a realização das análises, em especial ao **José Luiz P. Ferreira**, pela sua atenção e contribuição na interpretação do corte histológico.
- À **Dr<sup>a</sup>. Marilene Canto Cavalheiro** e a **Dr<sup>a</sup> Lenor Laura Pinto Leon**, responsáveis pelo Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, pela oportunidade que me foi dada em realizar os ensaios biológicos.
- Aos professores **Saulo Silva** e **Maria de Menezes** pelas importantes observações e correções durante o Exame de Qualificação.

- Aos professores do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em química por dividirem seus conhecimentos, dando ferramentas valiosas no engrandecimento deste trabalho e para minha formação profissional. O meu muito obrigado a vocês: **Ana Lúcia Galotta, Afonso Duarte Leão, Rita Nunomura, Sérgio Nunomura, Maria da Paz, Saulo Silva, Maria Lúcia Belém Pinheiro e Paulo Couceiro.**
- A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

*É com coragem e fé que nos realizamos  
nesta terra. É preciso deixar Deus ser  
Deus entre nós.*

*Alvarina Marques Bom Mundo*

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

ÍNDICE DE ESPECTROS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. Espécies botânicas.....	29
1.1.1 Família Clusiaceae.....	29
1.1.1.1 Gênero <i>Vismia</i> .....	29
1.1.1.2 Espécie <i>Vismia cayennensis</i> .....	30
1.1.1.3 Constituintes químicos de <i>Vismia cayennensis</i> .....	32
1.1.2 Família Piperaceae.....	34
1.1.3 Gênero <i>Piper</i> .....	35
1.1.4 <i>P. duckei</i> e <i>P. duckei</i> .....	37
1.1.5 Óleos essenciais.....	38
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 Gerais.....	42
2.2 Específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 Materiais e equipamentos.....	43
3.1.1 Métodos cromatográficos e espectrométricos.....	43
3.1.2 Reagentes de teste de identificação.....	45
3.2 Coleta e identificação botânica.....	47
3.3 ANÁLISE MORFOANATÔMICA.....	47
3.3.1 Corte histológico.....	47

3.3.2 MATERIAS E MÉTODOS.....	49
3.3.4 OBTENÇÃO DE IMAGENS DOS CORTES HISTOLÓGICOS.....	49
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.4.1 Características morfoanatômicas das folhas, cascas, frutos de <i>V. cayennensis</i> e folhas de <i>P. demeraranum</i> .....	50
3.4.2 Microscopia do limbo foliar de <i>V. cayennensis</i> .....	50
3.4.3 Microscopia das cascas de <i>V. cayennensis</i> .....	52
3.4.4 Microscopia dos frutos de <i>V. cayennensis</i> .....	53
3.4.5 Microscopia do limbo foliar de <i>P. demeraranum</i> .....	54
3.5 Preparação dos extratos.....	56
3.5.1 Método de extração do material botânico de <i>V. cayennensis</i> .....	57
3.5.2 Fracionamento do extrato hexânico das cascas de <i>V. cayennensis</i> .....	59
3.5.2.1 Cromatografia em coluna.....	59
3.5.2.2 Tratamento das frações 1-10.....	61
3.5.2.3 Tratamento das frações 54_66.....	63
3.6 Fracionamento do extrato clorofórmico dos frutos de <i>V. cayennensis</i> .....	64
3.6.1 Tratamento das frações 15_23 oriundas do ECFVc .....	65
3.6.2 Tratamento das frações 24_35 oriundas do ECFVc .....	65
3.7.1 Identificação dos constituintes químicos presentes no extrato hexânico das cascas de <i>V. cayennensis</i> (EHCVc).....	67
3.7.2 Identificação de FR12.....	70
3.7.3 FH 12 A.....	72
3.7.3.1 Ressonância Magnética Nuclear 2D, Cosy <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de Fridelina .....	79
3.8 Identificação dos constituintes químicos presentes no extrato clorofórmico dos frutos de <i>V. cayennensis</i> .....	80
3.8.1 Análise por cromatografia em camada fina das frações oriundas do ECFVc....	80
3.8.2 Análise por CLAE dos frutos de <i>V. cayennensis</i> .....	82
3.8.3 Análise por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas dos frutos de <i>V.</i> <i>cayennensis</i> .....	85
3.8.4 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas.....	86
3.8.5 Identificação da substância FV 15_23/9a.....	86
3.8.5.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	86

3.8.5.2 Identificação por espectrometria de massas e RMN <sup>1</sup> H .....	87
3.8.6 Identificação da substância FV 15_23/18a .....	89
3.8.6.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrometria de massas .....	89
3.9 IDENTIFICAÇÕES DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CG/EM DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE P. DUCKEI E P. DEMERARANUM .....	92
3.9.1 Extração dos óleos essenciais das folhas de <i>Piper duckei</i> e <i>Piper demeraranum</i> .....	92
4. ESPECTROS .....	95
5. FARMACOLOGIA .....	125
5.1 Leishmaniose .....	126
5.2 Vetor .....	127
5.3 Ciclo evolutivo da Leishmaniose .....	128
5.4 Formas clínicas .....	129
5.4.1 Leishmaniose cutânea ou tegumentar .....	129
5.4.2 Leishmaniose visceral ou calazar .....	130
5.5 Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose .....	131
5.6 MATERIAIS E MÉTODOS .....	135
5.6.1 Testes <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida .....	135
5.6.2 Parasitas utilizados .....	135
5.6.3 Amostras .....	135
5.6.4 Cultivo <i>in vitro</i> de promastigotas .....	136
5.6.5 Ajuste da concentração parasitária .....	136
5.6.6 Montagem da placa de microtitulação .....	138
5.6.7 Leitura espectrométrica .....	139
5.7 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos .....	139
5.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	141
5.8.1 Avaliação da atividade leishmanicida dos extratos das cascas de <i>V. cayennensis</i> .....	141
5.8.2 Avaliação da atividade leishmanicida do extrato clorofórmico obtido dos frutos de <i>V. cayennensis</i> .....	147
5.8.3 Avaliação da atividade leishmanicida da droga de referência - Pentamidina .....	149

5.8.4 Avaliação da atividade leishmanicida da substância FV 15_23/9a frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	149
5.8.5 Avaliação da atividade leishmanicida da substância FV 15_23/18a frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	149
5.8.6 Avaliação da atividade leishmanicida dos óleos essenciais de <i>P. duckei</i> e <i>P. demeraranum</i> .....	150
5.8.7 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos das substâncias FV 15_23/9a e FV 15_23/ 18a .....	153
5.8.8 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos dos óleos essenciais de <i>P. duckei</i> e <i>P. demeraranum</i> .....	154
5.9 HET - CAM.....	155
5.9.1 Materiais e Métodos.....	156
5.9.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	158
5.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>A. SALINA</i> (TAS) 160	
5.10.1 Metodologia.....	161
5.10.1.2 Avaliação da toxicidade dos extratos brutos e frações das espécies selecionadas.....	161
5.10.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	163
5.10.2.1 Avaliação da toxicidade do extrato e frações de <i>Vismia cayennensis</i> frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	163
5.10.2.2 Avaliação da toxicidade da substância FV 15_23/ 9a ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	166
5.10.2.3 Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais de <i>P. duckei</i> e <i>P. demeraranum</i> .....	167
5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA CAPACIDADE DE CAPTURAR RADICAIS LIVRES .....	168
5.11.1 Análise quantitativa da atividade antioxidante .....	170
5.11.2 Amostras .....	171
5.11.3 Amostras Controle.....	171
5.11.4 Construção da curva de calibração do DPPH .....	171
5.11.5 Ensaio do radical livre DPPH .....	172

5.11.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	173
5.11.6.1 Método Captura de radicais livres .....	173
5.11.6.2 Avaliação da atividade antioxidante das substâncias FV 15_23 / 9a e FV 15_23/ 18a frente ao radical DPPH .....	176
5.11.6.3 Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>P. duckei</i> e <i>P. demeraranum</i> substância FV 15_23 / 9a frente ao radical DPPH.....	178
6. CONCLUSÃO .....	179
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	181

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Materiais botânicos coletados.....	47
TABELA 2 – Codificação e quantidade de extratos.....	58
TABELA 3 – Composição química com respectivos índices de retenção do EHCVc.....	69
TABELA 4 – Composição química da fração FR12 de <i>V. cayennensis</i> .....	71
TABELA 5 – Comparação dos dados de RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H da amostra FH12A com os dados da literatura.....	80
TABELA 6 – Substâncias identificadas no extrato clorofórmico dos frutos de <i>V. cayennensis</i> .....	85
TABELA 7 – Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H da amostra FV 15_23 / 9a com os dados da literatura e RMN de <sup>13</sup> C.....	88
TABELA 8 – Comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup> H da amostra FV 15_23 / 18a com dados da literatura.....	91
TABELA 9 – Composição em porcentagem dos óleos essenciais das folhas de <i>Piper duckei</i> e <i>Piper demeraranum</i> .....	94
TABELA 10 – Efeito de <i>Piper duckei</i> e <i>Piper demeraranum</i> sobre as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. guyannensis</i> .....	152
TABELA 11 – Potencial de irritação dos óleos essenciais em função da vasoconstrição, hemorragia e coagulação.....	158
TABELA 12 – Potencial de irritação dos óleos essenciais em função da congestão, hemorragia e coagulação.....	159
TABELA 13 – Teste de toxicidade para <i>A. salina</i> dos extratos e frações de <i>V. cayennensis</i> .....	164
TABELA 14 – Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais de <i>Piper duckei</i> e <i>Piper demeraranum</i> .....	167
TABELA 15 – Percentual de inibição do DPPH pelo extrato bruto e frações oriundas do ECFVc.....	174

TABELA 16 – Porcentagem de inibição do DPPH pelos óleos essenciais de <i>Piper duckei</i> e <i>Piper demeraranum</i> .....	178
--	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Produtos naturais com atividade leishmanicida.....	28
FIGURA 2 – Folhas e frutos de <i>V. cayennensis</i> .....	31
FIGURA 3 – Distribuição na região amazônica de <i>V. cayennensis</i> .....	32
FIGURA 4 – Vismiafenonas isoladas das folhas de <i>V. cayennensis</i> .....	33
FIGURA 5 – Isofenonas isoladas das folhas de <i>V. cayennensis</i> .....	33
FIGURA 6 – Exemplos de espécies do gênero <i>Piper</i> e <i>Peperomia</i> .....	34
FIGURA 7 – Ocorrência do gênero <i>Piper</i> no mundo.....	37
FIGURA 8 – Folhas de <i>P. duckei</i> e <i>P. demeraranum</i> .....	38
FIGURA 9 – Monoterpenos: esqueletos básicos da esquerda para direita: $\rho$ – mentano, pinano, canfeno (bornano), isocanfeno, fencheno careno e tujano.....	39
FIGURA 10 – Tipos de esqueleto de sesquiterpenos.....	40
FIGURA 11 – A – Tricoma estrelado; B – Seção transversal do mesófilo dorsiventral; C – Parênquima esponjoso com cavidade fenólica; D – Tricoma tector unicelular; E – Tricoma tector bicelular.....	51
FIGURA 12 – Seção transversal do mesófilo dorsiventral.....	52
FIGURA 13 – Cascas de <i>V. cayennensis</i> floema com prismas e fenólicos.....	53
FIGURA 14 – Frutos de <i>V. cayennensis</i> epicarpo e mesocarpo.....	53
FIGURA 15 – A – Nervura central plana de <i>P. demeraranum</i> ; B – Células epidérmicas com contorno alongado ou arredondado.....	55
FIGURA 16 – Feixes de cristais de oxalato de cálcio de <i>P. demeraranum</i> .....	56
FIGURA 17 – Frutos de <i>Vismia cayennensis</i> .....	64
FIGURA 18 – Estrutura química do <i>trans</i> - <i>cariofileno</i> .....	68
FIGURA 19 – Ácido hexadecanóico etil éster.....	69
FIGURA 20 – Proposta de fragmentação de $\beta$ - sitosterol.....	73
FIGURA 21 – Cromatografia em camada delgada (CCD) de fase estacionária normal, da fração FH12A revelada com Lieberman Burchard.....	74
FIGURA 22 – Proposta de fragmentação da Fridelina.....	75
FIGURA 23 – Estrutura de Fridelina.....	79

FIGURA 24 – Cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica de fase normal, das frações oriundas da cromatografia em coluna (CC) do ECFVc.....	81
FIGURA 25 – Cromatograma de íons totais presentes ECFVc .....	82
FIGURA 26 – Espectros de ultravioleta das frações do ECFVc.....	84
FIGURA 27 – Avaliação em CCD da fase reversa (RP18) das substâncias FV 15_23/9a.e FV 15_23/ 18a.....	86
FIGURA 28 – Ferruginina A e suas formas tautoméricas .....	88
FIGURA 29 – Estrutura da substância FV 15_23/ 18a - Vismina.....	90
FIGURA 30 – Formas morfológicas do gênero leishmania (a) amastigotas; (b) promastigota.....	127
FIGURA 31 – Fêmea adulta de flebotomíneo.....	127
FIGURA 32 – Ciclo evolutivo da leishmaniose.....	128
FIGURA 33 – Lesão ulcerosa de leishmaniose cutânea.....	130
FIGURA 34 – Leishmaniose visceral.....	131
FIGURA 35 – Drogas usadas no tratamento da leishmaniose.....	133
FIGURA 36 – Placa de microtitulação de 96 poços utilizada para o teste <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida.....	138
FIGURA 37 – Membrana cório-Alantóide.....	156
FIGURA 38 – Estágios metanúplios do microcrustáceo de <i>Artemia salina</i> .....	161

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – Esquema geral de preparação de extratos.....	57
ESQUEMA 2 – Fracionamento completo do extrato hexânico de <i>V. cayennensis</i> ...	60
ESQUEMA 3 – Esquema de purificação das frações do EHCVc.....	62
ESQUEMA 4 – Esquema de purificação das frações do EHC54_66.....	63
ESQUEMA 5 – Fracionamento completo do ECFVc.....	66
ESQUEMA 6 – Ajuste da concentração parasitária a ser utilizada no teste <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida.....	137

## ÍNDICE DE CROMATOGRAMA

CROMATOGRAMA 1 – Cromatograma de íons totais presentes no extrato hexânico das cascas de <i>V. cayennensis</i> .....	96
CROMATOGRAMA 2 – Cromatograma de íons totais da fração FH12.....	98
CROMATOGRAMA 3 – Cromatograma de íons totais da fração FH12A.....	100
CROMATOGRAMA 4 – Cromatograma de íons totais do ECFVc.....	114
CROMATOGRAMA 5 – Cromatograma de íon total presente na fração FV 15_23/9a.....	115
CROMATOGRAMA 6 – Cromatograma de íon total presente na substância FV 15_23/ 18 a.....	115
CROMATOGRAMA 7 – Cromatograma dos íons totais presentes no óleo essencial de <i>P. duckei</i> .....	123
CROMATOGRAMA 8 – Cromatograma dos íons totais presentes no óleo essencial de <i>P. demerarium</i> .....	124

## ÍNDICE DE ESPECTRO

ESPECTRO 1 – Infravermelho da substância FR12 em pastilha de KBr.....	97
ESPECTRO 2 – Espectro de massa referente ao pico com $t_r$ de 45,44 min.....	97
ESPECTRO 3 – Espectro de massa referente ao pico com $t_r$ de 46,18 min.....	99
ESPECTRO 4 – Espectro no IV de FR12A em pastilha de KBr.....	99
ESPECTRO 5 – Espectro de massa referente ao pico com $t_r$ de 49,28 min.....	101
ESPECTRO 6 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FH12 A.....	102
ESPECTRO 7 – Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de FH12 identificação das metilas.....	103
ESPECTRO 8 – Espectro de DEPT 135 e DEPT – 90 da substância FH 12A (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	104
ESPECTRO 9 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) em destaque a região das metilas.....	105
ESPECTRO 10 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) em expansão com destaque os acoplamentos vicinal e geminal.....	106
ESPECTRO 11 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) em expansão parcial com sinais de quarteto da substância FH12A.....	107
ESPECTRO 12 – Expansão parcial do espectro de RMN de $^1\text{H}$ referente à multiplicidade do H – 1 ax.....	108
ESPECTRO 13 – Espectro de HSQC de FH12A – correlação de sinais de hidrogênio com seus carbonos.....	109
ESPECTRO 14 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-4.....	110
ESPECTRO 15 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-23.....	110
ESPECTRO 16 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-28.....	111
ESPECTRO 17 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-30.....	111

ESPECTRO 18 – Espectro de RMN 2D COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de Fridelina em $\text{CDCl}_3$ .....	112
ESPECTRO 19 – Espectro de RMN 2D COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ – Expandido de Fridelina em $\text{CDCl}_3$ .....	113
ESPECTRO 20 – Espectro de RMN 2D COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de – Expandido de Fridelina em $\text{CDCl}_3$ .....	116
ESPECTRO 21 – Espectro de ultravioleta no $T_r$ 14,60 min da substância FV 15_23 / 9a.....	116
ESPECTRO 22 – Espectro de ultravioleta no $T_r$ 22,12 min da substância FV 15_23 / 18a.....	117
ESPECTRO 23 – Espectro de massas da substância FV 15_23 / 9a .....	117
ESPECTRO 24 – Espectro de massas da substância FV 15_23 / 18a .....	118
ESPECTRO 25 – Espectro de RMN de $\text{H}^1$ Expandido (9.63 – 16.65 ppm) de Ferruginina em $\text{CDCl}_3$ .....	119
ESPECTRO 26 – Espectro de RMN de $\text{H}^1$ Expandido (3.60 – 9.63 ppm) de Ferruginina em $\text{CDCl}_3$ .....	119
ESPECTRO 27 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de FV 15_23/ 18 a ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz).....	120
ESPECTRO 28 – Espectro de RMN de $\text{H}^1$ Expandido (9.80 – 15.77 ppm) de Vismina em $\text{CDCl}_3$ .....	121
ESPECTRO 29 – Espectro de RMN de $\text{H}^1$ Expandido (6.97 – 7.16 ppm) de Vismina em $\text{CDCl}_3$ .....	121
ESPECTRO 30 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de FV 15_23/ 9a ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz).....	122

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato EECVc contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	142
GRÁFICO 2 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato EECVc contra as formas promastigotas de <i>L. guyannensis</i> .....	142
GRÁFICO 3 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato EHCVc contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	143
GRÁFICO 4 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato EHCVc contra as formas promastigotas de <i>L. guyannensis</i> .....	144
GRÁFICO 5 – Avaliação da atividade leishmanicida da Fridelina contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	145
GRÁFICO 6 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato EDCVc contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	145
GRÁFICO 7 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato EDCVc contra as formas promastigotas de <i>L. guyannensis</i> .....	146
GRÁFICO 8 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato ECFVc contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	147
GRÁFICO 9 – Avaliação da atividade leishmanicida do extrato ECFVc contra as formas promastigotas de <i>L. guyannensis</i> .....	148
GRÁFICO 10 – Avaliação da atividade leishmanicida da droga de referência – pentamidina contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	148
GRÁFICO 11 – Avaliação da atividade leishmanicida da substância FV 15_23/ 9a contra as formas promastigotas após 24h de incubação .....	149
GRÁFICO 12 – Avaliação da atividade leishmanicida da substância FV 15_23/ 18a contra as formas promastigotas após 24h de incubação .....	150
GRÁFICO 13 – Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de <i>P. duckei</i> contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	151
GRÁFICO 14 – Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de <i>P. demeraranum</i> contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	151

GRÁFICO 15 – Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de <i>P. duckei</i> contra as formas promastigotas de <i>L. guyannensis</i> .....	152
GRÁFICO 16 – Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de <i>P. demeraranum</i> contra as formas promastigotas de <i>L. guyannensis</i> .....	152
GRÁFICO 17 – Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos das substâncias FV 15_23/ 9a e FV 15_23/ 18a.....	153
GRÁFICO 18 – Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos dos óleos essenciais de <i>P. duckei</i> e <i>P. demeraranum</i> .....	154
GRÁFICO 19 – Toxicidade do ECFVc e das frações frente ao microcrustáceo de <i>Artemia salina</i> .....	165
GRÁFICO 20 – Toxicidade de FV 15_23/ 9a frente à <i>Artemia salina</i> .....	166
GRÁFICO 21 – Atividade antioxidante do ECFVc e Padrões – Quercetina e TBHQ .....	174
GRÁFICO 22 – Atividade antioxidante das frações do ECFVc.....	175
GRÁFICO 23 – Atividade antioxidante das frações do ECFVc.....	176
GRÁFICO 24 – Atividade antioxidante da substância FV 15_23/ 9a .....	176
GRÁFICO 25 – Atividade antioxidante da substância FV 15_23/ 18a.....	177

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acet – Acetato de etila

CCD – Cromatografia em camada delgada

CC – Cromatografia em Coluna.

$\text{CDCl}_3$  – Clorofórmio deuterado

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas

$\text{CH}_3\text{CN}$  – Acetonitrila

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

EDCVc – Extrato diclorometano das cascas de *V. cayennensis*

EECVc – Extrato etanólico das cascas de *V. cayennensis*

EHCVc – Extrato hexânico das cascas de *V. cayennensis*

ECFVc – Extrato clorofórmico das frutos de *V. cayennensis*

Hex – Hexano.

HMBC – Coerência heteronuclear em ligações múltiplas

MeOH - Metanol

Pdu – *Piper duckei*

Pdr – *Piper demeraranum*

ppm – parte por milhão

$R_f$  – Fator de retenção

RMN  $^{13}\text{C}$  – Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13

RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

UV – Ultravioleta

p.f – Ponto de Fusão

IV – Infravermelho.

## RESUMO

A busca de moléculas naturais bioativas presentes em plantas tem sido alvo de diversos estudos científicos, como urgência por drogas mais seletivas e menos tóxicas no tratamento de doenças incuráveis. A leishmaniose é uma das principais doenças com prioridade de pesquisa segundo a Organização Mundial de saúde. O presente trabalho selecionou as espécies botânicas, *Vismia cayennensis* (Clusiaceae), *Piper duckei* (Piperaceae) e *P. demeraranum* (Piperaceae), na busca de novas terapias químicas contra esta doença. As espécies mencionadas são plantas medicinais nativas do Brasil, usadas pela população no tratamento de dermatoses e como cicatrizante de ferida. O estudo fitoquímico das cascas e frutos de *V. cayennensis* foi realizado obtendo-se quatro extratos, etanólico, hexânico, diclorometano das cascas e clorofórmico dos frutos. O fracionamento do extrato hexânico resultou no isolamento e identificação de uma mistura de esteróides (sitosterol e estigmasterol) e de Fridelina, um triterpeno já isolado da espécie. Foi avaliada a atividade leishmanicida dos extratos e da Fridelina frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, os extratos hexânico e clorofórmico indicaram forte atividade leishmanicida frente às duas espécies, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, apresentando DL<sub>50</sub> de **32,4 µg/mL** (*L. amazonensis*), **9,1 µg/mL** (*L. guyanensis*) e **8,9 µg/mL** (*L. amazonensis*), **19,7 µg/mL** (*L. guyanensis*), respectivamente. A Fridelina isolada do extrato hexânico das cascas, não foi eficaz, apresentando moderada atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (DL<sub>50</sub> = **231,21 µg/mL**). O extrato clorofórmico dos frutos foi fracionado resultando no isolamento de dois compostos,

identificados através de perfis cromatográficos e espectrométricos, como sendo os antranóides prenilados, **Vismina** e **Ferruginina**. As atividades leishmanicida das substâncias foram fracas em relação ao extrato bruto, com  $DL_{50} = 178,3 \mu\text{g/mL}$  e  $DL_{50} = 214,8 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os extratos, frações e fitoconstituintes isolados também foram avaliados quanto atividade antioxidante e toxicidade frente ao microrganismo *Artemia salina*. Foram estudados os óleos essenciais das folhas de *P. duckei* e *P. demeraranum*, extraídos através da técnica de hidrodestilação, e posteriormente analisados por CG/EM. Observou-se como componentes majoritários dos óleos essenciais de *P. duckei* os sesquiterpenos, *trans*-cariofileno (29,62%), Germacreno D (15,92%) e 1H-Cicloprop[e]azuleno (19,20%) enquanto que no óleo de *P. demeraranum* foram observados os monoterpênicos  $\beta$ -elemeno (34,50%), dl-limoneno (20,56%) e os sesquiterpenos, Germacreno B (9,11%), Germacreno D (5,36%) e  $\beta$ -Selineno (5,20%). Foi avaliada a atividade leishmanicida dos óleos. A espécie *P. duckei* apresentou inibição de 50% dos parasitas na concentração de 70  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a espécie *P. demeraranum* apresentou  $DL_{50} = 91,51 \mu\text{g/mL}$ . Para a cepa de *L. guyanensis* os óleos apresentaram uma pronunciada atividade leishmanicida, com  $DL_{50} = 14,3 \mu\text{g/mL}$  para *P. duckei* e  $22,7 \mu\text{g/mL}$  para *P. demeraranum*. Foi avaliada a toxicidade dos óleos em células de macrófagos retiradas da cavidade intraperitônea de camundongos; os óleos apresentaram baixa citotoxicidade, incentivando futuros testes em formas amastigotas de *Leishmania*. O potencial irritante dos óleos também foi avaliado através do método HET – CAM, os dados obtidos foram bastante promissores caracterizando os óleos com moderada irritação cutânea.

## ABSTRACT

The discovery of natural substances found in plants has been a target of several scientific studies, as urgency for drugs more selective and less toxic for the treatment of incurable diseases. Leishmaniasis is a major disease with priority for research according to the World Health Organization. This study selected three botanical species in the search for new chemical therapies against this disease. *Vismia cayennensis* (Clusiaceae), *Piper duckei* (Piperaceae) e *P. demeraranum* (Piperaceae) are medicinal native species of Brazil, used by people to treat skin diseases and healing of wounds. The phytochemical study of the barks and fruits of *V. cayennensis* was carried out resulting in four extracts ethanolic, hexanic, chloroformic of fruit and dichloromethane of barks. The study of hexane extract resulted in the isolation and identification a mixture of steroids (sytosterol and stygmasterol), and Fridelin, a Triterpene, already isolated from the specie. The leishmanicidal activity of the extracts and Fridelin were evaluated against promastigotes forms of *L. amazonensis* and *L. guyanensis*, the chloroform and hexane extracts showed strong activity leishmanicidal for the two species, showing  $DL_{50} = 32,4 \mu\text{g/mL}$  (*L. amazonensis*), **9,1  $\mu\text{g/mL}$**  (*L. guyannensis*) e **8,9  $\mu\text{g/mL}$**  (*L. amazonensis*), **19,7  $\mu\text{g/mL}$**  (*L. guyannensis*), respectively. However the Fridelina showed moderate activity to promastigotes forms of *L. amazonensis* with  $LD_{50} = 231,21 \mu\text{g /mL}$ . The extract chloroform of the fruit was fractionated resulting in the isolation of two compounds, identified like the antranoid prenylated, **Vismin** and **Ferruginin**. The leishmanicidal activity this compounds were weak in relation to the crude extract with  $LD_{50} = 178,3$

$\mu\text{g /mL}$  and  $\text{DL}_{50} = 214,8 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The extracts, fractions and phytochemicals isolates were also evaluated as antioxidant activity and toxicity front of the microcrustáceo *Artemia salina*. Essential oils of the leaves were obtained by hydrodistillation and analyzed by GC/MS. The major constituents identified in the leaf of *Piper duckei* oil were *trans*-caryophyllene (29,62%), Germacrene D (15,92%) e 1H-Cicloprop[e]azulen (19,20%) while in the *P. demeraranum* oil was observed  $\beta$ -elemene (34.50%), dl-limonene (20.56%), Germacrene B (9.11%), Germacrene D (5.36%) e  $\beta$ -Selinene (5.20%). It was evaluated the leishmanicidal activity of oils. The species *P. duckei* showed inhibition of 50% of the parasites in the concentration 70  $\mu\text{g/mL}$ , while the species *P. demeraranum* presented  $\text{LD}_{50} = 91.51 \mu\text{g/mL}$ . To the strain of *L. guyanensis* strain the oils showed a pronounced leishmanicidal activity with  $\text{LD}_{50} = 15.2 \mu\text{g/mL}$  for *P. duckei* and 22.7  $\mu\text{g/mL}$  for *P. demeraranum*. It was evaluated the toxicity of oils in macrophage cells removed from the intraperitoneal cavity of mice; oils showed low cytotoxicity, encouraging future tests in amastigotes forms of *Leishmania*. The irritant potential of oils was also evaluated by the method HET - CAM, the data were very promising featuring oils with moderate skin irritation.

## 1. INTRODUÇÃO

A importância do estudo de produtos naturais se torna cada vez mais evidente e necessária no nosso país e no mundo. Estima-se que mais de 80% da população mundial usa as plantas na busca por alívio e cura de doenças, a partir da ingestão de ervas e folhas (VIEGAS *et al.*, 2006). O uso de plantas como medicamento é muito antigo e relatos de uso são encontrados em documentos das civilizações da China e da Índia. Esta prática milenar ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população (MACIEL, 2002), devido à prática comum entre os índios e as populações tradicionais da Amazônia (DI STASI, 1996)

Atualmente, a busca de novas substâncias bioativas em plantas tropicais é a esperança mais concreta para a cura de diversos males e um dos caminhos mais promissores para a criação de novos medicamentos, elas são quase que exclusivamente a única fonte de fármacos para a maioria da população mundial, representando a mais antiga e mais difundida forma de medicação (FAKIM, 2006). Produtos naturais e seus derivados representam mais que 50% no uso clínico. Plantas superiores contribuem não menos que 25% do total. Durante os últimos 40 anos, pelo menos doze drogas potenciais foram derivadas de plantas (GILANI *et al.*, 2005). Atualmente muitas classes farmacológicas de drogas incluem protótipo de produtos naturais, são exemplos destes benefícios, a aspirina, atropina, artemisinina, digoxina, morfina, reserpina, taxol, dentre outros (SCHMIDT *et al.*, 2007).

O Brasil é um país de grande potencial para pesquisa de produtos naturais, pois detém a mais rica diversidade genética vegetal do planeta sendo a Amazônia considerada a maior floresta tropical do mundo (YUNES *et al.*, 2001), apresentando uma grande biodiversidade

de plantas, animais e microorganismos. A população que vive dentro ou perto da floresta, conhece muitas espécies úteis, porém esse conhecimento, em geral, é restrito e pouco divulgado (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A seleção de uma planta para estudo farmacológico é muito importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, existindo vários caminhos que servem de orientação para esta seleção como o uso tradicional, o conhecimento do conteúdo químico e da toxicidade, a seleção ao acaso ou a combinação de vários critérios. Uma das estratégias mais comuns é a observação cuidadosa da medicina popular em diferentes culturas, a qual é conhecida como etnofarmacologia. Estratégias de busca de medicamentos com base nesta linha de atuação têm sido aplicadas no tratamento de diferentes doenças (KOEHN *et al.*, 2005).

Os protozoários parasitas estão entre os mais comuns patógenos no mundo, sendo reconhecidos como agentes causados de algumas das mais sérias doenças tropicais em seres humanos e animais domésticos. Os produtos farmacêuticos utilizados para o tratamento dessas doenças são limitados, em virtude disto a população utiliza plantas medicinais a partir de métodos tradicionais com o intuito de amenizar o seu flagelo.

Em artigo recente, PINK e colaboradores (2005), membros do TDR (*Training in Tropical Diseases*) citam que: “é notável o recrudescimento da falta de investimentos na terapia de doenças infecciosas, principalmente malária e leishmaniose, pois das 1.300 novas drogas introduzidas no mercado entre 1975 e 1999, apenas 13 foram para aplicação em doenças tropicais. Em 2000, apenas 0,1 % dos investimentos globais em pesquisas relacionadas à saúde foram direcionados a doenças tropicais e tuberculose, que em conjunto respondem por 5% dos problemas de saúde”.



## **1.1 ESPÉCIES BOTÂNICAS**

### **1.1.1 FAMÍLIA CLUSIACEAE**

A família Clusiaceae, equivalente Guttiferae, pertencente à ordem Theales, subclasse Dilleniidae, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta é composta de 25 gêneros distribuídos nos trópicos e regiões temperadas compreende cerca de 1500 espécies (RIBEIRO *et al.*, 1999).

São plantas primariamente lenhosas, arbóreas ou arbustivas, lactescente, ou não com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas isoladas, ou reunidas em inflorescência. Flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial (JOLY, 1993).

As Clusiaceae são utilizadas popularmente como citotóxica, antiinflamatória, antimicrobiana e hipotensiva (MINAMI *et al.*, 1995). Do ponto de vista químico, as espécies estudadas são reconhecidas como fontes, entre outros, de xantonas, benzofenonas, terpenóides, alquil e fenil cumarinas, antraquinonas (LINUMA *et al.*, 1998), derivados antranóides, cromonóis e floroglucinóis ativos contra diversos fins (CUESTA – RUBIO *et al.*, 2001).

#### **1.1.1.1 GÊNERO VISMIA.**

O gênero *Vismia* é pertencente à família Clusiaceae, subfamília Hypericoideae e tribo Vismiae (SANTOS *et al.*, 2000). Medicinalmente, algumas espécies de *Vismia* são apreciadas por seu látex alaranjado, que é usado por tribos existentes em toda bacia

amazônica para o tratamento de herpes, fungo e feridas, além do uso do látex para a pintura do corpo (MILIKEN, 1999). O exsudato também é empregado na medicina popular como antireumático, em tumores e contra úlceras crônicas (REYS *et al.*, 2004).

Cerca de 70 *Vismia* spp são conhecidas e 45 são restritas na América do Sul, com poucas espécies estendendo-se na América Central, oeste da África e da África Central e, mais raramente na Ásia (MONACHE, 1958), consiste de pequenas árvores de ocorrência espontânea, habitantes em capoeiras. Entre as 70 espécies conhecidas, apenas 15 tem sido investigada, sendo identificado a presença antranóides prenilados, terpenóides, flavonóides e xantonas (NAGEM *et al.*, 1997) outros autores relatam a existência de antracenodionas, antronas, antraquinonas, lignanas, quinonas (CAMELE *et al.*, 1982) e vismiona A (Antranóide prenilado). Este último composto rearranja-se para o correspondente antraquinona e biantronas durante purificação cromatográfica (GONZALES *et al.*, 1980). Quinonas, estes tem se mostrado ativas contra as formas promastigotas de *L. donovani* (CHAN – BACAB *et al.*, 2001).

Vismionas isoladas das folhas de *V. guianensis* apresentou moderada atividade citotóxica contra linhagens de células cancerígenas KB (SEO *et al.*, 2000) e Vismionas isoladas das folhas de *V. cayennensis* apresentou atividade inibitória contra o vírus HIV (FULLER *et al.*, 1999).

#### **1.1.1.2 ESPÉCIE *VISMIA CAYENNENSIS*.**

*V. cayennensis*, vulgarmente conhecida como Árvore-da-febre, goma-lacre, pau-de-lacre, lacre-branco e Pichirina, é uma árvore de pequeno porte, de 15 a 2 metros e 25 centímetros de altura; galhos lisos; folhas em forma de lâminas de 5-11,5 cm de

comprimento, meio elíptica ou oblonda - elíptica para lanceoladas ou ovais ou oblongeoladas; frutos de 10-15 mm de comprimento (**Figura 2**).

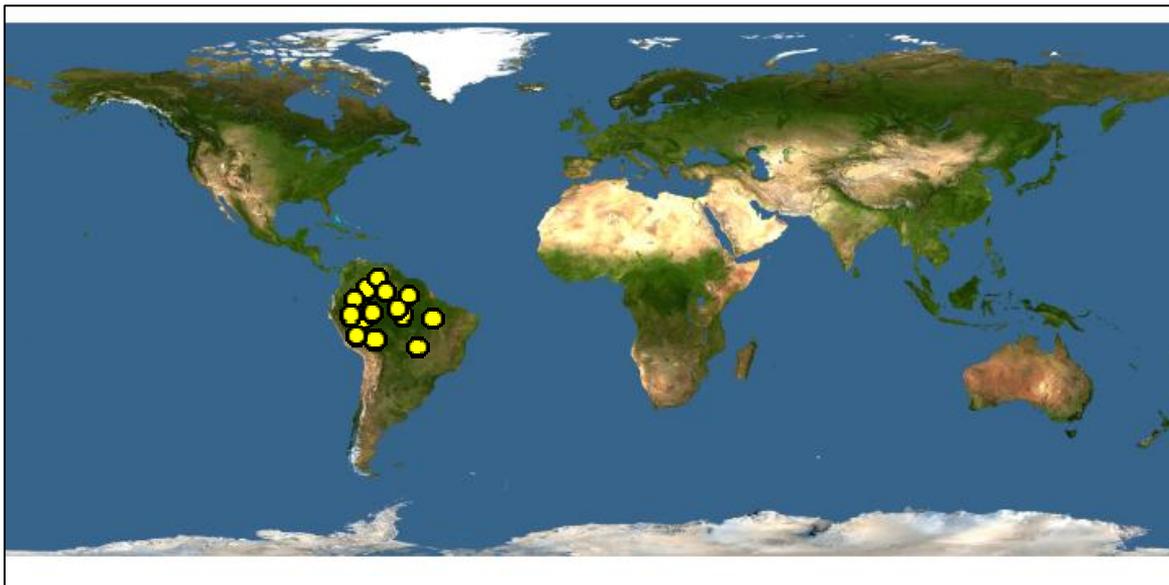


**FIGURA 2** – **A** Folhas e **B** – Frutos de *V. cayennensis*.

Fonte: [www.mobot.org/mobot/research/ven-guayana/clusiaceae/vismia](http://www.mobot.org/mobot/research/ven-guayana/clusiaceae/vismia).

Habitam as capoeiras e áreas de regeneração natural da Região Amazônica (**Figura 3**), com distribuição na América tropical, América do Norte, oeste da América do Sul e na África (MIRAGLIA *et al.*, 1981). Também são habitantes das bordas de florestas, savanas, terras baixas de árvores com folhas semipermanentes, espalhadas pelo Amazonas, Colômbia, Guiana, Suriname, Goiana Francesa e Nordeste do Brasil (MOURÃO *et al.*, 2001).

O interesse em estudar a espécie *V. cayennensis* surgiu do destaque na literatura sobre seu uso popular como antireumático e para baixar febres, segundo Miliken e Bruce (1999) os povos Yanomami do Amazonas, utilizam esta espécie para combater infecções de pele e no tratamento de lesões devidas a Leishmaniose do tipo Cutânea. O látex é friccionado nas bordas da lesão cutânea, obtendo-se a cicatrização da ferida.



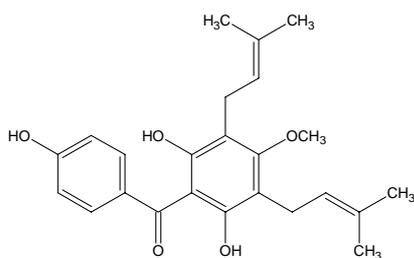
**FIGURA 3** – Distribuição na região amazônica de *V. cayennensis*.

Fonte: [www.discoverlife.org/20/m?kind=Vismia+cayennensis](http://www.discoverlife.org/20/m?kind=Vismia+cayennensis)

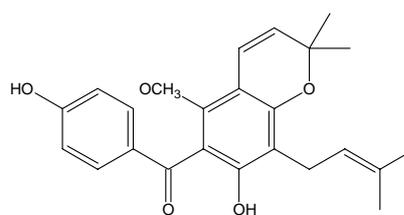
### 1.1.1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *V. CAYENNENSIS*

Sobre a química de *V. cayennensis* estudos revelaram nas cascas a presença de antraquinona, Fisciona (1,8-dihidroxi-3-metil-6-metoxi-antraquinona), além de sitosterol, lupeol, fridelina, ácido betulínico e fridelan -  $3\beta$ -ol (MIRAGLIA *et al.*, 1981).

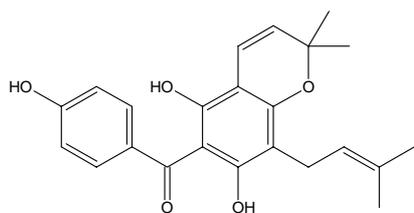
Um dos trabalhos mais relevantes já encontrados sobre esta espécie foi de Fuller (1999), onde são informados sobre o isolamento de vismiafenonas D – G (**Figura 4**) e isovismiafenonas B (**Figura 5**) das folhas de *V. cayennensis*.



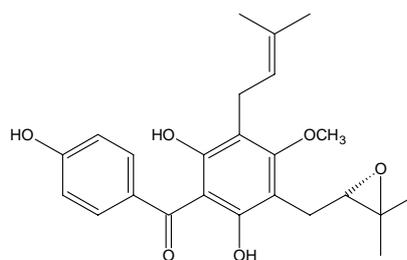
Vismiafenona D



Vismiafenona F

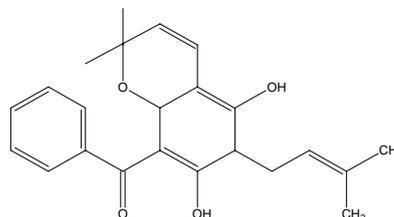
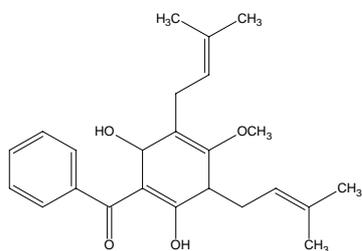
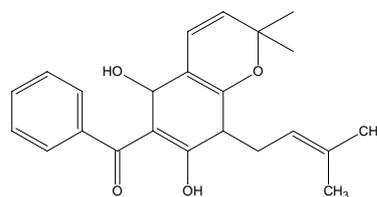
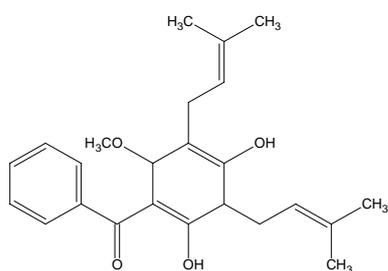


Vismiafenona E



Vismiafenona G

**FIGURA 4** – Vismiafenonas isoladas das folhas de *V. cayennensis*.



**FIGURA 5** – Isofenonas isoladas das folhas de *V. cayennensis*.

As vismiafenonas D – G foram avaliadas quanto sua atividade anti – HIV e somente a Vismiafenona D exibiu atividade inibitória HIV.

Outros trabalhos revelam nos frutos de *V. cayennensis* a presença de ácido crisofânico, isocariofileno,  $\beta$  – selineno, *trans* –  $\alpha$  – farneseno, Vismiona A, Vismiona B, Ferruginina e  $\gamma$  –  $\gamma'$  – diidroxiferruginina A (PINHEIRO *et al.*, 1984).

### 1.1.2 FAMÍLIA PIPERACEAE

A família piperaceae é pertencente à superordem Nymphaeiflorae e a ordem Piperales (DAHLGREN, 1980), a qual compreende aproximadamente 5 gêneros e 1400 espécies (JOLY, 1993). As plantas desta família são angiospermas que apresentam seu corpo vegetativo diferenciado em raiz, caule e folha. As angiospermas estão divididas em duas classes: dicotiledônea e monocotiledônea. As plantas das famílias piperaceae são dicotiledôneas (CRONQUIST, 1968).

Estudos taxonômicos feitos no Brasil determinaram as características das plantas desta família. São plantas eretas ou escandentes, arbustos ou arvoretas, terrestres ou epífitas; folhas estipuladas, alternadas, opostas ou verticiladas, inteiras, sésseis ou pecioladas de consistência e formatos os mais diversos, nem como de indumento muito variado, geralmente dotada de glândulas translúcidas (VALENTE *et al.*, 1994).

Os maiores representantes dessa família são os gêneros *Piper* e *Peperomia* compreendendo um total de 700 e 600 espécies, respectivamente (LEI e LIANG, 1999). Suas espécies em geral são usadas significativamente para enfeites ornamentais (DUQUE, 1985).

Na **figura 6** podem-se observar as fotos de algumas espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*.

*Piper solmsianum*   *Piper nigrum*   *Peperomia nivences*   *Peperomia scandens*



**FIGURA 6** – Exemplos de espécies dos gêneros *Piper* e *Peperomia*.

### 1.1.3 GÊNERO *PIPER*

O gênero *Piper* tem 700 espécies distribuídas em ambos os hemisférios. As plantas do gênero são geralmente arbustos ou árvores. Possuem importância: comercial, econômica e medicinal (TEBBS, 1989). Economicamente as plantas desta família, são importantes para o mercado de condimentos - a pimenta. Os frutos maduros de *Piper nigrum* são a fonte de pimenta branca, enquanto os frutos imaturos da mesma espécie são de pimenta preta (PARMAR *et al.*, 1997). As propriedades inseticidas de extratos da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L., Piperaceae) são conhecidas de 1924. E mostraram-se tóxicas para a mosca doméstica *musca domestica* L. (Díptera: Muscidae), o mosquito *Culex pipens* Palearctica (Díptera: culicidae) e o gorgulho-do-caupi *Callosobruchus chinensis* L. (Coleóptera: Bruchidae) (ESTRELA *et al.*, 2003).

Além de apresentar importância econômica para o mercado de condimentos e atividades inseticida, espécies do gênero *Piper* apresentam grande diversidade estrutural em relação seus constituintes químicos: lignanas, flavonóides, alcalóides e amidas (PARMAR *et al.*, 1997; ALÉCIO *et al.*, 1998; WU *et al.*, 1997; RUANGRUNGSI *et al.*, 1992, SILVA *et al.*, 2002).

A maioria dos trabalhos na área medicinal é realizado por pesquisadores principalmente da China e Índia.

*Piper aborescens*, uma espécie de origem chinesa, apresentou atividade citotóxica devido aos alcalóides piridônicos presentes nas folhas e caules (WU *et al.*, 1997). A espécie *Piper puberulum* (originária da China) é usada popularmente contra asma e artrite. Seu estudo químico levou ao isolamento das neolignanas puberulinas A, B e C (MARTINS *et al.*, 1998). Da espécie *P. aduncum* coletada na Nova Guiné, foram isolados diidrochalconas,

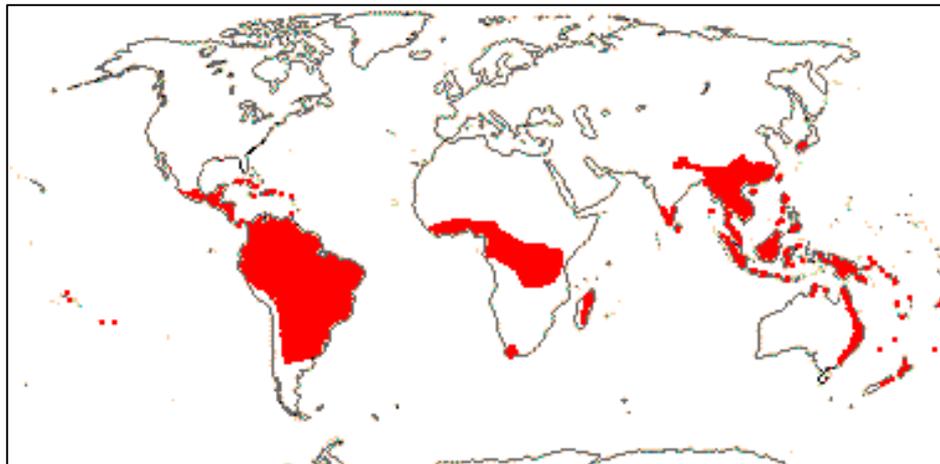
estes compostos apresentam atividade citotóxica e antibacteriana (BRAGA *et al.*, 2007), a substância 2,6 – diidrodexi-4-metóxicalcona (DMC) mostrou uma atividade significativa contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (CHAN – BACAB *et al.*, 2001). Os extratos brutos das folhas de *P. regnellii* apresentam atividade antileishmaniana e antitripanossoma (LUIZE *et al.*, 2005).

Dentre outros compostos isolados em espécie de *Piper* algumas como monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides (apiol, dillapiol, miristecina e safrol) demonstraram agir diretamente sobre o parasito, enquanto outras espécies que abrangem uma variedade de substâncias fenólicas, terpênicas, inclusive di- e triterpenóides, e polissacarídeos (PARMAR *et al* 1997; MARTINS *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 1998), agem ou parecem agir sobre o macrófago, célula hospedeira do parasito, estimulando-o a produzir óxido nítrico, mediadores como TNF $\alpha$  e INFs ou outros fatores da reação imunológica letais à Leishmania sem ser prejudiciais ao próprio macrófago (NAKAMURA *et al.*,2006).

No uso popular são relatados o uso das folhas de *P. umbellatum*, *P. arboreum* e *P. corchlatum* usadas como cicatrizante de ferida, irritações de pele e para reduzir inchaços (MUNDINA *et al*, 1997), as espécies *P. umbellatum* e *P. arboreum* foram estudadas quanto a atividade leishmanicida, apresentando uma inibição de proliferação do parasita de 76 e 83%, respectivamente (KAPLAN *et al*, 1996). A espécie *Ottonia frutescens*, tem sido largamente usada para aliviar dores de dente, de garganta e de lesões superficiais (KINGHORN, 1987).

Um extraordinário número de espécies do gênero *Piper* aparece em farmacopéias por todo mundo. O gênero *Piper* é um dos mais estudados e também um dos maiores (PARMAR *et al*, 1997). Na América do Sul, várias espécies de *Piper* são utilizadas como anestésico local (MCFERREN *et al*, 1998.; MCFERREN *et al*, 2002).

O mapa mostrado na **figura 7** apresenta a ocorrência do gênero *Piper* no mundo.



**FIGURA 7** – Ocorrência do gênero *Piper* no mundo *Piper*.

Com predominância na América central (200 espécies), Amazônia (300 espécies), Mata atlântica (150), Trópico da Ásia (300), Trópico da África (15) e Sul do pacífico (JARAMILLO *et al*, 2001).

#### **1.1.4 *P. DUCKEI* E *P. DEMERARANUM***

Devido à importância medicinal de espécies do gênero *Piper*, principalmente por algumas espécies apresentarem propriedades farmacológicas contra a leishmaniose, selecionou-se duas espécies do gênero, sem nenhum estudo químico e farmacológico, para a investigação de seus constituintes bioativos e propriedades farmacológicas.

Neste trabalho são apresentadas a composição química do óleo essencial das partes aéreas de *P. duckei* e *P. demeraranum* (**Figura 8**), e ação farmacológica das espécies.

São apresentados os resultados referentes aos estudos de sua atividade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2 difenil-1picrilhidrazil), avaliação do seu potencial irritante através do ensaio de HET-CAM (Hen`s egg test - chorioallantoic), avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, avaliação da toxicidade frente a células macrófagos peritoniais de camundongos Balb/c (RPMI + 10% SFB) e identificação dos constituintes químicos presentes nos óleos essenciais através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM).



*Piper duckei*

*Piper demeraranum*

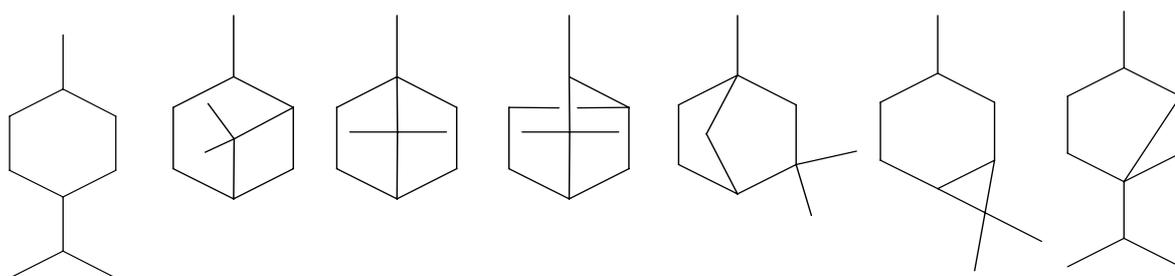
**FIGURA 8** – Folhas de *Piper duckei* e *Piper demeraranum*

### 1.1.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais, em sua maioria, são constituídos de substâncias terpênicas e eventualmente de fenilpropanóides. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de dez e quinze átomos de carbono (mono e sesquiterpenos), mas

dependendo do método de extração e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo essencial.

Os monoterpenos podem ser agrupados em diversos tipos, de acordo com sua estrutura química. Para os monoterpenos podem ser encontrados os do tipo:  $\rho$  – mentano, pinano, canfeno (bornano), isocanfeno, fenmeno careno e tujano (**Figura 9**) (DEWICK, 2001). Destes esqueletos básicos outros monoterpenos derivados são encontrados. O estudo de fragmentação destes compostos por Espectrometria de Massas é uma importante ferramenta para sua identificação.

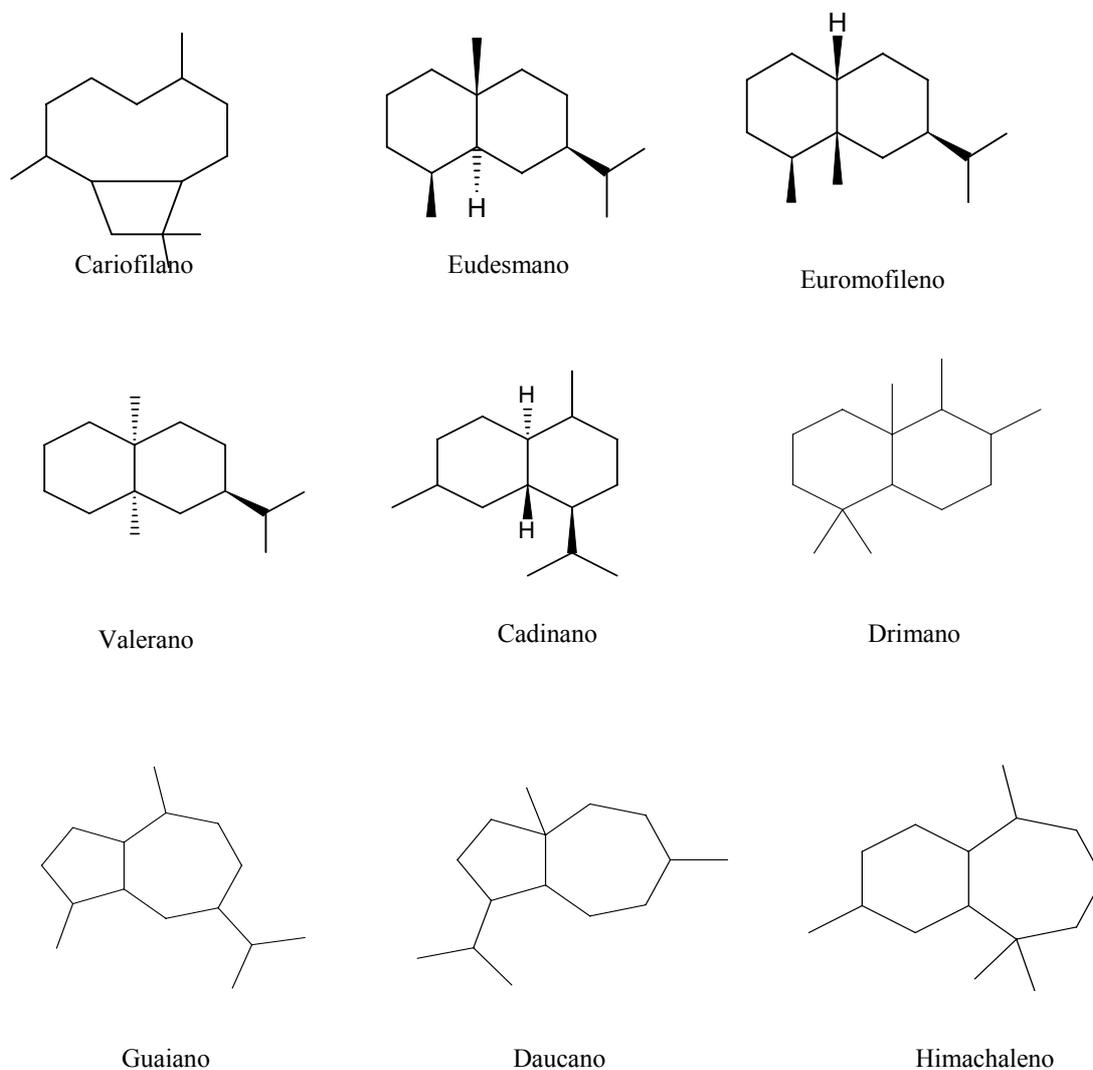


**FIGURA 9** – Monoterpenos: esqueletos básicos da esquerda para direita:  $\rho$  – mentano, pinano, canfeno (bornano), isocanfeno, fenmeno careno e tujano.

O estudo de sesquiterpenos é muito mais complexo em relação aos monoterpenos, fato este relacionado à maior variabilidade do esqueleto básico (**Figura 10**). Em muitos casos apenas o índice de retenção e comparação de seus espectros de massas mostram-se insuficientes para identificação do composto, sendo necessário outra técnica de identificação (PINTO *et al.*, 1996; VAN DER DOOL, 1964).

Na família Piperaceae, encontra-se vários estudos de óleos essenciais envolvendo principalmente o gênero *Piper*. Foi realizado, em Minas Gerais, o estudo comparativo dos

óleos essenciais de *Piper aduncum*, *P. amalago*, *P. arboreum*, *P. cernuum*, *P. hispidum*, *P. regnelli*, *P. vicosanum*, *Pothomorphe umbelatum* isolou e identificou - se vários mono e sesquiterpenos (MESQUITA *et al.*, 2005).



**FIGURA 10** – Tipos de esqueletos de sesquiterpenos.

As porcentagens de identificação entre monoterpenos e sesquiterpenos tiveram variações em relação à data da coleta, para a mesma espécie. Os dados desta comparação apresentou, dentre os compostos majoritários, os mais freqüentes nas 8 espécies estudadas os compostos  $\beta$  – pineno e espatulenol, seguidos por *E* – cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno D,  $\alpha$  – pineno e limoneno.

A composição do óleo essencial de *Piper cernnum* e *Peperomia emarginella* coletadas no vale do Itajaí em Santa Catarina, foi descrita por meio de análise de cromatografia gasosa e CG/EM. A espécie *Piper cernnum* um óleo constituído principalmente por  $\alpha$  – pineno (2,5 %),  $\beta$  – elemene (2,6%),  $\beta$  – cariofileno (4,4%), germacreno D (2,7%),  $\beta$  – diidroagarofurano (31,0%), elemol (12,0%) e 10-epi-eudesmol (13,0%). Já a espécie *Peperomia emarginella* forneceu o óleo mais interessante devido ao seu odor agradável e intenso, onde o limoneno (29,0%) e o decanal (33,0%) descrevem 62 % da composição total (ABREU *et al*, 2005). O óleo essencial das folhas de *Piper carniconectivum* coletadas no sul da floresta amazônica foram analisadas e seus componentes majoritário foram o óxido de cariofileno (21,3%) e o  $\beta$  – pineno (19,0%) (FERNANDES, 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAIS

- Realizar o estudo fitoquímico e farmacológico das espécies *Vismia cayeannesis* (Clusiaceae), *Piper duckei* e *P. demeraranum* (Piperaceae)

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Estudar a composição química das espécies selecionadas, identificando as estruturas moleculares dos metabólicos presentes nos extratos através de métodos cromatográficos e espectrométricos.
- Realizar testes biológicos *in vitro* e *in vivo* com os extratos, frações e fitoconstituintes isolados, das espécies selecionadas, visando à avaliação da toxicidade, atividade antioxidante e leishmanicida.
- Estudar os caracteres morfoanatômicos de órgão vegetativos das folhas, cascas e frutos de *Vismia cayennensis*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS**

##### **3.1.1 Métodos cromatográficos e espectrométricos**

Preliminarmente, o método cromatográfico utilizado foi à Cromatografia em camada delgada (CCD), realizada com uso de cromatofolhas Merck PI, sílica gel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm de espessura e sílica C-18 (Octadecyl-functionalized sílica gel – Aldrich 377635 – 100 G). Os solventes orgânicos utilizados foram grau P.A ou cromatógrafo gráfico. A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada de UV (366 e 254 nm) e posterior revelação com sulfato cérico, vanilina, ácido sulfúrico 10 % e difenilborinato.

##### **Espectrometria de absorção no Infravermelho:**

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em aparelho Perkin Elmer modelo Spectrum 2000 com transformada de Fourier. As análises foram feitas utilizando-se pastilhas comprimidas de brometo de potássio (KBr). Os máximos de frequência ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) das absorções estão expressos em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ).

##### **Ressonância Magnética Nuclear:**

Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bi dimensionais foram registrados em espectrômetros Bruker AM-200 (200MHz) e Bruker AC-400 (500MHz) com solventes deuterados utilizando o tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente com referencia interna, sendo os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em unidades ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz).

### **Cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM):**

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6896 N equipado com injetor split/splitless, acoplado a um espectrômetro de massas por impacto de elétrons, a 70eV, com detector de quadrupolo seletivo de massas AGILENT 5973 e banco de dados de espectroscopia Wiley 7n (40.000 registros) do Instituto de Tecnologia em Fármacos de Manguinhos – far-manguinhos (FIOCRUZ) Rio de Janeiro. Todas as análises foram efetuadas em coluna HP-5 MS (5% difenil e 95% demetil polisiloxano) com dimensões de 30 m X 25 mm X 0,25 µm; gás de arraste : Helio 1mL/min; e razão de split 1:20.

### **Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE):**

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/UV) analíticas foram efetuadas em um sistema integrado a um detector de feixe de diodos (DAD - Shimadzu SPD-M10Avp) na região de 200 a 600 nm e fluxo de 1 mL/min. Todas as análises em CLAE foram efetuadas em coluna de fase reversa, coluna Shim-pack “CLC(M)” 4,6mm x 15 cm X 5 cm (analítica).

Os solventes, metanol ou acetonitrila, utilizado nas diferentes análises por CLAE foram de alta qualidade – grau CLAE/UV – TEDIA. A água foi obtida por destilação em sistema Milli-q. Os solventes foram filtrados em filtro 0,45 µm (marca Millipore) antes da utilização.

**Condições cromatográficas.** As análises pro CLAE foram realizadas em equipamento e coluna de gel de sílica funcionalizada com octadecilsilano (C - 18), os gradientes de eluição utilizados estão na tabela abaixo, onde o solvente **A** é CH<sub>3</sub>CN e **B** é H<sub>2</sub>O com 0,05% de TFA.

O gradiente iniciou com 3 % de acetonitrila por 10 minutos; acetonitrila 50 % de 10 a 20 minutos e por fim 3% de acetonitrila de 20 a 30 minutos.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração de A</b>	<b>Concentração de B</b>
1-10	3	97
10-20	50	50
20-30	3	97

O volume das injeções foi de 20 µl (injetor automático) e os constituintes foram detectados a 230 nm.

#### **Espectrometria de massas com a técnica de ionização por “eletrospray”:**

As substâncias medidas com a técnica de ionização por “eletrospray” foram medidas em aparelho LC Micromass triplo – quadrupolo analisadas do modo negativo. Voltagens de 20 – 35 V e fluxo 10µL/min.

#### **Ponto de Fusão (PF):**

O ponto de fusão foi determinado em aparelho eletrônico da marca Mettler Toledo FP 62.

#### **3.1.2 Reagentes e testes de identificação**

- **Sulfato cérico/ ácido sulfúrico.** (MATTOS, 1997). Solução de 1% de sulfato cérico (IV) em ácido sulfúrico a 10%. O cromatograma foi então borrifado e aquecido a 100°C por alguns minutos.

- **Reagente de Lieberman Burchard** (MATTOS, 1997) Foram misturadas, sob refrigeração, 5 mL de anidrido acético, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 50 mL de etanol. A cromatoplaça foi pulverizada com a solução acima e, em seguida, aquecida por 10 min a 100 °C (específico para triterpenos pentacíclicos e esteróides. Triterpenos pentacíclicos desenvolvem coloração de rosa e esteróides, coloração esverdeada).
- **Vanilina sulfúrica** (MATTOS, 1997). Solução (A): 5-10% de ácido sulfúrico em etanol. Solução (B): solução a 1% de vanilina em etanol. O cromatograma foi então borrifado com uma mistura da solução A e B na proporção 1:1 e aquecido a 100°C por alguns minutos.
- **Ácido sulfúrico em Etanol.** (MATTOS, 1997). Solução de 5-10% de ácido sulfúrico em etanol. O cromatograma foi então borrifado e aquecido a 100°C por alguns minutos.
- **NP/PEG.** Duas soluções foram preparadas: (A) 0,5g de NP (difetilboroximetilamina), dissolvido em 10mL de etanol, e (B) 1g de PEG (polietilenoglicol 400), dissolvido em 10 mL de etanol. Inicialmente, o cromatofolha foi borrifado com a solução A e após a secagem, com a solução B. A cromatoplaça foi visualizada em lâmpada UV a 365 nm.

### **3.2 Coleta e identificação botânica**

As coletas das espécies botânicas ocorreram na Reserva florestal Ducke, Km 26, **Tabela 1.** Os materiais botânicos das espécies *V. cayeannensis*, *P. duckei* e *P. demeraranum*, foram identificados pelos profissionais do herbário do INPA, com número de registro de exsicata, 18448, 188187 e 188224, respectivamente.

**TABELA 1.** Materiais botânicos coletados.

<b>Data</b>	<b>Espécie</b>	<b>Parte da planta coletada</b>
17/07/2006	<i>V. cayeannensis</i>	Cascas/Frutos
01/10/2006	<i>P. duckei</i>	Folhas
01/10/2006	<i>P. demeraranum</i>	Folhas

### **3.3. ANÁLISE MORFOANATÔMICA**

#### **3.3.1 Corte histológico**

O corte histológico de um material botânico a ser utilizado para estudo morfoanatômico tem por finalidade a identificação da espécie selecionada, a fim de se comprovar que as análises realizadas estão sendo feitas com a real planta de estudo, além de contribuição para a diagnose farmacognóstica, que reúne informações químicas, farmacológicas e botânicas para futuro desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico (SILVA, 2007).

O material pode ser analisado a fresco ou fixado. As folhas ou folíolos são removidos da planta com todas as suas partes por meio de uma lâmina de barbear ou outro instrumento cortante, embrulhadas em papel-toalha úmido e armazenadas em um recipiente fechado. Deve-se ter o cuidado de identificar o nó da planta de que foi retirada a folha (SOUZA, 2005).

Para preservação de células, tecidos e órgãos, o material botânico precisa ser fixado em soluções adequadas cujos reagentes contêm ingredientes tóxicos ao protoplasma. Como os processos vitais das células e tecidos devem ser paralisados, é necessário que o fixador penetre o mais profundo possível na peça botânica. O fixador mata os tecidos, conservando-os com poucas alterações estruturais (SOUZA, 2005). Existem vários tipos de fixadores, o utilizado neste trabalho foi o FAA (formaldeído, ácido acético e álcool) e armazenados em etanol 70% para a desidratação do material botânico.

A anatomia pode ser estudada por meio de lâminas semipermanentes e permanentes, preparadas com cortes de fragmentos das cascas, frutos e região apical, mediana e basal das folhas. Lâminas semipermanentes são confeccionadas de material seccionado nos sentidos paradérmico e transversal, à mão livre. Lâminas permanentes os fragmentos dos materiais botânicos são incluídos em polietilenoglicol (SOUZA, 2005). As lâminas preparadas para estudo a partir da folha, cascas e frutos em fixador foram do tipo semipermanentes e também foram feitas lâminas do tipo permanente com o material sem fixador.

A seção transversal é executada em sentido perpendicular ao maior eixo do órgão a ser estudado. A seção paradérmica deve ser feita paralelamente ao maior eixo do órgão. Para órgãos cilíndricos, ela pode ser radial ou tangencial, e para órgãos laminares, longitudinal

anticlinal (perpendicular à superfície) e longitudinal periclinal (paralela à superfície do órgão laminar), esta última também chamada de seção longitudinal (SOUZA, 2005).

### **3.3.2 MATERIAS E MÉTODOS**

Foram confeccionadas lâminas permanentes e semipermanentes, posteriormente realizada inclusão em parafina a 50°C, durante 24 horas, emblocadas e cortadas em micrótomo rotativo seguindo metodologia de Johansen (1940) das regiões do ápice, da região mediana do limbo e da base foliar. Para as lâminas permanentes das cascas e frutos foram preparados de acordo com a técnica descrita obtendo-se cortes de espessura de 20 µm aproximadamente, que foram aderidos em lâminas e corados com safranina ou Astraublau-Fucsina básica e montados em glicerina a 50%, empregando-se esmalte para vedação (MENDONÇA, 1983). A coração consiste em passar o material em soluções de corantes ou reagentes. Assim o material apresentará uma cor ou duas cores ou mais cores diferentes, ou então apenas algumas estruturas ficarão coradas (KRAUS, 1997).

### **3.3.4 OBTENÇÃO DE IMAGENS DOS CORTES HISTOLÓGICOS**

O sistema de imagens, utilizado no projeto é constituído de microscópio Carl Zeiss Modelo Axioskop com câmara MC – 80, placa digitalizadora de imagem LGV-5480TV, microcomputador Pentium II 233 233Mhz com 128 Mb, monitor de 20’’ Sony Trinitron Multiscan20seII, impressora colorida Epson Stylus color 1520, softwares de análise de

imagem ImageJ, Cygnus, IPLab da Scanalytics, câmara de vídeo digital COHO e demais acessórios como cabeamento, etc.

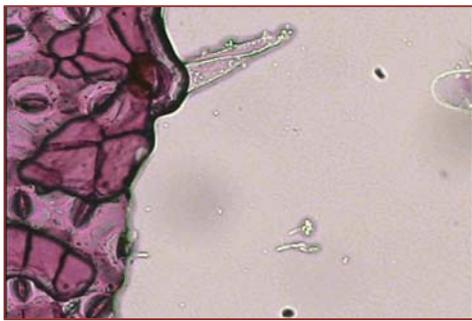
### **3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.4.1 Características morfoanatômicas das folhas, cascas, frutos de *V. cayennensis* e folhas de *P. demeraranum*.**

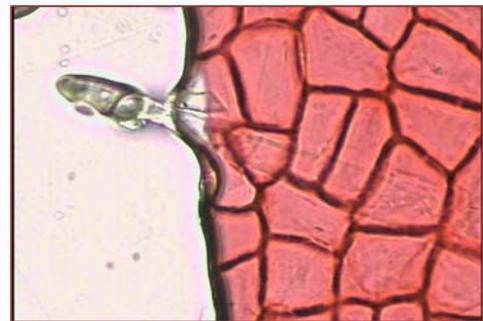
Foram realizados estudos sobre os aspectos botânicos das folhas de *P. demeraranum*, bem como investigação das características anatômicas das folhas, cascas, frutos de *V. cayennensis*.

#### **3.4.2 Microscopia do limbo foliar de *V. cayennensis***

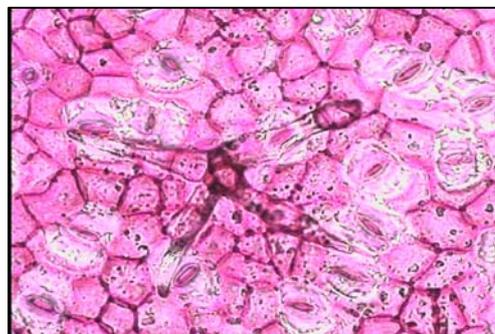
Em visão frontal (corte paradérmico) a folha é anfiestomática, com estômatos paracíticos característica mencionada por Metcalfe e Chalk (1950) para a família. O tecido epidérmico possui células de contorno poligonal, de paredes retas, mostram numerosas bases de tricomas, tectores simples, unicelular (**Figura 11. A**), bicelular (**Figura 11. B**) ou estrelado (**Figura 11. C**), com rara presença de tricomas glandulares, enquanto a região da sub-epiderme é principalmente composta de duas camadas celulares com paredes espessas (**Figura 11. D**). A epiderme da lâmina foliar é uniestratificada sobre superfície adaxial e abaxial com cutícula (**Figura 11. D**) espessa, mostrando tricomas. A presença de tricomas apesar de não ser comum na família Clusiaceae, já foi descrita em outra espécie do gênero *Vismia* (SILVA, 2007), em concordância com a observação dessa investigação.



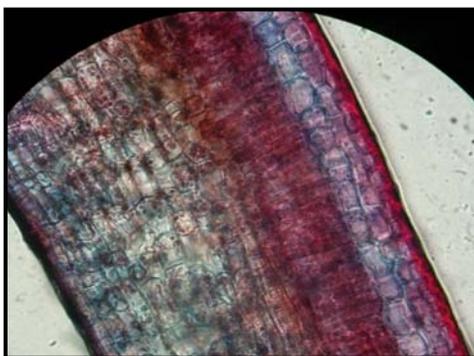
**A**



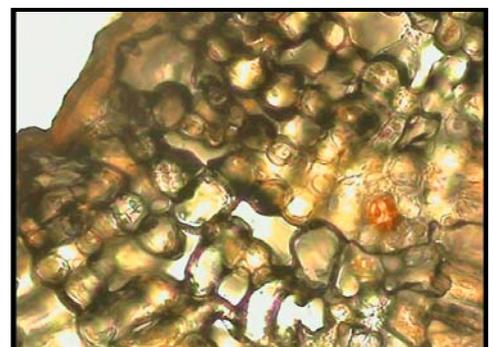
**B**



**C**



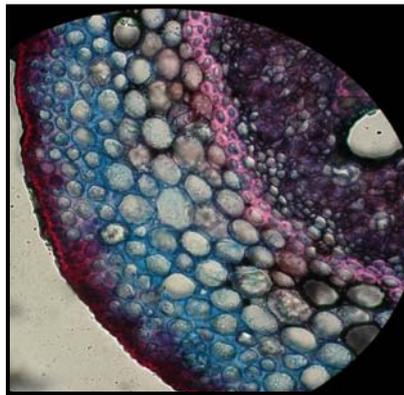
**D**



**E**

**FIGURA 11.** **A** - Tricoma tector unicelular; **B** - Tricoma tector bicelular; **C** - Tricoma estrelado; **D** - Seção transversal do mesófilo dorsiventral e **E** - Parênquima esponjoso com cavidade fenólica.

O mesófilo possui organização dorsiventral (**Figura 11. D**), constituído por uma camada de parede palisádica e um parênquima esponjoso compacto com cavidade fenólica (**Figura 11. E**). Observa-se ainda no mesofilo, drusas de oxalato de cálcio e feixes vasculares envolvidos por bainha esclerenquimática (**Figura 12**). A nervura principal possui contorno plano-convexo ou côncavo-convexo, com epiderme uniestratificada, colênquima angular formado por até quatro camadas de células, parênquima fundamental contendo numerosas drusas de oxalato de cálcio e feixes vasculares colaterais revestidos por periciclo fibroso. A região medular é preenchida por parênquima.

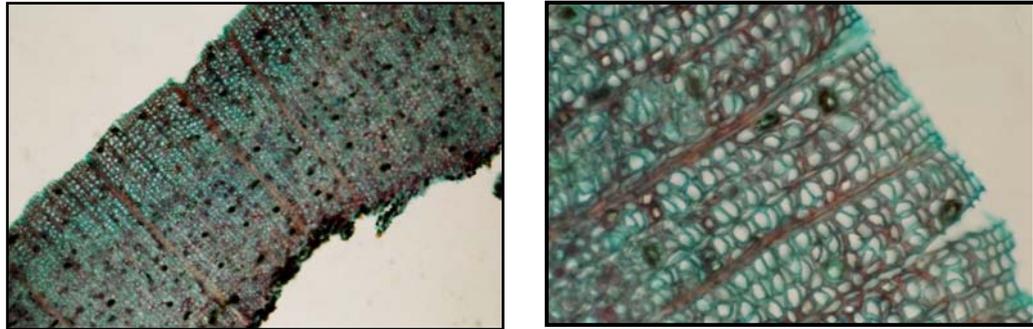


**FIGURA 12.** Seção transversal do mesófilo dorsiventral

### 3.4.3 Microscopia das cascas de *V. cayennensis*

A casca em estágio secundário apresenta um súber de células quadrangulares e parênquima cortical desenvolvido contendo idioblastos fenólicos e cristalíferos (prismas de oxalato de cálcio) (**Figura 13**). Raios parenquimáticos com uma a três séries de células atravessam toda a espessura da casca atingindo a região floemática sem se alargarem. Nesta

região mais interna encontram-se elementos crivosos e células companheiras imersos no parênquima de células com paredes espessas e lignificadas.



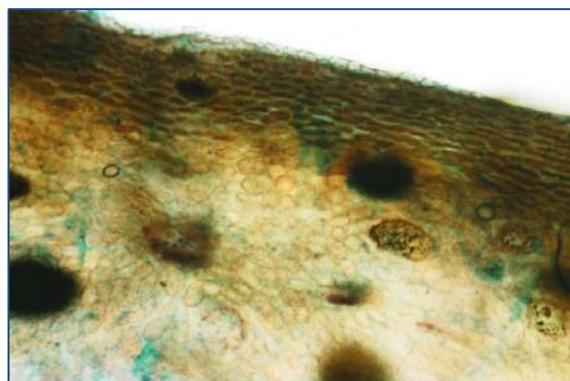
**A**

**B**

**FIGURA 13.** Cascas da *Vismia cayennensis* floema com prismas e fenólicos

#### 3.4.4 Microscopia dos frutos de *V. cayennensis*

O fruto de *V. cayennensis* é constituído por uma baga de contorno arredondado ou oblongo, de coloração castanha e polpa carnosa e avermelhada. O pericarpo (**Figura 14**) em secção transversal mostra epicarpo glabro com células arredondadas.



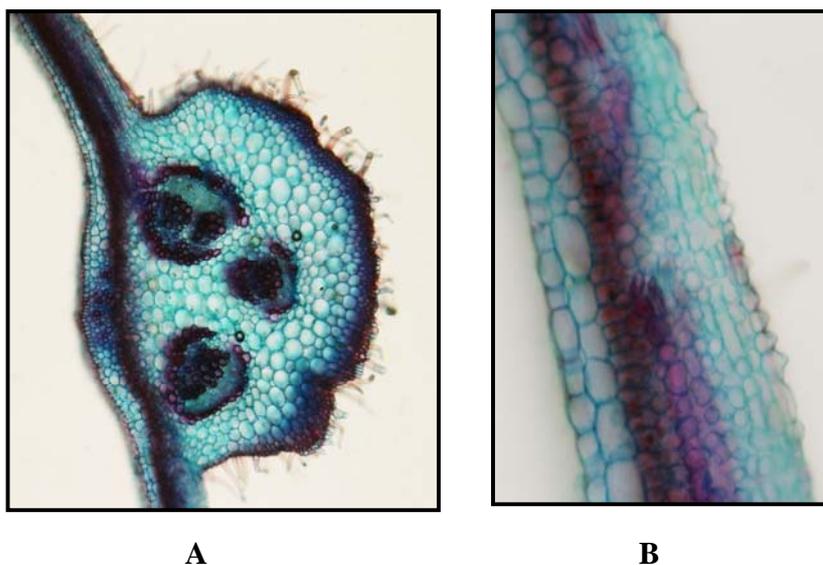
**FIGURA 14.** Frutos de *Vismia cayennensis* epicarpo e mesocarpo.

O mesocarpo parenquimatoso apresenta externamente camadas celulares mais alongadas tangencialmente, de paredes espessas, constituindo junto com o epicarpo a “casca” do fruto, detalhe descrito por Mourão e Beltrati (2001) para o fruto de *Vismia guianensis*. Na região mais interna as células tornam-se arredondadas, de paredes mais finas. Ao longo do mesocarpo amiláceo encontram-se numerosos ductos secretores e feixes vasculares. O endocarpo é morfológicamente semelhante ao tecido anterior, porém possui células de menores dimensões, mais estreitadas.

Este é o primeiro relato sobre o estudo anatômico das folhas, cascas e frutos de *V. cayennensis* e mostra que as características histológicas apresentam semelhanças com as já descritas para as folhas e frutos de *V. guianensis* (MOURÃO *et al*, 2001).

#### **3.4.5 Microscopia do limbo foliar de *P. demeraranum***

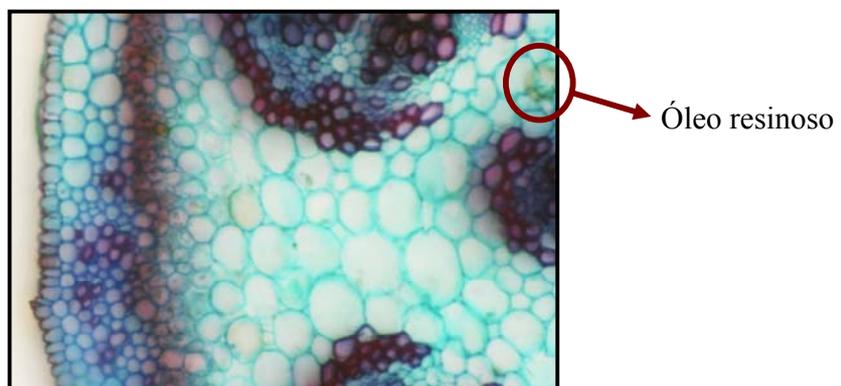
A nervura central plana ou levemente convexa na parte superior e fortemente convexa na inferior possui epiderme uniestratificada, sem tricomas no lado adaxial, porém fortemente pubescente na região abaxial com tricomas tectores pluricelulares (geralmente bi a tricelulares), unisseriados, alguns deles mais curtos, outros longos, porém ambos de paredes espessas e estriadas, curvos, com a célula basal curta e a da extremidade mais longa (**Figura 15. A**). As células epidérmicas apresentaram contorno arredondado ou ligeiramente alongado no sentido anticlinal e com cutícula espessa e estriada no lado adaxial (**Figura 15. B**).



**FIGURA 15.** A) Nervura central plana de *P. demeraranum*, B) Células epidérmicas com contorno arredondado ou alongado

O colênquima angular, com 3 a 6 camadas de células, apareceu adjacente a epiderme tanto do lado superior quanto do inferior. Mais internamente pôde ser visualizado um parênquima fundamental de células poligonais, bastante desenvolvido, notando-se externamente uma região rica em amido. Em direção ao centro da nervura as células aumentaram substancialmente de tamanho, podendo ocorrer o aparecimento de pequenos feixes de cristais de oxalato de cálcio na forma de ráfides e idioblastos de conteúdo óleo-resinoso (**Figura 16**). Na região vascular foram verificados três grupos de feixes colaterais, dois maiores situados no mesmo nível e o terceiro, menor, localizado mais abaixo, cada um deles envolvido por um periciclo fibroso descontínuo. O floema é constituído de tecido crivoso, células companheiras e parênquima, enquanto o xilema contém elementos de vaso de grosso calibre imersos em parênquima, estando à região cambial bem nítida. O mesofilo dorsiventral está revestido por epiderme do lado adaxial com células de paredes espessas,

mais alongadas no sentido periclinal, com cutícula estriada e glabra. Internamente a esta região apresenta uma camada de células hipodérmicas. A epiderme abaxial, de células menores, contém tricomas tectores idênticos aos descritos para a nervura central. O parênquima paliádico, uniestratificado é pouco nítido com as células discretamente alongadas no sentido anticlinal, enquanto o parênquima esponjoso amiláceo é formado por 6 a 7 camadas.



**FIGURA 16.** Feixes de cristais de oxalato de cálcio *P. demeraranum*

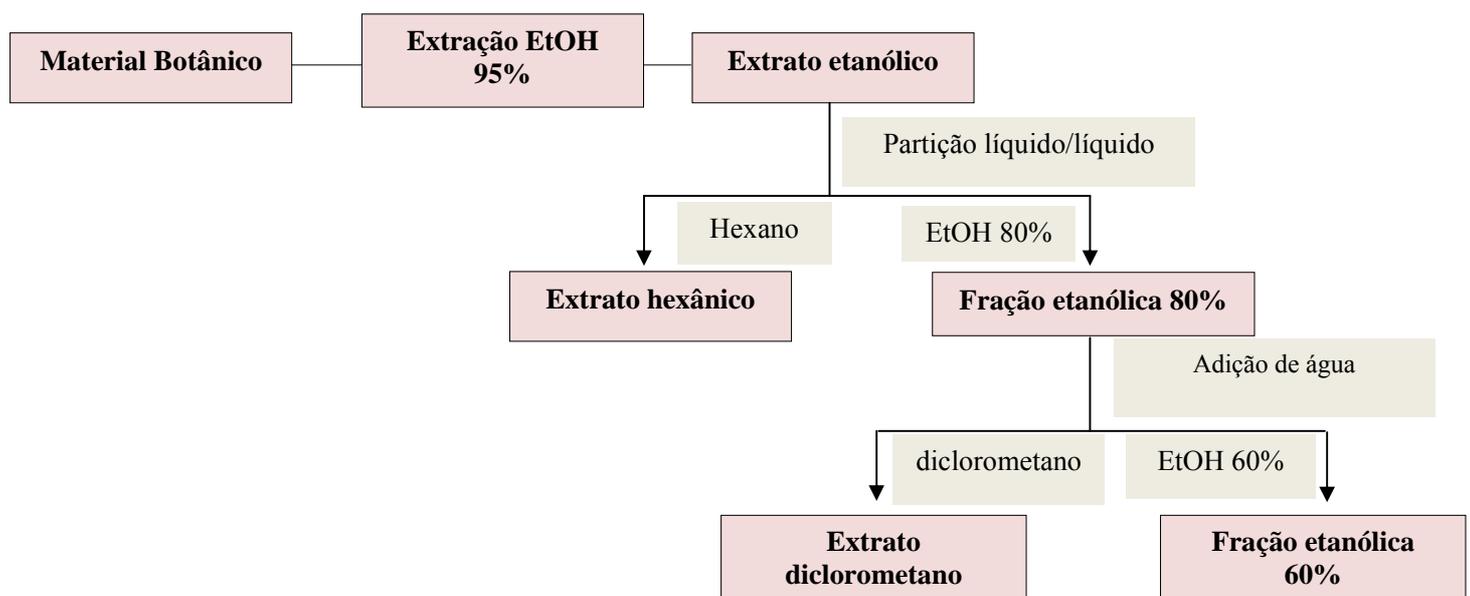
### **3.5 Preparação dos extratos**

Os materiais botânicos das espécies selecionadas foram secos à temperatura ambiente, sendo posteriormente moídos em moinho de facas.

### 3.5.1 Método de extração do material botânico de *V. cayennensis*

As cascas da *V. cayennensis* (1,4 Kg), foram submetidas à extração por maceração com etanol 95 %. O solvente foi removido sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotatório. O extrato etanólico obtido foi submetido à partição líquido-líquido com hexano e diclorometano (esquema 1).

**Esquema 1 – Esquema geral de preparação de extratos**



O extrato etanólico 95% foi diluído a solução etanólica 80%, a qual foi particionada com hexano em uma proporção 1:1, utilizando-se 100 mL de cada solução. Este procedimento foi repetido 34 vezes. A solução hexânica foi separada e o solvente removido. À fração etanólica 80% remanescente foi adicionado água de forma a obter a solução etanólica 60%, esta solução foi submetida à extração líquido-líquido com diclorometano, utilizando 100 mL de cada solução. Este procedimento foi repetido 25 vezes. A fração diclorometano e a fração EtOH 60% foram concentradas, obtendo-se o extrato diclorometano e solução aquosa. Para a remoção da água fez uso de um liofilizador. Os extratos obtidos foram submetidos a estudos químicos e farmacológicos.

A resina presente nos frutos de *V. cayennensis* (m = 240 g) foi retirada a partir da extração com clorofórmio por um período de 72 h. A solução clorofórmica foi concentrada em evaporador rotatório a 45°C. As amostras foram codificadas conforme a tabela 2:

**TABELA 2.** Codificação e quantidade dos extratos.

<b>Sigla</b>	<b>Significado</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
EECVc	Extrato etanólico das cascas de <i>V. cayennensis</i>	202	14,4
EHCVc	Extrato hexânico das cascas de <i>V. cayennensis</i>	2,25	0,16
EDCVc	Extrato diclorometano das cascas de <i>V. cayennensis</i>	0,98	0,07
ECFVc	Extrato clorofórmico dos frutos de <i>V. cayennensis</i>	1,86	0,7

### 3.5.2 Fracionamento do extrato hexânico das cascas de *V. cayennensis*

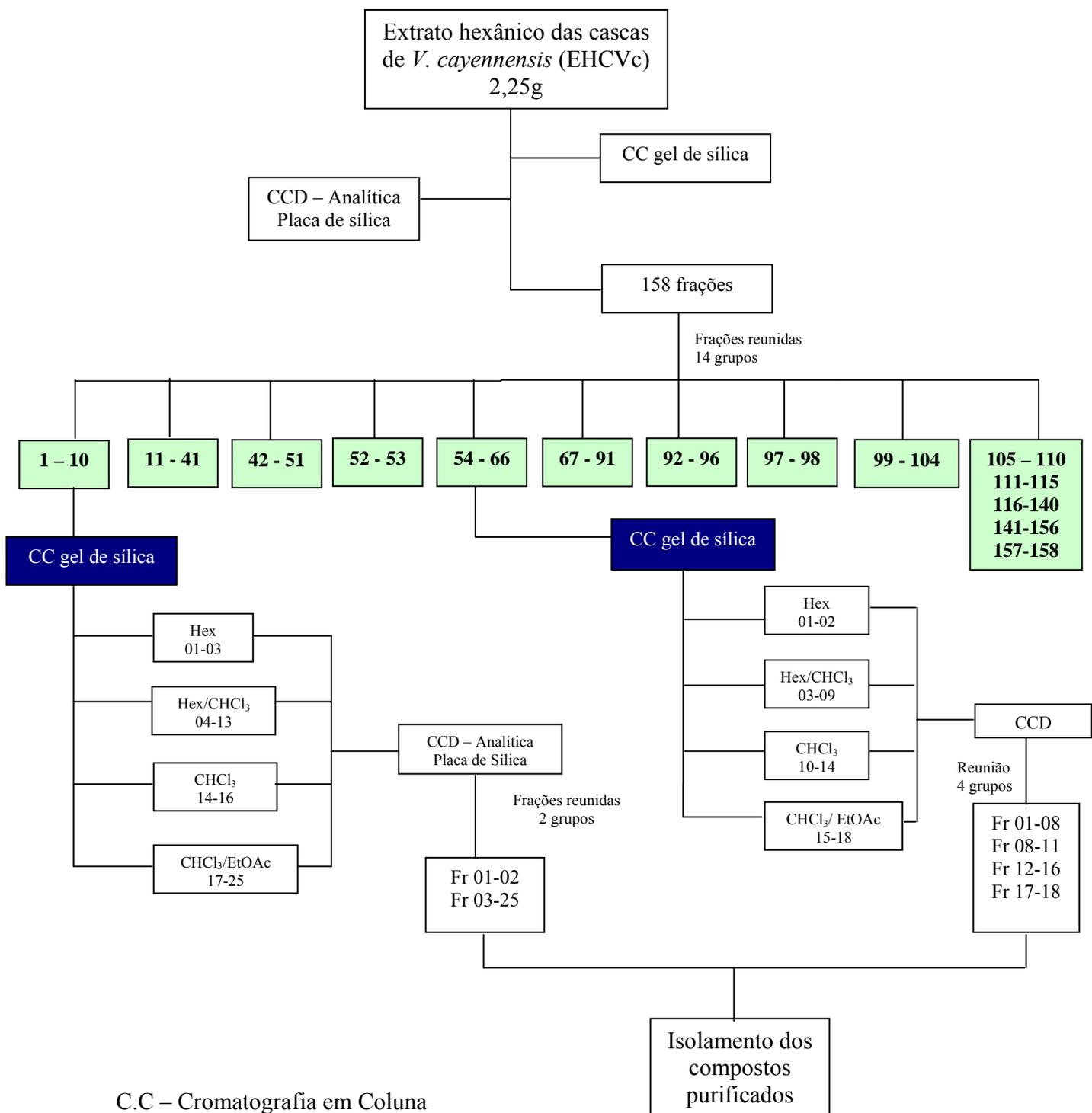
O extrato hexânico foi avaliado por métodos cromatográficos e testado frente às cepas de *L. amazonensis* e *L. guyannensis*.

#### 3.5.2.1 Cromatografia em coluna

O extrato hexânico obtido das cascas de *V. cayennensis* (EHCVc) (2,25 g) foi submetido ao fracionamento por meio de coluna cromatográfica (3 x 75 cm) em gel de sílica (70-230 mesh) eluída com: hexano, acetona e etanol, em gradiente de eluição, sendo recolhidas **158** frações.

Estas frações foram reunidas em 14 grupos (**Esquema 2**), mediante análise comparativa das frações por CCD e pela utilização de reveladores como a luz UV (365 nm) e vanilina sulfúrica.

**Esquema 2 – Fracionamento completo do extrato hexânico de *V. cayennensis***



C.C – Cromatografia em Coluna  
C.C.D – Cromatografia em camada delgada

### 3.5.2.2 Tratamento das frações 1 - 10

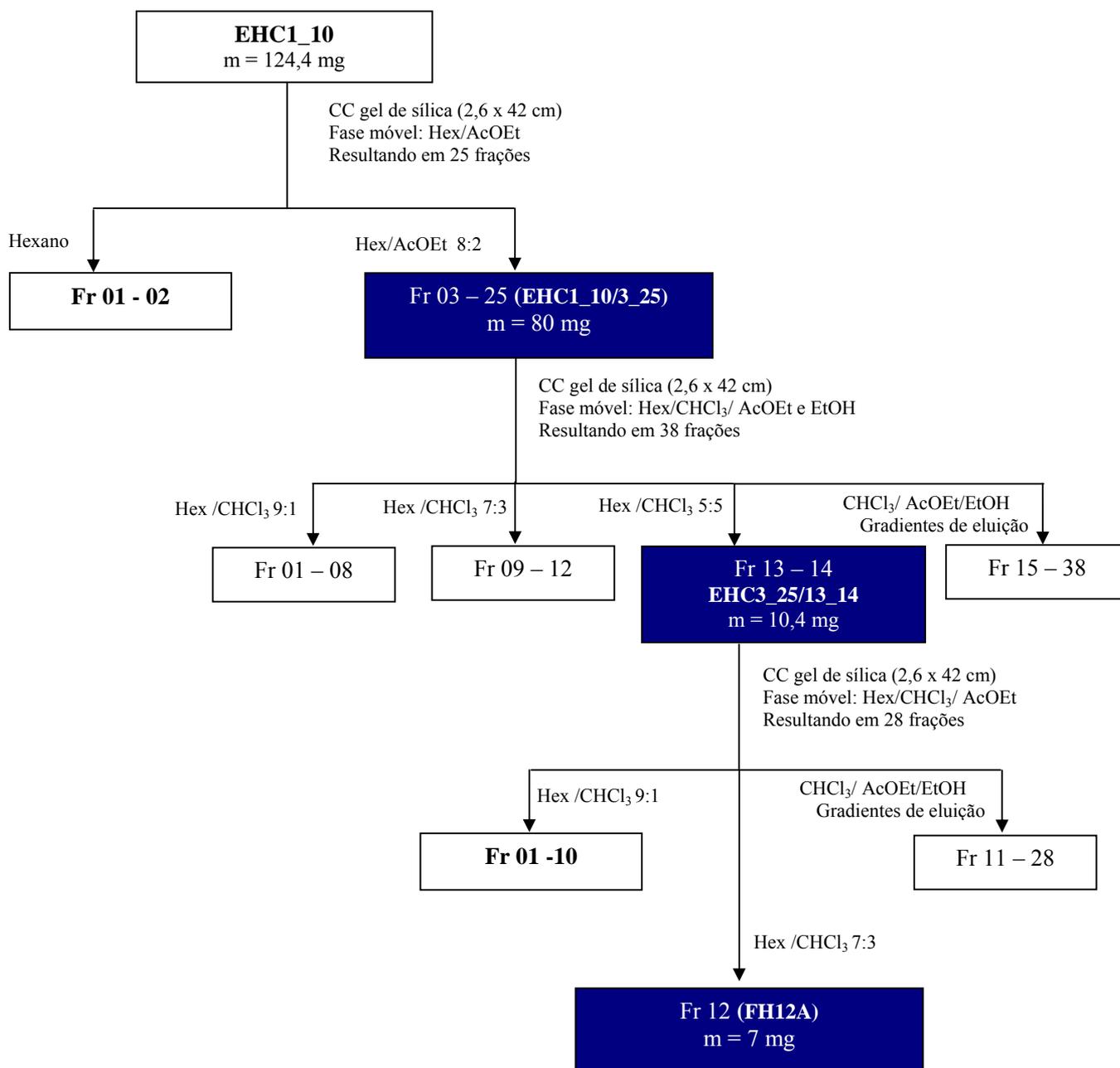
As frações de 1 a 10 (m = 124,4 mg) apresentaram perfil químico semelhante conforme avaliação em CCD, sendo reunidas e codificada como **EHC1\_10**, devido ao bom rendimento obtido, a fração foi re-cromatografadas em coluna gel de sílica (2,6 x 42 cm), eluída com hexano e acetato de etila em gradiente de eluição. Recolheu-se um total de 25 frações (**Esquema 3**).

As frações de 3 a 25 foram isoladas na forma de sólidos com uma mistura oleosa. Em avaliação por CCD foi observado perfil químico semelhante das frações, portanto foram reunidas (m=80 mg) e codificada como **EHC1\_10/3\_25**. Posteriormente a fração reunida foi re-cromatografada em coluna gel de sílica (2,6 x 42 cm) eluída com hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol em misturas de polaridades crescentes, recolhendo-se um total de 38 frações.

As frações 13-14 (10,4 mg) após análise por CCD, foram reunidas e recromatografadas em coluna de gel de sílica (m = 40g ; 0,040 – 0,063 nm) eluída com hexano, CHCl<sub>3</sub>, acetato de etila e etanol, obtendo-se um total de 28 frações. A fração reunida foi codificada como **EHC3\_25/13\_14**.

Entre as frações coletadas, a fração 12 codificada como FH12A (**Esquema 3**) foi purificada e recristalizada com clorofórmio, resultando no isolamento de um sólido branco em forma de agulhas, esta fração foi enviada para análise de CG/EM, RMN de H<sup>1</sup>, C<sup>13</sup>,DEPT,gHMBC,gHSQC.

**Esquema 3 – Esquema de purificação das frações do EHCVc.**

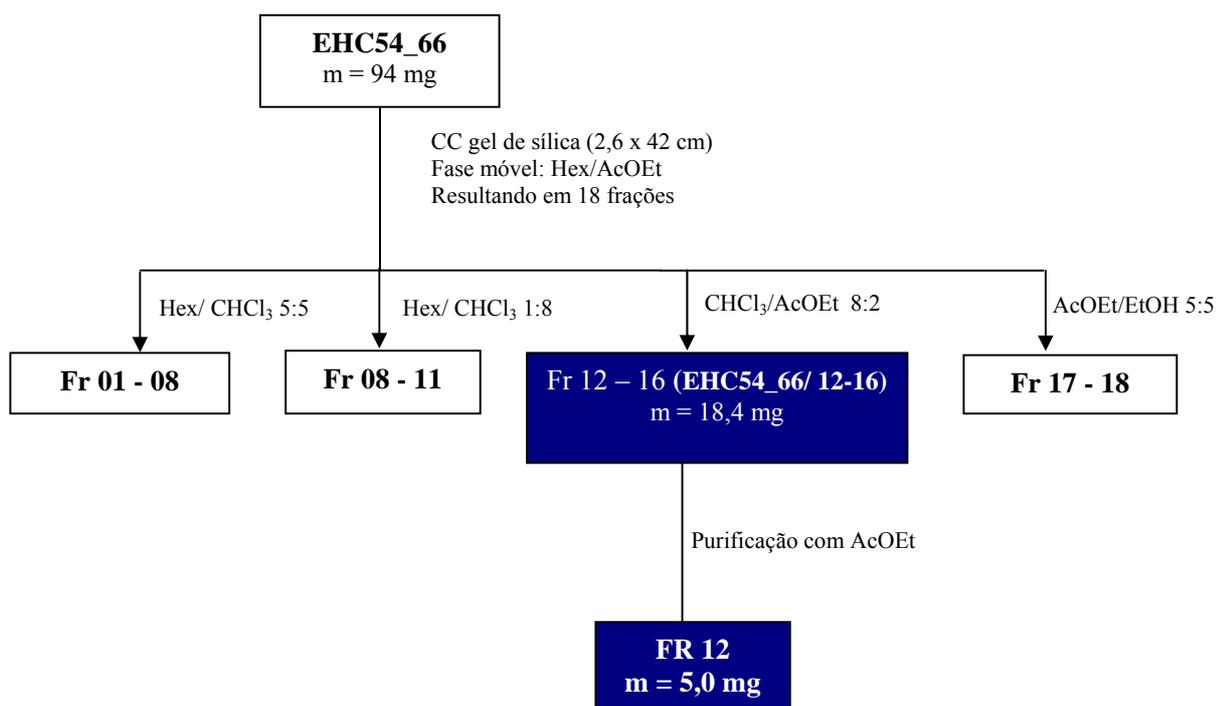


### 3.5.2.3 Tratamento das frações 54 \_66

As frações de 54 a 66 foram isoladas como uma mistura oleosa com sólidos alaranjados em forma de agulhas, devido a similaridade do perfil químico após avaliação em CCD, estas frações foram reunidas ( $m = 94 \text{ mg}$ ) e codificada como **EHC54\_66**, posteriormente recromatografadas em coluna de gel sílica ( $2,6 \times 42 \text{ cm}$ ) eluída com hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, obtendo 18 frações (**Esquema 4**).

As frações de 12 a 16 foram reunidas após avaliação da similaridade de seus perfis químicos em CCD. A fração reunida foi codificada **EHC54\_66/12\_16** ( $m = 18,4 \text{ mg}$ ). As frações foram isoladas como um sólido na forma de agulhas contendo impurezas, este sólido foi purificado e recristalizado com Acetato de etila. Após purificação, a fração foi avaliada em CCD, identificando-se um único spot. A substância foi codificada como FR12 (**Esquema 4**).

**Esquema 4 – Esquema de purificação da fração do EHC54\_66**



### 3.6 Fracionamento do extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis*

O extrato clorofórmico dos frutos (**Figura 17**) de *V. cayennensis*, codificado como ECFVc (1,863 g), foi inicialmente analisado por CLAE, em equipamento e coluna de gel de sílica funcionalizada com octadecilsilano (C-18) já descritos anteriormente (**Materiais e Métodos, p. 20**). Posteriormente o extrato foi cromatografado em gel de filtração de Sephadex LH-20 (650 g) (LH 20100 – 100 G – sigma Aldrich) tendo como fase móvel MeOH. Foram coletadas 60 frações.



**FIGURA 17.** Frutos da *Vismia cayennensis*.

As frações obtidas foram analisadas por CCD, eluídas no sistema de solvente: Hexano/Acetato 6:4, posteriormente reveladas com NPPEG e observadas no UV (365 nm).

Com base nessas análises as frações que apresentaram perfil químico semelhantes foram reunidas, obtendo-se um total de 7 frações reunidas. Todas as frações foram avaliadas frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e quanto à atividade antioxidante.

As frações de 15 a 23, devido à similaridade do perfil químico foram reunidas. Após reunião a fração foi codificada como **FV 15\_23**, e posteriormente fracionada por coluna de gel de sílica octadecilsilano (C - 18), eluída com MeCN / H<sub>2</sub>O 9:1, resultando em 21 frações.

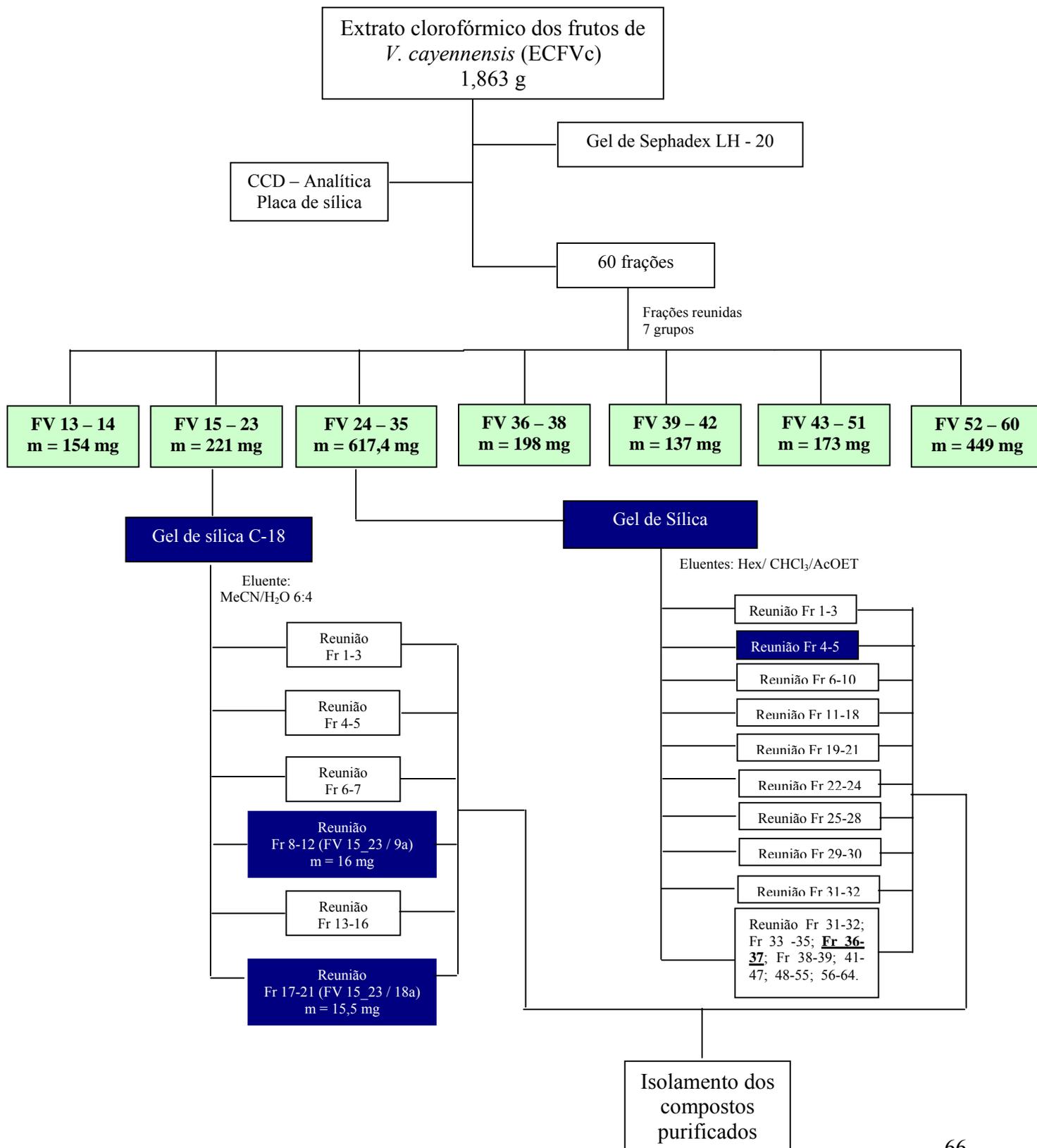
### 3.6.1 Tratamento das frações 15\_23 oriundas do ECFVc

As frações oriundas da cromatografia em coluna da fração **FV15\_23** (m = 120 mg), foram avaliadas em CCD, reveladas com NPPEG e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas. As frações reunidas de 8 – 12, codificada como **FV 15\_23/9a** apresentaram um único spot ao ser avaliado em CCD de fase normal, revelado com NPPEG e observada no ultravioleta, comprimento de onda 356 nm. As frações reunidas de 17 – 21, codificada como **FV 15\_23/18a (Esquema 5)** foram avaliadas em CCD de fase normal, sendo identificado um único spot após revelação com os reveladores específicos citados anteriormente. As frações foram submetidas a análises biológicas de toxicidade, atividade antioxidante, citotóxica e leishmanicida.

### 3.6.2 Tratamento das frações 24\_35 oriundas do ECFVc

As frações oriundas da cromatografia em coluna da fração **FV24\_35** (m = 144 mg), foram avaliadas em CCD, reveladas com NPPEG e as que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas. As frações reunidas de 4 – 5, codificada como **FV 24\_35/4a** e 36 – 37, codificada como **FV 24\_35/37a**, apresentaram um único spot ao ser avaliado em CCD de fase normal, revelado com NPPEG e observado no ultravioleta em comprimento de onda 356 nm (**Esquema 5**), a fração FV 24\_35/4a apresentou um rendimento de 1,0 mg, quantidade insuficiente para a realização de análises espectrométricas e realização de ensaios biológicos, sendo possível apenas a realização qualitativa em CLAE/UV. A fração 24\_35/37a foi isolada contendo um rendimento de 3 mg, sendo submetida a análises espectrométricas e biológicas.

**Esquema 5 – Fracionamento completo do ECFVc.**



### 3.7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.7.1 Identificação dos constituintes químicos presentes no extrato hexânico das cascas de *V. cayennensis* (EHCVc).

O extrato hexânico obtido das cascas de *V. cayennensis* foi analisado por CG/EM, os constituintes foram identificados por interpretação dos espectros de massa e fragmentações características e por comparação com a biblioteca do aparelho.

O cromatograma, no item anexo (**Cromatograma 1, p. 96**), do EHCVc evidenciou a presença de quatro componentes majoritários: *trans*-cariofileno (4,06 %), hexadecanoato de etila (7,57 %), viminalol (14,90 %) e fridelina ( 40,16 %) (**Tabela 3 p. 69**).

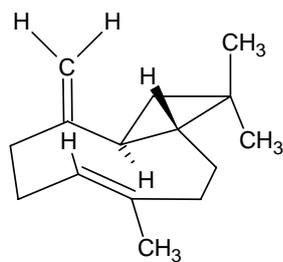
A substância com tempo de retenção de 13,08 minutos apresentou um espectro de íon molecular  $m/z$  204 (M -1) e fragmentos compatíveis com sesquiterpenos:

Foi registrado um pico em  $m/z$  189, provavelmente produzido por uma estrutura  $C_{14}H_{21}^+$  formada por isomerização (provocada pelo aumento de conjugação), seguida por clivagem alílica (SILVERSTEIN, 2002).

A formação do pico em  $m/z$  175 corresponde à fragmentação  $C_{13}H_{19}^+$ , envolve rearranjos seguidos da perda de  $CH_3$  (M-15), localizado na lateral do biciclo.

A formação do pico em  $m/z$  161 correspondentes a estrutura  $C_{12}H_{17}^+$  envolve rearranjos seguido da perda do segundo grupo metila (M-15) também localizado na lateral do biciclo.

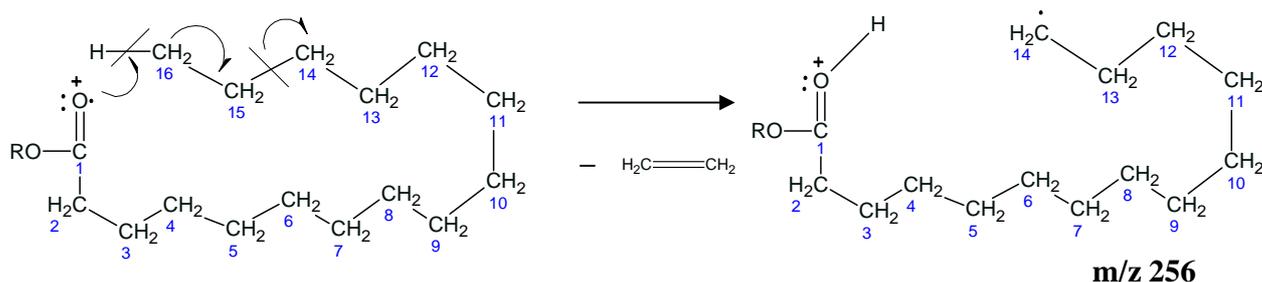
Os fragmentos do composto foram compatíveis, conforme comparação com dados na literatura, com o sesquiterpeno, *trans*-cariofileno (**Figura 18**).



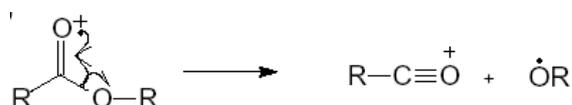
**FIGURA 18.** Estrutura química do *Trans* - Caryofileno

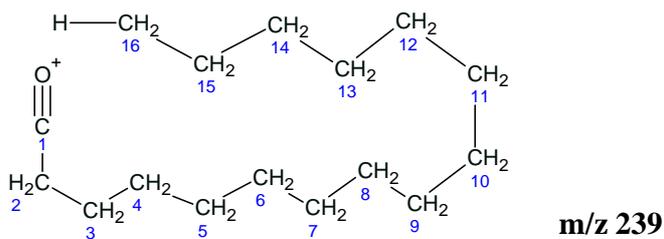
A substância com tempo de retenção 24,60 minutos apresentou um espectro de íon molecular  $m/z$  284 e fragmentos compatíveis com éster de fórmula molecular  $C_{18}H_{36}O_2$ .

O espectro identificou um pico em  $m/z$  256 é devido ao rearranjo de McLafferty, com quebra da ligação  $C_{15}$  e  $C_{14}$ , após a captura do hidrogênio pelo oxigênio. Pico característico do íon molecular do éster de metila ou etila de um ácido alifático de cadeia linear (SILVERSTEIN, 2000).

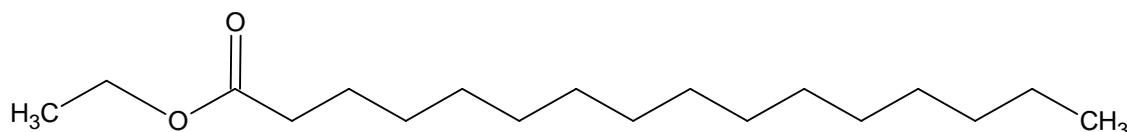


O íon  $R-C\equiv O^+$  é característico de ésteres, no espectro, este radical catiônico está identificado pela formação do pico em  $m/z$  239. Este fragmento é resultado de rearranjo McLafferty, no qual ocorre transferência  $\gamma$ -H para o hidrogênio da carbonila através de um estado de transição cíclico, e quebra da ligação C2-C3 para gerar uma oleofina e um íon como demonstrado a seguir (SILVERSTEIN, 2000).





Os fragmentos apresentados são compatíveis com éster de fórmula molecular  $C_{18}H_{36}O_2$  próprios do esqueleto de um éster alifático.



**FIGURA 19.** Ácido hexadecanóico etil éster

**TABELA 3.** Composição química com respectivos índices de retenção do EHCVc.

Substância	Íon molecular (m/z)	TR (min)	Fórmula Molecular	Area (%)
<b>SESQUITERPENOS</b>				
<i>trans</i> -Cariofileno	204	13.080	$C_{14}H_{30}$	4.06
<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>				
Hexadecanoato de etila	284	24.600	$C_{18}H_{36}O_2$	7.57
oleato de etila	310	27.58	$C_{20}H_{38}O_2$	2.47
linoleato de etila/acido linoléico	308	27.518	$C_{18}H_{32}O_2$	27.52
<b>QUINONA</b>				
Antraquinona	284	35.38	$C_{14}H_{10}O_4$	2.61
<b>TRITERPENO</b>				
Viminalol	426	44.48	$C_{30}H_{50}O$	14.90
Fridelina	426	45.90	$C_{30}H_{50}O$	40.16
<b>ROTENÓIDES</b>				
Rotenona	410	46.03	$C_{23}H_{22}O_7$	8.74

### 3.7.2 Identificação de FR12

A substância codificada como FR12, foi isolada na forma de um sólido amarelado cristalino (**Materiais e Métodos, p. 63**), com ponto de fusão entre 140 – 147°C, indicando provavelmente uma mistura de substâncias. Para maior purificação da fração os cristais foram lavados com clorofórmio. A CCD desta substância (Hex/Ac 7:3), mostrou após revelação com vanilina sulfúrica, uma coloração lilás característica de triterpenos ou esteróides (MATTOS,1997)

O espectro de absorção na região do infravermelho (**Espectro 1, p. 97**) apresentou uma banda larga em  $3424\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação axial de O-H e sobreposição de várias bandas na região de  $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$  devido a deformação axial de C-H de sistema saturado; em  $1642\text{ cm}^{-1}$  uma banda atribuída a deformação axial C = C (SILVERSTEIN, 2000) em  $960\text{ cm}^{-1}$ , bandas indicativas de deformação de ligação de olefinas dissustituídas *trans* e finalmente uma absorção em  $1060\text{ cm}^{-1}$ , de estiramento - C - C - O, identificando hidroxila equatorial de esteróis (GOAD, 1991).

A análise do cromatograma obtido indicou duas substâncias com tempo de retenção em 45.44 e 46.18 min (**Cromatograma 2, p. 98**). A interpretação dos espectros de massas obtidos apresentou para a substância com tempo de retenção 45.44 min, fragmentos característicos do esteróide estigmasterol conforme dados na literatura e em comparação com a biblioteca do aparelho (**Espectro 3, p. 99**).

Para a substância com tempo de retenção 46,18 min o espectro de massas mostrou o íon molecular  $m/z\ 414\ [M^+]$ , compatível com a fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O$ , correspondente ao íon molecular (M) menos 1 hidrogênio (M-1). Os fragmentos foram característicos com o esteróide e  $\beta$ -sitosterol (**Espectro 4, p. 99**) com 49,71 % de área total.

Com base nos resultados obtidos e por comparação com fragmentos característicos, a substância FR 12 é uma mistura de esteróides: estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Composição química da fração FR12 de *V. cayeannensis*

Substancia	íon molecular (m/z)	TR (min)	Fórmula Molecular	Area (%)
<b>ESTERÓIDES</b>				
$\beta$ - Sitosterol	414	46.18	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	49.71
Estigmasterol	412	45.44	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	50.29

Os esteróides são lipídios insaponificáveis. Os óleos e resinas dos vegetais, geralmente apresentam fitosteróis, os quais são encontrados no estado puro ou na forma esterificada ou ainda conjugados como glicosídeos (CARERI & ELVIRI, 2001).

De maneira geral, o fitosterol predominante entre as espécies é  $\beta$  – sitosterol e os menores constituintes são o campesterol, estigmasterol, avenasterol e brassicasterol (CARERI & ELVIRI, 2001).

Os fitosteróis são reconhecidos como uma das substâncias que possuem atividade biológica contra o câncer. Nos animais, o sitosterol é utilizado como antiinflamatório; anti-neoplástico, anti-pirético e modulador da atividade imunológica. Além disso vale a pena citar, que o  $\beta$  – sitosterol ajuda na redução do colesterol existente no plasma dos seres humanos.

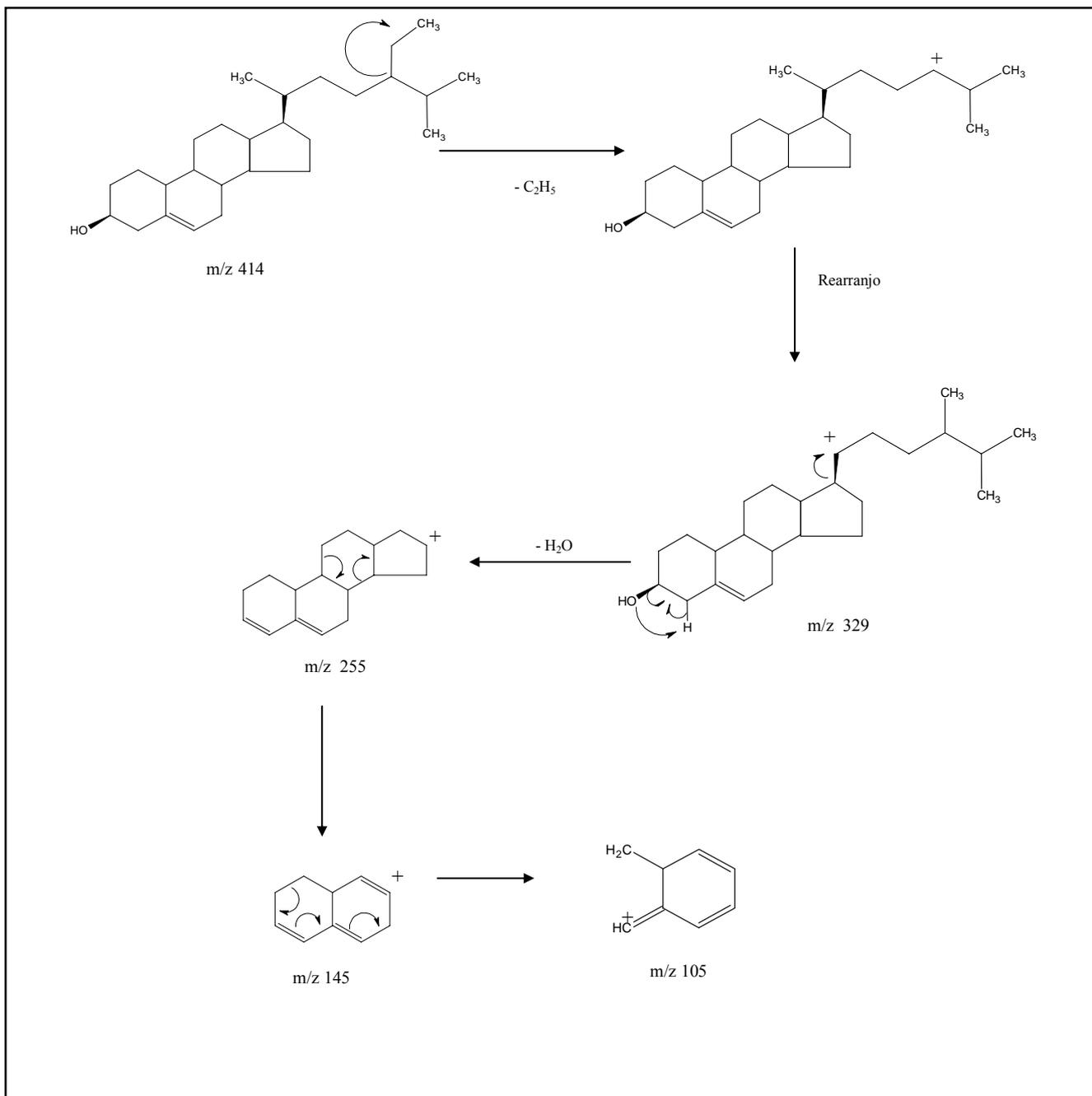
Os fragmentos observados no espectro dos compostos  $\beta$  - Sitosterol e Estigmasterol foram similares.

A seguir são demonstradas as fragmentações dos principais picos do composto  $\beta$  - Sitosterol:

- O espectro de massa do  $\beta$  – sitosterol é caracterizado pelo íon molecular em  $m/z$  414 e um sinal intenso em  $m/z$  396, devido à perda de uma molécula de água [(M- H<sub>2</sub>O)];
- Foi observado um fragmento em  $m/z$  329, relativo à perda do grupo etila (**Figura 20**);
- A molécula registrada no pico  $m/z$  329 sofre rearranjo de metila, seguido da perda da ramificação lateral ligada ao anel pentacíclico e posterior saída de água. O fragmento foi registrado em  $m/z$  255 (**Figura 20**);
- A formação do pico em  $m/z$  145 é devido a um processo de reação semelhante a uma reação *retro* – Diels – Alder (SILVERSTEIN, 2000) (**Figura 20**);
- Outros sinais observados são os  $m/z$  381, 357, 129; originados pelos fragmentos [(M-H<sub>2</sub>O+CH<sub>3</sub>)]; [(M-C1, C3+H<sub>2</sub>O)] e [(C1, C3 + H<sub>2</sub>O)], respectivamente. Todos estes sinais destacados pela literatura (CARERI & ELVIRI, 2001) puderam ser observados no espectro 4 de massas, em anexo.

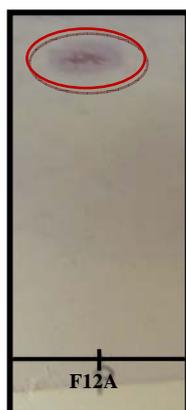
### 3.7.3 FH 12A

A fração codificada como FH12A oriunda da fração EHC3\_25/13\_14 (**Materiais de Métodos, p. 62**) foi analisada por CCD, espectroscopia de infravermelho (IV), espectrometria de RMN de H<sup>1</sup>, C<sup>13</sup>,DEPT,COSY,gHMBC,gHSQC.



**FIGURA 20.** Proposta de fragmentação de  $\beta$  – sitosterol .

A substância foi isolada na forma de um sólido branco em agulhas, com ponto de fusão na faixa 266,0 – 271,0°C. A análise de FH 12A por CCD – gel de sílica, utilizando como eluente a mistura de solventes Hex/Ac 7:3, apresentou teste positivo ao reagente de Lieberman Burchard, com coloração violácea (**Figura 21**) característico de triterpenos pentacíclicos (MATTOS, 1998).



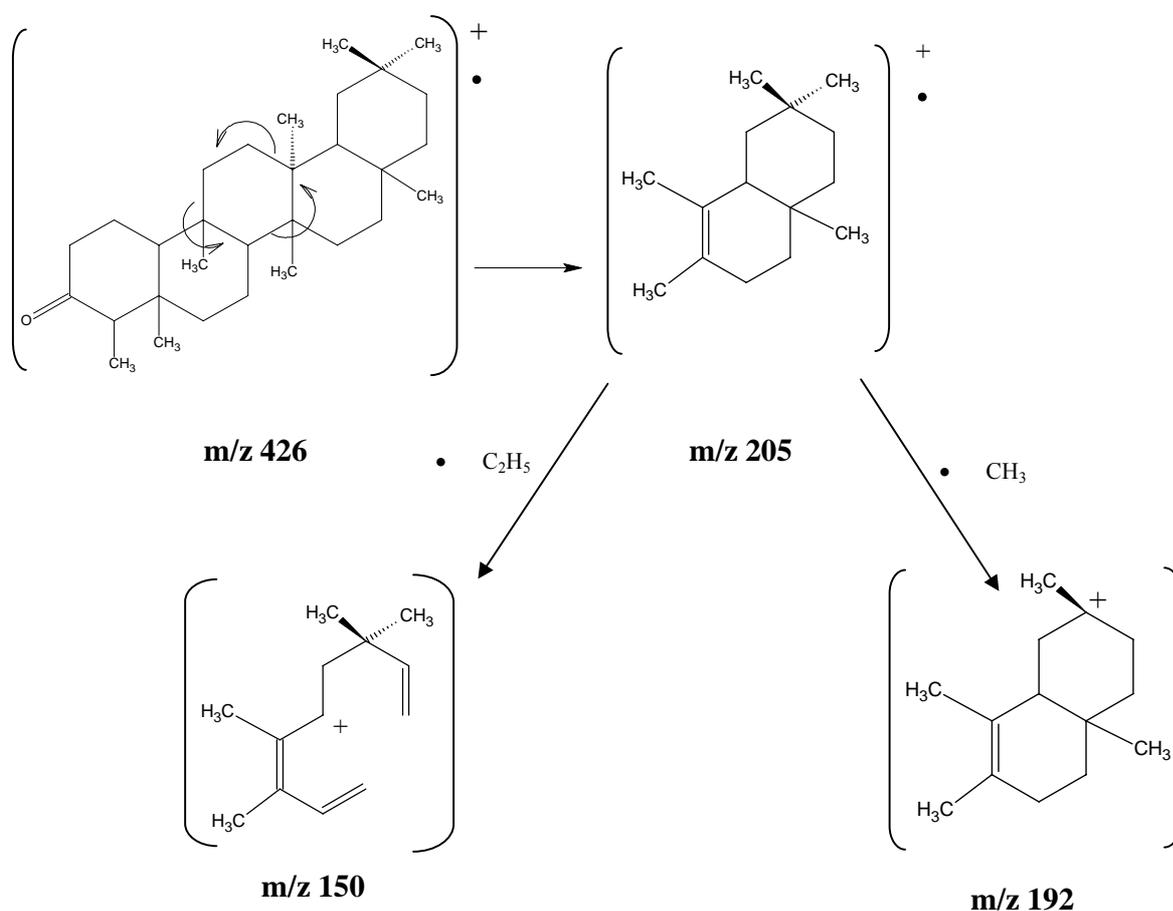
**FIGURA 21.** Cromatografia em camada delgada (CCD) de fase estacionária normal, da fração FH12A revelada com Lieberman Burchard. Fase móvel: Hexano / Acetato 7:3.

O espectro no infravermelho (**Espectro 2, p. 97**) apresentou banda em  $1720\text{ cm}^{-1}$  relativa a estiramento da ligação C=O de cetona. As bandas em  $1478\text{ cm}^{-1}$  e  $1392\text{ cm}^{-1}$ , foram atribuídas à deformação axial de ligações C-H alifático.(SILVERSTEIN, 2000).

A análise do cromatograma (**Cromatograma 3, p. 100**) registrou apenas um pico com íon molecular  $m/z$  426 (M-1) e tempo de retenção, 49.29 min, sugerindo a presença de um único constituinte, compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ . O espectro de massas (**Espectro 5, p. 101**) apresentou, entre outros fragmentos, o fragmento  $m/z$  69 ( $M^+-357$ ) referente à clivagem na ligação  $\beta$  ao anel da carbonila, com formação de um fragmento característico  $\text{R}-\text{C}\equiv\text{O}^+$ , levando ao pico base  $m/z$  69 (100 %), proveniente do rearranjo

de McLafferty.. Os demais fragmentos do espectro de massa observados foram característicos de triterpenos da série dos fridelanos (**Figura 22**).

Os triterpenos pentacíclicos são componentes minoritários em organismos vivos, e são definidos como metabólicos secundários. Os mesmos são encontrados nas plantas, onde ocupam um papel fundamental na defesa de organismos vivos contra agentes externos, tais como: micróbios, fungos e raio UV (JACOB & DISNAR, 2005).



**FIGURA 22.** Proposta de fragmentação de Fridelina.

O espectro de RMN <sup>13</sup>C (**Espectro 6, p. 102**) mostrou a presença de 30 sinais, incluindo 8 CH<sub>3</sub> (**Espectro 7, p. 103**), 11 CH<sub>2</sub>, 4 CH e 7 carbonos quaternários, cujo valores

obtido pela técnica DEPT ( $\theta = 135^\circ$  e  $90^\circ$ ) foram listados na tabela 5 (**p. 80**). A presença de 7 sinais de carbonos quaternários em  $\delta$  28.16,  $\delta$  30.00,  $\delta$  37.45,  $\delta$  38.30,  $\delta$  39.70,  $\delta$  42.14 e  $\delta$  213.9 sugerem que a substância possui esqueleto friedelano (KLASS *et al.*, 1992). Este último sinal indica a presença de um carbono carbonílico.

No **Espectro 8, p. 104** estão identificados os espectros de DEPT 135 e 90 que permitem distinguir entre os grupos  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$ . Os picos para cima de DEPT 135 mostram os grupos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}$ , os picos de DEPT 90 mostram o grupo de  $\text{CH}$ , aqueles não identificados no DEPT 90 refere-se aos grupos quaternários.

A análise do espectro de hidrogênio em solvente de clorofórmio deuterado de FH12A permitiu as seguintes observações:

- Foram observados a presença de oito sinais de metilas atribuídas aos deslocamentos entre  $\delta$  0.73 a 1.18, sendo sete ligadas a carbonos quaternários e uma ligada ao carbono terciário (Espectro em expansão – **Espectro 9, p. 105**).

- Um sinal simples em 0.72 ppm, cuja integração mostrou a presença de 3H, atribuída a um sinal metila.

- Um sinal simples em  $\delta = 0.95$  e dois sinais de simpletos em  $\delta = 1.01$  e  $\delta = 1.00$  ( $J = 4,0$  Hz) em frequências mais altas (desblindados). Foi identificado presença de 3H para cada sinal integrado.

- Um duplete em 0.88 ( $J = 6,5$  Hz) sugeriu a presença de uma metila ligada ao carbono  $\beta$  do anel pentacíclico friedelano. Este sinal apresentou acoplamento com um sinal de quarteto em 2.24 ( $J = 6,5$  Hz).

- Observou-se ainda, um sinal simples em 0.73 (3H) (**Espectro 9, p. 105**), correspondente ao hidrogênio metila.

- Em  $\delta$  2.39 ( $J = 13.7, 5.0$  e  $2.0$  Hz) o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou um duplo duplete duplo acoplado com outro sinal duplo duplete duplo em  $\delta$  2.29, referentes ao acoplamento geminal de H – equatorial e H – axial (SILVERSTEIN, 2000), pela integração confirma-se a presença de carbonos metílicos (2H) (**Espectro 10, p. 106**). Estes deslocamentos químicos são característicos do H ligado ao carbono 2 da Fridelina (KLASS *et al.*, 1992).

O sinal em  $\delta$  2.29, deveria ocorrer sinais de duplo-duplete-duplo, porém a difícil visualização ocorreu devido à sobreposição com os sinais em  $\delta$  2.24 (DUARTE, 2000).

- O sinal de quarteto em  $\delta$  2.24 ( $J = 6,5$  Hz) apresentou pela integração a presença de um único hidrogênio, com possível acoplamento com um grupo metila (3H) (**Espectro 11, p. 107**). Por comparação com dados da literatura o sinal de quarteto refere-se ao H-4 acoplado com H – 23, do composto fridelina (**Tabela 5, p. 80**). Em  $\delta$  1,68 foi verificado sinais de duplo-duplete referentes ao acoplamento vicinal axial – axial (**Espectro 12, p. 108**) (SILVERSTEIN p. 173, 2000).

A determinação estrutural da substância FH12A foi confirmada através da análise dos mapas de contornos de HSQC e HMBC atribuindo-se as correlações referentes ao deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios.

No mapa de contorno HSQC (**Espectro 13, p. 109**) foram observadas todas as correlações dos sinais de hidrogênio metílicos com seus respectivos carbonos.

No mapa de contornos do HMBC da amostra FH12A foram observadas as correlações dos hidrogênios metílicos com seus respectivos carbonos vizinhos.

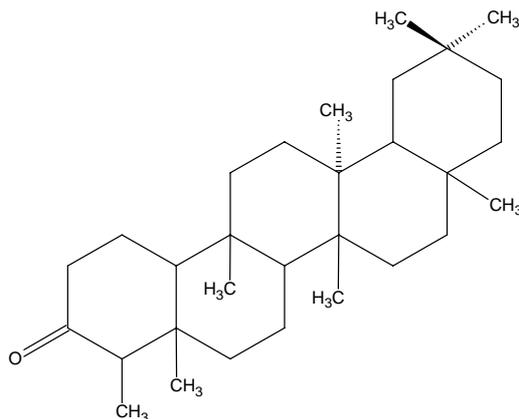
O sinal em  $\delta$  **2,24** (H-4) apresentou correlação com o sinal da carbonila em  $\delta$  213,9 (C-3) ( $J^2$ ) e também com os sinais de carbono em  $\delta$  42,1 (C-5) ( $J^2$ );  $\delta$  14,6 (C-24) ( $J^3$ ) e  $\delta$  6,8 (C-23) ( $J^2$ ) (**Espectro 14, p. 110**). O sinal metílico em  $\delta$  **0,88** (H-23) apresentou correlação com os sinais de carbono em  $\delta$  213,9 (C-3) ( $J^3$ );  $\delta$  42,1 (C-5) ( $J^3$ ) e  $\delta$  58,2 (C-4) ( $J^2$ ) (**Espectro 15, p. 110**).

O sinal dos hidrogênios metílicos em  $\delta$  **1.18** (H-28) mostrou correlação com os sinais de carbonos em  $\delta$  **42.8** (C-18) ( $J^3$ ), **39.2** (C-22) ( $J^3$ ), **36.0** (C-16) ( $J^3$ ) e **30.0** (C-17) ( $J^2$ ) (**Espectro 16, p. 111**).

O sinal dos hidrogênios metílicos em  $\delta$  **0,95** (H-30) mostrou correlação com os sinais de carbonos em  $\delta$  **35.3** (C-19) ( $J^3$ ), **28.1** (C-20) ( $J^2$ ) e **32.4** (C-21) ( $J^3$ ) (**Espectro 17, p. 111**).

Por meio dos deslocamentos químicos supracitados, unidas com as outras informações de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HSQC, confirmam a estrutura da Fridelina (**Figura 23**) como sendo a substância isolada.

A Fridelina tem sido extraída de outras plantas e apresentado efeitos biológicos promissores. Há relatos que atribuem à fridelina atividades antiúlcera estomacais e contra gastrite (CORDEIRO *et al.*, 1999; RAMESH *et al.*, 2001; RAMESH *et al.*, 2002). A fridelina possui ainda, efeito antiinflamatório quando administrado via tópica, inclusive para inflamações oculares (YAO; CHIO; 1993; SHIMIZU; TOMOO, 1994; DI STASI *et al.*, 1999).



**FIGURA 23.** Estrutura de Fridelina

### 3.7.3.1 Ressonância Magnética Nuclear 2D, COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de Fridelina

O espectro de COSY (**Espectro 18, p. 112**) foi realizado com o objetivo de determinar corretamente a posição e a vizinhança dos hidrogênios presentes na estrutura do triterpeno. Ao analisar o espectro foi possível identificar alguns sistemas de spins. Um dos sistemas de spins apresentou uma relação axial-equatorial entre os prótons H-1 e H-1, outra relação equatorial – axial entre os prótons H-2 e H-2 (**Espectro 19, p. 113**).

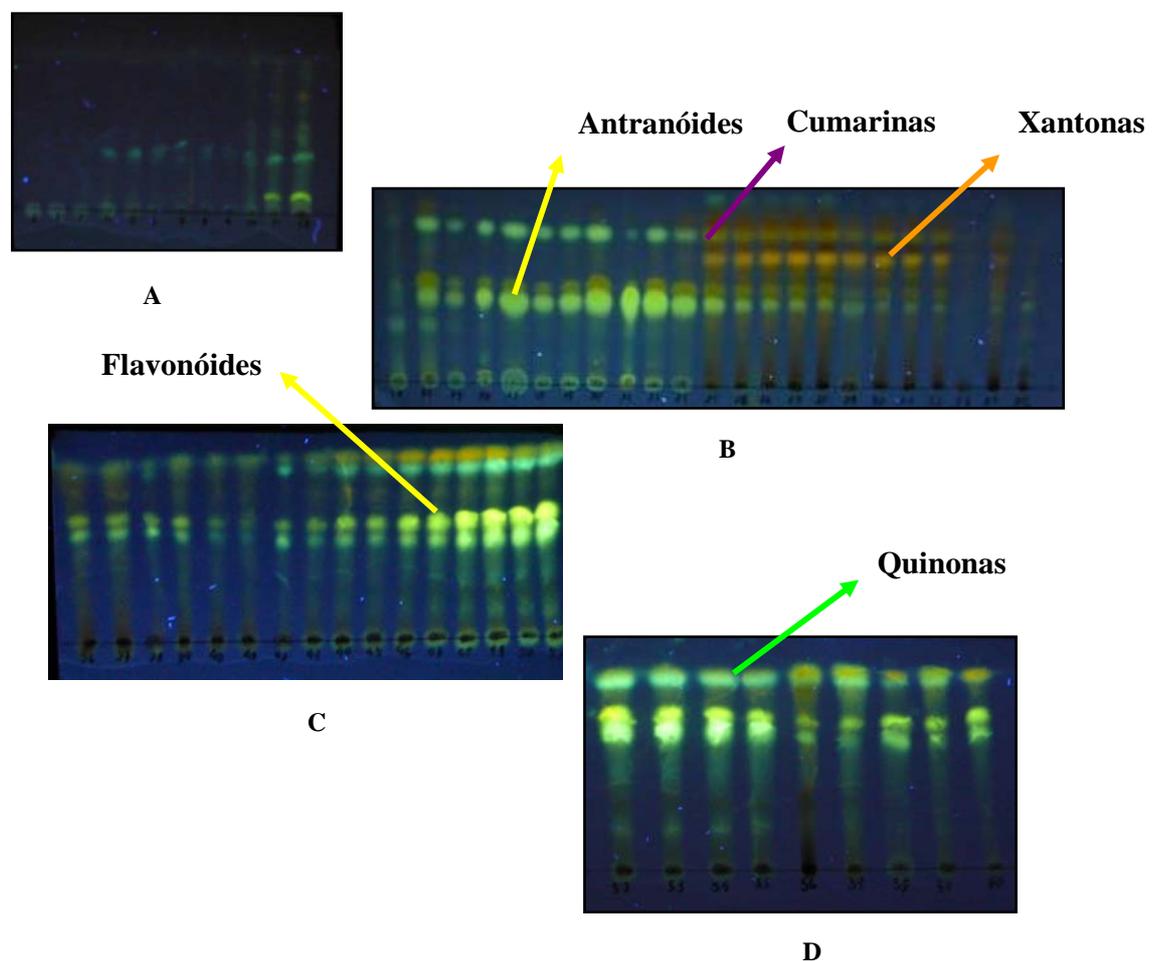
**TABELA 5.** Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da amostra FH12A com os da literatura.

KLASS <i>et al.</i> , (1992)			Fração FH12A ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz)	
C	$\delta(^{13}\text{C})$	$\delta(^1\text{H})$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	22,27	1,96	22,28	1,69 (1H, <i>m</i> , Hax) 1,97 (1H, <i>dp</i> , Heq)
2	41,51	2,39 2,28	41,52	2,29 (1H, <i>ddd</i> , Hax) 2,40 (1H, <i>m</i> , Heq)
3	213,17	-----	213,9	-----
4	58,19	2,25	58,23	2,24 (1H, <i>q</i> , H-4)
5	42,13	-----	42,14	-----
6	41,27	1,75; 1,28	41,30	1,75 (1H, <i>dd</i> , Heq); 1,27 (1H, <i>m</i> , Hax)
7	18,23	1,49; 1,37	18,24	
8	53,08	1,39	53,11	
9	37,42	-----	37,45	-----
10	59,45	1,53	59,49	1,55
11	35,61	1,46; 1,26	35,63	1,38 (1H; <i>m</i> )
12	30,50	1,34; 1,34	30,50	1,35 (1H; <i>m</i> )
13	39,68	-----	39,70	-----
14	38,28	-----	38,30	-----
15	32,76	1,46; 1,27	32,78	
16	63,00	1,57; 1,36	36,01	
17	29,98	-----	30,00	-----
18	42,77	1,56	42,81	
19	35,32	1,38; 1,20	35,35	1,37 (1H; <i>m</i> )
20	28,16	-----	28,16	-----
21	32,40	1,51; 1,30	32,43	1,49 (1H; <i>m</i> )
22	39,24	1,50; 0,94	39,25	1,48 (1H; <i>m</i> )
23	6,83	0,87	6,81	0,88 (3H, <i>d</i> , $J = 6,5$ Hz)
24	14,65	0,71	14,65	0,73 (3H, <i>s</i> )
25	17,94	0,86	17,94	0,87 (3H, <i>s</i> )
26	20,26	1,00	20,25	1,01 (3H, <i>s</i> )
27	18,67	1,05	18,65	1,05 (3H, <i>s</i> )
28	32,09	1,17	32,09	1,18 (3H, <i>s</i> )
29	31,79	1,00	31,77	1,00 (3H, <i>s</i> )
30	35,03	0,95	35,01	0,95 (3H, <i>s</i> )

### 3.8 Identificação dos constituintes químicos presentes no extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis*.

#### 3.8.1 Análise por cromatografia em camada fina das frações oriundas do ECFVc.

Após o fracionamento do ECFVc em Sephadex, obteve-se **60** frações. As quais foram avaliadas em CCD (**Figura 24**) e reveladas com NPPEG. Aquelas frações que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas.



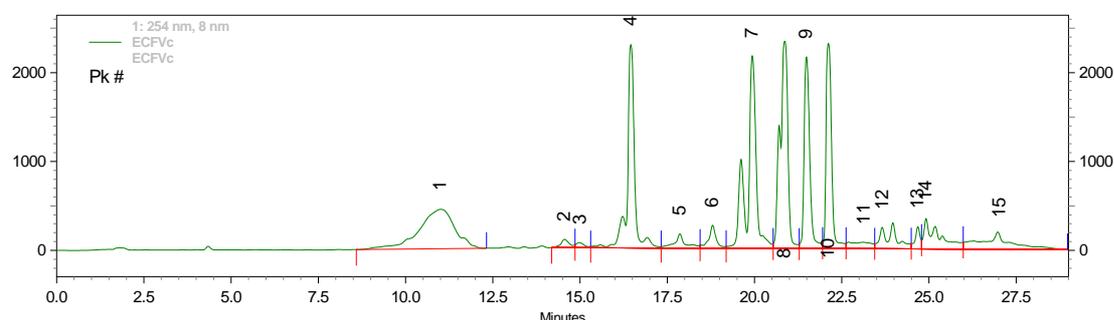
**FIGURA 24.** Cromatografia em camada delgada de sílica de fase normal, das frações oriundas da cromatografia em coluna (CC) do ECFVc.

O perfil cromatográfico obtido por CCD indicou a presença de: cumarinas, identificadas pela coloração roxa (Simões *et al.*, 1999), xantonas cuja absorção da luz na região de 400 nm é responsável pela coloração alaranjada; quinonas identificadas pela coloração amarelada ou esverdeada intensa (Simões *et al.*, 1999). A coloração amarelada também é indicativo de flavonóides e antranóides (WAGNER, 1996).

### 3.8.2 Análise por CLAE dos frutos de *V. cayennensis*

O extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis* foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo equipado com detector de arranjo de diodo. Cerca de 1 mg do ECFVc foi solubilizado em metanol e analisado.

A figura 25 apresenta o perfil cromatográfico do ECFVc. A figura 26 apresenta os espectros na luz ultravioleta dos compostos com tempo de retenção 11,01 min, 14,88 min, 16,46 min, 19,31 min, 23,67min e 24,91 minutos, os espectros apresentaram absorções características no UV de substâncias fenólicas, a maior classe de metabólicos foram reconhecidos como vismiona, antraquinona, benzofenona e derivados de xantonas com base nas absorções no UV preculiares as respectivas classes metabólicas.



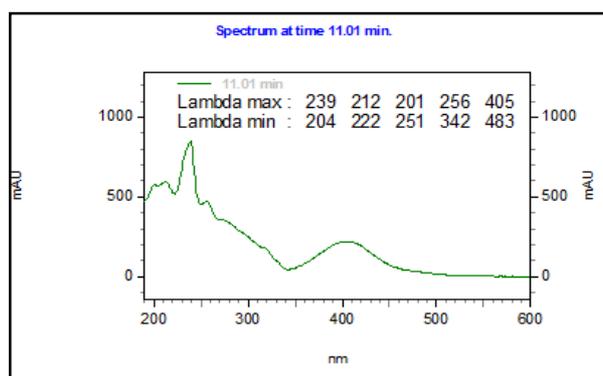
**FIGURA 25.** Cromatograma dos íons totais presentes ECFVc

O sinal em 11,01 minutos apresentou um espectro no UV que mostra máximos de absorção em 201, 212, 239 e 405 (**espectro 26. A**), em concordância com aqueles obtidos na literatura para algumas vismionas isoladas de *Vismia guineensis* (POLITI *et al.*, 2004). Estas absorções peculiares são devidas ao esqueleto antraceno com um anel não aromático formados através do ácido poli- $\beta$ -cetônico.

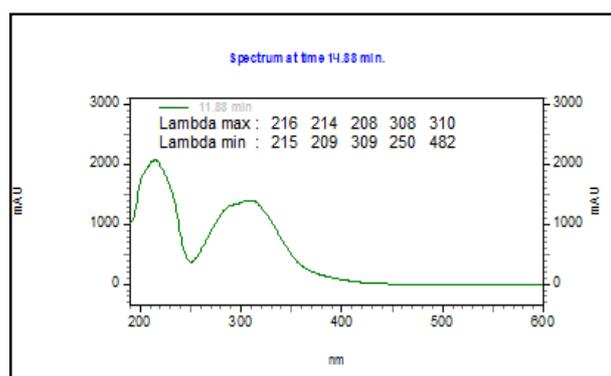
O sinal em 14,88 minutos apresentou um espectro no UV que mostra máximos de absorção em 216 e 306 nm (**espectro 26. B**) sendo provável ser uma benzofenona prenilada (MONACHE *et al.*, 1985).

O sinal em 19,31 minutos (**espectro 26. C**) e 23,67 minutos (**espectro 26. D**) apresentam um espectro no UV semelhantes com quatro máximos de absorções (219, 222, 346 e 406 nm) e (241, 263, 352 e 405 nm), respectivamente, também característicos de cromóforos de vismionas. Estes constituintes são conhecidos serem típicos metabólicos do gênero *Vismia* (MIRAGLIA *et al.*, 1981; BOTTA *et al.*, 1983).

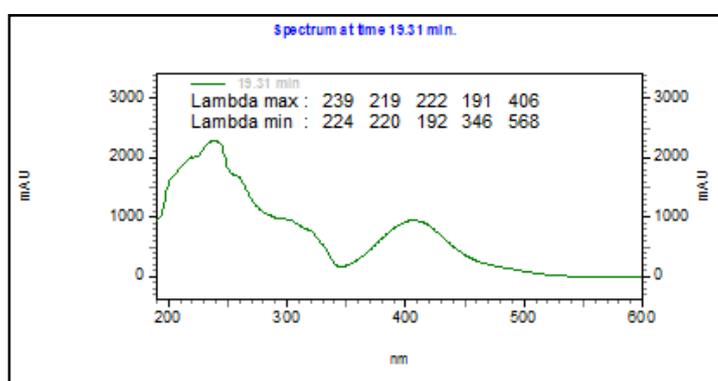
O sinal em 24,68 minutos (**espectro 26. E**) identificou compostos de xantonas pelas características máximas observados no espectro de UV ( $\lambda_{\max}$  226, 275 e 366 nm) (POLITI *et al.*, 2004).



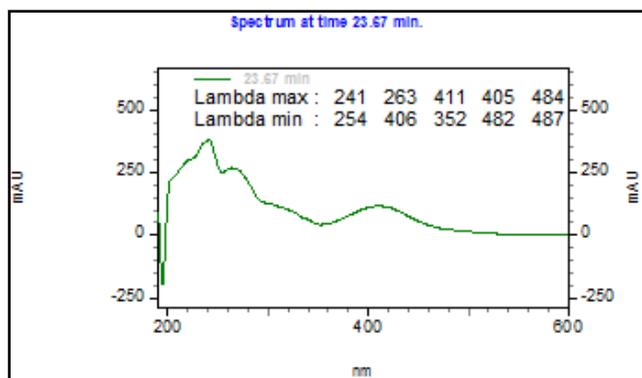
**A**



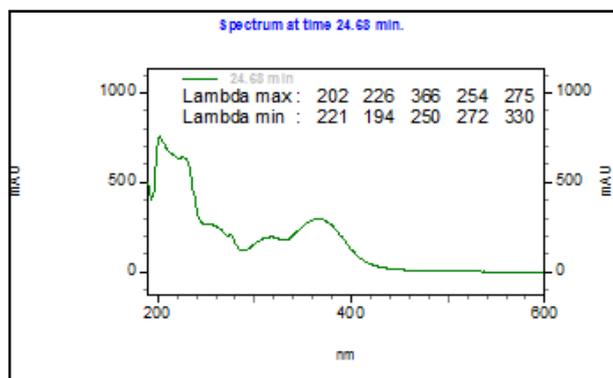
**B**



**C**



**D**



**E**

**FIGURA 26.** Espectros de ultravioleta nos  $T_r$  11,01 min (**A**) – **pico 1**;  $T_r$  14,88 min (**B**) – **pico 2**;  $T_r$  16,46 min (**C**) – **pico 4**;  $T_r$  19,31 min (**D**) – **pico 7**;  $T_r$  23,67 min (**E**) e  $T_r$  24,68 min (**F**) – **pico 13**.

### 3.8.3 Análise por Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas dos frutos de *V. cayennensis*

Os resultados obtidos com as análises do CG/EM e seus respectivos índices de retenção foram organizados na tabela mostrada abaixo, para facilitar a comparação dos compostos químicos existentes na amostra, sendo que os compostos foram identificados utilizando-se o banco de dados da biblioteca WILEY.

A tabela 6, mostra a relação de substâncias identificadas pelo banco de dados da biblioteca, além dos teores observados, o cromatograma (**Cromatograma 4, p. 114**) está inserido nos anexos.

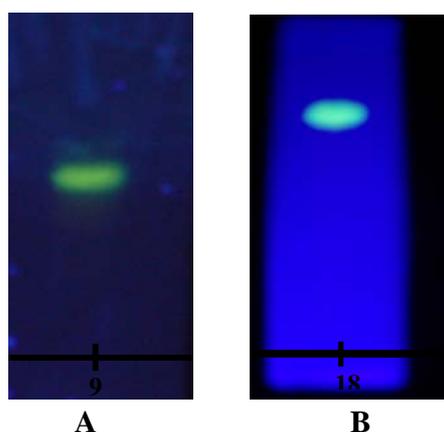
**TABELA 6.** Substâncias identificadas no extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis*.

Substância	Íon molecular (m/z)	TR (min)	Fórmula Molecular	Area (%)
<b>SESQUITERPENOS</b>				
<i>trans</i> -Cariofileno	204	21.13	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	45.85
β – selineno	204	21.97	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	6.74
Óxido cariofileno	220	24.93	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> O	11.71
Óxido humuleno	138	25.52	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> O	2.25
Germacrene B	193	43.98	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	2.40
<b>HIDROCARBONETOS</b>				
<b>ACÍCLICOS</b>				
1,5 – Heptadieno	123	6.80	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	2.27
1,6 Octadieno	138	9.04	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub>	5.32
9 – Octadeceno	338	41.2	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	1.79
Undeca -1,3,5 – triene	321	43.9	C <sub>11</sub> H <sub>21</sub>	2.40

### 3.8.4 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias codificadas como FV 15\_23/ 9a e FV 15\_23/ 18a foram isoladas, na forma de um sólido amarelado, a partir do fracionamento em coluna da fração FV 15\_23, utilizando como fase estacionária C – 18 e fase móvel, Acetonitrila/ água 9:1.

A análise das frações FV 15\_23/ 9a (**Figura 27. A**) e FV 15\_23/ 18a (**Figura 27. B**) por CCD – C<sub>18</sub> mostraram, após revelação com o reagente NP/PEG, uma coloração amarelada fluorescente característica de quinonas, flavonóides e antranóides.



**FIGURA 27.** Avaliação em CCD de fase reversa (RP18) da substância (A) FV 15\_23/ 9a e (B) FV 15\_23/ 18a. Fase móvel: Acetonitrila/ água 9:1.

### 3.8.5 Identificação da substância FV 15\_23/ 9a.

#### 3.8.5.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A substância foi submetida à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao detector no UV com rede de diodos. O cromatograma de íon total obtido revelou a presença de uma única substância (**Cromatograma 5, p. 115**). Os sinais

com máximos de absorção no espectro de UV (**Espectro 20, p. 116**) em 214, 239, 256 e 405 nm levam a especular sobre o isolamento de vismiona (MIRAGLIA *et al.*, 1981; BOTTA *et al.*, 1983).

### 3.8.5.2 Identificação por Espectrometria de Massas e RMN <sup>1</sup>H

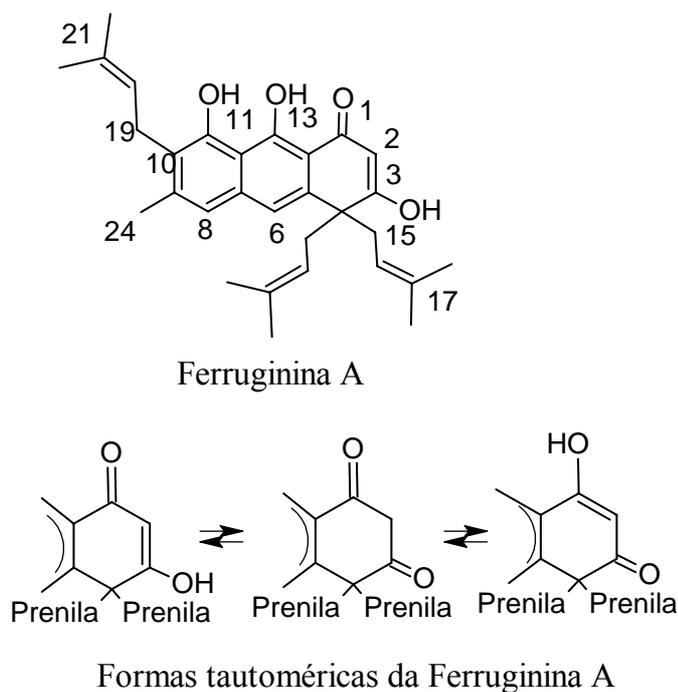
O espectro de massas (**Espectro 22 p. 117**) (ESI, íons negativos) forneceu o íon de m/z igual a 460.4, compatível com a fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>. Foram observados fragmentos em m/z 391.3 e m/z 255.3, relativo à perda de 69 e 207 daltons. Tais fragmentos são relativos à perda de dois grupos prenil, referente à estrutura de compostos pertencentes à classe dos antranóides prenilados (NICOLETTI *et al.*, 1982). Esse grupo é caracterizado por uma mistura 1,4-diidroantraceno com um anel C não aromático e são triprenilados (DELLE MONACHE, 1985).

A partir do espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Espectro 24, p. 118**) em CDCl<sub>3</sub> foi observado os seguintes itens:

- ❖ Divisão de dois sinais em campo baixo ( $\delta$ 16,65 e  $\delta$ 16,02;  $\delta$ 9,90 e  $\delta$ 9,63) devido à quelação dos grupos hidroxila (**Espectro 25 p. 119**),
- ❖ Redução da intensidade do sinal em H-2 ( $\delta$ 5,79) (**Espectro 26 p. 119**) e
- ❖ Aparecimento de um sinal simples em  $\delta$ 3,60 relacionado ao CH<sub>2</sub> da forma dicetônica (**Espectro 26 p. 119**).

Os dados obtidos foram comparados com o da literatura para essa substância (NICOLETTI *et al.*, 1982) permitindo identificar a existência de três formas tautoméricas de uma antranóide prenilado, conhecido como ferruginina A (**Figura 28**) como descrito na literatura (NICOLETTI *et al.*, 1982).

Adicionalmente, no espectro de RMN  $^1\text{H}$  para as duas principais formas tautoméricas puderam ser evidenciados os hidrogênios listados na tabela abaixo. Devido a pouca quantidade isolada e a transformação da molécula em outras formas de ressonância apenas os espectros de hidrogênio e massas foram realizados.



**FIGURA 28:** Ferruginina A e as suas formas tautoméricas

**TABELA 7.** Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  da amostra FV 15\_23/ 9a com os da literatura.

	Dados do espectro em $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ )	Dados da literatura em Acetona- $\text{d}_6$ ( $\delta$ )
H16	4,73, t, J = 6,7Hz*	5,10, t, J = 7Hz
H15	4,63, tl	4,65, t, J = 7Hz
$\text{CH}_2$ (tautômero)	3,60, sl*	3,47,d

4 CH <sub>3</sub>	1,53, sl	1,43, sl
CH <sub>3</sub>	1,49, s	1,80, s
CH <sub>3</sub>	1,47, s	1,67, s
Hidrogênios aromáticos e olefinicos		
10	7,19, s	7,26, s
6	7,01, s	7,02, s
2	6,71, s	5,77, s

### 3.8.6 Identificação da substância FV 15\_23/18a.

#### 3.8.6.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectrometria de Massas

Os dados do espectro UV (**Espectro 21, p. 116**) indicaram a classe de antranóides para FV 15\_23/18a. O espectro de massas (**Espectro 23, p. 117**), ESI - íon negativo forneceu um fragmento de 392,4 Daltons (M-1) compatível a fórmula molecular C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>. Foram observados fragmentos em m/z 322.4 e m/z 253.4, referente à perda de grupo prenil, conforme mencionado anteriormente.

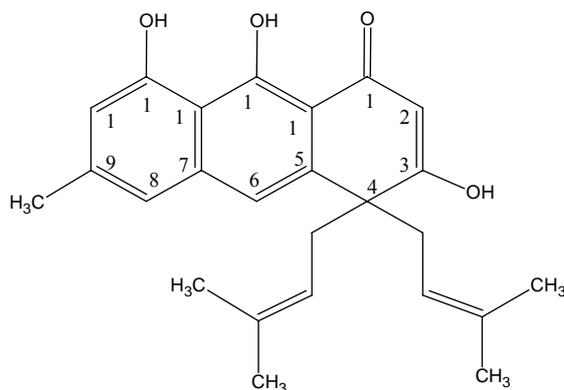
A análise do espectro de hidrogênio (**Espectro 27, p. 120**) em solvente de clorofórmio deuterado de FV 15\_23/ 18a permitiu as seguintes observações:

- Foram observados a presença de 3 sinais simples entre os deslocamentos  $\delta$  10.03 a 15.77 ppm (**Espectro 28, p. 121**). Os deslocamentos químicos em campo baixo parecem indicar a presença de hidroxilas fenólicas. O sinal de simpleto em  $\delta_H = 11.93$  é típico de hidroxila aromática quelada à carbonila (MOREIRA *et al*, 2006).

• O conjunto de três duplo duplete (**Espectro 29, p. 121**), todos integrando um hidrogênio, em  $\delta_H = 6.99, 7.04$  e  $7.14$  é característico de hidrogênios aromáticos com padrões de acoplamento do tipo *orto-meta*, *orto-orto* e *orto - meta* (MOREIRA *et al*, 2006).

Os dados de RMN  $^1H$  (**Espectro 27, p. 120**) e RMN  $^{13}C$  (**Espectro 30, p. 122**) listados na tabela abaixo quando comparados com os da literatura (DELLE MONACHE *et al.*, 1980) confirmaram a caracterização da vismina (**Figura 29**), substância que pertence ao grupo das ferrugininas da classe de antranóides prenilados.

Os dados de RMN  $^{13}C$  foram atribuídos de acordo com os presentes na literatura para vismina (NICOLETTI *et al.*, 1982) (**TABELA 8**).



**FIGURA 29.** Estrutura da substância FV 15\_23 / 18a - Vismina

**TABELA 8.** Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  da amostra FV 15\_23/ 18a com os da literatura e RMN  $^{13}\text{C}$ .

RMN $^1\text{H}$			RMN $^{13}\text{C}$	
H	Dados do espectro em $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ )	Dados da literatura em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}^*$ e Acetona- $\text{d}_6$ ( $\delta$ )	C	Dados do espectro em $\text{CDCl}_3$ ( $\delta$ )
2	5,35, sl	5,80, sl	1 C	191,1
6	7,01, sl	7,0, sl	2CH	131,7
8	6,71, sl	6,60, sl	3C	161,5
10	7,19, sl	7,35, sl	4C	50,2
15	3,2-2,6, m	3,3-2,7, m*	5C	136,4
16 (16')	5,10, tl	4,67, t	6CH	117,8
18 (18')	1,59, sl	1,43, sl	7C	118,8
19 (19')	1,59, sl	1,43, sl	8CH	114,5
20	2,44, sl	2,31, s*	9C	122,5
OH	9,72, s	9,80, s	10CH	118,2
OH	15,64, s	16,10, s	11C	139,3
			12C	110,9
			13C	153,9
			14C	115,8
			15CH <sub>2</sub>	40,6
			15' CH <sub>2</sub>	40,6
			16CH	125,2
			16' CH	125,2
			17C	136,4
			17' C	136,4
			18 CH <sub>3</sub>	25,0
			18' CH <sub>3</sub>	25,0
			19 CH <sub>3</sub>	25,0
			19' CH <sub>3</sub>	25,0
			20 CH <sub>3</sub>	22,7

### 3.9 IDENTIFICAÇÕES DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS POR CG/EM DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *P.DUCKEI* E *P.DEMERARANUM*.

#### 3.9.1 Extração dos óleos essenciais das folhas de *P. duckei* e *P. demeraranum*

Os óleos essenciais de *Piper duckei* e *Piper demeraranum* foram extraídos das folhas (400 g) através da técnica de hidrodestilação, utilizando aparelho do tipo Clevenger durante quatro horas. Os óleos foram coletados em pequena quantidade de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e armazenados em vials mantendo-se sob refrigeração de - 15°C até análise por CG/EM e testes biológicos. Foram obtidos 500 mg de *P. duckei* e 600 mg de *P. demeraranum*.

Os constituintes foram identificados pelos índices de retenção calculados através da co-injeção de uma mistura de *n* – alcanos e comparação dos seus espectros de massas com a literatura (ADAMS, 2001).

Os óleos essenciais das folhas de *P. duckei* e *P. demeraranum*, obtidos através da técnica de hidrodestilação, foram analisados por CG/EM e os cromatogramas estão apresentados nas **páginas 123 e 124**, respectivamente. Os óleos essenciais são largamente estudados e no gênero *Piper* tem-se vários relatos na literatura, mas para as duas espécies em estudo, este é o primeiro trabalho que descreve a composição dos óleos.

Observa-se no cromatograma dos óleos das folhas de *P. demerarnum* a presença de monoterpenos (acíclico e monocíclico) e sesquiterpenos (acíclico, monocíclico e bicíclico) em teores distintos. Nos óleos essenciais de *Piper demeraranum*. Um total de 13 compostos diferentes foi identificado. Os monoterpenos majoritários são β-elemeno (34.50%) e dl-

limoneno (20.56%), componentes majoritários, enquanto que os sesquiterpenos são Germacreno B (9.11%), Germacreno D (5.36%) e  $\beta$ -Selineno (5.20%)

Os óleos essenciais de *Piper duckei* também foram caracterizados pela alta percentagem de monoterpenos e sesquiterpenos, mas eles mostraram algumas diferenças em seus constituintes principais em relação ao óleo essencial de *Piper demeraranum*. Os componentes majoritários foram: Trans-cariofileno (29,62%), Germacrene D (15,92%) e 1H-Cicloprop[e]azuleno (19,20%) (**Tabela 9**).

O índice de Kovat foi determinado em programa de computador levando em consideração a série homóloga dos carbonos lineares de C-7 a C-40, de acordo com a seguinte fórmula:

$$I = 100 \times (Z_{\text{menor}}) + (100 \times (TA - Tr_{\text{menor}}) / Tr_{\text{maior}} - Tr_{\text{menor}})$$

Onde,

TA = corresponde ao tempo de retenção das substâncias presentes na amostra analisada;

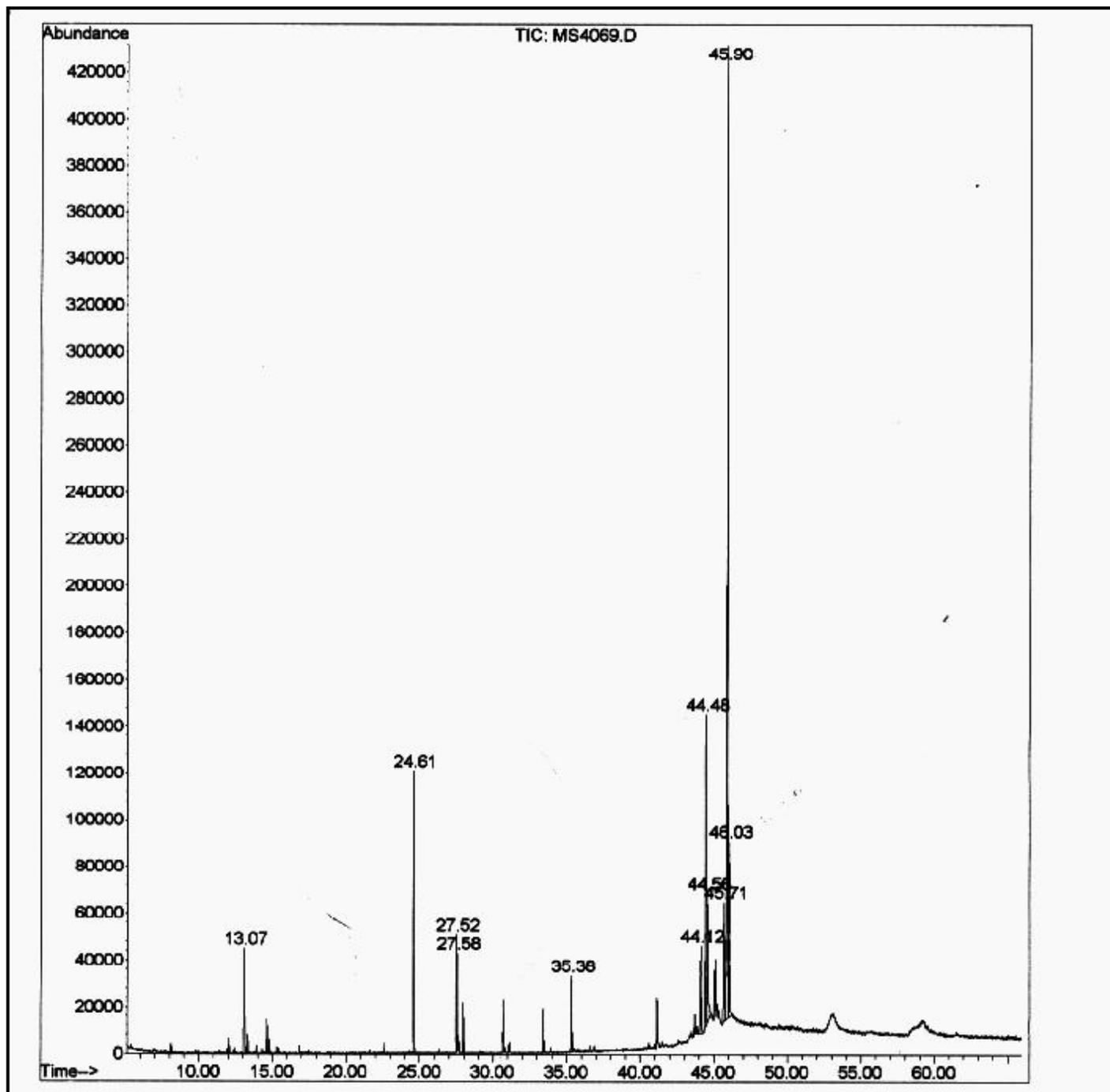
$Tr_{\text{menor}}$  e  $Tr_{\text{maior}}$  = correspondem aos tempos de retenção dos padrões de hidrocarbonetos lineares de cadeia normal (C-7 a C-40), sendo que TA é intermediário ao  $Tr_{\text{menor}}$  e  $Tr_{\text{maior}}$ .

**Tabela 9.** Composição em porcentagem dos óleos essenciais das folhas de *P. demeraranum* e *P. duckei*.

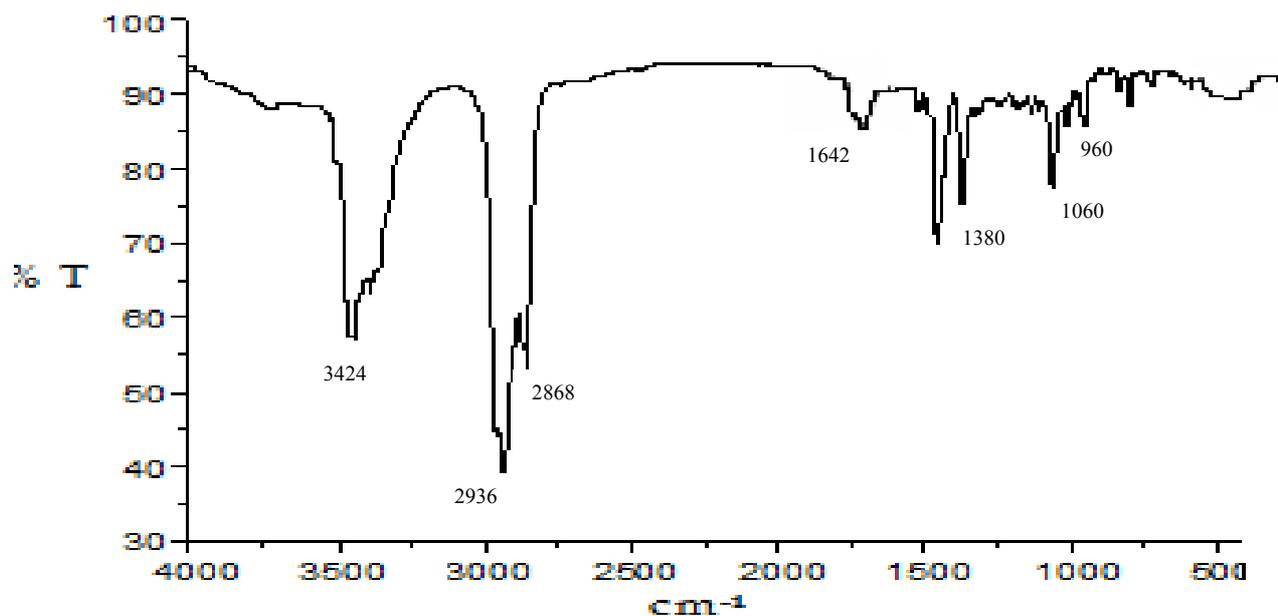
<b>Componentes</b>	<b>IR<sup>a</sup> Lit.</b>	<b>IR Cal. <i>Piper duckei</i></b>	<b>Essential oil (%)</b>	<b>IR Cal. <i>Piper demeraranum</i></b>	<b>Essential oil (%)</b>
<i>Hydrocarbonetos Monoterpenos</i>					
$\alpha$ -Pineno	939	-	-	1008	4.14
$\beta$ -Pineno	980	-	-	1033	7.07
$\alpha$ -Terpinelono	1088	-	-	1359	1.24
dl-Limoneno	1031	-	-	1087	20.56
1,8 – Cineole	1033	1089	6.27	-	-
<i>Hydrocarbonetos Sesquiterpenos</i>					
$\alpha$ -Cubebeno	1351	-	-	-	-
$\alpha$ -Copaeno	1376	1388	1.66	-	-
$\alpha$ -Copaeno	1376	1445	1.14	-	-
$\beta$ -Cubebeno	1390	1483	0.59	-	-
$\beta$ -Elemeno	1391	-	-	1370	34.50
$\beta$ -Elemeno	1391	-	-	1382	1.21
<i>Trans</i> -Cariofileno	1418	1413	29.62	1388	6.19
$\alpha$ -humuleno	1454	1433	2.85	-	-
Germacrene-D	1480	1457	15.92	1434	5.36
Ledeno	-	1466	1.68	-	-
$\beta$ -Selineno	1485	-	-	1445	5.20
1H-Cycloprop[e]azuleno	1491	1587	19.20	-	-
Biciclogermacrene	1494	1470	5.36	-	-
$\alpha$ -Muuroloeno	1499	1473	1.25	-	-
$\Delta$ -Cadineno	1524	1486	4.22	1479	1.30
Germacrene B	1556	-	-	1470	9.11
Germacrene B	1556	-	-	1516	1.11
Guanosine	-	-	-	1550	0.87
Calareno	-	1553	1.48	-	-

O índice de retenção, introduzido por Kováts, se baseia na comparação do tempo de retenção na coluna cromatográfica de uma série homóloga de n-alcenos, utilizando-se sistema isotérmico.

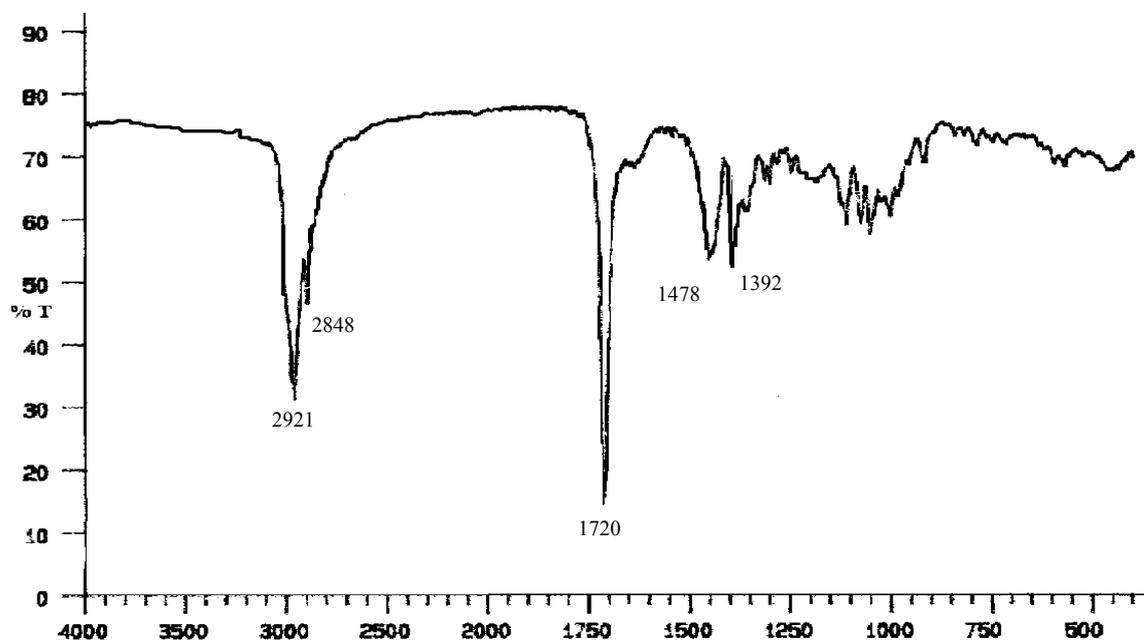
## **4. ESPECTROS**



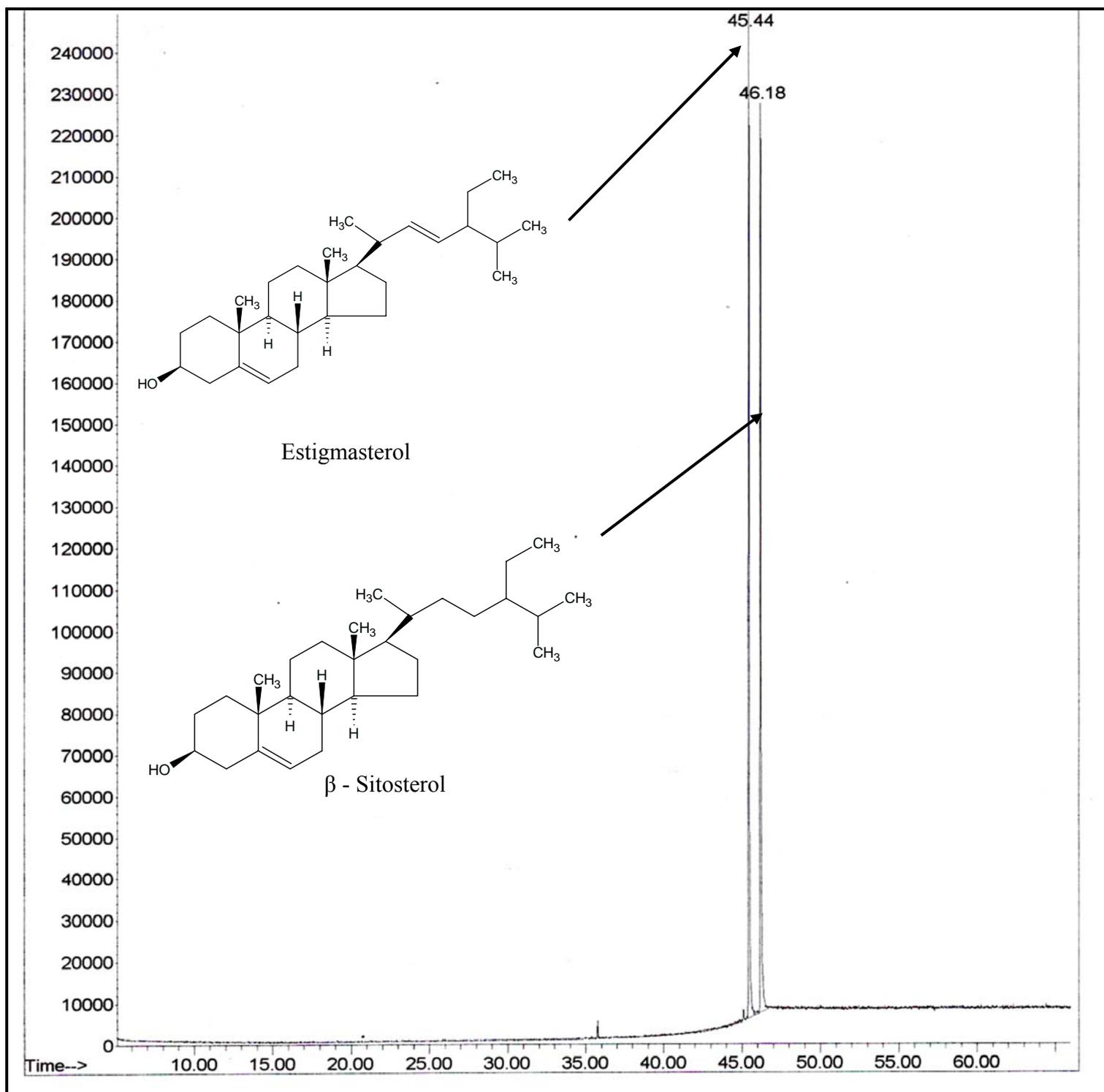
**CROMATOGRAMA 1.** Cromatograma dos íons totais presentes no extrato hexânico das cascas de *V. cayeannensis*



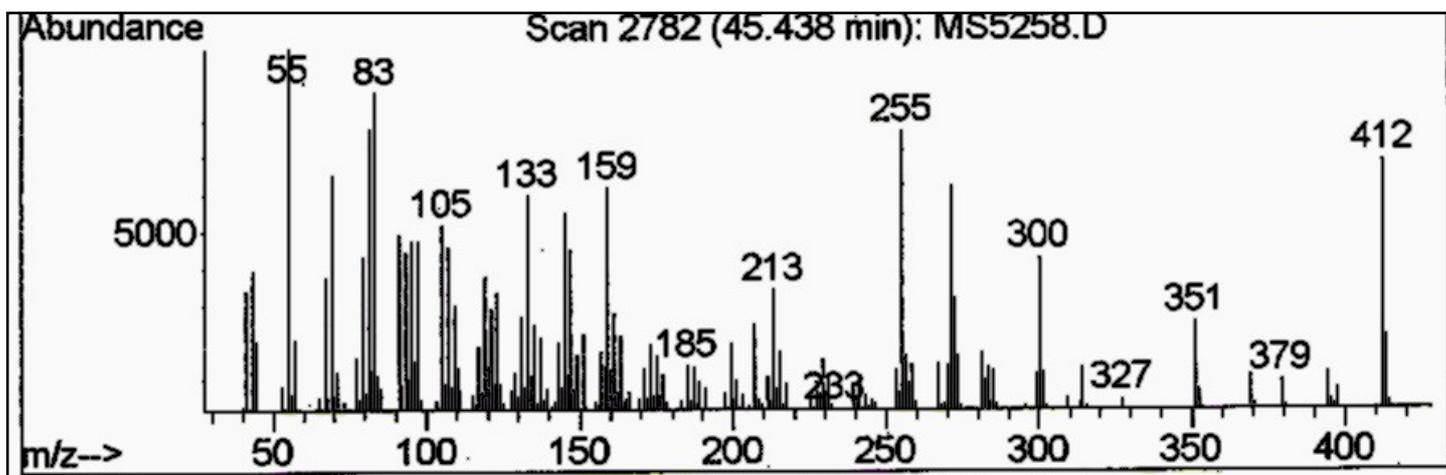
ESPECTRO 1. Infravermelho da substância FR12 em pastilha de KBr



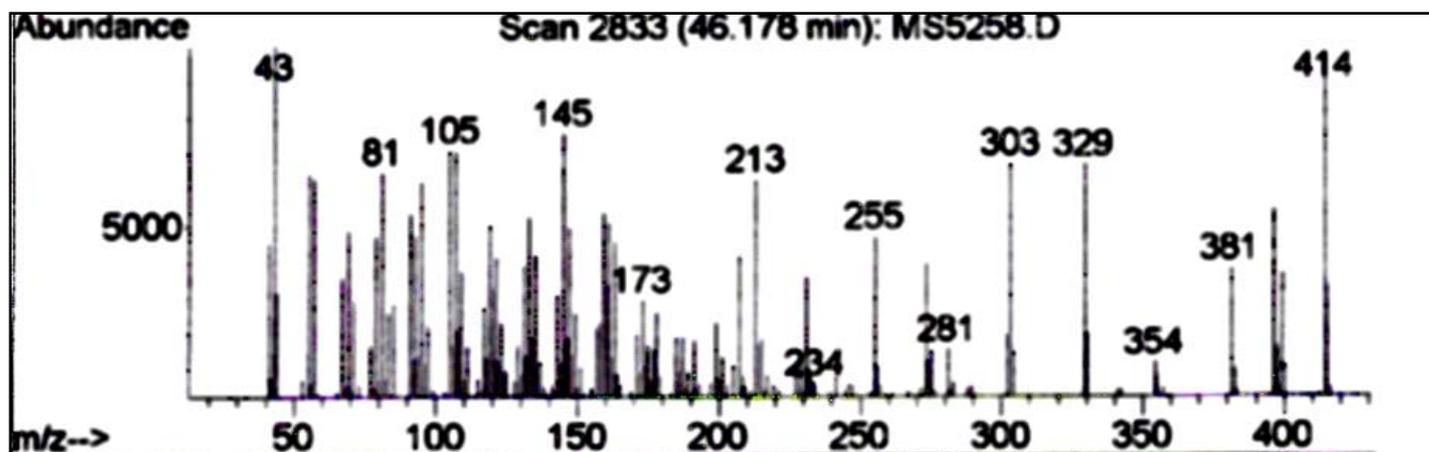
ESPECTRO 2. Espectro no IV de FH12A em pastilha de KBr



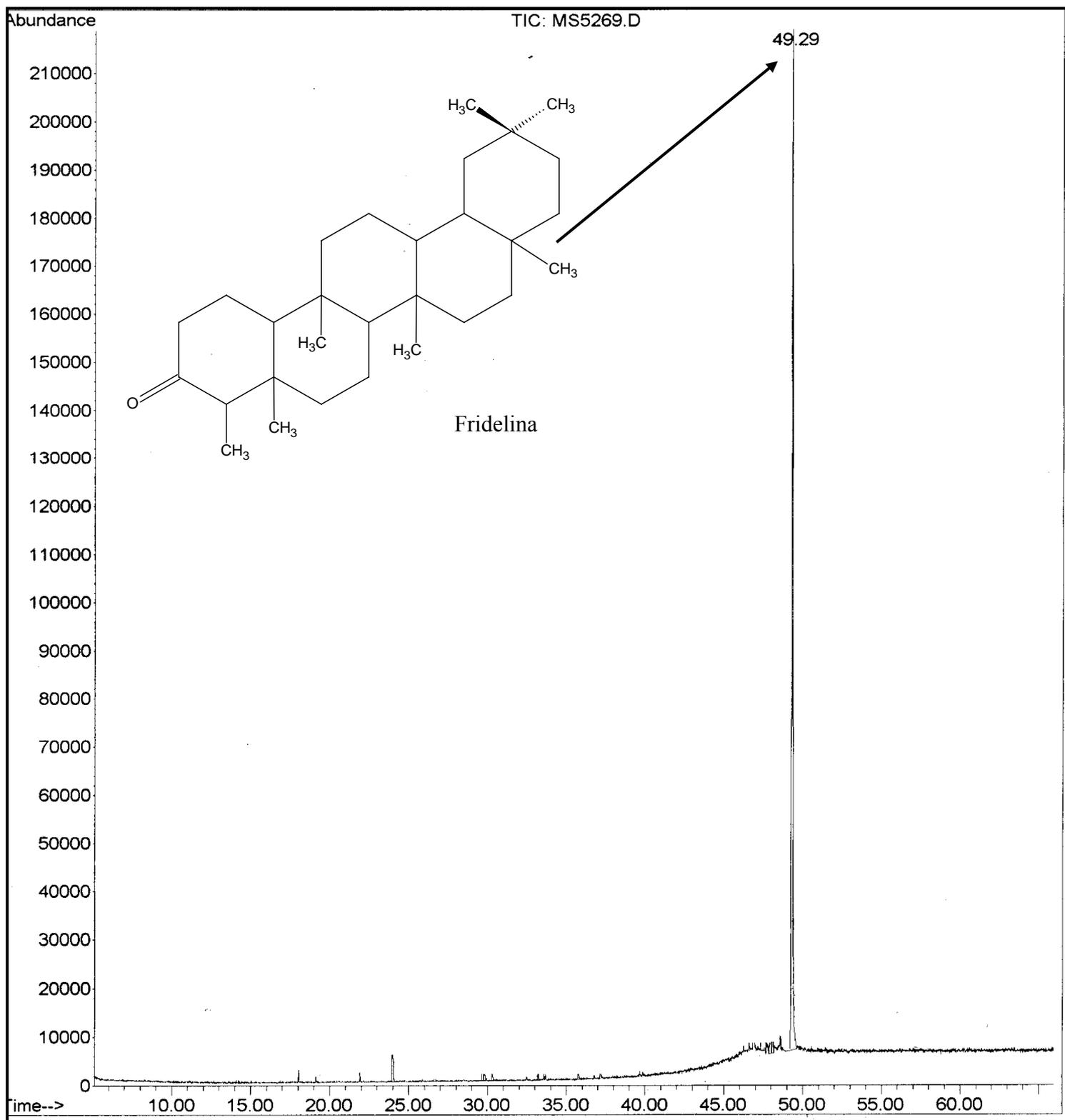
**CROMATOGRAMA 2.** Cromatograma de íons totais da fração FR12.



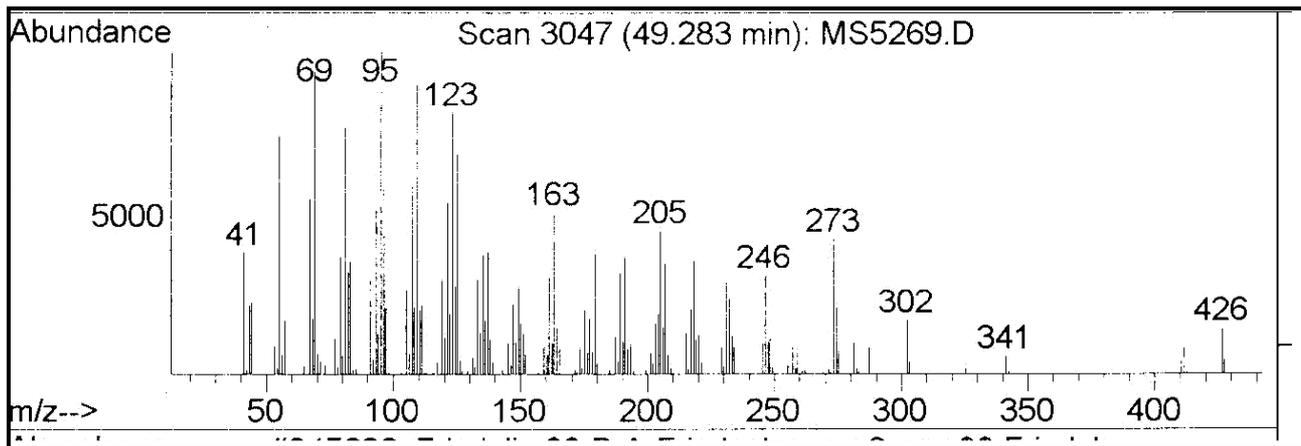
ESPECTRO 3. Espectro de massas referente ao pico com  $t_r$  de 45,44 min.



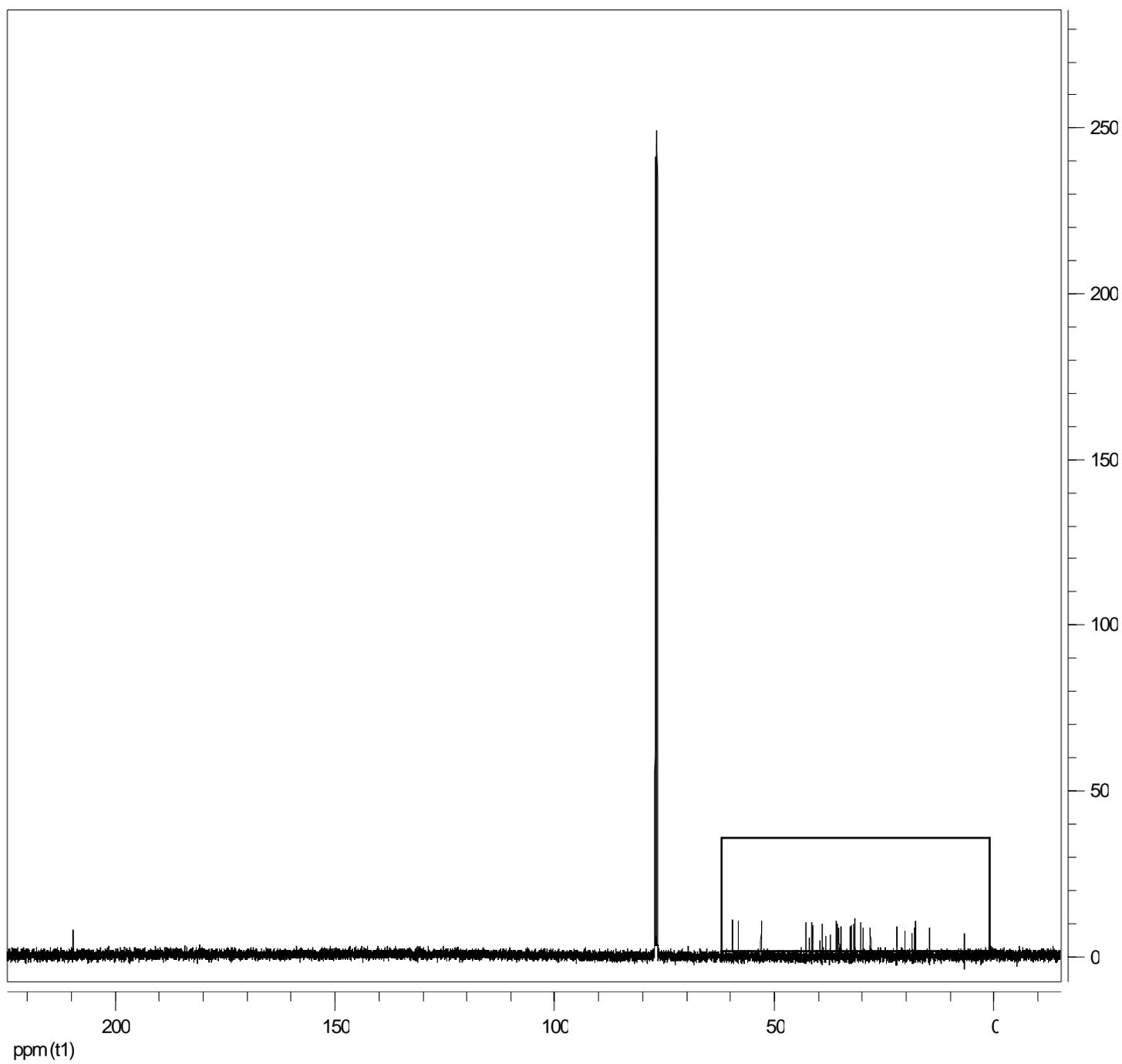
ESPECTRO 4. Espectro de massas referente ao pico com  $t_r$  de 46,18 min.



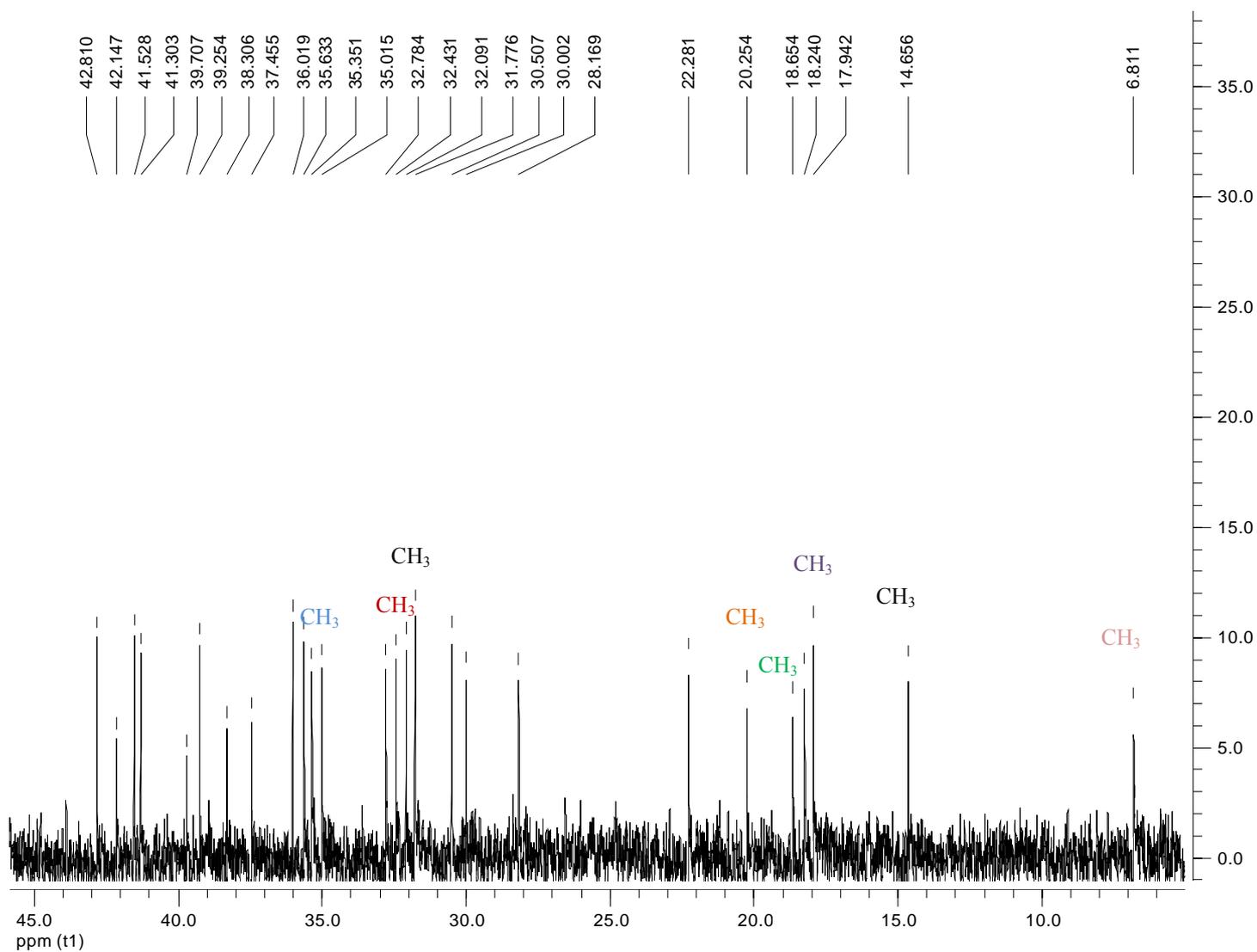
**CROMATOGRAMA 3.** Cromatograma de íons totais da fração FH12A.



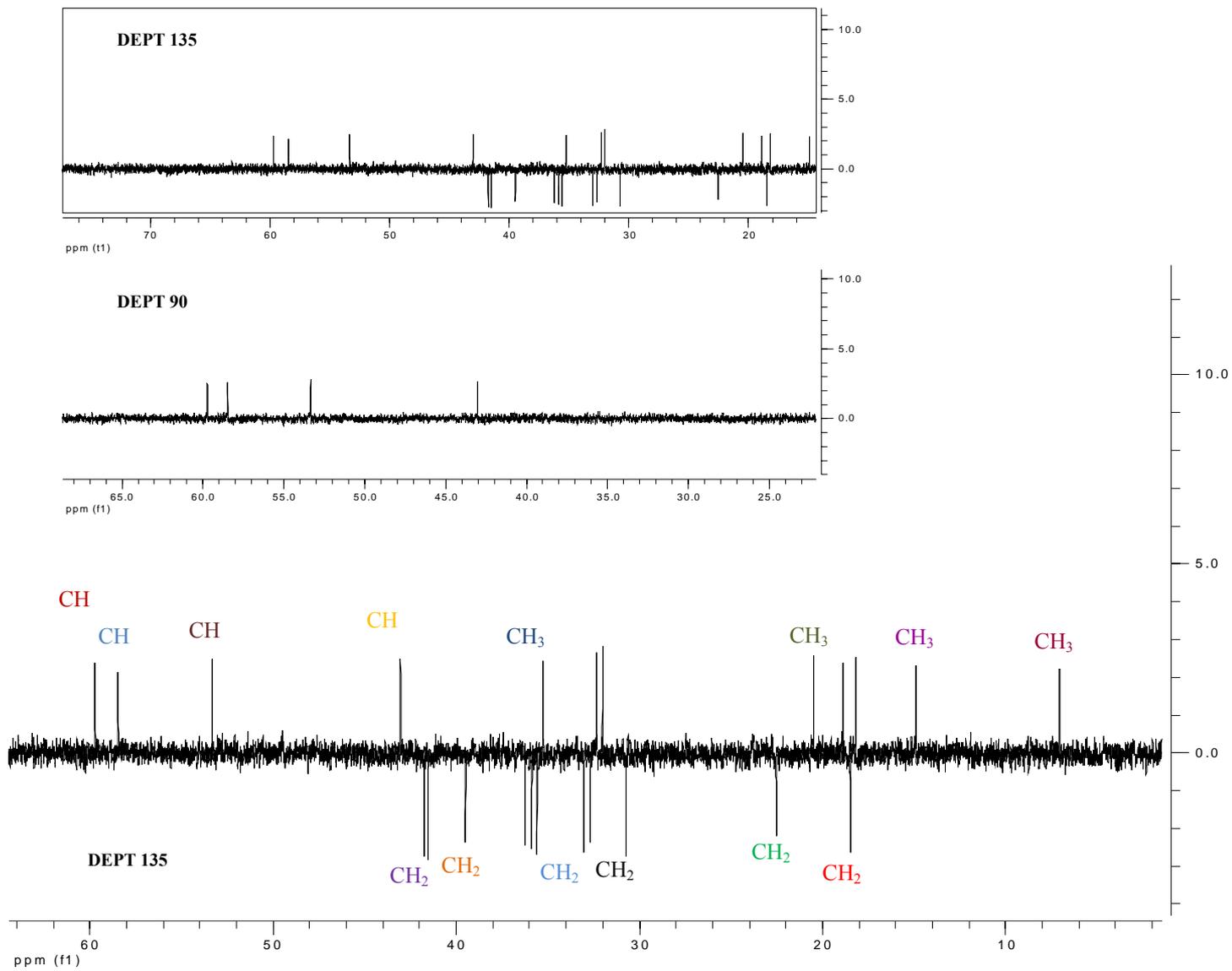
**ESPECTRO 5.** Espectro de massas referente ao pico com  $t_r$  de 49,28 min.



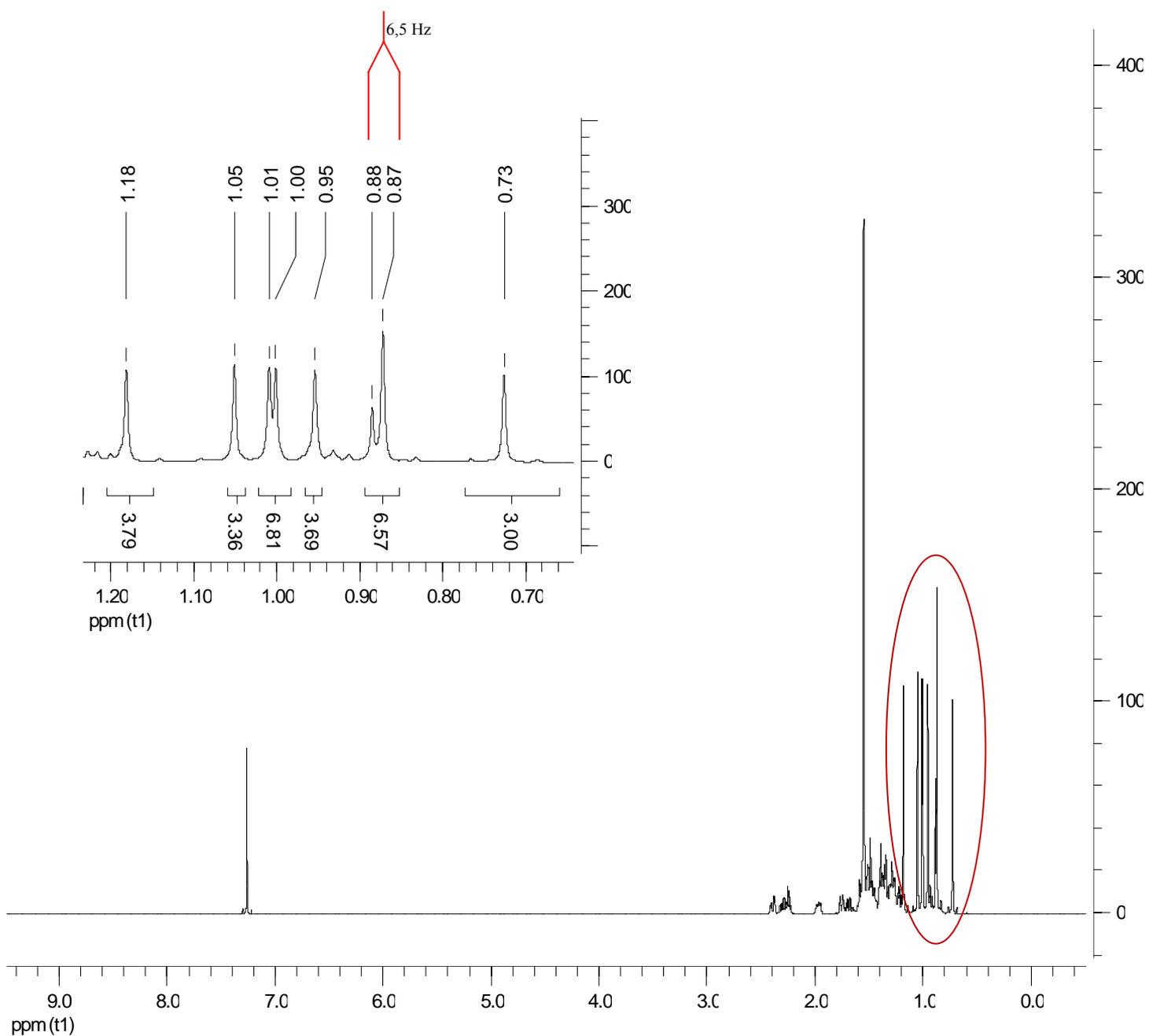
**ESPECTRO 6** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FH12A.



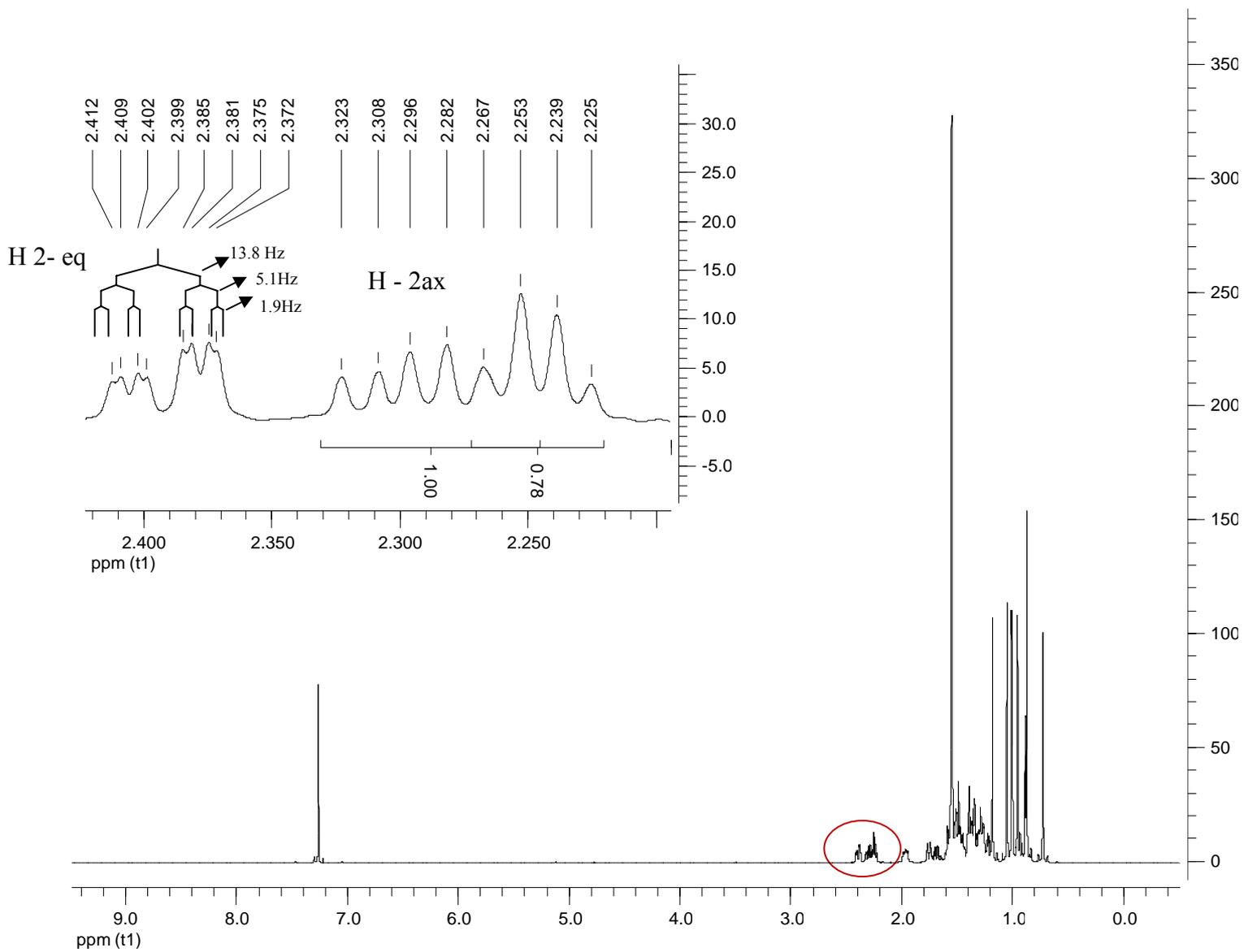
**ESPECTRO 7** – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de FH12A, identificação das metilas.



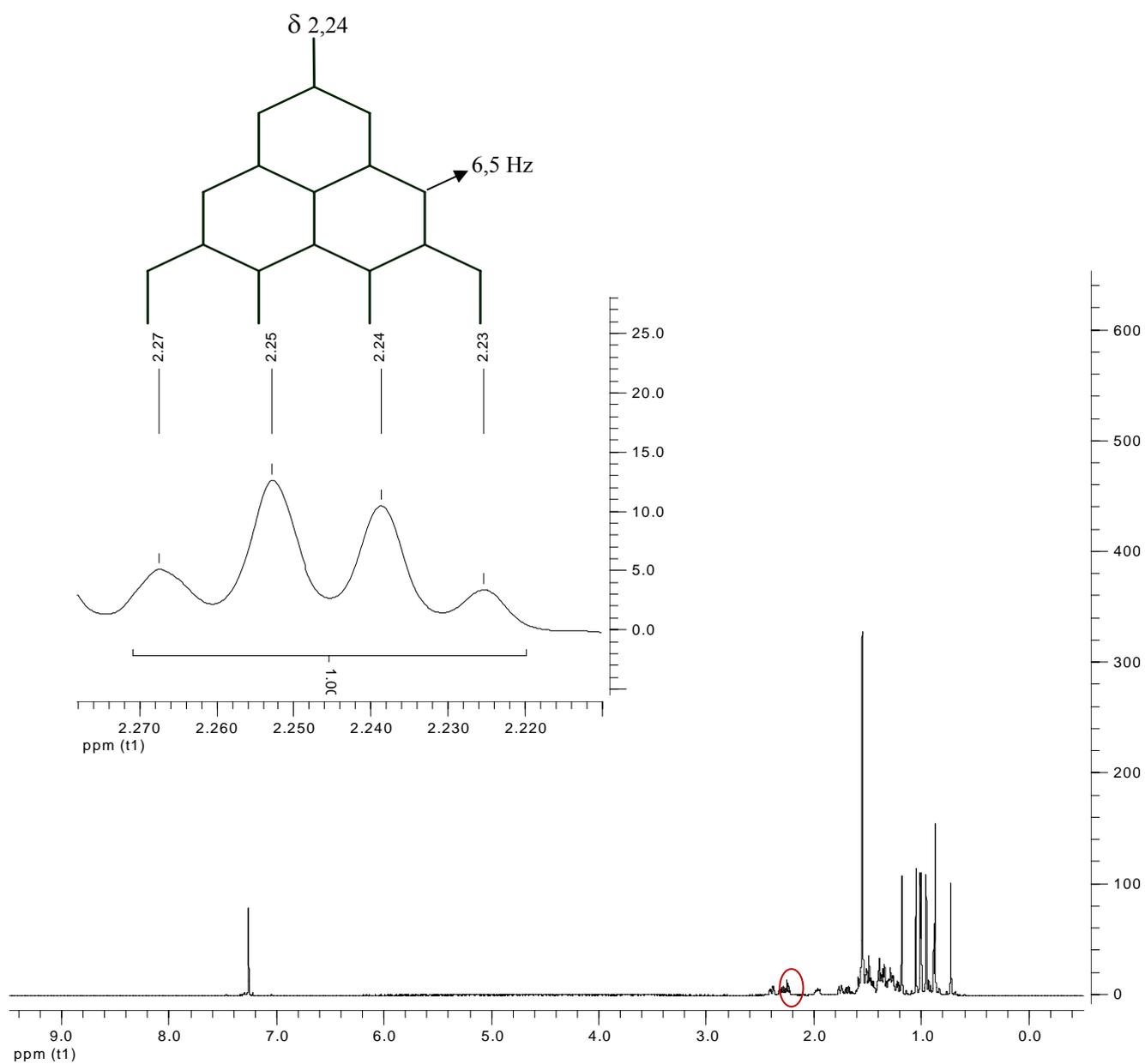
**ESPECTRO 8** - Espectro de DEPT – 135 e DEPT – 90 da substância FH12A (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



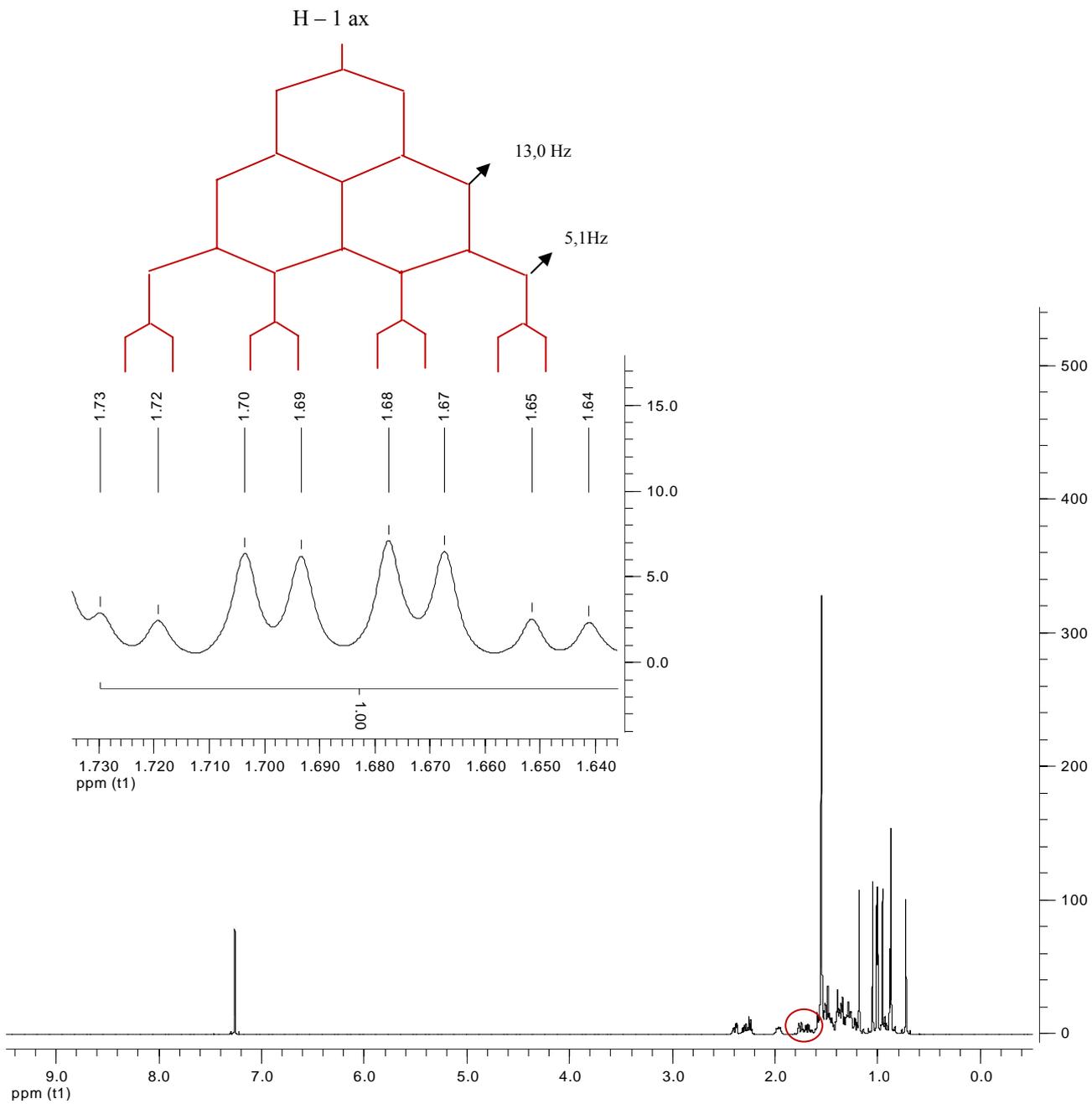
**ESPECTRO 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de FH12A ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz) – destaque da região das metilas.



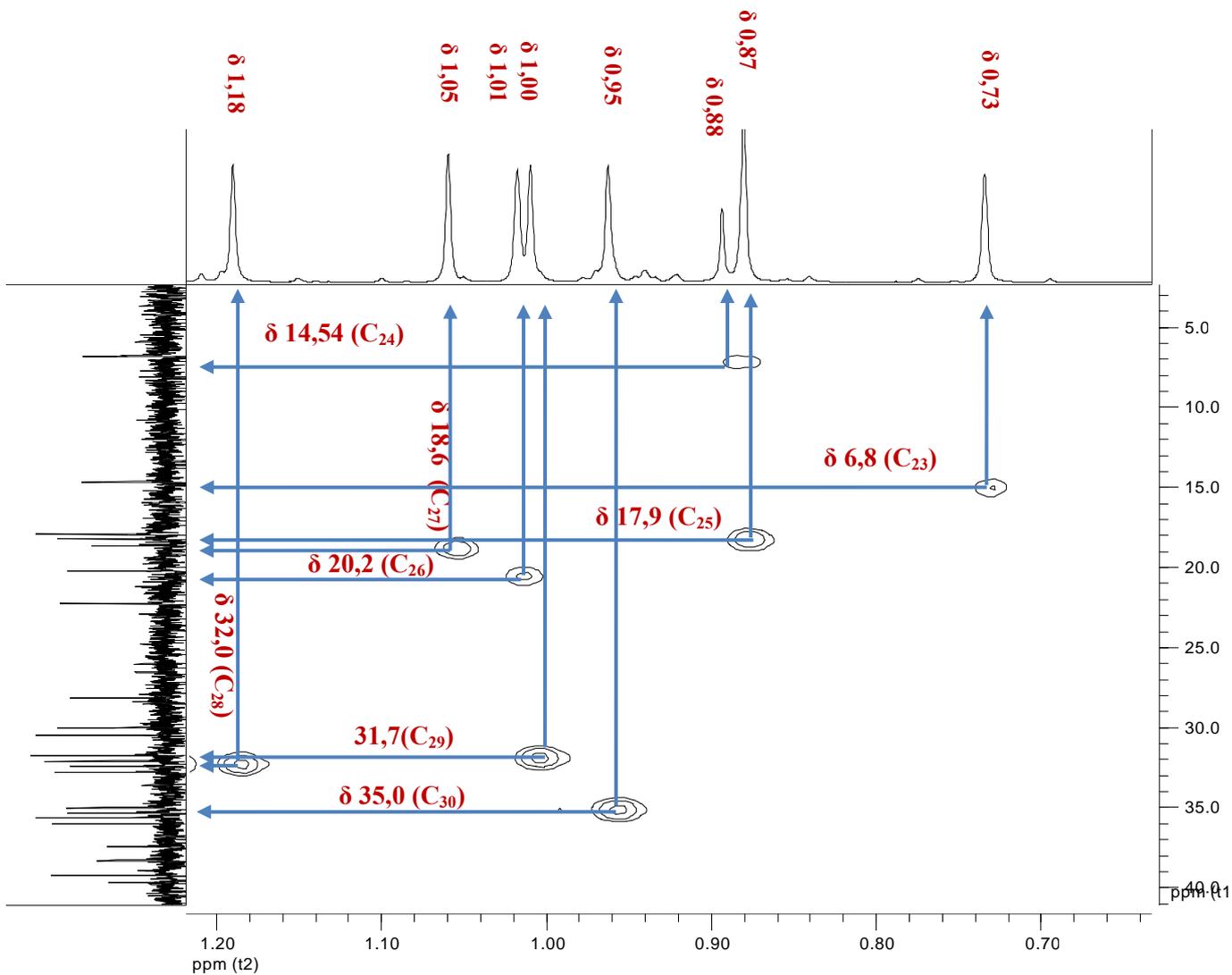
**ESPECTRO 10** – Espectro de RMN de  $H^1$  em expansão parcial com destaque os acoplamentos vicinais e geminais.



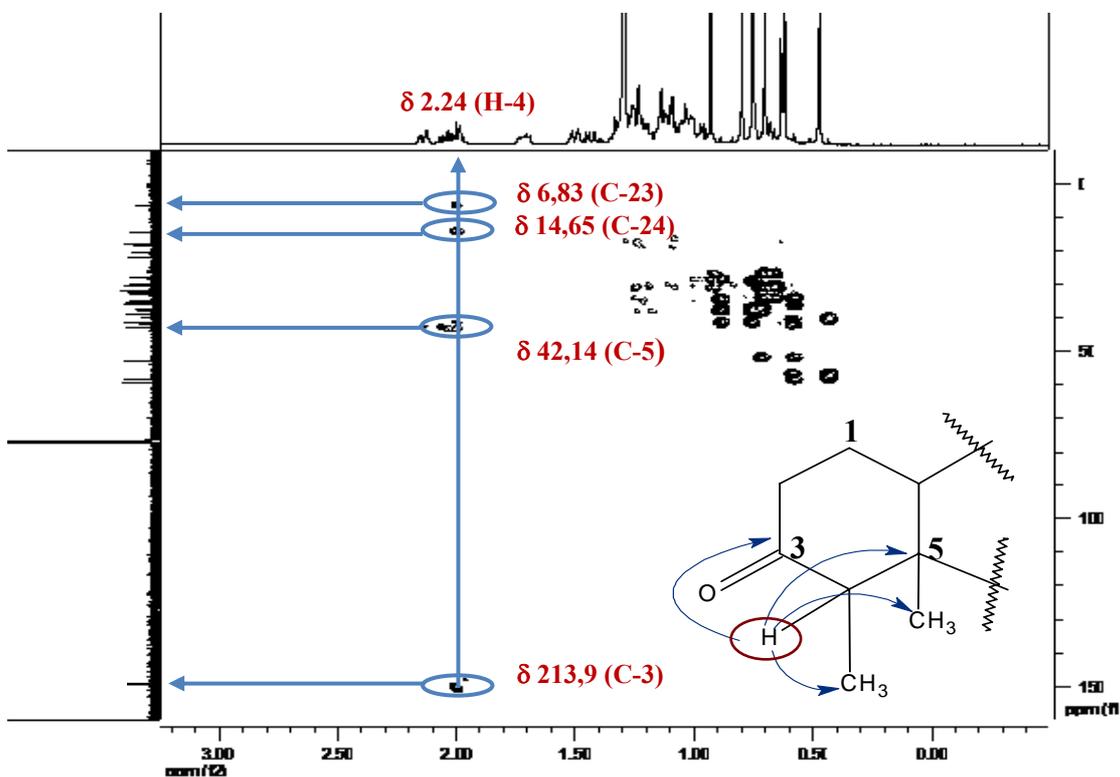
**ESPECTRO 11** – Espectro de RMN de  $\text{H}^1$  em expansão parcial com sinais de quarteto da substancia FH12A.



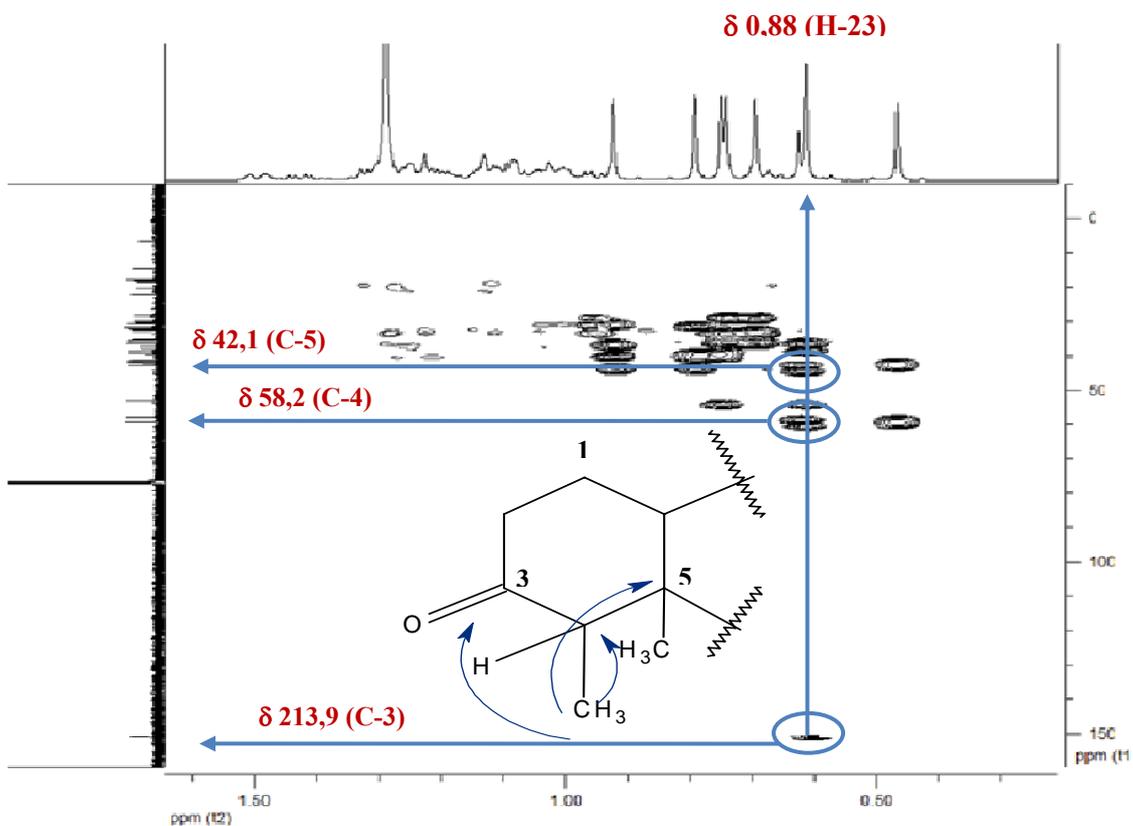
**ESPECTRO 12** – Expansão parcial do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , referente à multiplicidade do H – 1 ax.



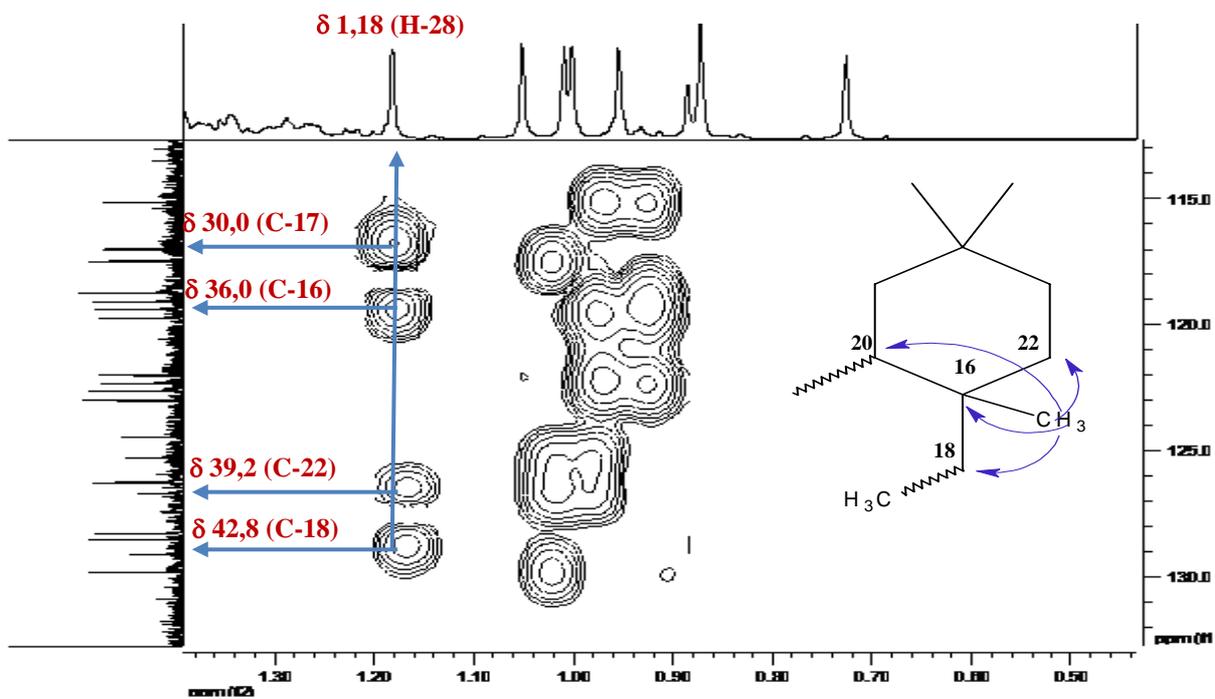
ESPECTRO 13 - Espectro de HSQC de FH12A – correlação de sinais de hidrogênio com seus carbonos.



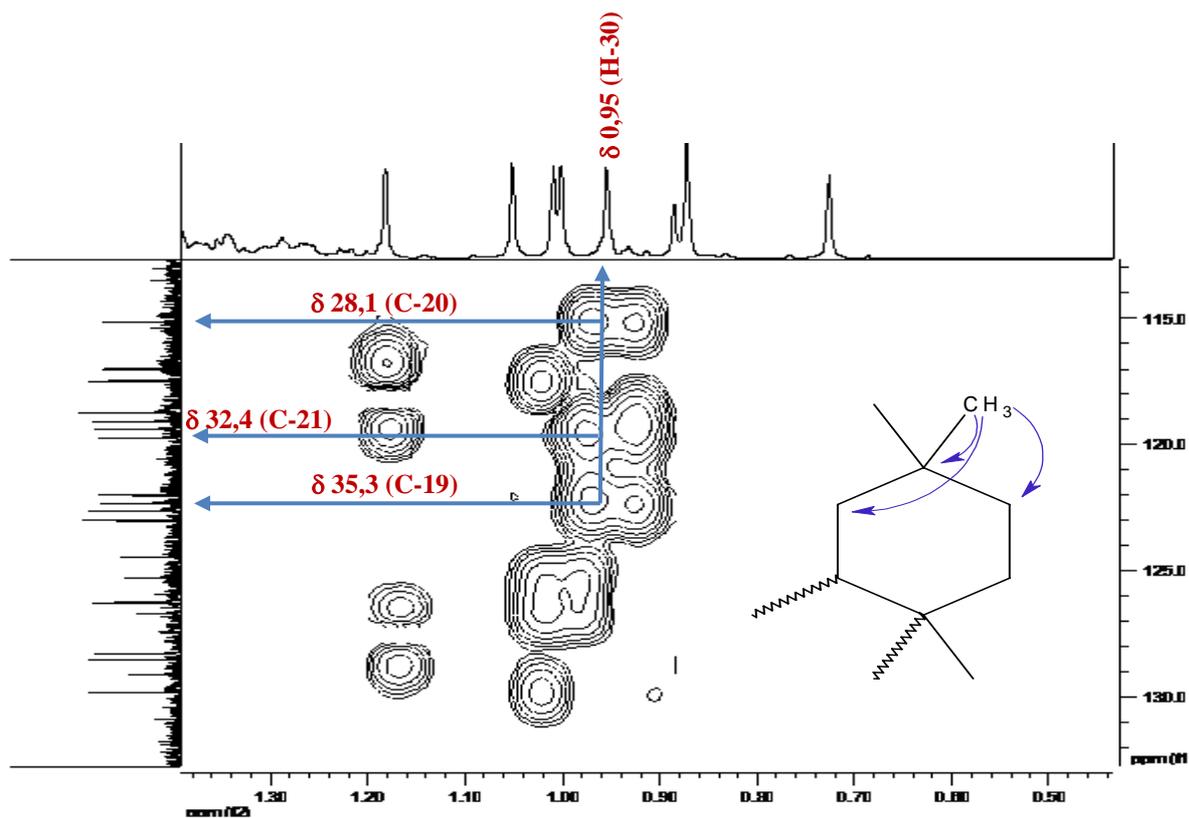
ESPECTRO 14 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-4.



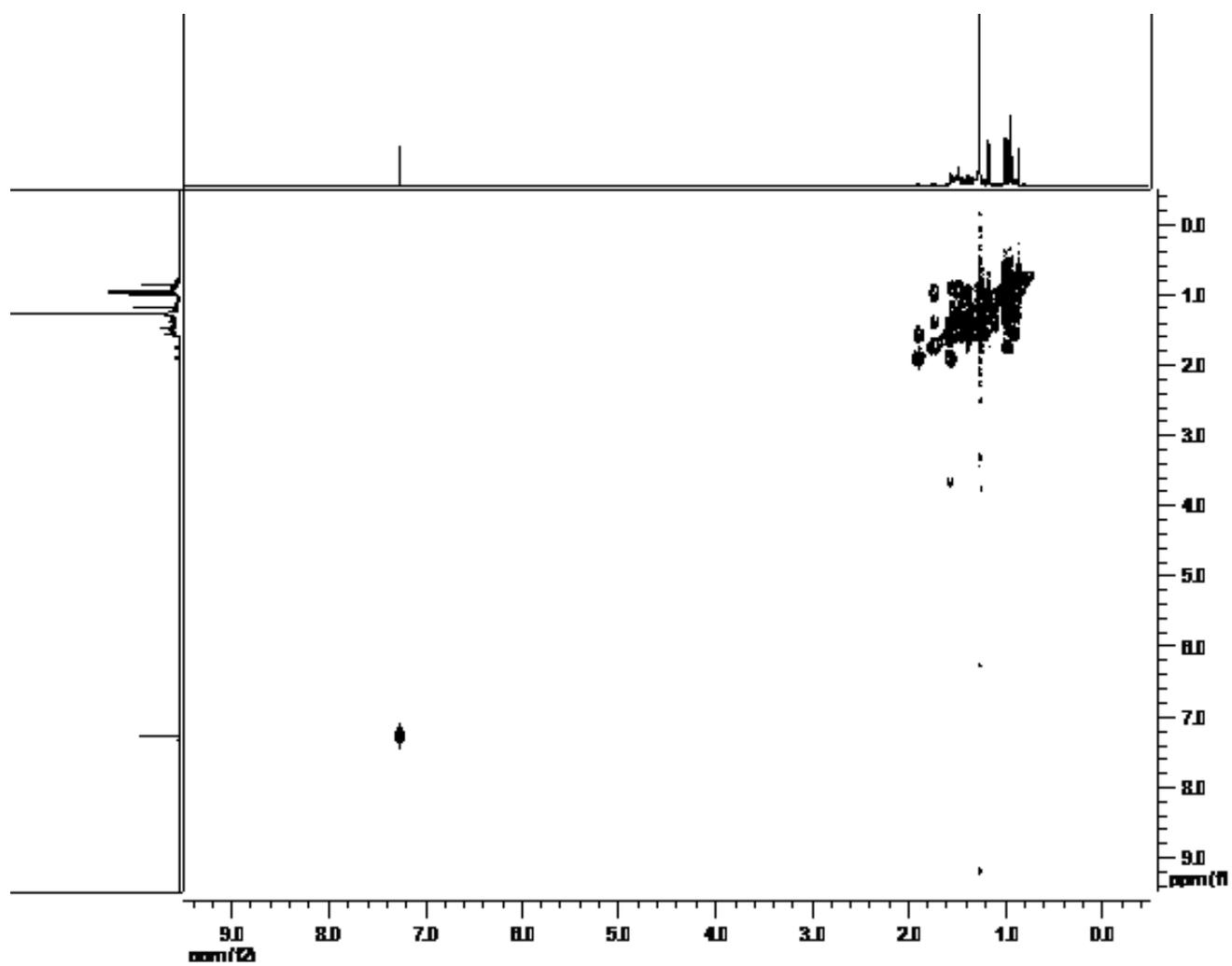
ESPECTRO 15 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-23.



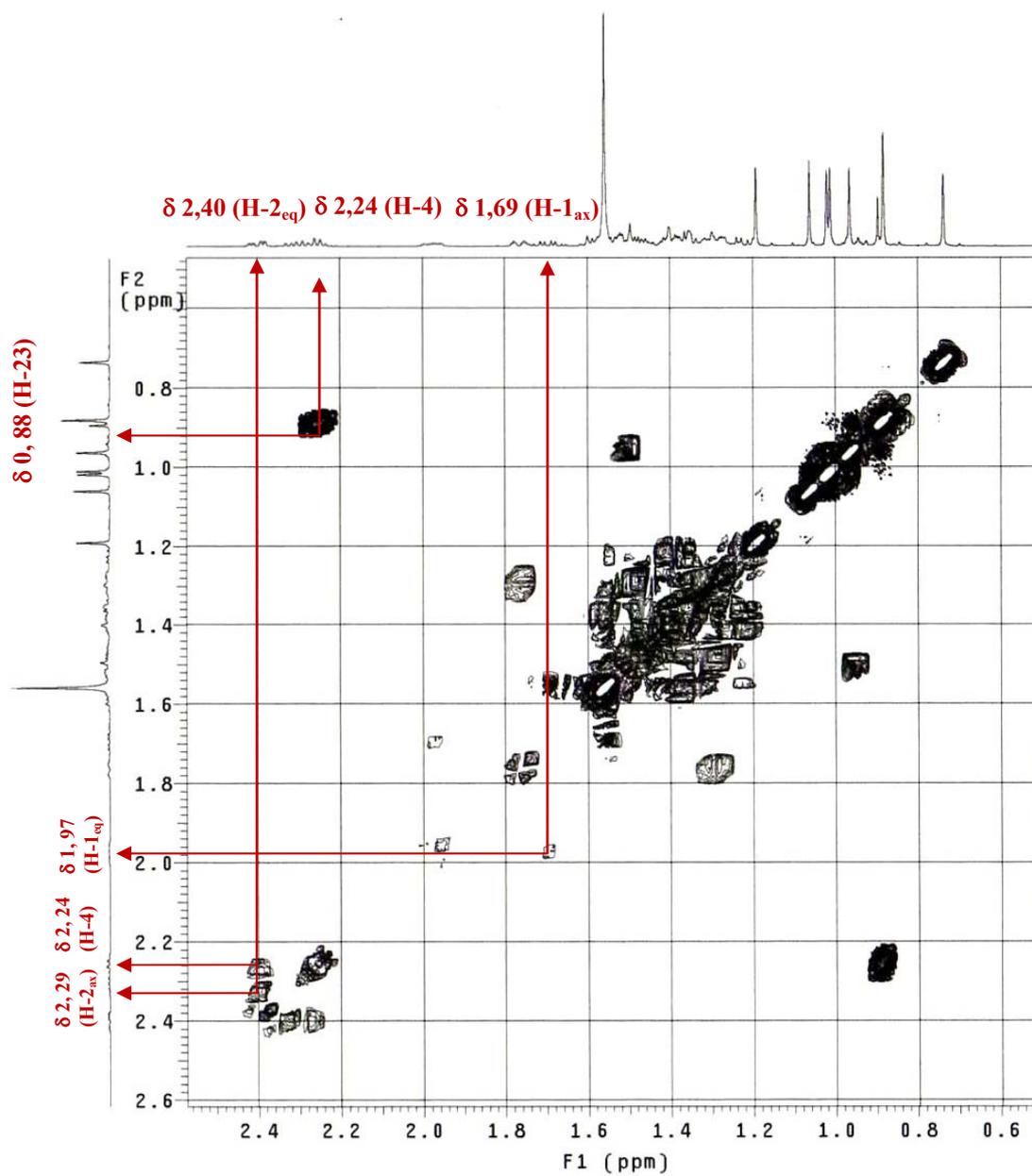
ESPECTRO 16 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-28.



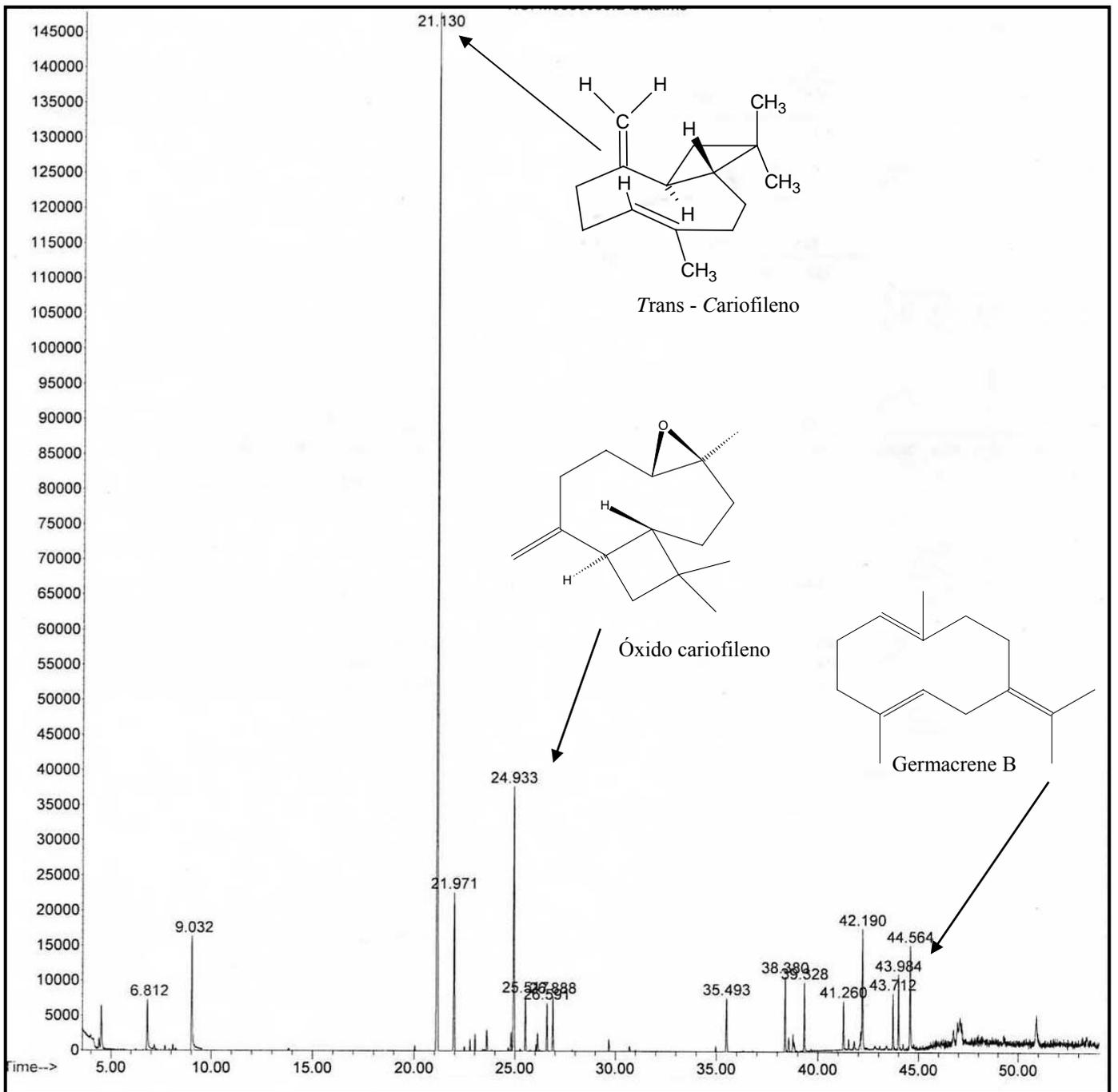
ESPECTRO 17 – Expansão parcial do mapa de contorno de HMBC de FH12A – correlações do H-30.



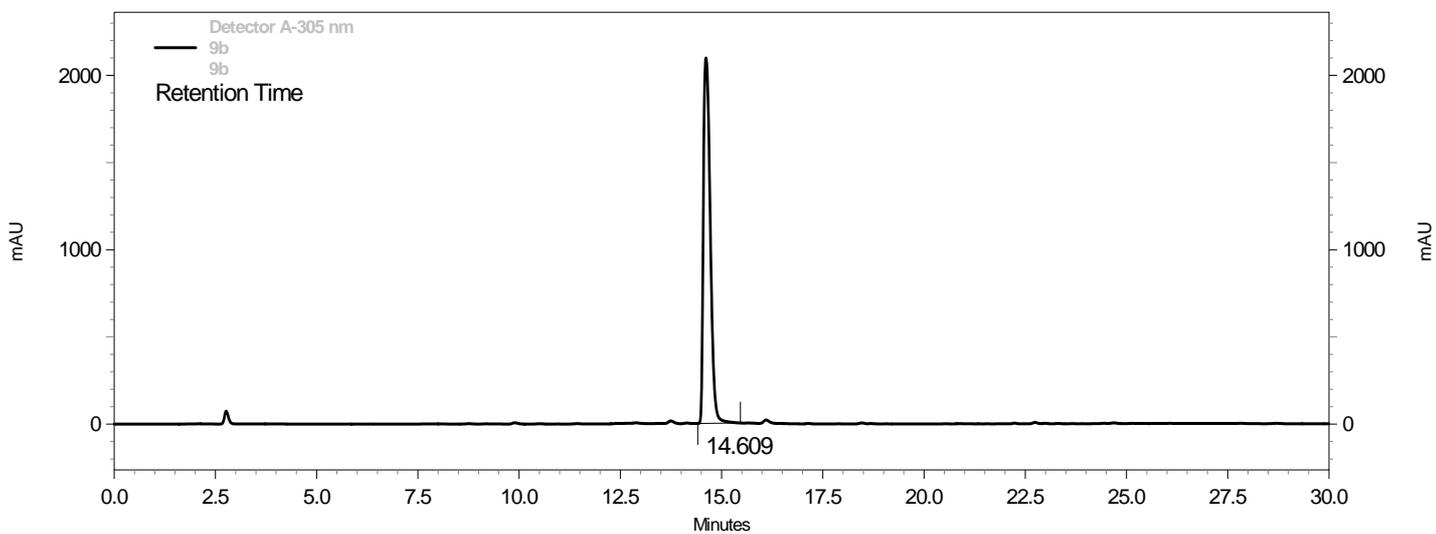
ESPECTRO 18 – Espectro de RMN 2D COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de Fridelina em  $\text{CDCl}_3$ .



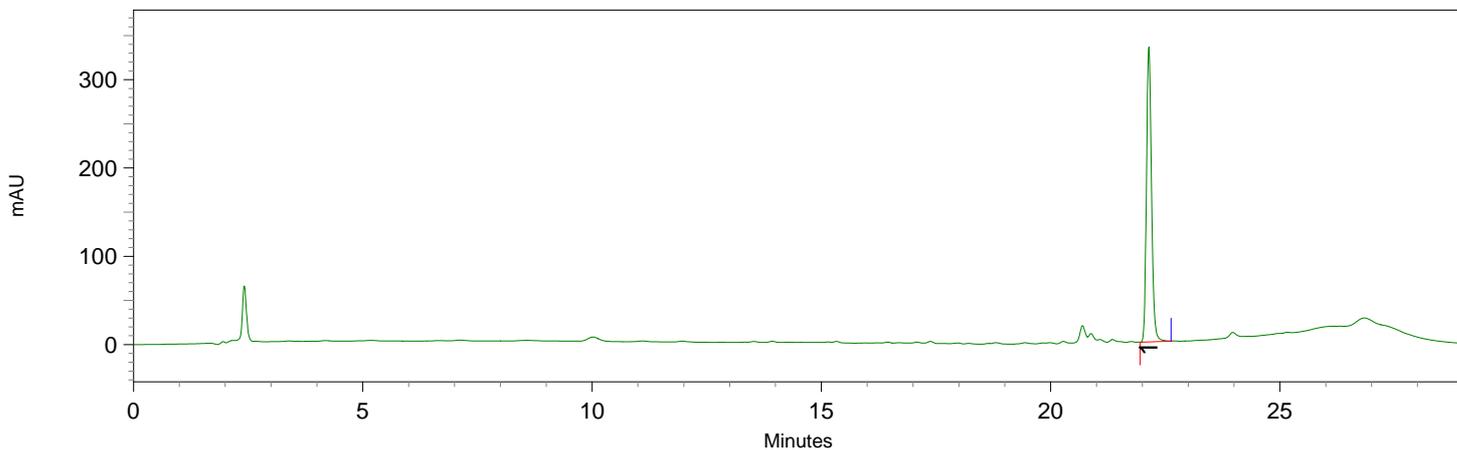
**ESPECTRO 19** – Espectro de RMN 2D COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  – Expandido de Fridelina em  $\text{CDCl}_3$



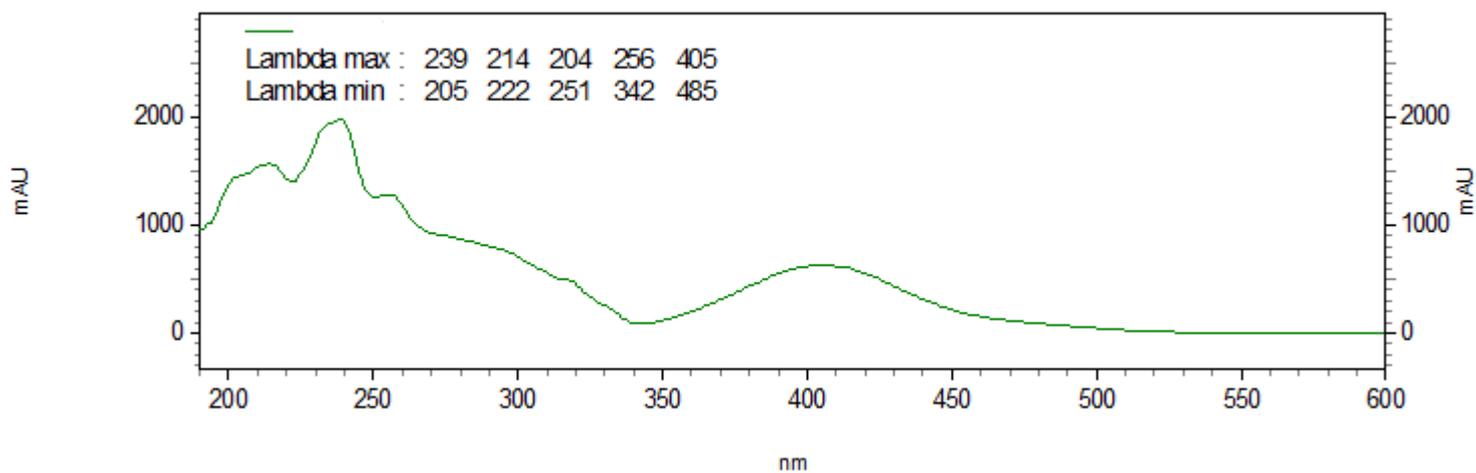
**CROMATOGRAMA 4**– Cromatograma de íons totais do ECFVc



**CROMATOGRAMA 5.** Cromatograma de íon total presente na substância FV 15\_23/ 9a.

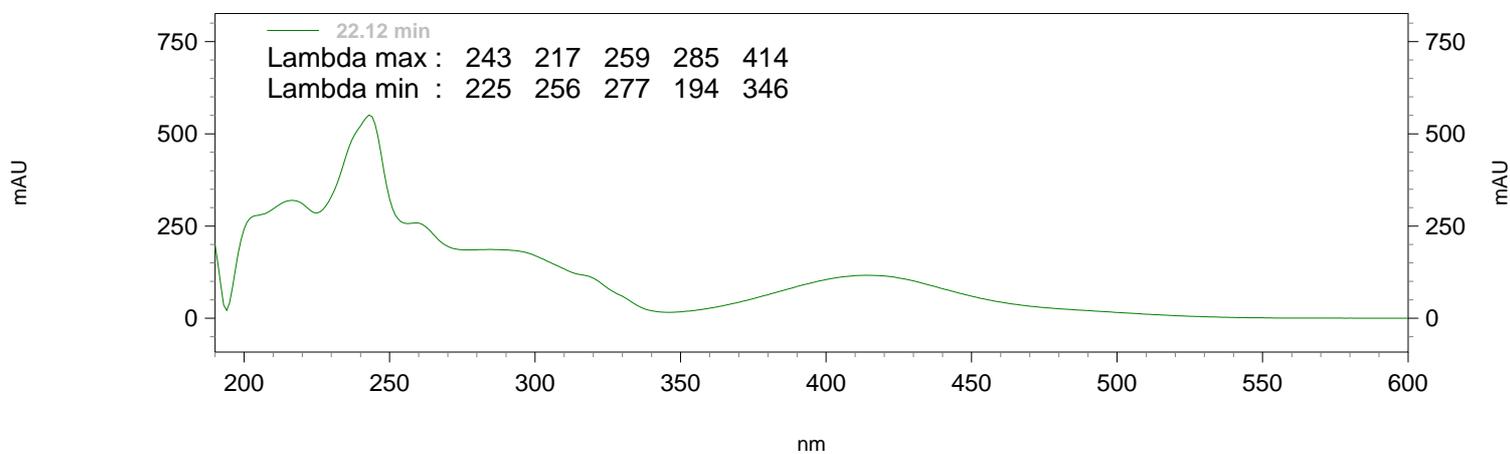


**CROMATOGRAMA 6.** Cromatograma de íon total presente na substância FV 15\_23/ 18a.

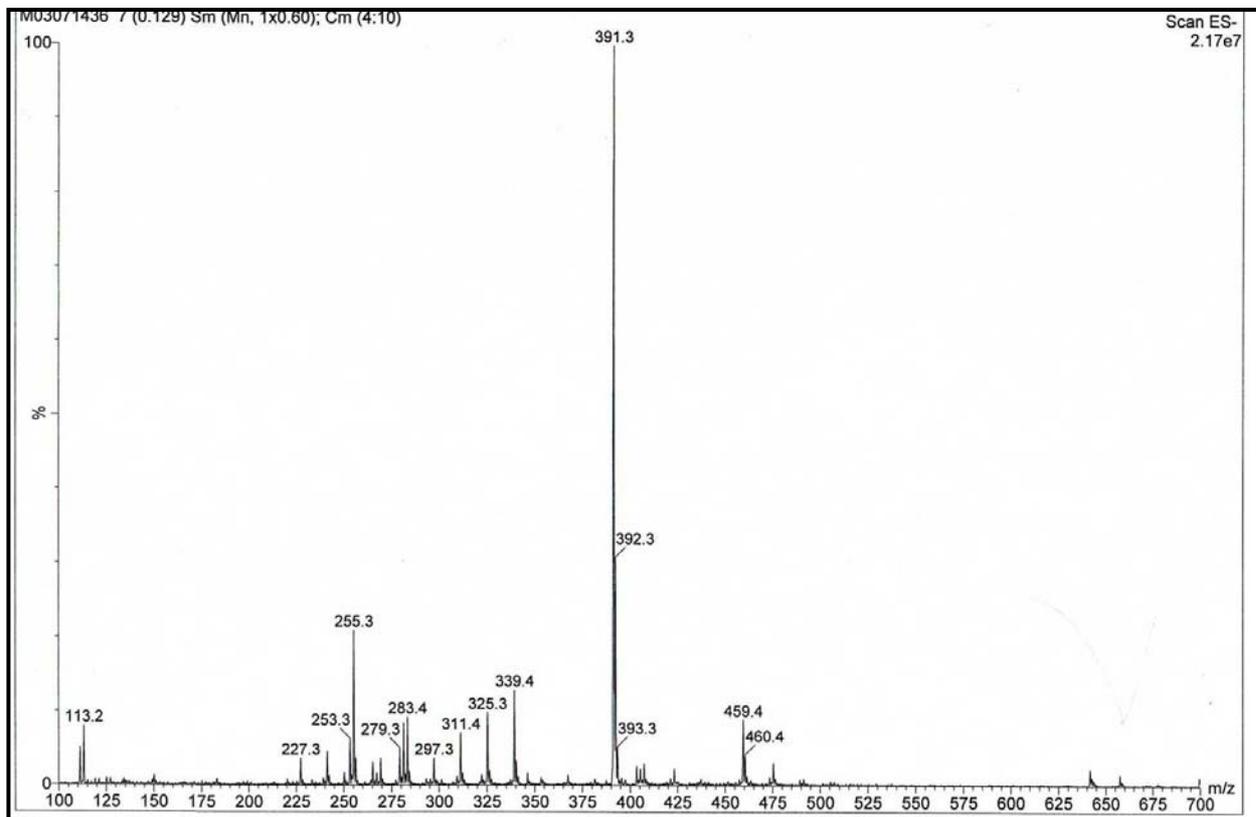


**ESPECTRO 20.** Espectro de ultravioleta no  $T_r$  14,60 min da substância FV 15\_23/ 9a.

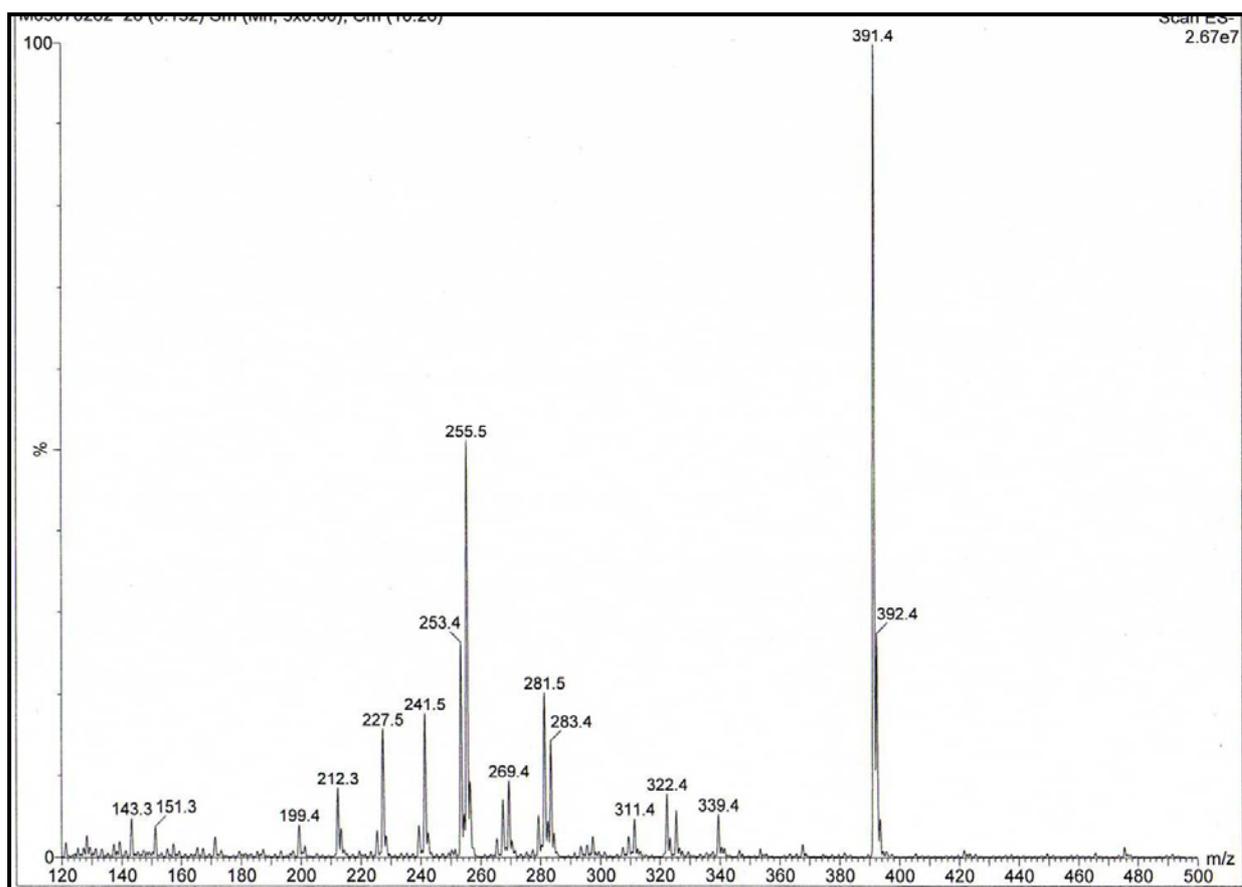
Spectrum at time 22.12 min.



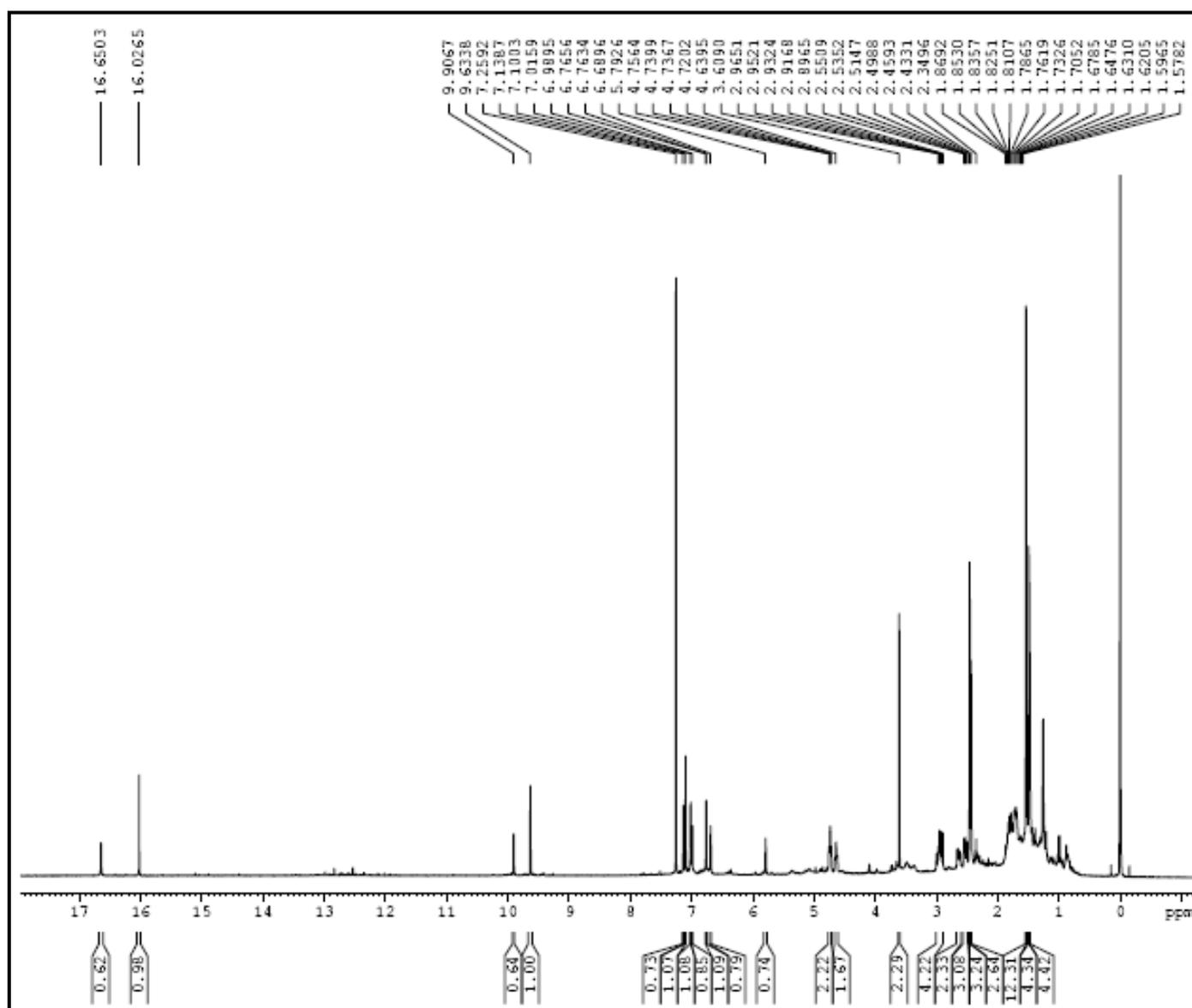
**ESPECTRO 21.** Espectro de ultravioleta no  $T_r$  22,12 min da substância FV 15\_23/ 18a.



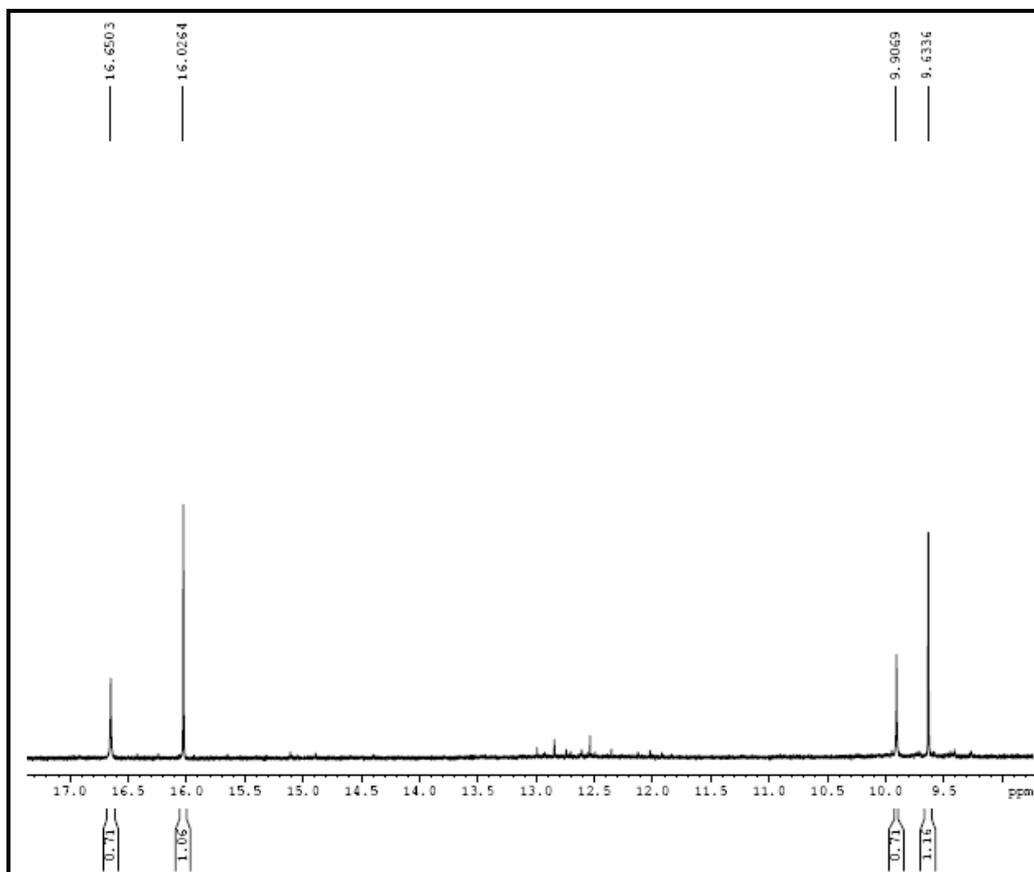
ESPECTRO 22. Espectro de massas da substância FV 15\_23/ 9a.



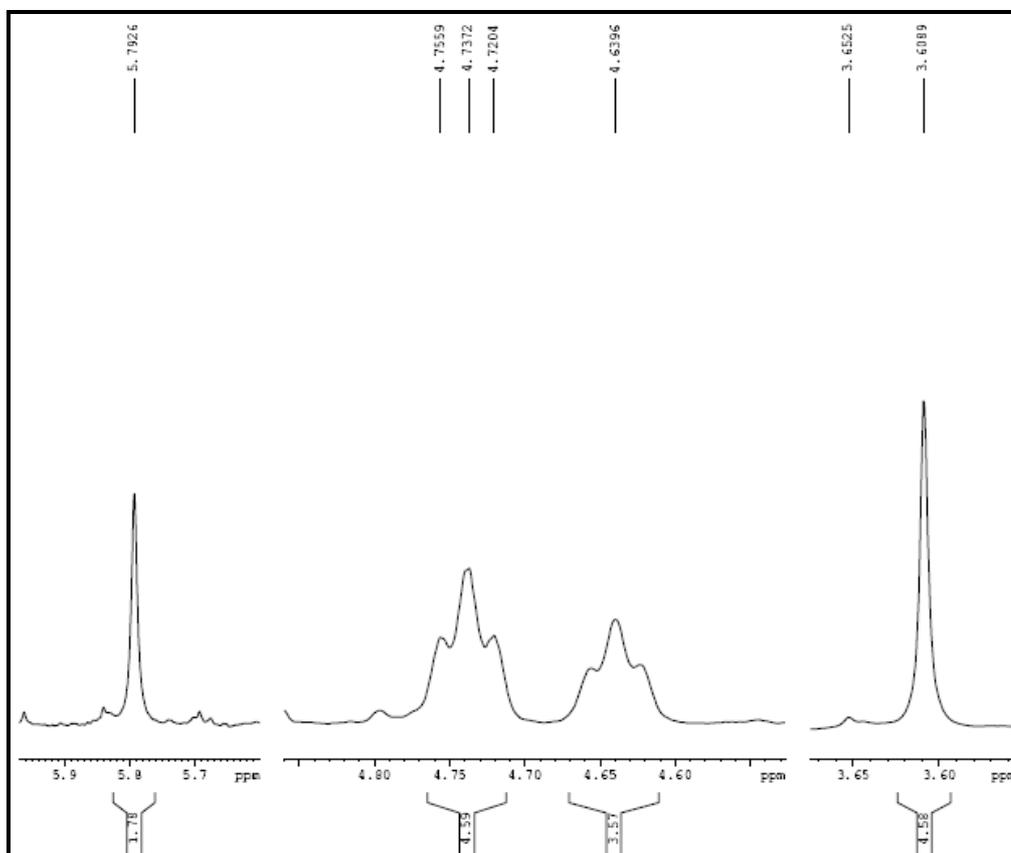
ESPECTRO 23. Espectro de massas da substância FV 15\_23/ 18a.



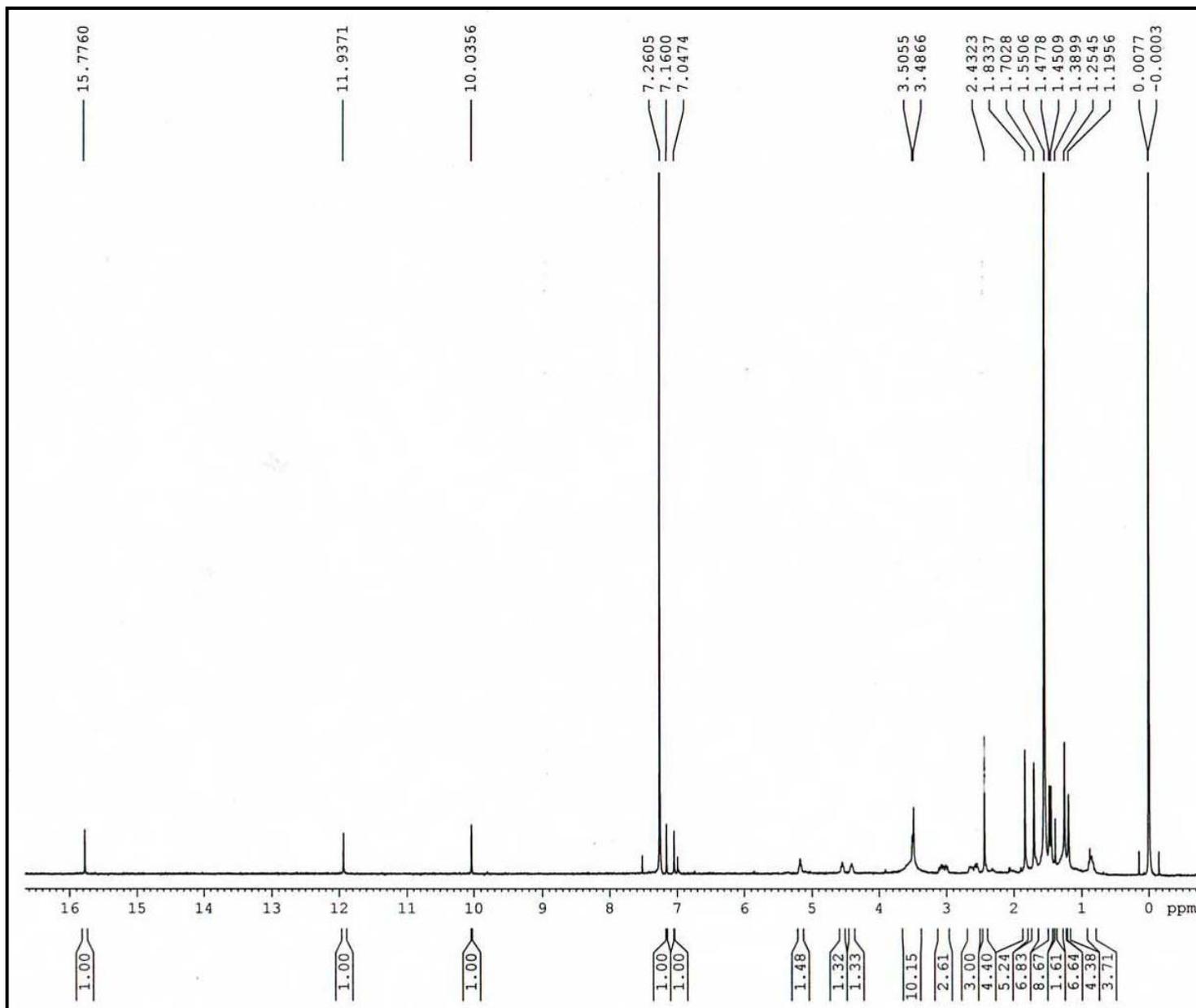
**ESPECTRO 24.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de FV 15\_23/ 9a ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz).



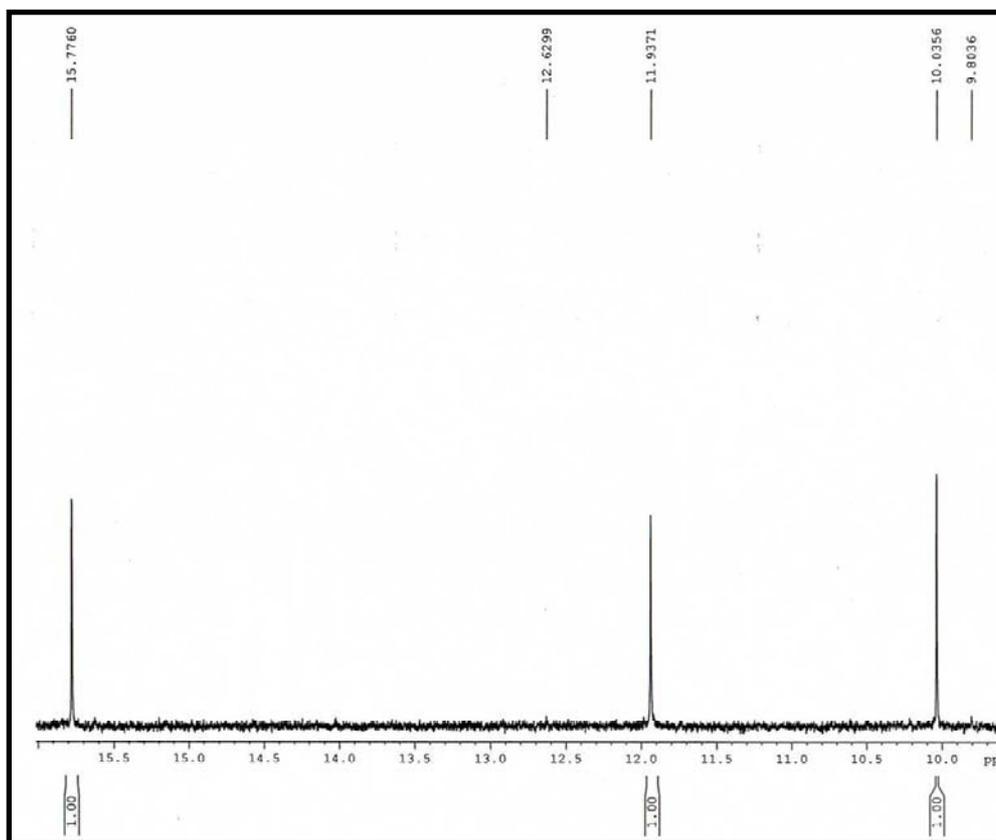
**ESPECTRO 25** – Espectro de RMN de  $H^1$  Expandido (9.63 – 16.65 ppm) de Ferruginina em  $CDCl_3$



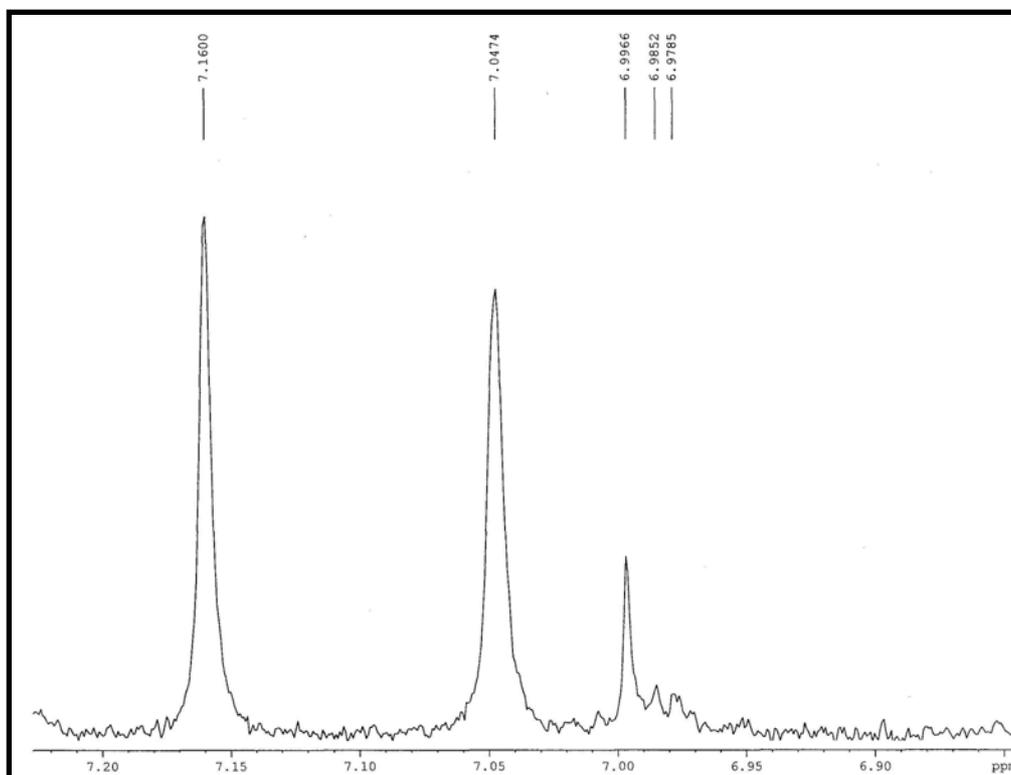
**ESPECTRO 26** – Espectro de RMN de  $H^1$  Expandido (3.60 – 9.63 ppm) de Ferruginina em  $CDCl_3$



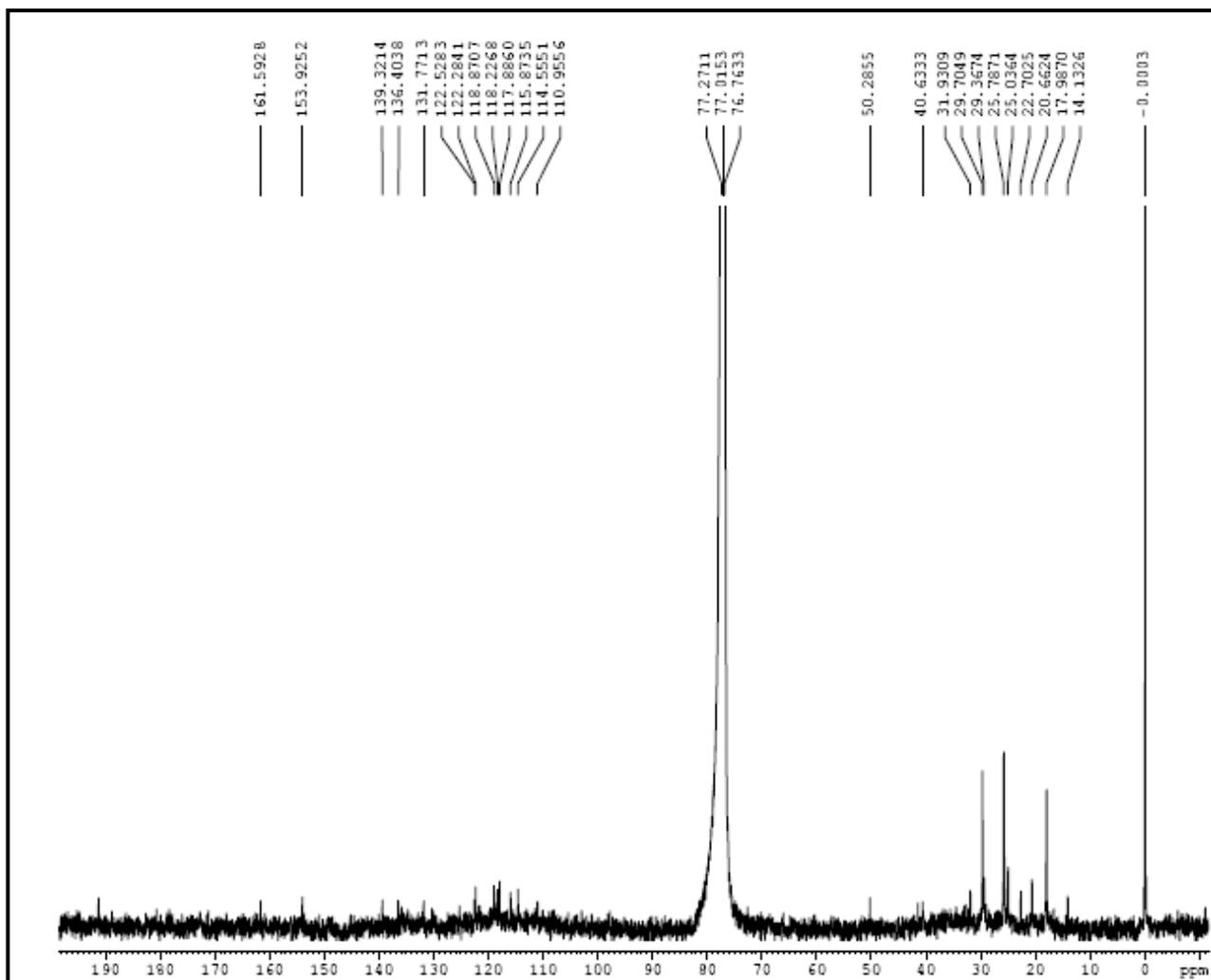
ESPECTRO 27. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de FV 15\_23/ 18 a ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz ).



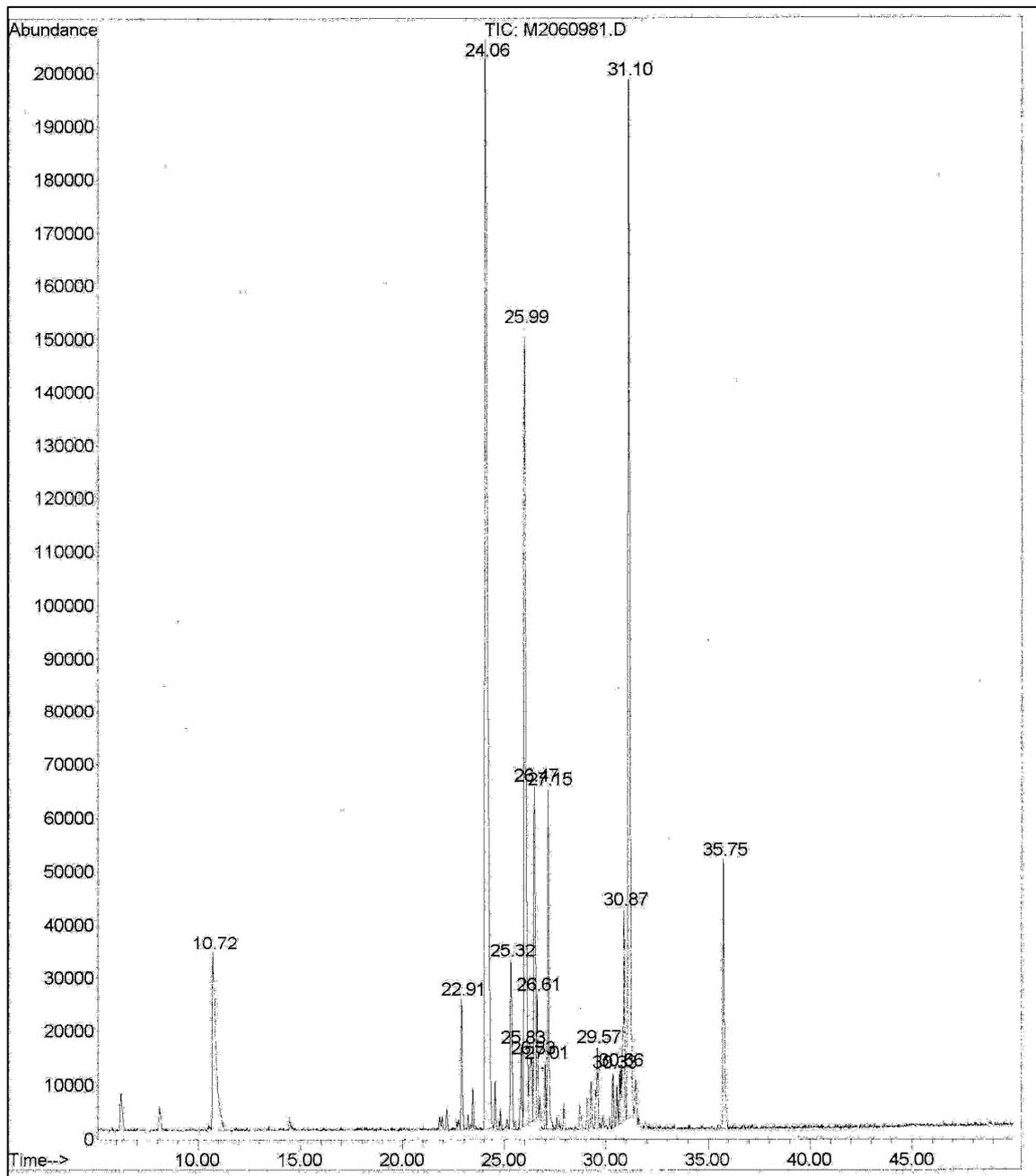
**ESPECTRO 28** – Espectro de RMN de  $\text{H}^1$  Expandido (9.80 – 15.77 ppm) de Vismina em  $\text{CDCl}_3$



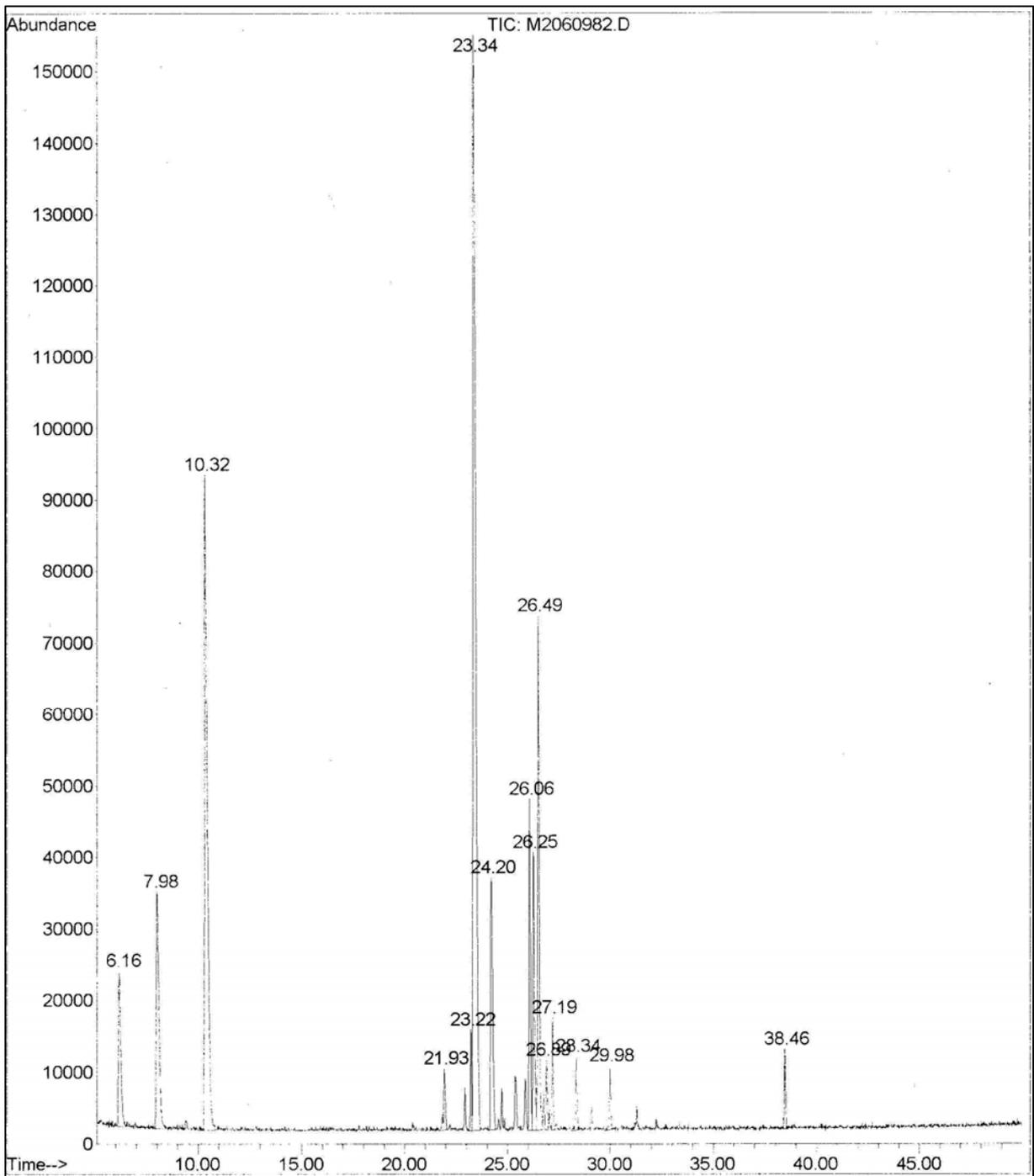
**ESPECTRO 29** – Espectro de RMN de  $\text{H}^1$  Expandido (6.97 – 7.16 ppm) de Vismina em  $\text{CDCl}_3$



ESPECTRO 30. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de FV 15\_23/ 9a ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz).



**CROMATOGRAMA 7.** Cromatograma dos íons totais presentes no óleo essencial de *P. duckei*.



**CROMATOGRAMA 8.** Cromatograma dos íons totais presentes no óleo essencial de *P. demeraranum*.

## 5. FARMACOLOGIA

A utilização de princípios ativos de vegetais, é muito antiga. Os egípcios já recorriam a substâncias como o ópio, com função narcótica, ou a beladona, como antiespasmódico e calmante (VIEGAS *et al.*, 2006). No início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporada às farmacopéias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas (YUNES *et al.*, 2001). Dada a importância das plantas para a medicina, hoje a química e a medicina passam a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos (YUNES *et al.*, 2001). Desta forma, muitas substâncias ativas são conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos.

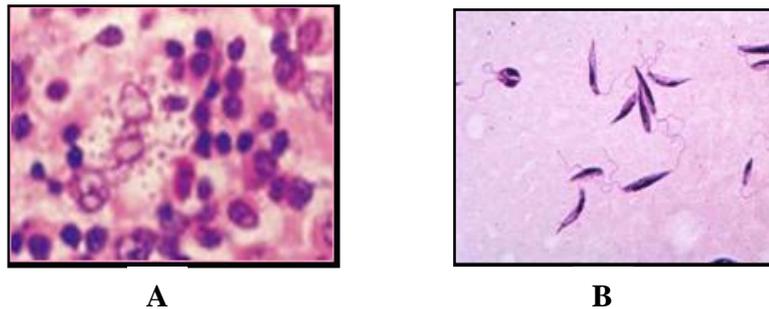
Os princípios ativos de um medicamento têm diferentes origens. Predominam, no entanto, entre as muitas substâncias utilizadas, os vegetais (alcalóides, monoterpenos, flavonóides, cumarinas etc.) e as elaboradas por microrganismos, como por exemplo os fungos, os quais são utilizados para produção de antibióticos (SCHMIDT *et al.*, 2007). Independentemente de sua origem, os diferentes processos de preparação e teste dos medicamentos têm uma série de etapas comuns. Inicialmente, isola-se um princípio ativo ou sintetiza-se uma molécula que possa exercer algum tipo de ação terapêutica. Em seguida, se procede à realização de uma série de testes de segurança para analisar possíveis ações tóxicas e efeitos colaterais nocivos, além de consequências negativas que a administração do medicamento possa acarretar ao feto em caso de gravidez. Todos esses exames constam da fase de experimentação em animais de laboratório e, uma vez confirmada sua inocuidade, segue-se uma segunda fase em pacientes.

Na tentativa de correlacionar os resultados obtidos a atividade atribuída popularmente ao látex que exsudam de *V. cayennensis* e aos óleos essenciais de *P. demeraranum* e *P. duckei*, procurou-se avaliar os extratos, frações e substâncias isoladas frente às cepas de *L. amazonensis* e *L. guyannensis*. Outros testes farmacológicos também foram realizados com objetivo de reunir dados para futuros testes clínicos.

### 5.1. LEISHMANIOSE

Leishmaniose é um grupo de doenças tropicais, causada por um conjunto de espécies de protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (CHAN – BACAB E PENA – RODRIGUEZ, 2001). Ocorrendo em cerca de 88 países, incluindo o Brasil, a cada ano dois milhões de novos casos são diagnosticados (WHO, 2007). Os agentes causadores dessa doença são parasitas unicelulares heteroxênicos do gênero *Leishmania* que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida: promastigota e amastigota (**Figura 30**) (MICHALICK, 2003).

As formas promastigotas caracterizam-se por serem fusiformes e flageladas; medem cerca de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento vivem no tubo digestivo de insetos vetores, os flebotomíneos. As formas amastigotas, porém, são arredondados e com flagelos inaparentes, têm um diâmetro de aproximadamente 2,3  $\mu\text{m}$ , vivem dentro de células macrófagos do hospedeiro vertebrado.



**FIGURA 30-** Formas morfológicas do gênero *Leishmania* (a) Forma amastigota; b) Forma promastigota

FONTE: Retirado de <[http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/leishmaniose\\_n.htm](http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/leishmaniose_n.htm)>.

## 5.2. O VETOR

As células dos seres vertebrados são infectadas com a forma promastigota do parasita por intermédio da picada do inseto vetor (**Figura 31**), os flebótomos, que são pequenos insetos de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, com pernas longas e delgadas, e o corpo densamente piloso. Voam aos saltos e mantém as asas eretas mesmo em repouso, ao contrário de outros dípteros, o que facilita sua identificação. Apenas as fêmeas são hematófagas. Machos se alimentam dos sucos de flores e plantas. Em cada região do Brasil, os flebótomos recebem um apelido: mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado, arrepiado, etc. (CARMAGO *et al.*, 2003).

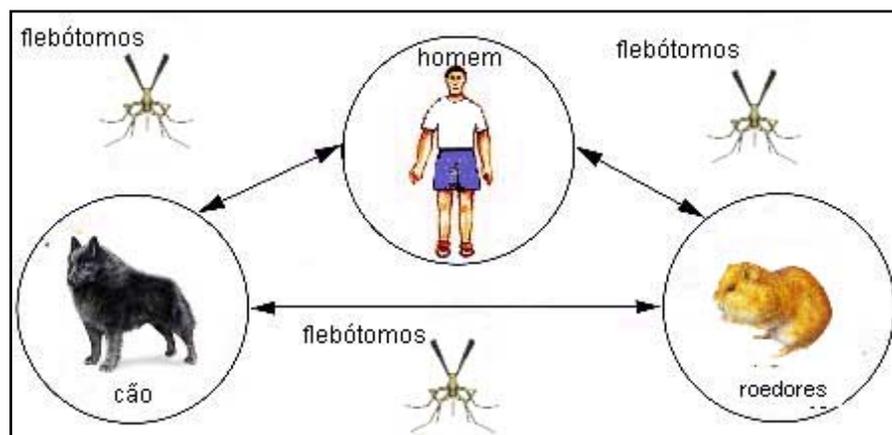


**FIGURA 31-** Fêmea adulta de Flebotomíneo

FONTE: Retirado de <<http://www.icb.usp.br>>.

### 5.3. CICLO EVOLUTIVO DA LEISHMANIOSE

Em muitos casos, a leishmaniose é transmitida zoonoticamente, ou seja, de animais para o homem, contudo em outros casos quando o reservatório não é conhecido, uma transmissão antropônica é suspeita. Os animais domésticos e animais selvagens são identificados como os reservatórios dos parasitas *Leishmania*, enquanto os vetores para a doença têm sido caracterizados como os insetos voadores, fêmeas do gênero *Phlebotomus* (Leishmaniose do velho mundo) e *Lutzomyia* (Leishmaniose do novo mundo) (DÁVILA *et al.*, 1995). A transmissão acontece quando uma fêmea infectada passa o protozoário a uma vítima saudável, enquanto se alimenta de seu sangue. Tais vítimas, além do homem (**Figura 32**), são vários mamíferos silvestres (como a preguiça, o gambá e alguns roedores, dentre outros) e domésticos (cão, cavalo etc.). Os indivíduos infectados são conhecidos no meio científico como hospedeiros. Entre eles, alguns têm um papel preponderante na manutenção do parasito na natureza e são então chamados de reservatórios.



**FIGURA 32.** Ciclo evolutivo da leishmaniose

FONTE : [http://www.saudeanimal.com.br/imagens/leishmaniose\\_transmissao.jpg](http://www.saudeanimal.com.br/imagens/leishmaniose_transmissao.jpg)

No contexto epidemiológico, os reservatórios representam a principal fonte de infecção dos flebotomíneos que posteriormente transmitirão a doença ao homem (TEMPORAL, 2000).

#### **5.4. FORMAS CLÍNICAS**

Essa zoonose compreende 2 grupos: **Leishmaniose Tegumentar** e **Leishmaniose Visceral**. A Leishmaniose Tegumentar apresenta-se em três formas clínicas, leishmanioses cutânea, mucocutânea e difuso – cutânea.

##### **5.4.1 Leishmaniose cutânea**

São formas que produzem exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas (**Figura 33**) (BARTORI *et al.*,1986). Essa forma clínica da doença admitiu-se ser autóctone do Continente Americano. Gaspar Vianna, em 1991, propôs que o agente etiológico da leishmaniose cutânea é a *L. braziliensis* (VERONESI, 1991) ou complexo *L. braziliensis*.

Atualmente encontram-se identificadas seis espécies do gênero *Leishmania*, implicadas no aparecimento da Leishmaniose Tegumentar Americana ou Cutâneo-mucosa, assim discriminadas: *L. (Viannia) braziliensis*; *L. (Viannia) guyanensis*; *L. (Viannia) lainsoni*; *L. (Viannia) shawi*; *L. (Viannia) naiffi* e *L. (Leishmania) amazonensis*.



**FIGURA 33.** Lesão ulcerosa de Leishmaniose cutânea  
Fonte: [www.fiocruz.br/](http://www.fiocruz.br/)

No Brasil, nos últimos 25 anos (entre 1980 e 2005), foram registrados 671.225 casos da doença concentrados nos dois tipos: visceral e tegumentar. O tipo visceral é considerado endêmico no país, atingindo pessoas em 19 dos 26 Estados brasileiros, enquanto a tegumentar já foi registrada em todos os estados ([www.agenciabrasil.gov.br](http://www.agenciabrasil.gov.br)). A Região Sul apresenta o menor número de incidência (GUERRA, 2006). Na Amazônia, e em particular no Estado do Amazonas, a incidência da leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem se mantido elevada. A abertura de novas estradas, a instalação de núcleos residenciais em áreas de floresta e os treinamentos militares constituem fatores importantes na epidemiologia da leishmaniose (GUERRA *et al.*, 2003).

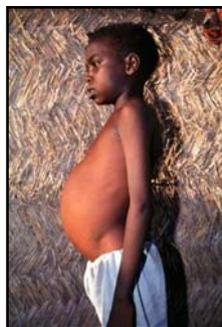
Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, apenas três países concentram 90% dos casos de leishmaniose no globo: Bolívia, Brasil e Peru. As autoridades brasileiras de saúde consideram o processo de contaminação em franca expansão, sendo que nas regiões Norte e Nordeste estão concentrados 73% dos casos do tipo mucocutânea.

#### **5.4.2 Leishmaniose visceral ou calazar**

É a forma clínica mais grave, podendo causar a morte se não for tratada. Causa efeito nos órgãos internos principalmente no fígado e baço (BARTORI *et al.*, 1986), causada pela

*L. donovani* e *L. infantum*, nos países do velho mundo e *L. chagasi*, nos países do novo mundo. É endêmica em muitas partes do mundo e afeta aproximadamente 15 milhões de pessoas (ASHFORD *et al.*, 1992). *L. donovani* vivem, sob a forma amastigota, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente nas células de Kupfler do fígado, nas células reticulares e macrófagos do baço, da medula óssea e dos gânglios linfáticos, que são órgãos mais ricos em células desse sistema; mas também nos rins, supra-renais, intestinos, pulmões e pele (MICHALICK, 2003), por atingir células maiores do nosso corpo esta espécie de *Leishmania* é considerada maligna de todas as formas clínicas.

A Leishmaniose visceral provoca febre, ascite (barriga d'água) (**Figura 34**), hepatomegalia (grande fígado), esplenomegalia (aumento do baço), emagrecimento, complicações cardíacas e circulatórias.



**FIGURA 34.** Leishmaniose visceral  
Fonte: <http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/lei13>.

## 5.5. FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Historicamente, a quimioterapia da leishmaniose tem sido baseada no uso de metais pesados tóxicos, particularmente em compostos de antimônio (CHAN – BACAB E PENA – RODRIGUEZ, 2001). Quando esta espécie de tratamento não é eficaz, outros medicamentos

são utilizados incluindo pentamidina e anfotericina B. Todos esses medicamentos são injetáveis, com várias aplicações, necessitando de supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento devido aos possíveis efeitos secundários como náuseas, vômitos, febre, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas (GONTIJO *et al.*, 2003).

Os agentes leishmanicidas com mais favoráveis índices terapêuticos são os compostos de antimônios conhecidos como antimoniais: estilbogliconato de sódio (Pentostam) e antimoniato de meglumina (Glucantime) conhecidos como drogas de primeira linha (**Figura 35**). A eficácia de uma das atuais drogas de primeira linha, estilbogliconato de sódio (Pentostam) foi comprovada há mais de 50 anos. A forma genérica de Pentostam produzida na Índia é mais barata que a versão original da droga e mostrou-se segura e efetiva para o tratamento de leishmaniose visceral (MOORE *et al.*, 2001; RITMEIJER *et al.*, 2001). O mecanismo de ação dos antimoniais é baseado na interferência no processo bioenergético das formas amastigotas de *Leishmania*. O Sb V ao entrar na célula hospedeira atravessa a membrana fagolisossomal e age contra as formas amastigotas intracelulares, é bem provável que o Sb V seja convertido para a forma trivalente Sb III (primeiros antimoniais usados, são altamente tóxicos) sendo esta forma a responsável pelo apoptose do parasita (M. OUELLETTE *et al.*, 2004).

Quando alguns casos de leishmanioses não respondem a estes tipos de tratamento as chamadas drogas de segunda linha são as indicadas para o tratamento: pentamidina, anfotericina B e Miltefosina. A Anfotericina B (AnB) é uma droga antifúngica, interagindo com os esteróis da membrana do fungo, especialmente com o ergosterol. Como o fungo a *Leishmania* também possui uma membrana com esteróis, composta pelo ergosterol, e isso

provavelmente explica a eficácia de AnB contra a *Leishmania*. Este tipo de medicamento também é muito tóxico ocasionando alteração na função renal dos pacientes tratados.

A Pentamidina é um aromático derivado da diamina, tóxico para um grande número de protozoários parasitas, é usada para tratamento de casos de leishmaniose visceral. Contudo a eficácia da pentamidina está decaído na Índia, sugerindo que parasitas estão tornando-se resistentes (SUNDAR, 2001). A considerável toxicidade (hipertensão, hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade) associada com a pentamidina tem sempre restrição ao seu uso (M. OUELLETTE *et al.*, 2004).

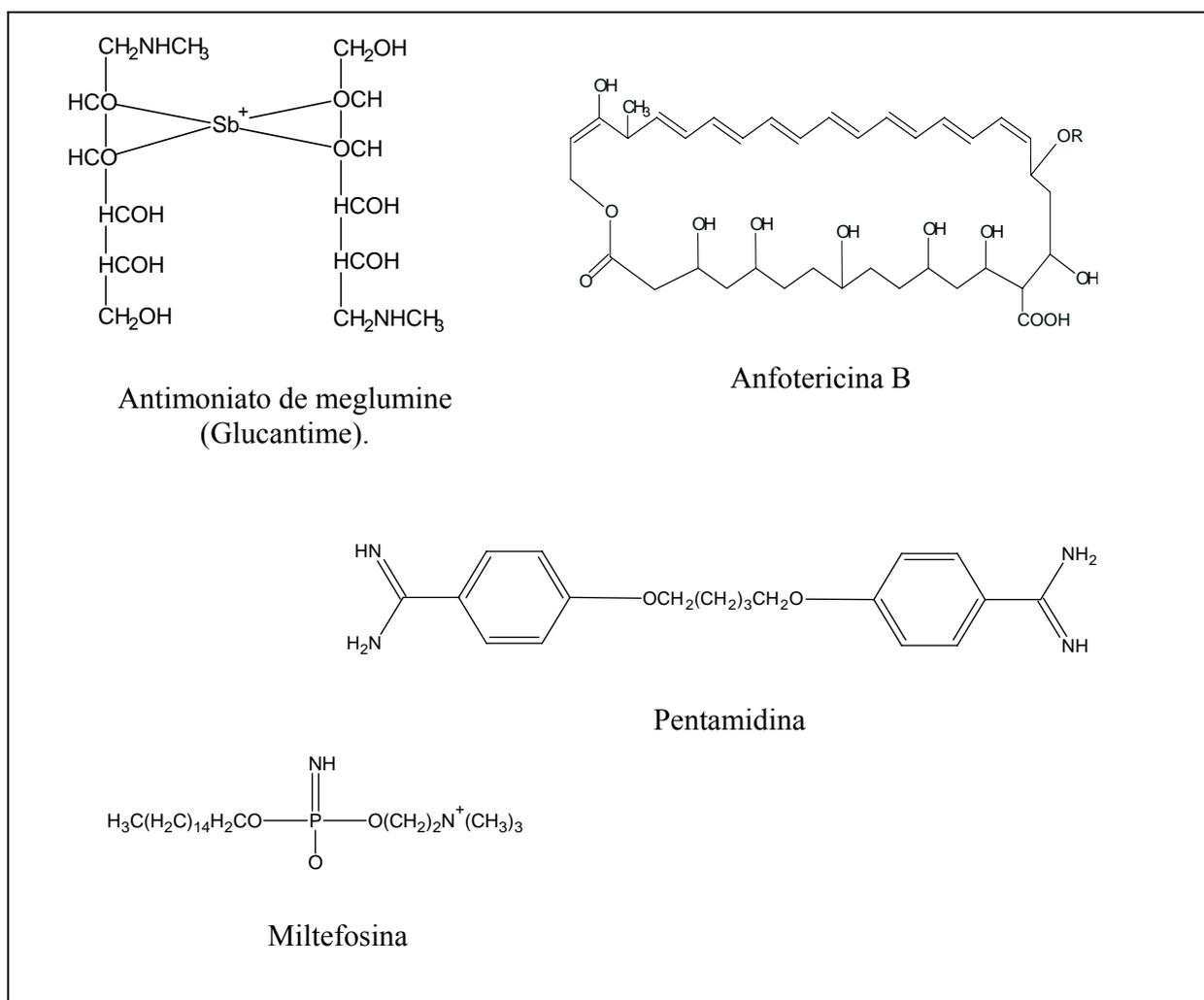


FIGURA 35. Drogas usadas no tratamento de Leishmanioses

A miltefosina é um alquilfosfolípido inicialmente desenvolvido com agente antitumoral. Miltefosina mostrou primeiro ser ativa contra *L. donovani* “in vitro” (CROFT *et al.*, 1987) e rapidamente mostrou em estudos ter favorável ação terapêutica para leishmania visceral indiana (M. OUELLETTE *et al.*, 2004). Estudos revelaram que a administração da miltefosina via oral foi altamente ativa contra leishmaniose visceral (SUNDAR, 2001) e isto pode ser considerado o maior avanço da quimioterapia anti-leishmanial.

Em virtude dos tratamentos atuais causarem sérios efeitos colaterais, vários estudos estão sendo direcionados na descoberta de novos medicamentos. Uma alternativa é proveniente da pesquisa com plantas medicinais, a partir da etnofarmacologia. Alguns dos métodos populares mais utilizados consistem na administração oral dos extratos brutos das plantas (chás) e na preparação tópica dos correspondentes extratos no tratamento de infecções de pele (IWU *et al.*, 1994). Outros métodos populares fazem uso de ácidos e de aquecimento no local afetado (BERMAN, 1988), contudo, geralmente, a medicina tradicional inclui o uso de plantas nativas. A busca de novos e melhores agentes farmacêuticos de alta eficiência e baixa toxicidade levaram o programa de doenças tropicais da Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar a investigação de plantas usadas nas práticas da medicina tradicional para o tratamento da leishmaniose como essencial e de alta prioridade. Diante dessas premissas, a presente dissertação apresenta os resultados da avaliação das espécies *Vismia cayennensis* (Clusiaceae), *Piper duckei* e *P. demeraranum* (Piperaceae) em seus aspectos farmacológicos, relacionados à identificação de substâncias ativas contra as formas promastigotas e formas amastigotas do gênero *Leishmania*.

## **5.6 MATERIAS E MÉTODOS**

### **5.6.1 Testes *in vitro* da atividade leishmanicida**

Os ensaios de atividade leishmanicida foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, do Departamento de Imunologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), sob orientação da Dra. Leonor Laura Pinto Leon.

### **5.6.2 Parasitas utilizados**

Foram utilizadas cepas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77LTB0016) doada pela Dr. Suzane Corte-Real- Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular – Instituto Oswaldo Cruz – FioCruz, e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/95/IOCL-2092/IM4216) cedidos pela Dra. Antônia Maria Ramos Franco, do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (CPCS/INPA), previamente caracterizadas pela técnica molecular de eletroforese de isoenzimas.

### **5.6.3 Amostras**

Os extratos brutos e substâncias isoladas (10 mg/mL), dissolvidos em DMSO, de *V. cayennensis*, e os óleos essenciais de *P. duckei* e *P. demeraranum* foram preparados e posteriormente diluídos nas concentrações 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31 e 0.16 µg/mL.

Para as substâncias puras foram testadas nas mesmas concentrações mencionadas acima, porém a solução estoque preparada foi inferior a 1 mL, devido a pouca quantidade de substâncias isoladas.

#### **5.6.4 Cultivo *in vitro* de promastigotas**

As formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, obtidas a partir de formas amastigotas de lesões de humanos infectados, foram mantidas, através de passagens semanais, como promastigotas, consecutivas a 26°C em estufa, utilizando-se meio de cultura bifásico. Como fase sólida foi usado o meio NNN (NOVY, MACNEAL, 1904 & NICOLLE, 1908), constituído de ágar com 15% de sangue desfibrinado de coelho e como fase líquida meio Schneider (Schneider's Insect Medium; Sigma Cell Culture, St. Louis, MO, USA), suplementado como 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, e estéril (Sigma Cell Culture, St. Louis, MO, USA) para *Leishmania amazonensis*, para cepas de *Leishmania guyanensis* o meio foi suplementado com 2% de urina humana esterilizada.

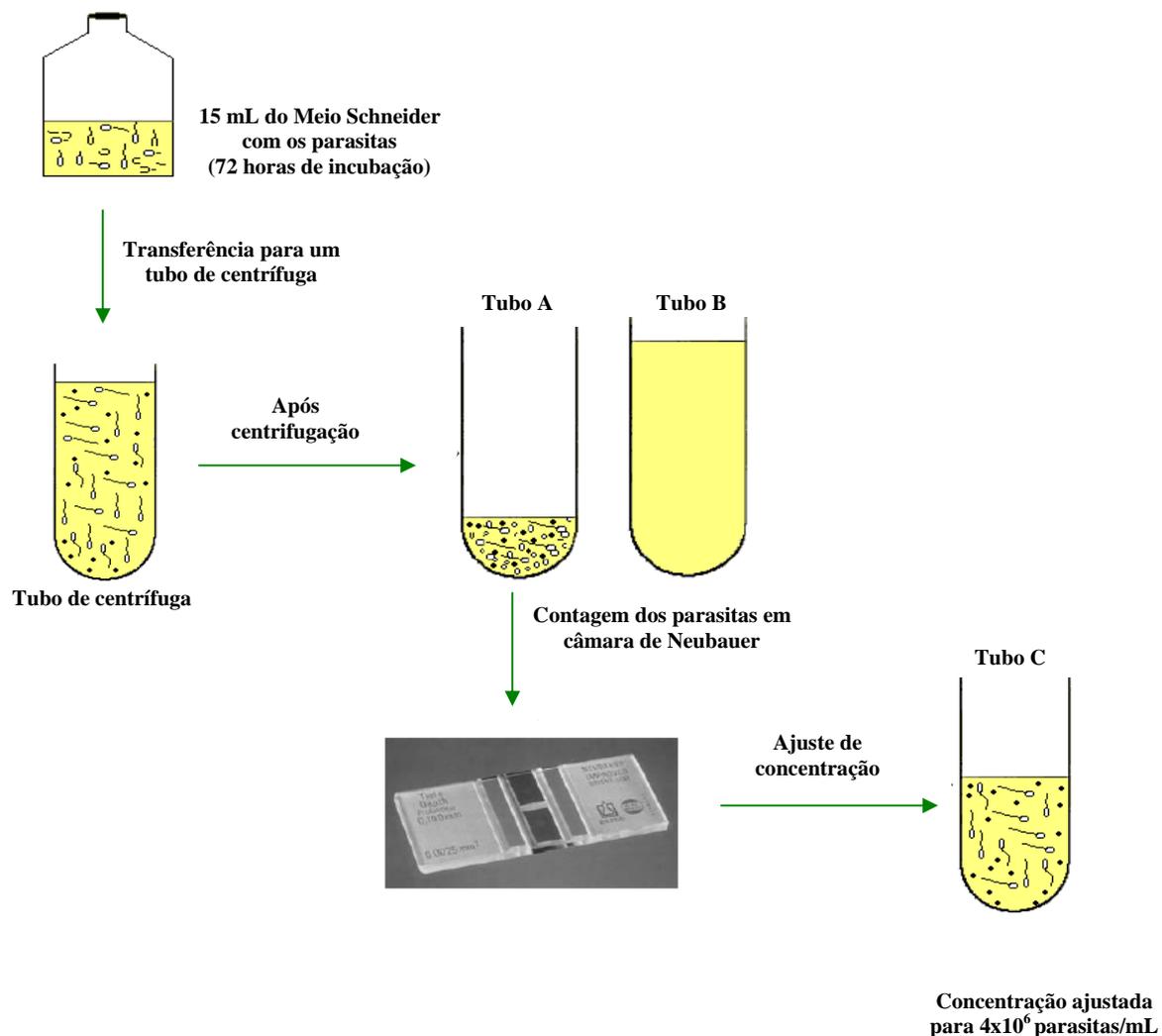
Retirou-se 1 mL do meio de cultura, mencionado anteriormente, para um frasco contendo 15 mL de meio Schneider, pH 7,2. Este frasco foi incubado em uma estufa por 72 horas a uma temperatura de 26°C.

#### **5.6.5 Ajuste da concentração parasitária**

As cepas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* foram ajustadas para concentração de  $4,0 \times 10^6$  parasitas/mL de meio de cultura, através da contagem dos parasitas pela câmara de Neubauer.

Os parasitas foram separados do meio de cultura, por 15 minutos de centrifugação a 4° e 4000 rpm. A fase líquida foi transferida para outro tubo de centrífuga (Tubo B) e os parasitas (*pellet*) permaneceram no tubo de origem (Tubo A).

Ao Tubo A foi adicionado 1 mL do sobrenadante (ressuspensão). Desta diluição, foi realizada a contagem dos parasitas, através da câmara de Neubauer, e calculado o volume a ser transferido do tubo A e do tubo B para um tubo C, para a obtenção de um meio contendo de  $4,0 \times 10^6$  parasitas/mL (**Esquema 6**).

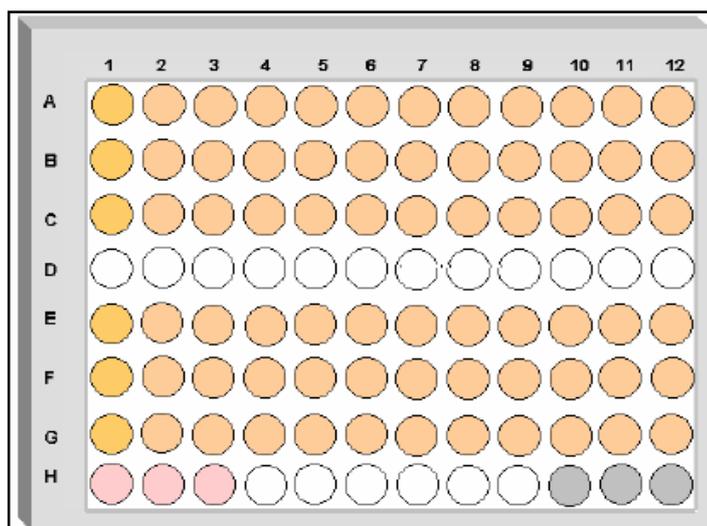


**Esquema 6:** Ajuste da concentração parasitária a ser utilizada no teste *in vitro* da atividade leishmanicida.

### 5.6.6 Montagem da placa de microtitulação

Para a montagem da placa de microtitulação de 96 poços (**Figura 36**), foram colocados 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante (Tubo B) nos primeiros poços de cada fileira da placa e 100  $\mu\text{L}$  nos demais poços, incluindo os poços controles (poços da linha H da placa). Nos primeiros poços foi retirado um volume de 6,4  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, sendo substituído o mesmo volume pelas amostras dissolvidas em DMSO (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA). O primeiro poço da primeira fileira foi homogeneizado e, em seguida, foram retirados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão, transferindo-se às próximas fileiras, em sucessivas diluições, até a última, da qual o volume de 100  $\mu\text{L}$  foi descartado. Um inóculo de 100  $\mu\text{L}$  do parasita será misturado ao sobrenadante e adicionado a todos os poços da placa.

Após 24 horas de incubação a 26°C, os valores das  $DL_{50/24 \text{ horas}}$  foram determinados pela contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e comparados numericamente com os controles: (a) DMSO contendo os parasitas sem as drogas e (b) os parasitas sozinhos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, usando a Pentamidina como droga de referência.



**FIGURA 36.** Placa de microtitulação de 96 poços utilizada para o teste *in vitro* da atividade leishmanicida.

### **5.6.7 Leitura espectrométrica.**

Outra metodologia empregada para a determinação dos valores das DL<sub>50/24 horas</sub> foi empregando-se um método colorimétrico baseado na redução de sódio-2,3-bis-[2-métoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2-H-tetrazólio-5-carboxilanido (XTT) pela enzima dehidrogenase do parasita.

Após as 24 horas de incubação a 26° C, foram adicionados aos poços 50 µL de PBS (contendo 1,48 mM de XTT ativado com 200 µM de metossulfato de fenazina – PMS, Sigma), depois de 2 h de incubação em estufa a uma temperatura de 37°C os valores de DO (densidade óptica) foram obtidos em espectrofotômetro (µ Quant<sup>TM</sup> Universal Microplate Spectrophometer – marca: Bio Tek Instruments, Inc. Highland Park, P.O. Box 998; Winooski, Vermont 05404-0998 USA) em intervalos de comprimento de onda de 450 nm a 650 nm.

## **5.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS**

Os macrófagos foram retirados da cavidade intraperitoneal de camundongos e mantidos em meio RPMI + 10% de Soro fetal bovino (SFB). A formulação do meio RPMI utiliza um sistema de tamponamento com bicarbonato, concentrações modificadas de aminoácidos essenciais e vitaminas para estimular o crescimento celular. O meio RPMI tem sido utilizado na cultura de células humanas, suplementado com 10% de soro fetal bovino e distribuídas em placas de 96 poços com 4x10<sup>6</sup>/ 100 µl (Volume 200 µl/ poço). Após o ajuste das células em tubo de centrifugação adicionou-se 100 µl do SN + macrófagos (MΦ) na placa esterilizada.

Após 2 horas de aderência dos MΦ, lavou-se a placa para retirada de células não aderidas (RPMI), posteriormente adicionou-se 100 µl das drogas diluídas em RPMI + 10% de SFB já com suas devidas concentrações. Foram submetidos à avaliação citotóxica os óleos essenciais de *P. duckei* e *P. demeraranum*, as substâncias isoladas dos frutos de *V. cayennensis*, codificadas como: **FV 15\_23/ 9a** e **FV 15\_23/ 18a**. A placa foi levada a incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 24 horas. Após 24 horas lavou-se novamente a placa com o meio RPMI + 10% SFB.

As células foram analisadas pelo método do MTT, que consiste na avaliação de crescimento e sobrevivência celular usando corante Brometo de 3-(4,5 dimetiliazol – 2il)-2,5-difenil-tetrazoliu ou “Methy Thiazolyl Blue”, que é um sal tetrazódio, de fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>SBr que detecta somente células metabolicamente ativas. Este corante apresenta coloração amarela, mas quando é adicionado às células vivas, sofre clivagem por enzimas desidrogenases, passando a apresentar cor azul escuro, de intensidade proporcional a concentração metabolismo celular. Faz-se em seguida leitura em um espectrofotômetro a 570 nm e, a coloração azul obtida, é diretamente proporcional ao número de células vivas.

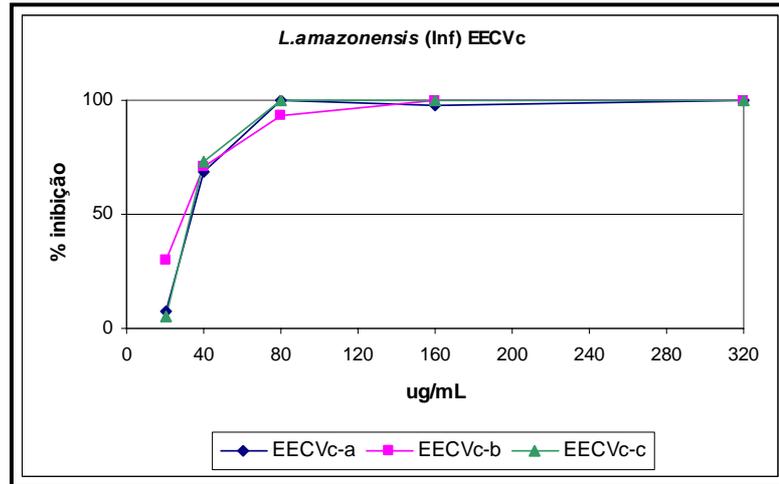
## 5.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos brutos das cascas e o extrato clorofórmico dos frutos obtidos de *V. cayennensis*, juntamente com os óleos essenciais de *P. duckei* e *P. demeraranum* foram avaliados em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Foi utilizada a Pentamidina como droga de referência. Os ensaios biológicos foram realizados após 24 h de incubação dos parasitas, os quais foram contados em câmara de Neubauer e/ou identificados pelo método espectrométrico com o reagente XTT (**Materiais de Métodos, pg. 139**).

### 5.8.1 Avaliação da atividade leishmanicida dos extratos das cascas de *V. cayennensis*

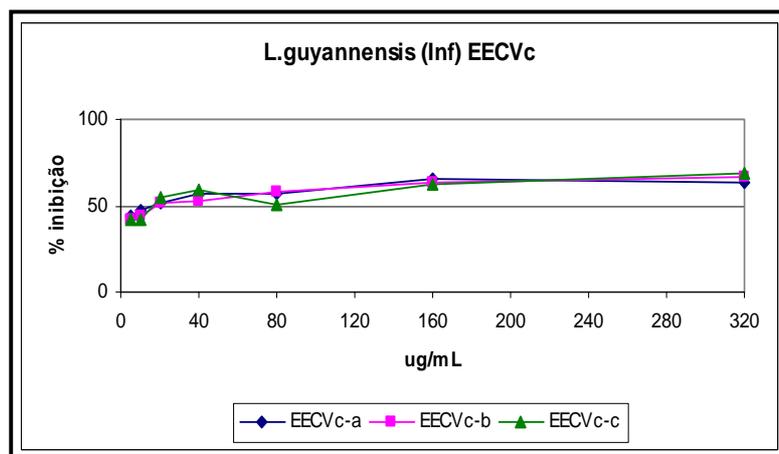
O extrato etanólico obtido das cascas de *V. cayennensis*, codificado como EECVc, foi submetido ao teste de avaliação leishmanicida.

O fracionamento do EECVc foi monitorado por bioensaio com o intuito de identificar as substâncias relacionadas ao uso popular atribuído a planta, o EECVc foi submetido aos processos clássicos de partição partição (**Materiais e Métodos p. 57**). O extrato bruto (EECVc) mostrou inibição superior a 50 % na concentração de 40 µg/mL, a  $DL_{50}$ , calculada utilizando o programa Microsoft Excel, foi de **32,6 µg/mL (gráfico 1)**. Cerca de 95,3 % de inibição das cepas foi determinado na concentração de 160 µg/mL, em concentrações superiores a inibição foi de 100% dos parasitas.



**GRÁFICO 1.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato EECVc contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

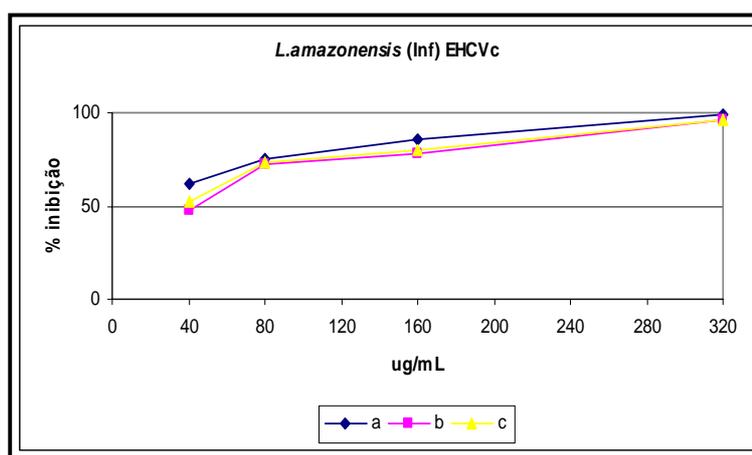
O gráfico 2 avalia a atividade leishmanicida frente as cepas de *L. guyanensis*, observou-se que o extrato apresentou inibição acima de 50% na concentração de 16 µg/mL, apesar de nenhuma das concentrações ter matado 100% dos parasitas a DL<sub>50</sub> foi muito menor (16,6 µg/mL) quando comparada com a DL<sub>50</sub> de *L. amazonensis*.



**GRÁFICO 2.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato EECVc contra as formas promastigotas de *L. guyanensis*.

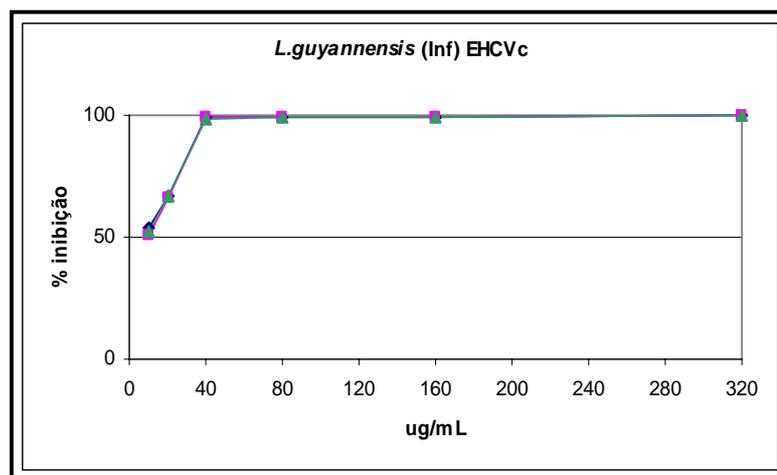
Estudos fitoquímicos anteriores sobre espécies de *Vismia* revelam a presença de metabólicos fenólicos, como, flavonóides, antraquinonas, vismiaquinonas, xantonas e antranóides prenilados (NAGEM *et al.*, 1996). Estas substâncias são muito promissoras em diversas atividades farmacológicas, como, antioxidante, fungicida, antimicrobiana, dentre outras (FULLER *et al.*, 1999).

A fração hexânica codificado como **EHCVc (Materiais e Métodos, pg. 59)**, mostrou inibição de 50% das cepas de *L. amazonensis* na concentração **32,4 µg/mL (gráfico 3)**. Na concentração 320 µg/mL a fração inibiu 100 % dos parasitas.



**GRÁFICO 3.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato EHCVc contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Para *L. guyanensis* (**Gráfico 4**) observou-se que o extrato apresentou inibição acima de 50% na concentração de 10 µg/mL, e 100% de inibição nas concentrações superiores a 40 µg/mL, sua  $DL_{50}$  foi de **9,1 µg/mL**.

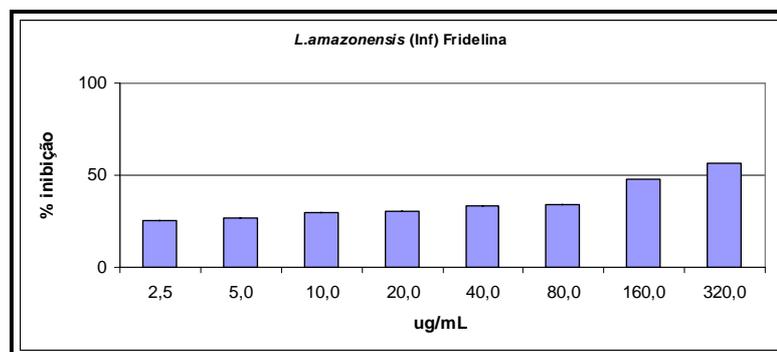


**GRÁFICO 4.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato EHCVc contra as formas promastigotas de *L. guyanensis*.

A abordagem fitoquímica, revelou a presença de sesquiterpenos, triterpenos e antraquinona (**Resultados e discussão, pg. 69**). Compostos correspondentes a estas classes metabólicas são citadas na literatura por sua atividade leishmanicida (MOWAMBO *et al.*, 2004). Sobre as antraquinonas já é conhecida sua atividade antileishmanial relatado por Simões e colaboradores, 1999; os triterpenóides apresentam um potente inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* a 100 µg/mL (SANTOS *et al.*, 2004), além da alta atividade contra as formas amastigotas intracelular.

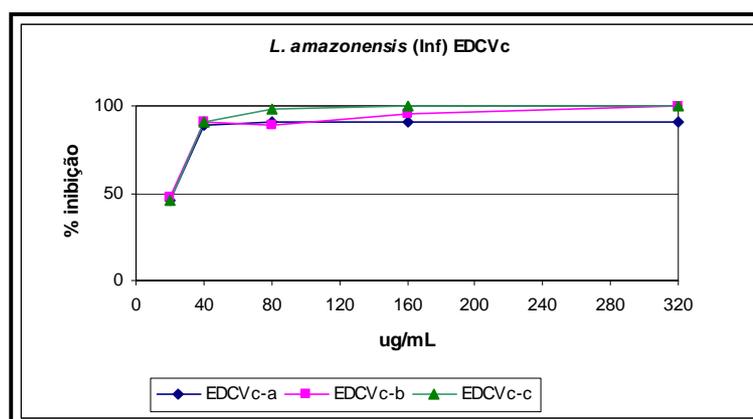
Com o intuito de identificar a(s) substância(s) responsáveis ao expressivo resultado, o EHCVc foi submetido a purificação sucessivas em coluna de gel de sílica (**Materiais e Métodos, pg. 59**), resultando em várias subfrações (**Materiais e Métodos, pg. 60**). A análise por IV, CG/EM, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da fração **FH12A** permitiram a identificação do triterpeno Fridelina.

A Fridelina, avaliada nas formas promastigotas de *L.amazonensis*, apresentou moderada atividade (**Gráfico 5**), na maior concentração testada a droga inibiu 56% dos parasitas, a DL<sub>50</sub> foi calculada em **231,21 µg/mL**.



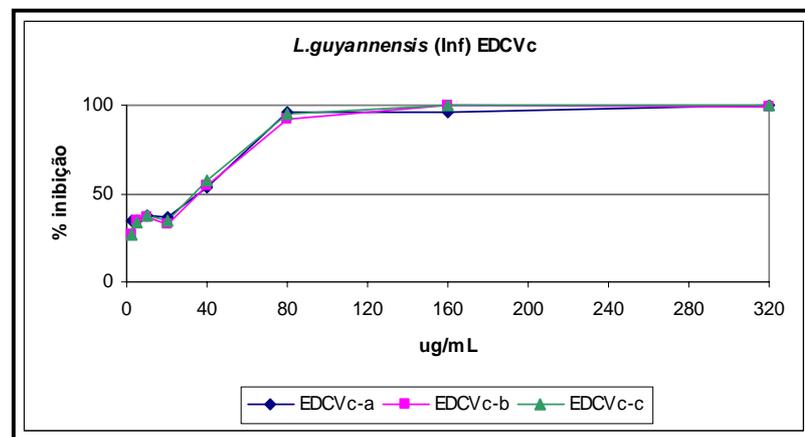
**GRÁFICO 5.** Avaliação da atividade Leishmanicida da fridelina contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

A fração diclorometano codificado como **EDCVc (Materiais e Métodos, pg. 58)**, avaliado contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresentou inibição superior a 50% na concentração de 20 µg/mL e cerca de 95,3% de inibição na concentração de 160 µg/mL. A DL<sub>50</sub> determinada foi de **20,9 µg/mL (Gráfico 6)**.



**GRÁFICO 6.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato EDCVc contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

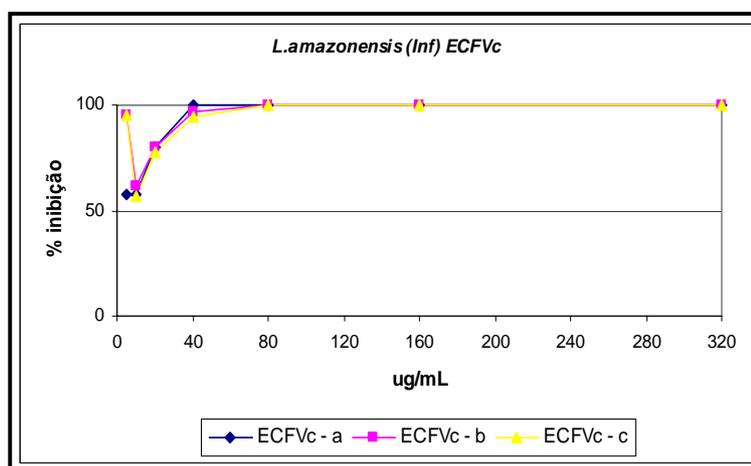
A avaliação frente às cepas de *Leishmania guyanensis* (**Gráfico 7**) observou-se que o extrato apresentou inibição acima de 50% na concentração de 40 µg/mL e 100 % de inibição na concentração de 160 µg/mL, sua DL<sub>50</sub> foi **34,1 µg/mL** Segundo Monache 1980, os extratos de média polaridade da espécie, apresentam em sua composição a presença de quinonas, vismionas e antranóides, sendo possivelmente os principais responsáveis pela atividade leishmanicida.



**GRÁFICO 7.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato EDCVc contra as formas promastigotas de *L. guyanensis*.

### 5.8.2 Avaliação da atividade leishmanicida do extrato clorofórmico obtido dos frutos de *V. cayennensis*

O extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis*, codificado como **ECFVc**, apresentou forte atividade frente as formas promastigotas de *L. amazonensis* (**Gráfico 8**), nas concentrações a partir de 40  $\mu\text{g/mL}$  foi verificado 100% de inibição no crescimento dos parasitas. O extrato apresentou  $\text{DL}_{50}$  de **8,9  $\mu\text{g/mL}$** .

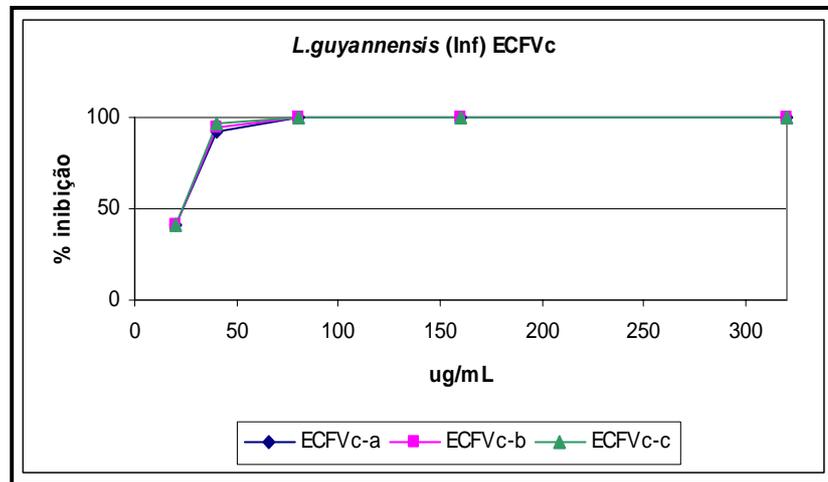


**GRÁFICO 8.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato ECFVc contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Enquanto que *L. guyanensis* (**Gráfico 9**) apresentou inibição de 100% de morte dos parasitas a partir de 80  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{DL}_{50} = 19,7 \mu\text{g/mL}$ .

Extratos clorofórmicos de espécies do gênero *Vismia* apresentam em sua composição Xantonas, Antranóides, Benzofenonas (SEO *et al.*, 2000), Vismionas, Flavonóides

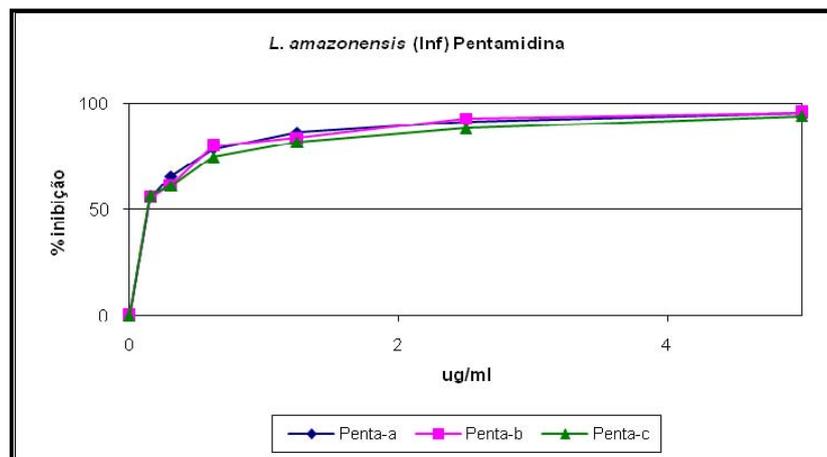
(MONACHE *et al*, 1985) Acredita-se que a atividade leishmanicida esteja relacionada com a presença dessas substâncias.



**GRÁFICO 9.** Avaliação da atividade Leishmanicida do extrato ECFVc contra as formas promastigotas de *L. guyanensis*.

### 5.8.3 Avaliação da atividade leishmanicida da droga de referência – Pentamidina.

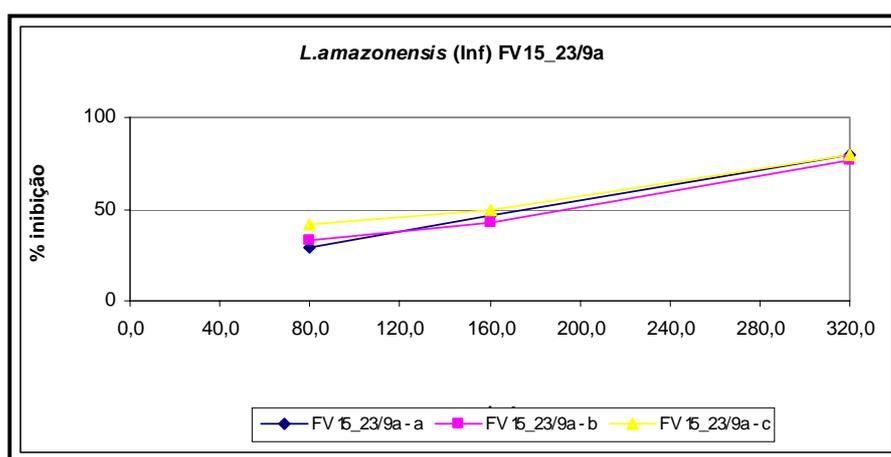
A atividade leishmanicida da pentamidina (**Gráfico 10**) que apresentou uma  $DL_{50}$  de 0,1 µg/mL frente às cepas promastigotas.



**GRÁFICO 10.** Avaliação da atividade Leishmanicida da droga de referência – pentamidina contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

#### 5.8.4 Avaliação da atividade leishmanicida da substância FV 15\_23/ 9a frente as formas promastigotas de *L. amazonensis*

O **gráfico 11** exibe a atividade leishmanicida da substância FV 15\_23/9a, contra *Leishmania amazonensis*. Conforme observado, a substância apresentou moderada atividade. Na maior concentração testada (320 µg/mL) o extrato demonstrou inibição de 78% de parasitas, na concentração de 160 µg/mL a porcentagem de inibição foi menor que 50%, a DL<sub>50</sub> encontrada foi de **178,3 µg/mL**.

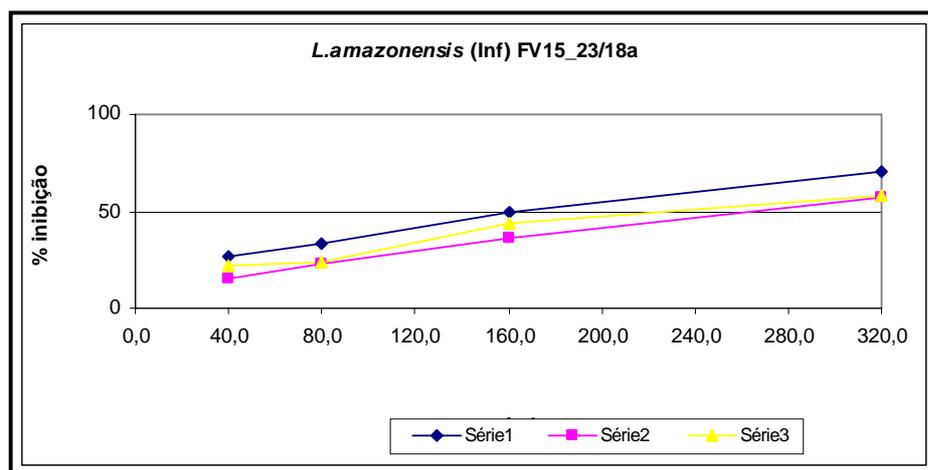


**GRÁFICO 11.** Avaliação da atividade Leishmanicida da substância FV 15\_23/ 9a (**Ferruginina**) contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

#### 5.8.5 Avaliação da atividade leishmanicida da substância FV 15\_23/ 18a frente as formas promastigotas de *L. amazonensis*

O **gráfico 12** exibe a atividade leishmanicida da substância FV 15\_23/18a, contra *Leishmania amazonensis*. Conforme observado, a substância apresentou moderada atividade.

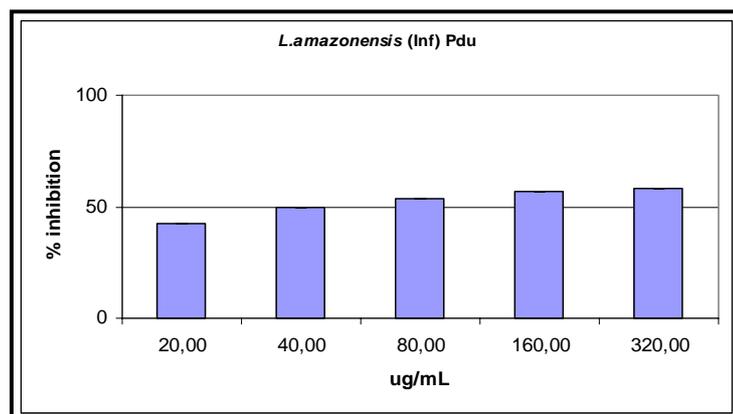
Na maior concentração testada (320 µg/mL) o extrato demonstrou inibição de 78% de parasitas, na concentração de 160 µg/mL a porcentagem de inibição foi menor que 50%, a DL<sub>50</sub> encontrada foi de **214,8 µg/mL**.



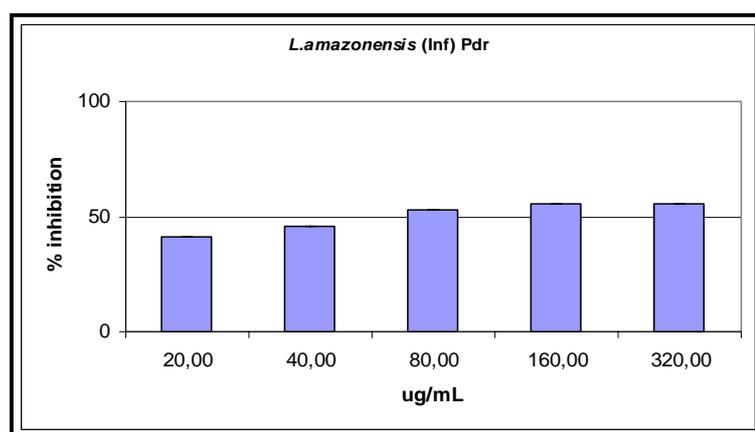
**GRÁFICO 12.** Avaliação da atividade Leishmanicida da substância FV 15\_23/ 18a (**Vismina**) contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

### 5.8.6 Avaliação da atividade leishmanicida dos óleos essenciais de *P. duckei* e *P. demeraranum*

A atividade leishmanicida frente às cepas de *L. amazonensis*, como evidencia a **tabela 10, pg. 154**, as duas espécies de *piper* apresentaram inibição acima de 50%. Para a espécie *P. duckei* (**Gráfico 13**) apresentou inibição de 50% dos parasitas na concentração em torno de 70 µg/mL, enquanto a espécie *P. demeraranum* (**Gráfico 14**) a DL<sub>50</sub> foi de **91,51 µg/mL**.

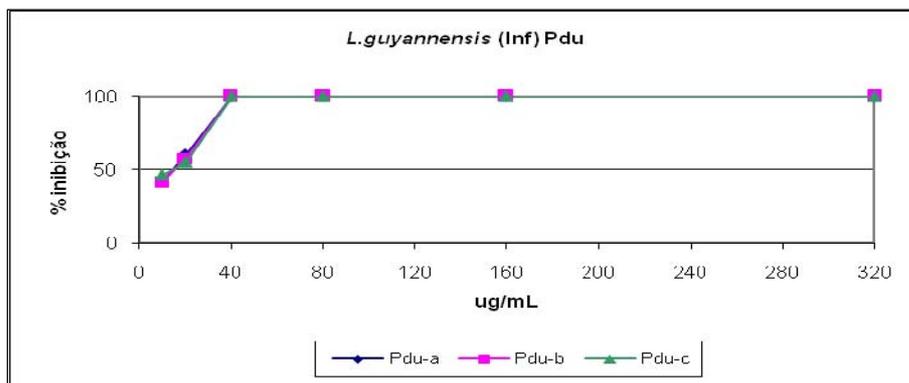


**GRÁFICO 13.** Avaliação da atividade Leishmanicida do óleo essencial de *P. duckei* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

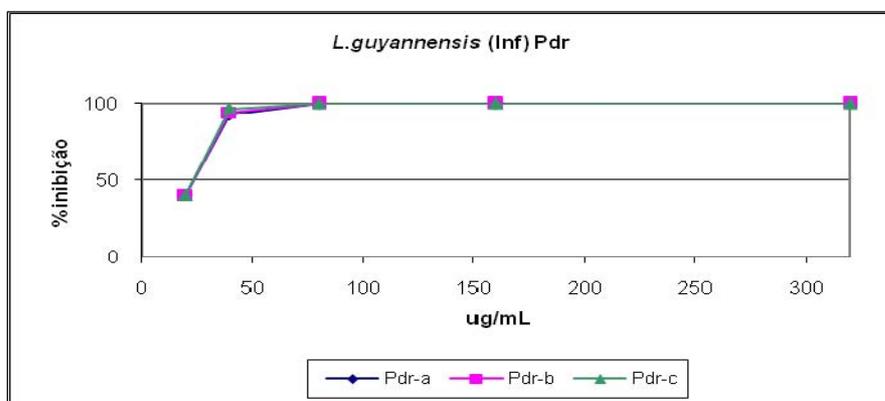


**GRÁFICO 14.** Avaliação da atividade Leishmanicida do óleo essencial de *P. demeraranum* contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Os óleos essenciais mostraram uma pronunciada atividade leishmanicida em *L. guyanensis*, a DL<sub>50</sub> foi de 15,2 µg/mL para *P. duckei* (**Gráfico 15**), e 22,7µg/mL para *P. demeraranum* (**Gráfico 16**).



**GRÁFICO 15.** Avaliação da atividade Leishmanicida do óleo essencial de *P. duckei* contra as formas promastigotas de *Leishmania guyannensis*.



**GRÁFICO 16.** Avaliação da atividade Leishmanicida do óleo essencial de *P. demeraranum* contra as formas promastigotas de *Leishmania guyannensis*.

**TABELA 10.** Efeito de *Piper duckei* e *Piper demeraranum* sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*.

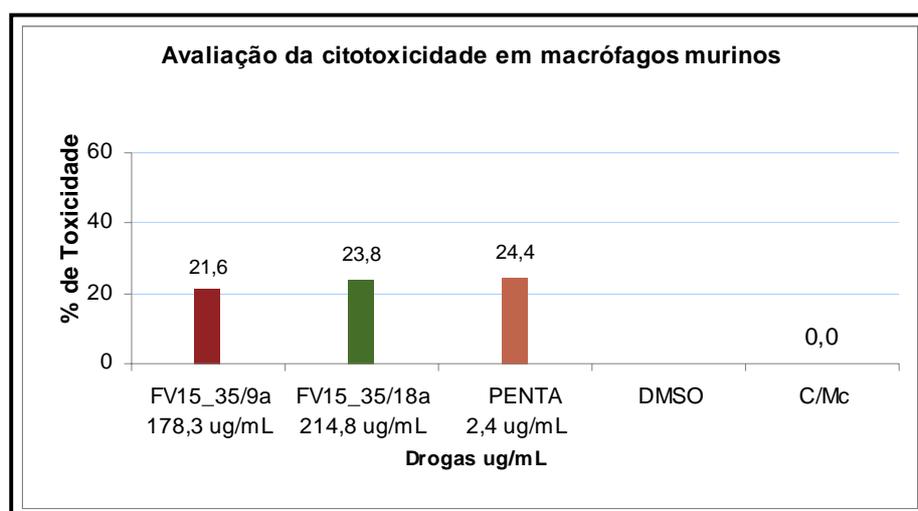
Cepas	Designação	Espécies	<i>P. duckei</i> <sup>a</sup> DL <sub>50</sub> (µg/mL)	<i>P. demeraranum</i> <sup>a</sup> DL <sub>50</sub> (µg/mL)
LTB0016	MHOM/BR/77LTB0016	<i>L. amazonensis</i>	69,78	91,51
IM4216	MHOM/BR/95/IOCL-2092/IM4216	<i>L. guyanensis</i>	15,2 ± 0,9	22,7

<sup>a</sup>Poços (4x10<sup>6</sup>/ 200µl/poço) foram incubados com aumento de concentração das drogas por 48h a 26°C, o ensaio e valores de DL<sub>50</sub> values foram realizados conforme descrito em materiais e métodos.

### 5.8.7 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos das substâncias FV 15\_23/ 9a e FV 15\_23/ 18a.

As frações FV 15\_23/ 9a e FV 15\_23/ 18a, identificadas e elucidadas por técnicas cromatográficas, como sendo os antranóides prenilados, **Ferruginina** e **Vismina**, respectivamente. Foram avaliadas nas concentrações de **178,3 µg/mL** e **214,8 µg/mL**, apresentando um valor de toxicidade em células macrófagos em torno de 21,6 % e 23,8%, respectivamente (**Gráfico 17**). A droga de referência, pentamidina, foi avaliada na concentração de **2,4 µg/mL**, apresentando um valor de citotoxicidade de 24,4%.

A pentamidina apresentou uma citotoxicidade maior, conforme esperado (M. OUELLETTE *et al.*, 2004) em relação as substâncias testadas. A droga de referência foi avaliada em uma concentração bastante inferior em relação as concentrações de Vismina e Ferruginina, o que representa um baixo nível de citotoxicidade dessas substâncias. Um dado relevante na possibilidade de redução de efeitos colaterais dos potenciais fármacos.



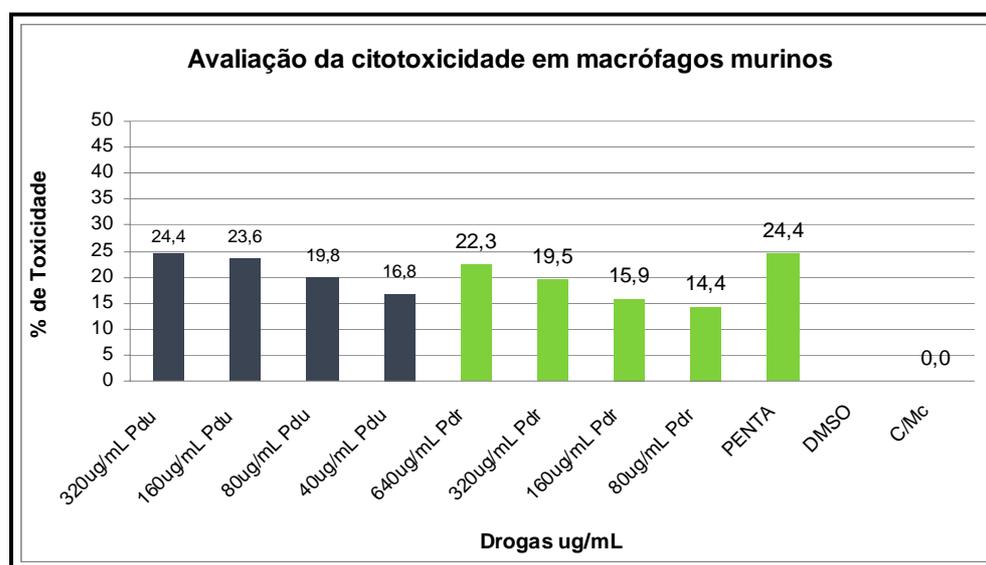
**GRÁFICO 17.** Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos retirados da cavidade intraperitoneal de camundongos das substâncias FV 15\_23/ 9a e FV 15\_23/ 18a.

### 5.8.8 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos dos óleos essenciais de

#### *P. duckei* e *P. demeraranum*

O óleo essencial de *Piper duckei* foi avaliado em 4 concentrações diferentes, seus valores de citotoxicidade foram inferiores a droga de referência (**Gráfico 18**), exceto para maior concentração de **320 µg/mL** que apresentou mesmo valor, vale ressaltar que a pentamidina revelou citotoxicidade de 24,4 % na concentração de **2,4 µg/mL**, o que sugere a baixa citotoxicidade do óleo essencial de Pdu.

O óleo essencial de *Piper demeraranum* foi avaliado em 5 concentrações diferentes, todos seu valores de citotoxicidade foram inferiores a pentamidina, portanto o óleo desta espécie é de menor citotoxicidade em relação ao óleo essencial de *Piper duckei*.



**GRÁFICO 18.** Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos dos óleos essenciais de *P. duckei* e *P. demeraranum*.

## 5.9 HET - CAM

O ensaio de HET-CAM (Hen's egg test - chorioallantoic), tem como objetivo avaliar semi-quantitativamente o potencial irritante de um produto sobre a membrana Cório-Alantóide de ovo embrionário de galinha. O ensaio é baseado na observação dos efeitos irritantes, após cinco minutos de aplicação do produto, puro ou diluído sobre a membrana cório-alantóide. O teste foi realizado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ-RJ) sob supervisão de **Eloísa Nunes Alves** e **Rosaura Farias Presgrave**.

HET-CAM tem sido extremamente usado para avaliar o potencial irritante de substâncias (LUEPKE, 1985). O ensaio utiliza ovos de galinha com idade de 10 dias fertilizados, a membrana que envolve o desenvolvimento do pinto ainda embrião é denominada de **membrana cório-Alantóide**, sendo altamente vascularizada (**Figura 37**) (BAGLEY *et al.*, 1991, 1992, 1994; FEDER *et al.*, 1991). O teste de HET – CAM é considerado por alguns pesquisadores um substituinte aceitável para o teste Draize de irritação ocular, em coelhos. O teste convencional de Draize preconiza o estudo quantitativo das lesões induzidas por produtos cosméticos na **conjuntiva**, **córnea** e **íris** do animal. O sistema HET – CAM é de fato uma passagem entre teste *in vitro* e em *in vivo* (LUEPKE, 1985) e prova ser especialmente capaz de simular um perfil farmacocinético (especialmente absorção) das substâncias testadas.

O método HET – CAM tem sido estudado extensivamente nos Estados Unidos e na Europa como o principal ensaio de medição da irritação cutânea de substâncias e extratos aquosos de plantas (WILSON, 2000).



**FIGURA 37.** Membrana cório-Alantóide

### **5.9.1 Materiais e Métodos**

#### ***Preparação do ensaio – ovos de galinha***

Ovos de galinha frescos e férteis foram postos imediatamente dentro de uma incubadora com um dispositivo de rotação automática, sendo mantida a temperatura em  $37,5 \pm 0,5$  °C e uma relativa umidade de  $62,5 \pm 7,5$  % por um período de 10 dias. Os ovos não fertilizados, ou não contendo um embrião vivo, foram descartados, os restantes foram então pesados, somente ovos com peso em torno de 50 a 60 g foram usados. Uma vez pesados, os ovos retornaram para a incubadora e mantidos até o uso. Para cada teste, três ovos foram usados e dos três dados foram realizados os cálculos para a determinação do poder anti-irritante.

#### ***Amostras testadas***

Foram testados os óleos das folhas de *P. demeraranum* e *P. duckei*, codificados como **Pdr** e **Pdu**, respectivamente. As amostras testadas foram dissolvidas em DMSO e gotejadas sobre a membrana em um volume de 0,2 mL, seguidas do controle positivo (Lauril Sulfato de

Sódio 1%), e um controle negativo, água destilada. Para cada amostra testada 3 ovos foram usados. Depois da aplicação da amostra, o CAM, as veias sanguíneas, incluindo o sistema capilar, e a albumina foram examinados por 5 minutos, observações superiores a 5 minutos não acrescentaram nenhuma informação. O tempo de aparência, medidos em segundos de cada efeito irritante (vasoconstrição, hemorragia, coagulação, congestão) foram registrados (LUEPKE, 1985). O índice de irritação foi calculado usando a seguinte fórmula:

$$\text{Potencial irritante} = (301 - H) \times 5 / 300 + (301 - V) \times 7/300 + (301 - C) \times 9/300$$

Onde  $H$  é o tempo (s) em que a hemorragia apareceu  $V$  é o tempo em que a vasoconstrição foi observada e  $C$  é o tempo (s) em que a coagulação foi primeiro notada.

A média das categorias (baseada em três ovos) foi calculada para cada amostra, e o material testado foi classificado dentro de quatro categorias: não – irritante (0,0 – 0,9) irritante leve (1,0 – 4,9), irritante moderado (5,0 – 8,9) e irritante altamente forte (9,0 – 21,0).

## 5.9.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas abaixo mostram os resultados do potencial irritante induzido pelos óleos essenciais, determinado pelo método HET-CAM. Na **tabela 11** apresentam os principais valores do tempo de aparência de cada efeito irritante (hemorragia, vasoconstrição e coagulação), os valores descritos representam a média de três experimentos independentes.

A água destilada é uma referência negativa sem indução irritante. A solução de Lauril sulfato de sódio a 1% induz uma intensa hemorragia, apresentando um potencial de irritação 15,42, sendo classificado como um irritante severo. O óleo essencial de *Piper duckei* apresentou em um tempo de  $t = 88,45s$  vasoconstrição e com intensa congestão (**Tabela 12**), porém após 5 minutos não foi notada hemorragia nem coagulação, o potencial de irritação foi calculado classificando o óleo como um irritante moderado.

**Tabela 11** – Potencial de irritação dos óleos essenciais em função da vasoconstrição, hemorragia e coagulação. De acordo com Spielmann *et AL.* 1996 ATLA, 24 741 – 858. Citado no trabalho de M.P. Vinardell (2006) Toxicology in Vitro 20 1066 – 1070.

Extratos	Tempo (segundo)			Potencial de irritação	Classificação
	Vasoconstrição	Hemorragia	Coagulação		
Controle (-)	0	0	0	0	Não irritante
PDU (4 µg)	88,45	0	0	4,96	Irritante leve
PDR (8 µg)	82,32	0	0	5,1	Irritante moderado
Controle (-) - água destilada					

O óleo essencial de *Piper demeraranum* apresentou em um tempo de  $t = 82,32s$  vasoconstrição, sem hemorragia e coagulação, porém com intensa congestão em um tempo  $t = 1,67s$ , o potencial de irritação foi calculado, o óleo também foi classificado como um irritante moderado.

Estes resultados incentivam a avaliação de novos estudos *in vivo*, como exemplo o teste Draize, para a obtenção de dados clínicos para futura aplicação topical dos óleos no tratamento da leishmaniose.

**Tabela 12** – Potencial de irritação dos óleos essenciais em função da congestão, hemorragia e coagulação – Metodologia Francesa Luepke 1985, Food Chemical Toxicology (23), 2 287 – 291.

Extratos	Notas			Potencial de irritação	Classificação
	Congestão	Hemorragia	Coagulação		
Controle (-)	0	0	0	0	Não irritante
Controle (+)	5	5,67	4,75	15,42	Irritante severo
PDU (4 µg)	1,83	0	0	4,96	Irritante leve
PDR (8 µg)	1,67	0	0	5,1	Irritante moderado

Controle (+) - Lauril sulfato de sódio a 1%

Controle (-) - água destilada

## **5.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *ARTEMIA SALINA* (TAS).**

As normas éticas internacionais com relação ao uso de animais de laboratório recomendam o uso criterioso destes animais, e o desenvolvimento de métodos alternativos tem ganhado evidência nestes últimos anos, Com este propósito, a padronização e implantação do bioensaio com *Artemia salina* foi objeto deste trabalho, para determinação da toxicidade de extratos, frações, substâncias e óleos essenciais e verificar as correlações com atividades farmacológicas (LOPES *et al.*, 1999).

Os ensaios biológicos de *Artemia salina* foram realizados no laboratório B08 de química de produtos naturais da Universidade Federal do Amazonas. É um ensaio simples, barato e eficiente de determinação da toxicidade aguda.

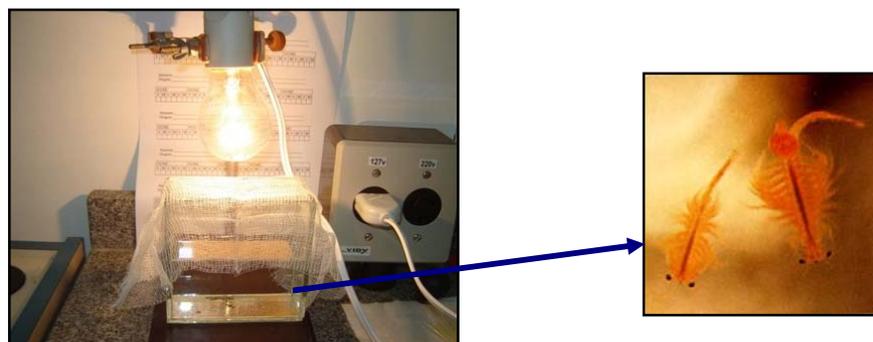
*Artemia salina* é um crustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo. Possui 4 estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie (VINATEA,1994). Essas “alternativas” ou modos de reprodução se referem à oviparidade, viviparidade, partenogênese e encistamento (diapausa), quando as condições ambientais são impróprias. Os indivíduos adultos apresentam notável dimorfismo sexual e, em condições adequadas, é possível eclodir simultaneamente as larvas em cultura. O custo da implantação e manutenção da cultura de *Artemia salina* é muito baixo, o que faz desta, um excelente modelo experimental, utilizado nas mais diversas áreas da biologia. *Artemia salina* é amplamente conhecida como indicador de

toxicidade em um bioensaio (Brine Shrimp Test), utilizando-se a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (LOPES *et al.*, 1999).

### 5.10.1 Metodologia

#### 5.10.1.2 Avaliação da toxicidade dos extratos brutos e frações das espécies selecionadas.

Utilizou-se a metodologia de Meyer adaptada. Em um aquário de vidro, os cistos de *A. salina* foram incubados na solução salina (10mg de cistos/100mL de solução), sob iluminação artificial a 28°C. Após 24 horas foram transferidos o primeiro estágio larval (náuplio), para outro aquário (**Figura 38**) que continha solução salina, e mantida em nova incubação por mais 24 horas, sob iluminação artificial a 28°C. Após essa incubação, obtêm-se apenas estágios de metanáuplios do microcrustáceo (cultura pura).



**FIGURA 38.** Estágios metanáuplios do microcrustáceo de *Artemia salina*.

Foram preparadas soluções, em triplicata, dos extratos e frações em nas concentrações 5, 10, 20, 30 e 50 µg/mL em DMSO, utilizando como droga de referência o **Lapachol**. Um volume de 4,5 mL de solução salina foram transferidos para tubos de ensaio, sendo ainda adicionados as larvas de *A. salina* em 0,5 mL (10/tubo), em um volume final de 5 mL. Os

extratos e frações que não apresentaram respostas com as concentrações mencionadas foram repetidas suas análises em concentrações maiores. As culturas de *A. Salinas* foram incubadas a 28°C. Após 24 horas, os microcrustáceos imóveis e/ou depositados no fundo do tubo de ensaio foram considerados como mortos.

Utilizou-se o método Probitos de análise para obtenção das  $DL_{50}$  e respectivos intervalos de confiança. Os extratos foram considerados ativos quando  $DL_{50} < 1000$  ppm.

## 5.10.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.10.2.1 Avaliação da toxicidade do extrato e frações de *Vismia cayennensis* frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

O teste de *Artemia salina* foi realizado com a finalidade de detectar a atividade citotóxica dos extratos e frações, podendo ser correlacionada com atividade farmacológica. Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antitumoral (DOLABELA, 1997), moluscicida, inseticida (RUIZ *et al.*, 2005), tripanossomicida (DOLABELA, 1997), entre outras. DOLABELA (1997) demonstrou que substâncias com toxicidade sobre *A.salina* de  $80 \mu\text{g/mL} < \text{DL}_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$  podem apresentar atividade anti-*Tripanossoma cruzi*; por outro lado, substâncias com toxicidade de  $\text{DL}_{50} < 145 \mu\text{g/mL}$  podem apresentar atividade antitumoral. Entre outros critérios estabelecidos por Dolabela com base nos níveis de  $\text{DL}_{50}$  em *Artemia salina*, a saber:  $\text{DL}_{50} < 80 \mu\text{g/ml}$ , altamente tóxicos;  $\text{DL}_{50}$  entre  $80 \mu\text{g/ml}$  e  $250 \mu\text{g /ml}$ , moderadamente tóxicos; e  $\text{DL}_{50} > 250 \mu\text{g /ml}$ , com baixa toxicidade ou não tóxicos.

O ECFVc e frações oriundas do fracionamento em Sílica gel – C 18, foram avaliados quanto a sua toxicidade. O extrato e as frações avaliadas foram considerados ativos (TAS < 1000 ppm, **Tabela 13**).

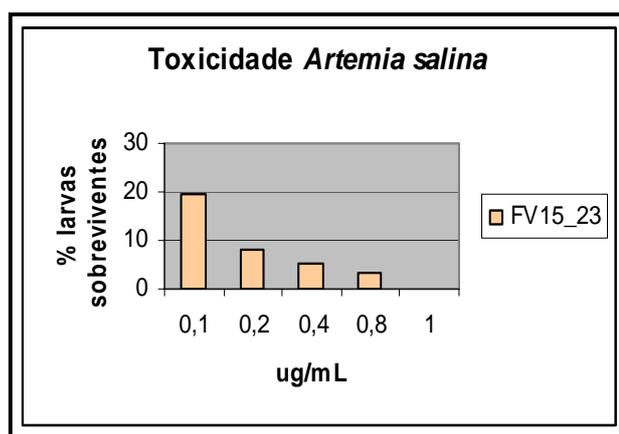
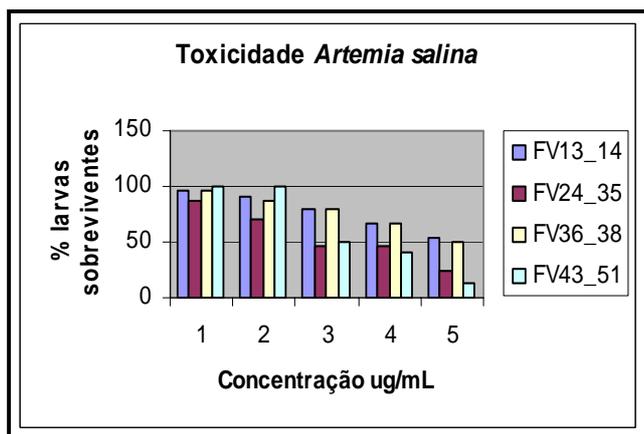
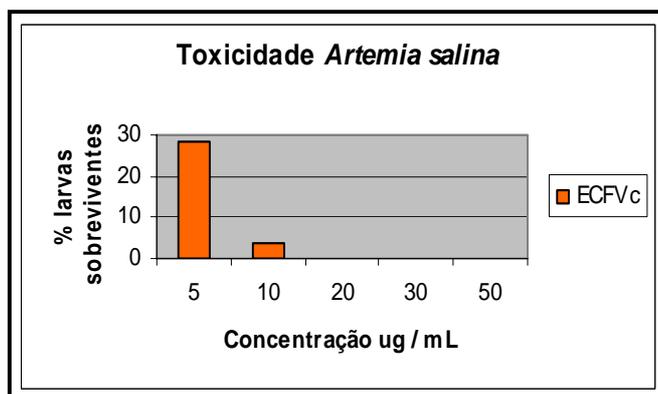
**TABELA 13.** Teste de toxicidade para *A. salina* dos extratos e frações de *V. cayennensis*

<i>V. cayennensis</i>	DL <sub>50</sub> (ppm)	Intervalo de confiança 95 % (ppm)
<b><u>Extratos</u></b>		
Extrato clorofórmico dos frutos	3.03	1.97 – 4.68
<b><u>Frações</u></b>		
FV 13_14	74.12	30.56 – 179.78
<b>FV 15_23</b>	<b>0.70</b>	<b>0.61 – 0.79</b>
FV 24_35	22.33	15.87 – 31.43
FV 36_38	62.99	35.74 – 111.04
FV 39_42	_____	_____
FV 43_51	24.54	20.48 – 29.41
FV 51_60	_____	_____
<b><u>Amostra Padrão</u></b>		
<b>Lapachol</b>	<b>10.47</b>	<b>8.55 – 12.81</b>

O extrato clorofórmico dos frutos de *V. cayennensis*, foi considerado tóxico frente à *A. salina*, apresentando uma DL<sub>50</sub>= 3.03 µg/mL.

O resultado mais expressivo, entre as frações, foi obtido por FV 15\_23 (  $DL_{50}= 0.70$   $\mu\text{g/mL}$ ), sendo considerada altamente tóxica. Ao ser avaliada na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ , foi observado 0% de larvas sobreviventes (**Gráfico 19**)

As demais frações, também foram consideradas tóxicas, porém de menor toxicidade em relação ao extrato bruto e a fração anteriormente citada. Temos FV 24\_35 com  $DL_{50}= 22.33$   $\mu\text{g/mL}$ , FV 43\_51 com  $DL_{50}= 24.54$   $\mu\text{g/mL}$ . As frações codificadas como **FV 39\_42** e **FV 52\_60** não foram avaliados, devido à precipitação das amostras quando diluídas em água salina.



**GRÁFICO 19.** Toxicidade do ECFVc e das frações frente ao microcrustáceo de *Artemia salina* .

Em 2003, Bacab sugeriu que o teste de toxicidade em *A. salina* pode não ser um teste indireto confiável para a detecção de atividade leishmanicida em extratos de plantas. Porém os testes realizados foram válidos para a determinação da toxicidade dos extratos e frações.

#### 5.10.2.2 Avaliação da toxicidade da substância FV 15\_23/ 9a ao microcrustáceo *Artemia salina*.

A substância identificada como Ferruginina (FV 15\_23/ 9a) foi submetida ao bioensaio de toxicidade sobre *A. salina* (TAS) o resultado (Gráfico 20) demonstrou uma  $DL_{50} = 2,39$  ppm e intervalo de confiança entre 1,26 - 4,54 ppm. Esta substância pode ser um dos princípios ativos responsáveis pela atividade do extrato clorofórmico ( $DL_{50} = 3,03$ ) nesta espécie de *Vismia*. A toxicidade da substância identificada como Vismina não foi determinada, devido a pouca quantidade da amostra.

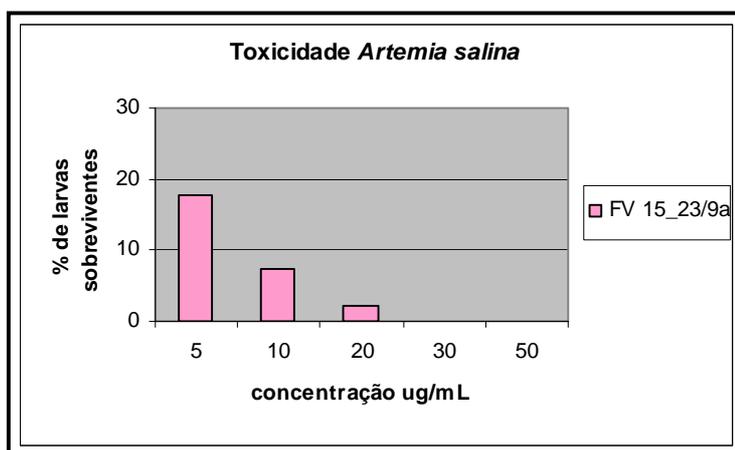


GRÁFICO 20. Toxicidade de FV 15\_23 / 9a frente à *Artemia salina* .

### 5.10.2.3 Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais de *P. duckei* e *P. demeraranum*

Os resultados de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* são apresentados na **tabela 14**. O resultado de ambos os óleos essenciais tem revelado dados promissores, com forte toxicidade.

O óleo essencial de *P. duckei* apresentou maior atividade ( $DL_{50} = 0,78 \mu\text{g/mL}$ ) em relação ao óleo essencial de *P. demeraranum* ( $DL_{50} = 1,37 \mu\text{g/mL}$ ). A toxicidade dos óleos essenciais das folhas de *P. duckei* e *P. demeraranum* pode ser atribuída a componentes específicos dos óleos, há uma presença de sesquiterpenos em ambos, como é informado por Sylvestre, os sesquiterpenos são responsáveis pela alta toxicidade do óleo essencial de *Myrica gale L.* Sesquiterpenoides e seus derivados possuem várias ações biológicas, incluindo atividades antiasmática, antibacteriana, anti-fúngica, antiinflamatória e antineoplástica (FARNSWORTH *et al*, 1977). Os sesquiterpenos,  $\alpha$  – humuleno,  $\gamma$  – elemeno e  $\delta$  – elemeno, identificados na espécie *P. surrulata* (JIE *et al*, 2007), apresentou elevada toxicidade.

O expressivo resultado dos óleos essenciais pode ser atribuído à presença de sesquiterpenos.

**TABELA 14.** Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais de *Piper duckei* e *Piper demeraranum*.

	LD <sub>50</sub> (ppm)	Intervalo de confiança 95 % (ppm)
Óleos essenciais de <i>Piper duckei</i>	0.78	0.69 – 0.89
Óleos essenciais de <i>Piper demeraranum</i>	1.37	0.98 – 1.92

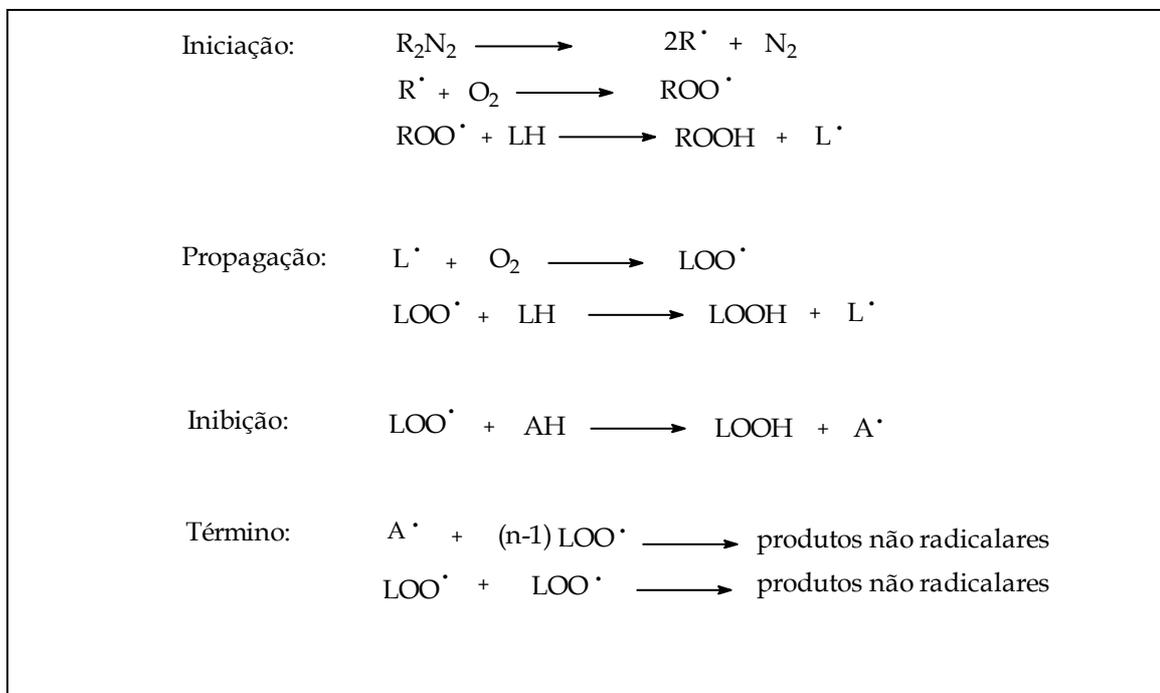
## 5.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA CAPACIDADE DE CAPTURAR RADICAIS LIVRES.

Espécies reativas de oxigênio (EROs), dos quais fazem parte radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) e hidroperoxila (ROO<sup>•</sup>), causam danos ao DNA e podem oxidar lipídios e proteínas, ocasionando doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUZA *et al.*, 2007).

Estes radicais são controlados pelos seres vivos por antioxidantes, que podem ter origem endógena (como por exemplo, superóxido dismutase) ou exógena, através da dieta alimentar e outras fontes, são exemplos os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifênois, selênio e carotenóides (SOUZA *et al.*, 2007). Essas substâncias estabilizam ou desativam os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI *et al.*, 2005).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se principalmente às propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres (SOUZA *et al.*, 2007). Os antioxidantes efetivos são capazes de capturar radicais que iniciam peroxidação lipídica, interrompendo a propagação da reação (Quadro 1).

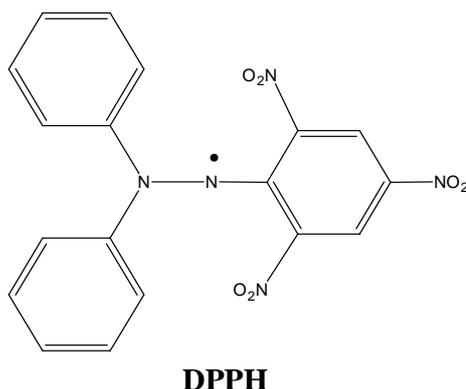
**Quadro 1** - Mecanismo da reação em cadeia para a formação de radicais livres e a ação do antioxidante



$R_2N_2$ =composto azo     $LH$ =substrato     $AH$ =antioxidante

Pesquisas fitoquímicas com extratos de plantas de maneira geral, e não apenas aquelas utilizadas na alimentação, têm focalizado seu trabalho na detecção, no isolamento e na determinação estrutural de antioxidantes naturais (HUANG *et al.*, 2005). Portanto, tornou-se vital para os pesquisadores o desenvolvimento de um método conveniente para a rápida quantificação da ação antioxidante de extratos vegetais e/ou substâncias puras. Várias metodologias já surgiram e, dentre elas, o teste com o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DDPH), é "um método fácil e exato para se medir a capacidade antioxidante de frutas, sucos, substâncias e extratos vegetais" (SANCHEZ-MORENO, 2002).

O DPPH é um dos poucos radicais orgânicos estáveis e comercialmente disponíveis, tendo máximo de absorção, no UV, em torno de  $\lambda=517$  nm. Sob redução, sua coloração violeta desaparece gradualmente. O progresso da reação é convenientemente monitorado por um espectrofotômetro.



Acreditava-se que a reação do antioxidante com o DPPH envolvia simplesmente a transferência do radical hidrogênio do primeiro para o segundo, mas recentes trabalhos sugerem que a reação envolve um rápido processo de transferência de elétrons de ânions fenóxido para o DPPH.

## Metodologia

### 5.11.1 Análise quantitativa da atividade antioxidante

Todos os solventes e reagentes eram analiticamente puros. O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi adquirido da Aldrich Co. As medições foram feitas usando espectrofotômetro UV Vis BioMate™ 3.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura com modificações (CHOI *et al*, 2002), monitorando-se o consumo do radical DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância das soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 517 nm (BENTO *et al*, 2006), tendo como controle positivo o *terc*-butilhidroquinona (TBHQ).

#### **5.11.2 Amostras**

Soluções dos extratos (1000 µg/mL) e do controle positivo TBHQ (*terc*-butilhidroquinona) e quercetina em metanol foram previamente preparados (SOUZA *et al*, 2006) e posteriormente foram diluídos nas concentrações 200, 150, 100, 33 e 11 µg/mL (CHELL *et al*, 2005).

#### **5.11.3 Amostras controle**

Preparou-se 2,5 mL de metanol e 1,0mL de DPPH (controle negativo) e um branco para o extrato 2,5 mL e 1,0 mL de metanol. Os testes são feitos em triplicata, para o branco utiliza-se as mesmas concentrações já mencionadas (BENTO *et al*, 2006).

#### **5.11.4 Construção da curva de calibração do DPPH**

Inicialmente foram preparados 250 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, posteriormente realizadas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância (tirando-se a média da triplicata em cada concentração) a 517 nm, medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como branco o metanol. A equação da curva de calibração do DPPH foi  $[X] = 36,583 \cdot A + 0,1677$ , onde  $[X]$  é a concentração de DPPH no meio,  $A$  é a absorbância medida no comprimento de onda de 517 nm e o coeficiente de correlação  $R = 0,9996$ .

#### **5.11.5 Ensaio do radical livre DPPH**

Um volume de 2,5mL de cada amostra nas divergentes concentrações (200-11 µg/mL) foi adicionado a 1,0 mL de solução de DPPH (40 µg/mL) e misturados vigorosamente. Posteriormente é feito o armazenamento à temperatura ambiente por 30 minutos ao ar (HAN *et al*, 2003), a absorbância de DPPH foi determinada pelo espectrofotômetro em 517nm contra absorbância de DPPH (CHELL *et al*, 2005) e convertida em porcentagem da atividade antioxidante (AA) usando a seguinte fórmula (BENTO *et al*, 2006):

$$AA\% = 100 - \left\{ \left[ (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 / Abs_{controle} \right] \right\}$$

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE<sub>50</sub>), foi determinada usando o Microsoft Office

excel 2003, a partir de uma curva, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra e do controle ( $\mu\text{g/mL}$ ) e na ordenada os valores de %AA.

### 5.11.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- **5.11.6.1 Método Captura de radicais livres**

O extrato ECFVc e frações foram submetidos ao teste preliminar de avaliação da atividade antioxidante. Na tabela 14 encontram-se as médias dos valores do percentual de redução de DPPH (D9132-1G, sigma-aldrich 115K1319) para as amostras, nas concentrações que variaram de  $10 \mu\text{g/mL}$  a  $200 \mu\text{g/mL}$ . O TBHQ foi avaliado nas concentrações 12, 24, 60, 72 e  $84 \mu\text{g/mL}$  e a quercetina nas concentrações 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 e  $5.0 \mu\text{g/mL}$

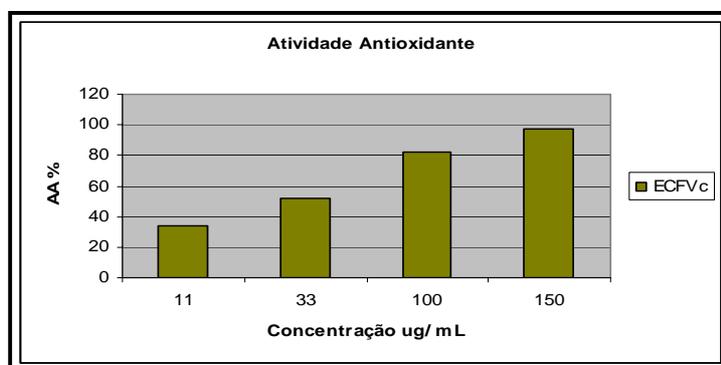
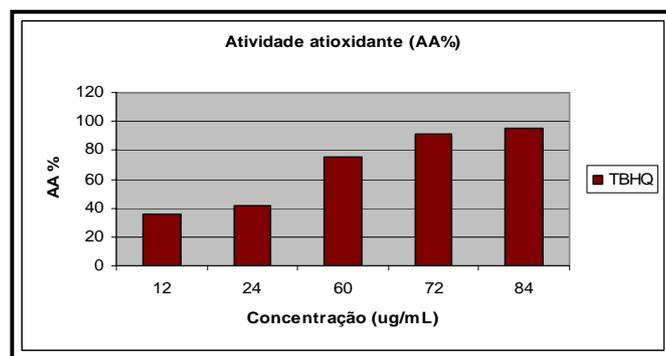
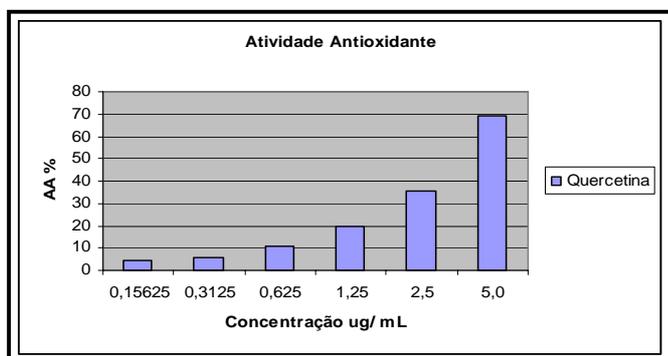
O ECFVc apresentou excelente atividade antioxidante em  $33 \mu\text{g/mL}$ , como pode ser observado no gráfico (**Gráfico 21**), o percentual da atividade antioxidante foi próximo dos valores encontrados para o padrão TBHQ. O valor de  $CE_{50}$  encontrado para esse extrato foi de  $36,10 \pm 0,82 \mu\text{g/mL}$ .

**TABELA 15.** Percentual de inibição do DPPH pelo extrato bruto e frações oriundas do ECFVc .

<b>Amostra</b>	<b>11 µg/mL</b>	<b>33 µg/mL</b>	<b>100 µg/mL</b>	<b>150 µg/mL</b>	<b>200 µg/mL</b>
ECFVc	34,6	53,5	83,4	87,47	91,23
FV 13_14	16,1	38,7	83,2	92,5	-
FV15_23	14,91	29,96	49,08	60,38	80,38
FV 24_35	7,48	10,12	29,92	41,97	53,24
FV 51_60	4,9	27,5	64,6	76,3	-

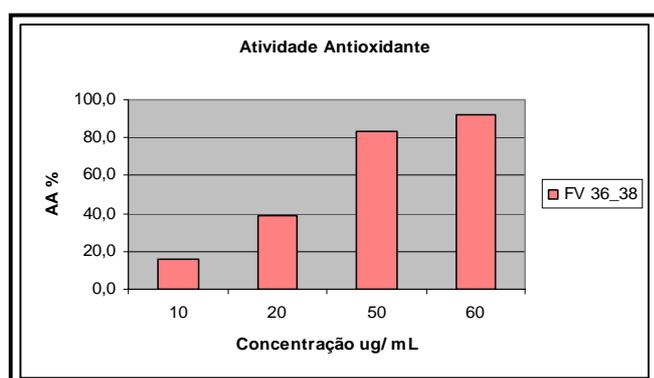
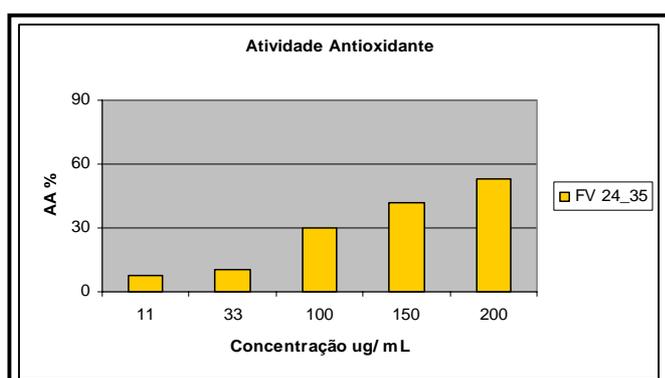
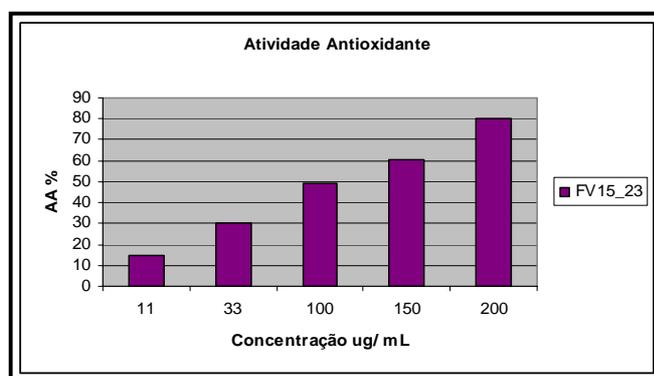
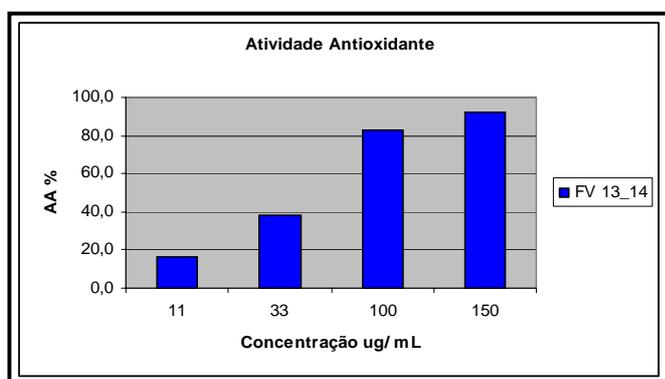
<b>Amostra</b>	<b>10 µg/mL</b>	<b>20 µg/mL</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>60 µg/mL</b>	<b>70 µg/mL</b>
FV 36_38	16,1	38,7	83,2	92,3	-
FV 39_42	4,3	13,4	24,0	31,5	44,1



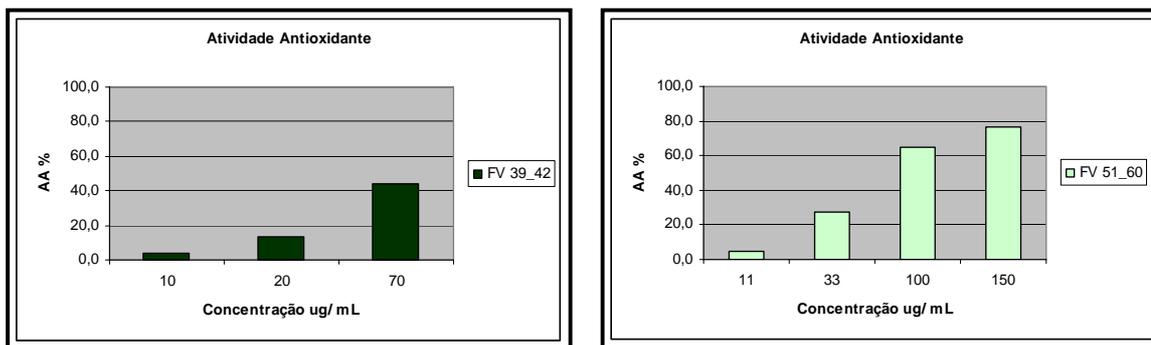
**GRÁFICO 21.** Atividade antioxidante do ECFVc e Padrões – Quercetina e TBHQ

As frações FV 13\_14 ( $CE_{50} = 62,52 \pm 0,58$ ), FV 36\_38 ( $62,52 \pm 0,45$ ) (Gráfico 22), FV 39\_42 ( $78,74 \pm 0,79$ ) e FV 51\_60 ( $79,97 \pm 0,47 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 23, pg 148) apresentaram relevante atividade antioxidante, em relação as frações FV 15\_23 e FV 24\_35 cujos valores de  $CE_{50}$  foram  $108,32 \pm 25,58$ ;  $184,26 \pm 19,84$ , respectivamente.

A atividade antioxidante do extrato bruto e frações podem ser justificadas pela presença de compostos fenólicos devido ao caráter redox dos grupos hidroxila fenólico e com a relação estrutural desses grupos com o restante da molécula.



**GRÁFICO 22.** Atividade antioxidante das frações oriundas do ECFVc

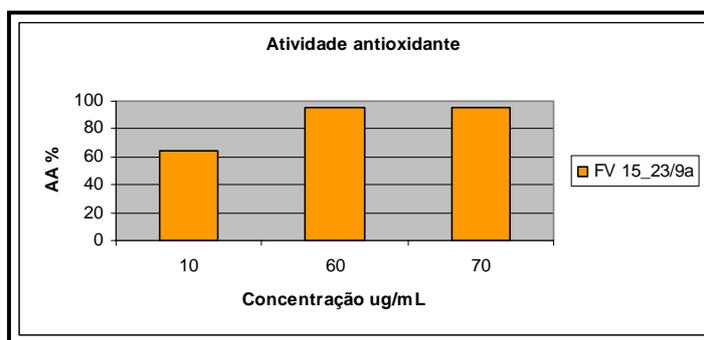


**GRÁFICO 23.** Atividade antioxidante das frações do ECFVc

### 5.11.6.2 Avaliação da atividade antioxidante das substâncias FV 15\_23/ 9a e FV 15\_23/ 18 frente ao radical DPPH.

O resultado da avaliação quantitativa da atividade antioxidante da substância FV 15\_23/ 9a, determinada pelo ensaio do DPPH, está apresentado no **Gráfico 24**, mostrando que a espécie tem atividade sequestradora do radical DPPH atingindo um máximo de 95,01% em uma concentração de 70  $\mu\text{g/mL}$ , o valor de  $\text{CE}_{50}$  encontrado para a **Ferruginina** foi  $\text{CE}_{50} = 17,11 \pm 2,802$ .

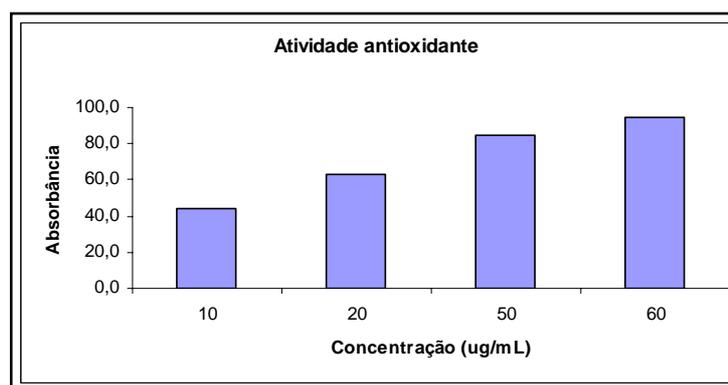
A presença de um sistema tetra – hidróxi – diantrona, que possuem grupos hidroxilas livres nos anéis aromáticos são considerados essenciais para uma excelente capacidade antioxidante.



**GRÁFICO 24.** Atividade antioxidante da substância FV 15\_23/ 9a

A substância FV 15\_23/ 18a, identificada como **Vismina**, também apresentou forte atividade antioxidante (**Gráfico 25**) o valor de  $CE_{50}$  encontrado foi  $CE_{50} = 11,55 \pm 2,3$ .

As substâncias testadas foram consideradas importantes antioxidantes, uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres. O efeito antioxidante, que pode ser explicado pela doação de um átomo de hidrogênio para os radicais livres, formando novos tipos de radicais livres que não são tão reativos quanto à espécie inicial. O grau de hidroxilação em uma molécula é um fator importante para a atividade antioxidante.



**GRÁFICO 25.** Atividade antioxidante da substância FV 15\_23/ 18a

### 5.11.6.3 Avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de *P. demeraranum* e *P. duckei*.

Para atividade antioxidante em particular, monoterpenos oxigenados (especialmente dos compostos fenólicos bem conhecidos, Timol e Carvarol) são principais responsáveis pelo potencial antioxidante dos óleos de plantas que os contém (AESCHBACH *et al.*, 1994; BARATTA *et al.*, 1998; LAGUORI *et al.*, 1993). Monoterpenos hidrocarbonos; particularmente terpinoleno,  $\alpha$  – terpineno e  $\gamma$  – terpineno poderiam também contribuir para atividade antioxidante, mas obviamente, nenhum tem maior atividade antioxidante que os monoterpenos oxigenados (TEPE *et al.*, 2004). estes compostos estão ausentes nos óleos essenciais de *P. duckei* e *P. demeraranum*, justificando a baixa atividade antioxidante (Tabela 16).

**TABELA 16.** Porcentagem de inibição do DPPH pelos óleos essenciais de *Piper demeraranum* e *Piper duckei*.

Amostras	11 $\mu\text{g/mL}$	33 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$
<i>P. duckei</i>	3,83%	5,04%	7,94%	10,44%
<i>P. demeraranum</i>	2,50%	4,51%	6,01%	9,05%

## 6. CONCLUSÃO

- Os caracteres morfoanatômicos dos órgãos vegetativos das folhas, cascas e frutos da espécie *Vismia cayennensis* são coerentes com padrões da família Clusiaceae, adicionalmente, revelam alguns aspectos importantes para identificação que contribuem para a diagnose farmacognóstica.
- A substância Fridelina isolada das cascas de *V. cayennensis* não teve uma significativa atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, não sendo atribuída a esta substância a expressiva atividade leishmanicida do extrato hexânico das cascas.
- A espécie *V. cayennensis* apresentou no extrato clorofórmico a presença metabólicos secundários de grande interesse farmacológico, tais como flavonóides, benzofenonas preniladas, xantonas e as quinonas. Dados na literatura evidenciam atividade leishmanicida e antioxidante para substâncias do tipo fenólicas. Os isolamentos dos antranóides prenilados, **Vismina** e **Ferruginina**, confirmaram alta toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e atividade antioxidante, no entanto apresentou-se com moderada atividade leishmanicida nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, mas é bastante relevante a avaliação destes compostos nas formas amastigotas desta espécie, devido a baixa toxicidade dos antranóides prenilados em células macrófagos. Estes resultados apresentam-se animadores para uma futura comprovação do potencial leishmanicida da espécie e criam perspectivas para investigações futuras, relacionadas à estrutura e atividade do componente isolado e de outros compostos presentes na espécie.
- O teste de toxicidade dos extratos e frações frente ao microcrutáceo de *Artemia salina* se apresentou como um excelente indicador de toxicidade além de constituir um teste simples e de baixo custo, apesar do teste de ter sido afirmado por Bacab como um método indireto e

não confiável, os resultados obtidos orientaram a seleção da fração FV 15\_23 para o estudo químico e farmacológico, levando ao isolamento de uma substância muito promissora. A relação das propriedades farmacológicas e os efeitos tóxicos correspondentes têm a finalidade de se evitar a utilização indiscriminada dos extratos sem rigor, nem critério científico.

- Os resultados obtidos das duas espécies da família Piperaceae, *Piper duckei* e *Piper demeraranum*, foram inéditos, seus estudos químicos revelaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos, estes compostos foram os prováveis responsáveis pela toxicidade dos óleos frente à *Artemia salina* e a expressiva atividade leishmanicida. Os resultados de baixa citotoxicidade em células macrófagos e baixo potencial irritante somam grandes incentivos em realizar teste intracelular em formas amastigotas e futuras comprovações de uso topical do óleo nas leishmanioses do tipo cutânea e mucocutânea.
- A análise química do extrato clorofórmico de *V. cayennensis* tem mostrado a presença de flavonóides, xantonas, quinonas e benzofenonas preniladas. Os flavonóides já são considerados substâncias com potentes atividades antioxidantes. Porém modelos de outras substâncias fenólicas como os antranóides prenilados (**Vismina e Ferruginina**) ainda são pouco conhecidos. Assim, as substâncias isoladas de *V. cayennensis* podem constituir um modelo promissor para se avaliar mecanismos envolvidos na atividade antioxidante.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. ENGLER.. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. 12th edn., 2, 444, 1964.

ABREU, A.M; **Volatile constituents of Piperaceae from Santa Catarina, Brazil: Essential oils Composition of *Piper cernuum* Veil. and *Peperomia emarginella***. *J. Essent. Oil Res*, 17, p. 286-288, 2005.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil Components by gas chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2001.

AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; SCOTT, B. C.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. and ARUOMA, O. U. **Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol**. *Food Chemical Toxicology* **32**, pp. 31–36, 1994.

ALÉCIO, A. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. **Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum***. *Journal of Natural Products* **61**, 637–639, 1998.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P.; *Food Chem.*, **89**, 27, 2005.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DERAADT, P.; 1992. **Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis**. *Parasitol. Today* **8**, 104 – 105.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; BIONDI, D. M. and RUBERTO, G.; 1998, **Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils**. *Journal of Essential Oil Research* **10**, pp. 618–627.

BENTO, A. F.; AZEVEDO, A. S.; SANTOS, A. R. S. **Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica e antioxidante de Solanum acanthodes Hook.f.** XIV Pibic, Universidade Federal de Santa Catarina, p 1 - 4, 2006.

BOTTA, B.; MONACHE, D.; MARINI, F.; BETTOLO, G. B.; MENICHINI, F.; **Vismione H and prenylated xanthenes from *Vismia guianensis*.** Phytochemistry 25, 1217 – 1219, 1986.

BRAGA, G. F.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O. ; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. **Antileishmanial and antifungal activity of plants in traditional medicine in Brazil.** Journal of ethnopharmacology 111, 396-402, 2007.

CHAN-BACAB, M. J.; BALANZA, E.; DEHARO, E.; MUÑOZ, V.; GARCIA, R. D.; PEÑA-RODRÍGUEZ **Variation of leishmanidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*.** Journal of Ethnopharmacology 86, 234-247, 2003.

CHELL, J.; THEODULOZ, C.; RODRIGUEZ, J.; HIRSCHMANN- SCHMEDA, G. **Free radical scavenger and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.),** J. Agric. Food Chem, 53, 2511-2571, 2005.

CHOI, C. W.; KIM, S. C. ; HWANG, S. S. ; CHOI, B. K. ; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK.; KIM, S. K. **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Koren medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison.** Plant Science, 1116-1168, 2002.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants.** Houghton Mifflin, Boston. 1968.

LEZAMA-DÁVILA C. M. and ISAAC-MÁRQUEZ A. P. **Immunobiologia de las Leishmaniosis,** Universidad Autónoma de Campeche, México, 1995.

DAHLGREN, R. M. T., **A revised system of classification of the angiosperms.** Bot. J. Linn. Soc. 80 (2), 91–124, 1980.

DUARTE, L. P. **Estudo químico e estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia popunea*** – tese de doutorado, Dep. Química UFMG, Belo Horizonte, 2000.

DUKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs.** CRC, New York, pp. 378–383, 521, 563, 1985.

BACAB, M. J. C.; RODRIGUEZ, L. M. P., **Plant natural products with leishmanicidal activity.**, The Royal Society of Chemistry 18, pp. 674-688, 2001

BAGLEY D. M.; BRUNER L.H.; SILVA, O.; COTTIN, M.; O'BRIEN K. A. F.; UTTLEY M. and WALKER A. P., **An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*.** *Toxicology In Vitro* **6**, 275-284, 1992.

BAGLEY, D. M.; RIZVI, P. Y.; KONG B. M. and SALVA, S. J. **Factors affecting use of the hen's egg choriollantoic membrane as a model for predicting eye irritation potential:** I *Journal of Toxicology-Cutaneous and Ocular Toxicology* **10**, 95-104, 1991.

BAGLEY, D. M.; WALTERS, D. and KONG, B. M., **Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test.**, *Food and Chemical Toxicology* **32**, 1115-1160, 1994.

BARTORI, A.; et al. **Imune complex glomerulonephritis in experimental Kalazar.** *Parasite Immunology*; v.9., 1986.

BERMAN, J. D. **Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies.** *Review of Infectious Diseases* **10**, 560-586. 1988.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. **Leishmanioses, feridas bravas e Kalazar.** *Ciência e Cultura*, São Paulo , v.55 , n.1 , 2003.

CAMELE, G.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; MARINI BETTOLO, G. B.; LIMA, R. A. *Phytochemistry* 1982, 21, 417-419.

CARERI, M., ELVIRI, L., **Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil.** *Journal of chromatography A*, 935, p. 249-257, 2001.

CARPENTER, I.; LOCKSLEY, H.; SCHEIMANN, F. **Xanthones in higher plants: biogenetic proposal and a chemotaxonomic survey.** *Phytochemistry*, v 8, p 201e 3-2025, 1969.

CORDEIRO, P.; VILEGAS, J. Y. H.; LANÇAS, F. M. HRGC-MS. **Analysis of Terpenoid from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolia* (“Espinheira Santa”).** *J. Braz. Chem. Soc.* (10) 6: 523-526, 1999.

CUESTA-RUBIO, O.; CASTRO, H.V.; URIBE, B.A.F. & CARDENÁS, J. **Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*.** *Phytochemistry* 57: 279-283. 2001

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products*. 2 ed. Londres. John Wiley e Son LTD, p. 501, 2001.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** Ed. UNESP, São Paulo, 229 p, 1996.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas.** Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 128p, 1997.

DUCKE, J. A. **Handbook of Medicinal Herbs**. CRC, New York, pp.387-383, 521, 563, 1985.

ESTRELA, J. L. V.; GUEDES, R. N. C. MALTHA, C. R. A.; FAZOLIN, M. **Toxicidade de amidas análogas a Piperina a larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda***. Neotropical Entomology 32 (2), p. 343 – 346, 2003.

FAKIM, A.G. **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow**. Molecular Aspect of Medicine, 1-93, 2006.

FARNSWORTH, N. R.; BINGEL, A. S., **Problems and prospects of discovering new drugs from higher plants by pharmacological screening**. In: **New Natural Products and Plant Drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**; Wagner, H.; WOLFF, P. (Eds.), Springer, Verlag. Berlin, pp. 1-22, 1977.

FEDER P. I.; LORDO R. A.; DIPASQUALE L. C.; BAGLEY D. M.; CHUDKOWSKI M.; DEMETRULIAS J. L.; HINTZE K. L.; MARENUS K. D.; PAPE W. J. W.; RODDY M.; SCHNETZINGER R.; SILBER P. M.; TEAL J. J.; WEISE S. L. and GETTINGS S. D. **The CTFA evaluation of alternative program: An evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test (Phase 1) hydro-alcoholic formulations; (Part 1) statistical methods**. *In vitro Toxicology* **4**, 231-245,1991.

FERNANDES, G. **Avaliação Fitoquímica de *Sarcorrhachis obtusa* – PIPERACEAE**, Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2006.

FULLER, R. W.; WESTERGAARD, C. K.; COLLINS, J. W.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R.; **Vismiaphenones D-G, New Prenylated Benzophenones from *Vismia cayeannensis***. *Journal Natural Products*, 62, 67-69, 1999.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. **Trends in ethnopharmacology**. *Journal of ethnopharmacology* 100, 43-49, 2005.

GHOSAL, S.; CHAUDHURI, R. K. **Chemical constituents of Gentianaceae. XVI, p. Anti – *Mycobacterium tuberculosis* activity of naturally occurring xanthenes and synthetic analogs.**, J. Pham. Sci., v. 67, p. 1978, 1978.

GOAD, L. J. Phytosterols. In: CHARLWOOD, B. V e BANTHORPE, D. V (Eds). **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press, London, p. 399-434, 1991.

GONZALES, G. J.; MONACHE F. D.; MONACHE, G. D.; BETTOLO B.M.; **Chemistry of the genus *Vismia*.**, Journal o Medicinal Plant Research, Vol.40, pp 347-350, 1980.

GUERRA, J. A. O. **Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos à infecção na Amazônia.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v. 36, n.5, 2003.

GUERRA, J. A. O. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na Comunidade São João, Manaus, Amazonas, Brasil** . Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba,22 (11) : 2319-2327, 2006.

HASLAM, E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of actions.** Natural Products Reports, Canada, v. 59, n. 2, p. 205-220, May./Jun. 1996.

HAN,. S. S.; LO, S. C, CHOI, Y, W.; KIM, J. H.; BACK, S. H. **Antioxidant activity of crude extract and pure compounds of *Acer guinnala* Max** , Bull Korean Chem Soc, Vol. 25, N° 25, 2004.

HUANG, C. H.; HUANG, S. L. **Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *O. niloticus* X *O. aureus*, fed oxidized oil.** Aquaculture, v. 237, p. 381-389, 2005.

IWE, M. M. JACKSON, J. E. and SCHUSTER B. G., **Parasitol. Today**, 10, 65, 1994.

- JACOB, J., DISNAR, J.R., **Pentacyclic triterpene methyl ethers in recent lacustrine sediments (Lagoa do Caçó, Brazil)**. *Organic Geochemistry* 36, p. 449-461, 2005.
- JARAMILLO, M. A. MANOS, P. S. **Phylogeny and Patterns of floral diversity in the Genus *Piper* (Piperaceae)**. *American Journal of Botany* 88(4), p. 706 – 716, 2001.
- JIE, H.; TAO, S.; JUN, H.; SHUANGYANG, C.; XIAOQIANG, C.; GUOLIN, Z., **CHEMICAL composition cytotoxic and antioxidant activity of the leaf essential oil of *Photinia serrulata***. *Food Chemistry* 103, 355-358, 2007.
- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill, Book Company, Inc. New York and London.
- JOLY, A. B. **Botânica- Introdução à Taxonomia Vegetal**. Companhia Editora Nacional, São Paulo, Brazil, 1993.
- KINGHORN, A. D. **Biologically Activity Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties**. *J. Nat. Prod.*, 50 (6), p. 1009 – 1024, 1987.
- KLASS, J.; TINTO, W. F.; MACLEAN, S.; REYNOLDS, W. **Friedelane Triterpenoids from *Peritassa compta*: Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C assignments by 2D NMR spectroscopy**. *Journal of Natural Products*. V 55, N<sub>0</sub> 11 p. 1626-1630. 1992.
- KOEHN, F. E .; CARTER, G.T. **The evolving role of natural products in drug discovery**. *Reviews*, V 04, p. 206-220. 2005.
- KRAUS, J. E. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198p.
- LAGUORI, V.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M.; KOKKINI, S. and BOSKOU, D. **Composition and antioxidant activity of essential oils from oregano plants growth wild in Greece**. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forzchung* 197, pp. 20–23, 1993.

- LEI, L. G.; LIANG, H. X. **Variations in floral development in Peperomia (Piperaceae) and their taxonomic implications.** Botanical Journal of the Linnean Society 131, 423–431, 1999.
- LIN, C. N.; LIOU, S. J.; LEE, T. H.; CHUANG, T. C.; WON, S. J. **Xanthon derivatives as potential anti – cancer drugs.** J. Pharm. Pharmacol., v. 48, n. 5, p. 539-544, 1996.
- LINUMA, M.; ITO, T.; MIYAKE, R.; TOSA, H.; TANAKA, T.; CHELLANDURA, V. **Phytochemistry**, 47, 1169. 1998.
- LOPES, W. B.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para a avaliação da toxicidade de extratos vegetais.** Livro de resumo, p. 84, 1999.
- LUIZE P. S.; TIUMAN T. S.; MORELLO L. G.; MAZA P. K.; UEDA-NAKAMURA, T. DIAS FILHO B. P.; CORTEZ D. A. G, MELLO J. C. P.; NAKAMURA C. V.; **Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*.** *Rev Bras Ci Farma* 41: 85-94, 2005.
- LUEPKE N. P. **Hens`s egg chorioallantoic membrane test for irritation potential.** Food and Chemical Toxicology **23**, 287 – 288, 1985.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V. F. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química Nova, Vol. 25, Nº 25, Nº 3, 429 – 438, 2002
- MACFOY, C. A.; SAMA, A. M., **Medicinal plants in Pejehun district of Sierra Leone.** Journal of Ethnopharmacology 8, 215 – 223, 1983.
- MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L.; VILA R.; TOMI F.; CANIGUERAL S.; CASANOVA, J.; CUNHA, P. C.; ADZET T.,1998. **Essential oils from four *piper* species.** *Phytochemistry* 49, 2019-2023.

- MATTOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 141p, 1997.
- MCFERREN, M.A.; CORDOVA, D.; RODRIGUEZ, E.; RAUH, J. J. **In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutyramide from *Piper piscatorium* (Piperaceae)**. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, p. 201 – 207, 2002.
- MCFERREN, M.A.; RODRIGUEZ, E. **Piscicidal properties of piperovatine from *Piper piscatorium* (Piperaceae)**. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, p. 183 – 187, 1998.
- MENDONÇA, M. S. **Estudo de Plantas laticíferas. Aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos de *Monihot caerulescens* Pohl**. *Acta Amazônica*. 13 (3): 501-517, 1983.
- 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*, 15 (1), p. 6 -12, 2005.
- METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon, v. 1, 724 p, 1950.
- MEYER, B. N. **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents**. *Planta Medica*, 45: 31-34. 1982.
- MICHALICK M. S. M. **Gênero *Leishmania***. In: Neves DP, Melo AL, Genaro O, Linardi PM *Parasitologia humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, p.31-35, 2003.
- MILLIKEN, W., BRUCE A. **The use of medicinal plants by Yanomami indians of Brazil, Part II**. *Journal of Botany*, 51 (3), 1999.
- MINAMI, H.; KINOSHITA, M.; FUKUYAMA, Y.; KODAMA, M.; YOSHIZAWA, V. *Phytochemistry*, 26, 501, 1995.

- MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; VAREJÃO, M. J. C, GOTTLIEB, O. R. **Anthraquinone from *Vismia* species**. *Phytochemistry* 20: 2041-2042, 1981.
- MONACHE, F. D. **Chemistry and biological activity of the secondary metabolites of *vismieae***. *Rev Latioamer. Quim.* 16-1, 5-15 1985.
- MONACHE, F. D.; FERRARI, F.; BETOLLO, G. B. M.; SUAREZ, E. C. **Chemistry of the genus *Vismia***. *Planta médica*, Vol. 40, p. 340-346, 1980.
- MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A.; **Essential oil analysis of two *Piper* species (*Piperaceae*)**. *An. Acad. Bras. Ci.* 70 (4), 751–754, 1998.
- MOREIRA, R. Y. O; ARRUDA, M. S. P; SANTOS, L. S.; MÜLLER, A. H; TEREZA, E. **Antraquinonas e Naftoquinonas do caule de uma espécime de reflorestamento de *Tectona grand* (*Verbenaceae*)**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16 (3) 392 – 396. 2006.
- MOWAMBO, Z.; APERS, S.; MOSSH, M.; KAPINGU, M.; MIERT, S. V.; CLAEYS, M.; BRUN, R.; CÓS, P.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. **Antranoid Compounds with Antiprotozoal Activity from *Vismia orientalis***. *Planta Med* 70: 706-710, 2004.
- MOORE, E., O'FLAHERTY, D., HEUVELMANS, H., SEAMAN, J., VEEKEN, H., WIT, S., DAVIDSON, R.N. **Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya**. *Bull. World Health Organ.* 79, 388–393, 2001.
- MOURÃO, K. S. M. and C. M. BELTRATI. **Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (*Clusiaceae*)**. *Rev. Brasil. Biol.*, 61 (1): 147-158, 2001.
- MUNDINA, A.; VILA, R.; TOMI F.; GUPTA, P. M., CASANOVA J.; ADZET T.; CANIGUERAL S.; 1997. **Leaf essential oils of three panamaian *piper* species**. *Phytochemistry* 47, 1277-1282.

NAKAMURA C. V., SANTOS A. O., VENDRAMETTO M. C., LUIZE P. S., FILHO B.P. D., CORTEZ D. A.G., NAKAMURA T. U. **Atividade antileishmanial do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var *pallescens* (C.DC.)** Yunck. Brazilian Journal of Pharmacognosy 16, 61-66, 2006.

NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F.F. **Xanthones and Other Constituents of *Vismia parviflora*.** J. Braz. Chem. Soc., Vol 8, N°5, 505-508, 1997.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL-FILHO, V. **Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica.** Quim. Nova, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

NOVY, F.G.; MACNEAL, W.J., 1904. **On the cultivation of *Trypanosome brucei*.** J. Infect. Dis., New York, V.1, pp 1-30. 2) Nicole, G.L.,. Culture du parasite du Boutond' Orient C.C. Acad. Sci., Paris. v. 146, pp. 842-843, 1908.

OUELLETTE. M., DRUMMELSMITH. J., PAPADOPOULOU. B. **LEISHMANIASIS: drugs in the clinic, resistance and new developments, Drugs resistance Updates 7 (2004), 257-266.**

PACHUTA, R.R.; COOKS, R.G.; CASSADY, J.M.; CONG, P.; MCCLOUD, T.G.; CHANG, C.J. **Antineoplastic agents from higher plants: application of tandem mass spectroscopic to xanthones from *Psorospermum febrifugum*.** J. Nat. Prod., v. 49, n. 3, p. 412-423, 1986.

PARMAR, V.S., JAIN, S.C., BISHT, K.S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O.D., PRASAD, A.K., WENGEL, J., OLSEN, C.E., BOLL, P.M., 1997. **Phytochemistry of the genus *Piper*.** Phytochemistry 46 (4), 597–673. P.R.D. dos Santos et al. / Phytochemistry 58 (2001) 547–551 551.

PEREIRA, D. N.; LANE, A. M.. **Parasitologia Humana.** 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PESSOA, S.B. MARTINS, A.V. **Parasitologia.** 10 ed. São Paulo: Atheneu, 1987.

PINHEIRO, L.; CORTEZ, D. A.; VIDOTTI, G., J; YOUNG, M. C. M; FERREIRA, A. G.. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (Clusiaceae).** química nova, vol. 26, n°2, 2003.

PINHEIRO, R. M; QUHAE, M.M.M; BETTOLO, G.B.M; MONACHE F.D. **Prenylated anthranoids from *Vismia* species,** Phytochemistry, Vol. 23. N° 8, pp, 1737 – 1740, 1984.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, MARIE-ANNICK.; BENDIG, M. **Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery.** Nature Reviews Drug Discovery, v. 4, p.727-740, 2005.

PINTO, A. C. **Extração dos Constituintes Químicos voláteis por “ Headspace” e Coobação de três.** Espécies do gênero Piper 19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1996.

POLITI, M; NGJOKO, K; SANOGO, R; WOLFENDER, J.L; HOSTETTEMANN, K; MORELLI, I. **HPLC – UV/PAD and HPLC – MS Analyses of Leaf and Root Extracts of *Vismia guineensis* and Isolation and Identification of Two New Bianthrone.** Phytochemical analysis, 15, 355-364, 2004.

RAMESH N., VISWANATHAN, M. B., SARASWATHY, A.; BALAKRISHNA, K.; BRINDHA, P.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Phycochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 934-936, 2001.

RAMESH N., VISWANATHAN, M. B., SARASWATHY, A.; BALAKRISHNA, K.; BRINDHA, P.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Phycochemical and antimicrobial studies on *Begonia Malabarica*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 8, p. 934-936, 2001.

RATH, G.; POTTERAT, O.; MAVI, S.; HOSTETTMMANN, K. **Xanthones from *Hypericum roeperatum*.** Phytochemistry, v. 43, p. 513-520, 1996.

REYS, C.; ESTRADA, M. E.; APAN, T. R.; AMEKRAS, B. JANKOWSKI, C. K. **Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *calophyllum brasiliense*.** Life, New York, v. 75, n. 13 p. 1635-1647, 2004.

- RIBEIRO, E. L. Flora da Reserva Ducke: **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999.
- RITMEIJER, K., VEEKEN, H., MELAKU, Y., LEAL, G., AMSALU, R., SEAMAN, J., DAVIDSON, R.N., 2001. **Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome**. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 95, 668–672.
- REYNOLDS, J.E.F. (ed.) Martindale. **The Extra Farmacopéia**. 30. ed., London: Pharmaceutical, 1993.
- RUANGRUNGSI, N., PRATHANTURARUG, S., LANGE, G., ORGAN, M. **An N-methyl aristolactam and oxygenated cyclohexane derivative from Piper rebesioides**. Phytochemistry 31, 2397–2400, 1992.
- RUIZ, A.L.T.G., MAGALHÃES, E.G., MAGALHÃES, A.F., FARIAS, A.D., AMARAL, M.C.E., SERRANO, D.R., MAGALHÃES E.M.Z., MAGALHÃES, L.A **Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae)** . Brazilian Journal of Pharmacognosy, 15(2): 98-102, 2005.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. **Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante**. *Alimentaria*, p.29-40, 2002.
- SANTOS, E.C.T., LOPES, D., OLIVEIRA, R.R., CARAUTA, J.P.P., FALCÃO, C.A.B., KAPLAN, M.A.C., BERGMANN, B.R. **Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis***. Phytomedicine 11: 114-120, 2004.
- SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J, SILVA, L. G. F. **Xanthones from *Vismia latifolia***. Journal Braz. Chem. Soc. Vol. 11, Nº 5, 537-539, 2000

SCHMIDT, M. B.; RIBNICKY, D. M. .; LIPSKY, P. E.; RASKIN, I. **Revisiting the ancient concept of botanical therapeutics**, Nature chemical biology, Vol 3 , N° 7, 2007.

SEO, E.K., WANI, M.C., WALL, M.E., NAVARRO, H., MUKHERJEE, R., FARNSWORTH, N.R., KINGHORN, A.D. **New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis***. Phytochemistry 55, 35-42, 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 5.ed.. Porto Alegre: UFRS,1999.

SILVA, M.N., FERREIRA, V.F., SOUZA, M.C.B.V. **Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados**. Quím. Nova vol.26 no.3 São Paulo, 2003.

SILVA, R.M. **Caracteres morfoanatômicos de folha e caule de espécies brasileiras e uso medicinal**. Curitiba. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, p.6, 2007.

SILVA, R.V., NAVICKIENE, H.M.D., KATO, M.J., BOLZANI, V., YOUNG, M.C.M., Furlan, M. **Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum***. Phytochemistry 59, 521–527. 2002

SILVERSTEIN, Robert. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. São Paulo:LTC,. 25 p, 2000.

SOUZA, C. M. M., SILVA, H. R., VIEIRA, G. M., AYRES., COSTA, C. L. S., ARAÚJO, D. S. A., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H. **Fénois totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova, Vol. 30, N° 2, 351-355, 2007.

SOUZA, L.A. **Morfologia e anatomia vegetal: técnicas e práticas**. Ponta Grossa: UEPG, 194 p, 2005.

SHIMIZU, M., TOMOO, T. **Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugsv. constituents and anti-inflammatory effect of Aoki, *Aucuba japonica* Thumb.** **Biol. Pharm. Bull**, v. 17, n.5, p. 665-667, 1994.

SYLVESTRE et al., 2005 M. SYLVESTRE, J. LEGAULT, D. DUFOUR and A. PICHETTE, **Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L.** *Phytomedicine* **12**, pp. 299–304, 2005.

SUNDAR, S., 2001. **Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis.** *Trop. Med. Int. Health* **6**, 849–854.

TEMPORAL, R.M. **Estudos de derivados amidínicos em *Leishmania amazonensis*: avaliação da toxicidade e do efeito na interação parasita-hospedeiro.** Tese de Doutorado em **Biologia Parasitária**. Ministério da saúde, Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz, 2000.

TEBBS, M., *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Bot.)*, 1989, 19, 175.

TEPE, B., DAFERERA, D., SOKMEN, M., POLISSIOU, M., & SOKMEN, A. **In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 1132–1137, 2004.

YUNES, R.A., PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. 2001. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** *Química Nova*, **24** (1), p. 147-152.

VALENTE, M. C.; MAUTONE, C.; COSTA, M. L. N. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Periódicos brasileiro. Vol XXXII, p. 103, 1994.

VAN DEN DOOL E KRATZ, P. D. J. **A generalization of Retention Index System including linear temperature programmed gás-liquid partition chromatography.** Journal of Chromatography, 11, p. 463 – 471, 1964.

VERONESI, Ricardo. **Doenças infecciosas e parasitárias**, ed. Guanabara koogan, 8º edição. Rio de Janeiro 750-758, 1991.

VIEGAS, C.J., BOLZANI, V.S. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**, Quim. Nova, Vol.29, N° 2, 326 – 337, 2006.

VINATEA, J. E. **Artemia um ser vivo excepcional.** Panaroma da aqüicultura, V. 4, n. 25, p 8-9, 1994.

MACIEL, M.A.M, VEIGA, V.F.J; PINTO, A.C;. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Química nova, Vol. 25, N°3, 429-438, 2002.

MILLIKEN, W., BRUCE A. **The use of medicinal plants by Yanomami indians of Brazil.** Journal of Botany, 50 (1), p. 10-25, 1997.

WAGNER, H. **Plant Drug Analysis – A thin Layer Cromatography Atlas.** Ed Springer, New York, p. 383, 1996.

WILLIAN, B. L.; FÁBIO, T. M., MARIA I. H. BRANDEBURGO, A. H. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais.** Universidade Federal de Urbelândia, 1999.

WILSON, T.D and STECK, W.F. **A modifield HET – CAM assay approach to the assessment of anti-irritant properties of plant extracts.** Food and Chemical Toxicology 38, 867 – 872, 2000.

WHO/TDR. **Tropical Diseases Research – Leishmaniasis Fourteen Programme Report:** 101 – 111, 2002.

WU, Q., WANG, S., TU, G., FENG, Y., YANG, J., 1997. **Alkaloids from Piper puberullum.** *Phytochemistry* 44, 727–730.

YAO, Q.S., CHIOU, G. C. **Inhibition of crystallins-induced inflammation in rabbit eyes with five phytogetic compounds.** *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 14, n.1, p. 13-17, 1993.

YUNES, R. A.; CECHINEL , F. V.; **Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** *Quim. Nova*, 24, 147, 2001.

[www.agenciabrasil.gov.br](http://www.agenciabrasil.gov.br)

[www.mobot.org/mobot/research/ven-guayana/clusiaceae/vismia](http://www.mobot.org/mobot/research/ven-guayana/clusiaceae/vismia)

[www.discoverlife.org/20/m?kind=Vismia+cayennensis](http://www.discoverlife.org/20/m?kind=Vismia+cayennensis)

[http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/leishmaniose\\_p.htm](http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/leishmaniose_p.htm)

<http://www.icb.usp.br>

[http://www.saudeanimal.com.br/imagens/leishmaniose\\_transmissao.jpg](http://www.saudeanimal.com.br/imagens/leishmaniose_transmissao.jpg)

[www.fiocruz.br/](http://www.fiocruz.br/)

<http://pathmicro.med.sc.edu/parasitology/lei13>