

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIA DA SAÚDE – ESA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS -MBT

**ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS DO PRODUTO  
FITOTERÁPICO DERMODILAPIOL**

**LAURA CRISTINA PEREIRA DE OLIVEIRA**

MANAUS - AMAZONAS  
2005

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA  
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIA DA SAÚDE – ESA  
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS -MBT**

**ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS DO PRODUTO  
FITOTERÁPICO DERMODILAPIOL**

**LAURA CRISTINA PEREIRA DE OLIVEIRA**  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADOR: Dr. SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA

MANAUS-AMAZONAS  
2005

“ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS DO PRODUTO  
FITOTERÁPICO DERMODILAPIOL”

**LAURA CRISTINA PEREIRA DE OLIVEIRA**

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Curso de mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau mestre.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:** Utilização Sustentável de Recursos da Biodiversidade

Avaliada por:

---

Dr. SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA

---

Prof. Dra. MARIA LÚCIA BELÉM PINHEIRO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

---

Profa. Dra. MARIA DA PAZ LIMA  
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA

Manaus, 19 de maio de 2005

OLIVEIRA, Laura Cristina Pereira

**ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS DO PRODUTO FITOTERÁPICO  
DERMODILAPIOL**

101p.: ilust.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO – UEA, 2005

1. *Piper aduncum*. 2. Dermodilapiol. 3. Marcadores Químicos. 4. Perfil Cromatográfico. 5. CLAE. 6. Óleo Essencial. 7. Antimicótico. 8. Flavonóides

**Sinopse:**

O trabalho relata o isolamento e identificação estrutural de 2 fenilpropanóides (dilapiol, miristicina), 1 derivado do ácido benzóico prenilado (3-3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila), 1 chalcona (diidroflavocavina B) e 1 flavanona (sacuranetina) presentes no produto fitoterápico Dermodilapiol produzido a partir das partes aéreas da espécie vegetal *Piper aduncum*.

A caracterização química (perfil cromatográfico) e o doseamento dos marcadores químicos foram realizados para quatro lotes do produto, através da cromatografia líquida de alta eficiência.

Paralelamente foi realizado o acompanhamento do óleo essencial das folhas de três indivíduos, localizados em três diferentes localidades na cidade de Manaus.

1. *Piper aduncum*. 2. Dermodilapiol. 3. Marcadores Químicos. 4. Perfil Cromatográfico. 5. CLAE. 6. Óleo Essencial. 7. Antimicótico. 8. Flavonóides

Ó profundidade da riqueza, tanto da sabedoria,  
como do conhecimento de Deus! Quão  
insondáveis são os seus juízos e quão  
inescrutáveis os seus caminhos!

Porque Dele e por meio Dele e para Ele são  
todas as coisas. A Ele, pois, a glória  
eternamente. Amém.

Romanos 11:33 e 36

Dedico este trabalho a minha mãe **Almira**  
pelo amor, pela presença constante e por  
ter me mostrado o caminho a seguir e  
agora já grande não me desviarei dele.

Aos meus irmãos pelos estímulos e às  
minhas irmãs pela compreensão

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por ter me concedido a vida e juntamente com ela todas as outras coisas que cooperam para o meu bem.

Ao meu orientador Sergio pelos ensinamentos, dedicação, amizade e por ter sido o melhor orientador que eu poderia ter.

Ao Dr. Adrian M. Pohlit por um dia abrir as portas do Laboratório 18-CPPN/INPA com uma oportunidade de estágio.

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia onde minhas pesquisas foram realizadas.

À empresa SIEMA Eco Essências da Amazônia Ltda., na pessoa do Sr. Robert Mause.

Às agencias de fomento, CNPq (Editais Fitomedicamentos e CTPetro) e FAPEAM/MCT (Edital PPP), pelos auxílios financeiros.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia pelas análises realizadas na Central Analítica.

À SUFRAMA pelo auxílio financeiro destinado ao pagamento dos professores do curso.

À Universidade UNESP-Rio Claro na pessoa do Dr. Fernando Pagnocca pelos ensaios antimicrobianos.

À Universidade do Estado do Amazonas por nos ter proporcionado o curso.

Ao Prof. Dr. Massayoshi Yoshida pelos ensinamentos e colaboração.

Às minhas amigas Márcia, Pammy, Patrícia e Cynara pela amizade e orações a meu favor.

À grande amiga Ana Cristina pela convivência, companheirismo e por estar presente em momentos difíceis e alegres.

Aos colegas do Laboratório 18: Patrícia Pinto, Suniá, Ellen, Mirian, Orivaldo, Hércules, Taiana, Tatiana e em especial à Elaine, Aline e Yara pela alegria de trabalharmos juntas.



Aos amigos do curso, principalmente, a Hyelen, Raimundo Junior e Ângela pela amizade e companheirismo nas horas de estudos.

À Arlene e Julieta pela amizade e por suprirem minha ausência na SEDEMA.

Àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização desse trabalho.

# ÍNDICE

**Tabelas**

**Figuras**

**Esquemas**

**Apêndice**

**Abreviatura e Símbolos**

**Resumo**

**Abstract**

**Substâncias Isoladas**

## **INTRODUÇÃO**

### **CAPÍTULO 1 – ESTUDO FITOQUÍMICO: ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL**

#### **1.1 – Introdução**

#### **1.2 - Equipamentos e materiais utilizados**

#### **1.3 – Experimental**

1.3.1 - Análises preliminares do produto por lote

1.3.2 - Fracionamento preliminar

1.3.3 – Separação cromatográfica do extrato clorofórmico

1.3.4 - Separação cromatográfica da fração 44-7

1.3.5 - Separação cromatográfica da fração 55-3

1.3.6 - Separação cromatográfica da fração 55-4

1.3.7 - Separação cromatográfica da fração 55-5

1.3.8 - Separação cromatográfica da fração 55-9

#### **1.4 - Resultados e Discussão**

1.4.1 - Análise preliminares

1.4.2 - Elucidação estrutural dos marcadores isolados

1.4.2.1 - Fenilpropanóides

- 1.4.2.1.1 - Fenilpropanóides [1]
- 1.4.2.1.2 - Fenilpropanóides [2]
- 1.4.2.2 - Derivado do ácido benzóico prenilado [4]
- 1.4.2.3 - Flavonóides
  - 1.4.2.3.1 - Chalcona [3]
  - 1.4.2.3.2 - Flavanona [7]

## **CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE BIOLÓGICA**

### **2.1 - Introdução**

### **2.2 - Experimental**

### **2.3 - Resultados e discussão**

## **CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS**

### **3.1 - Introdução**

### **3.2 - Equipamentos e materiais utilizados**

### **3.3 - Experimental**

- 3.3.1 - Determinação do perfil cromatográfico
  - 3.3.1.2 - Preparo das amostras
  - 3.3.1.3 - Desenvolvimento do método
- 3.3.2 - Análise Quantitativa
  - 3.3.2.1 - Desenvolvimento do método
  - 3.3.2.2 - Tratamento do produto
  - 3.3.2.3 - Tratamento da fração clorofórmica
  - 3.3.2.4 - Preparo de soluções dos marcadores químicos para a quantificação em CLAE

### **3.3.3 - Resultados e discussão**

- 3.3.3.1 - Perfis cromatográficos
- 3.3.3.2 - Quantificação dos marcadores químicos
  - 3.3.3.2.1 – Curvas de calibração

3.3.3.2.2 Quantificação do marcador dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado [3] no produto Dermodilapiol

3.3.3.2.3 – Quantificação do marcador dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado na fração clorofórmica

## **CAPÍTULO 4 – ÓLEOS ESSENCIAIS**

### **4.1 – Introdução**

### **4.2 – Equipamento e materiais utilizados**

### **4.3 – Experimental**

4.3.1 – Caracterização do óleo por CG-EM

4.3.2 – Avaliação sazonal do teor de dilapiol por CG-DIC

### **4.4 – Resultados e Discussão**

4.4.1 – Análise em CG-EM

4.4.2 – Avaliação sazonal

4.4.2.1 – Análise de umidade e rendimento do óleo

4.4.2.2 – Avaliação sazonal do teor de dilapiol por CG-DIC

## **II – CONCLUSÃO GERAL**

## **III - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **APÊNDICE**

## TABELAS

Tabela 1 - Alguns exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais

Tabela 1.1 - Resultados da atividade antimicrobiana do estudo biomonitorado

Tabela 1.2 - Resultados preliminares de densidade, concentração e partição por lote do produto Dermodilapiol

Tabela 1.3 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para o fenilpropanóide [1] ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz)

Tabela 1.4 - Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para o fenilpropanóide [1] ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz)

Tabela 1.5 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para o fenilpropanóide [2] ( $\text{CDCl}_3$ , 200MHz)

Tabela 1.6 - Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para o fenilpropanóide [2]

Tabela 1.7- Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para o derivado do ácido benzóico prenilado [4]

Tabela 1.8 - Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para o derivado do ácido benzóico prenilado [4]

Tabela 1.9 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para a chalcona [3]

Tabela 1.10 - Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para a chalcona [3]

Tabela 1.11 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para a flavanona [7]

Tabela 1.12 - Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para a flavanona [7]

Tabela 2.1 - Atividade antimicrobiana das plantas medicinais de Honduras

Tabela 2.2 - Principais classes de substâncias isoladas de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada

Tabela 2.3 - Resultados de atividade biológica do produto e frações (lotes 1-3)

Tabela 2.4 - Medidas dos halos de inibição em milímetros dos discos contendo substância (antibióticos) controle

Tabela 2.5 - Resultados da atividade antimicrobiana do estudo biomonitorado

Tabela 2.6 - Resultados de atividade antimicrobiana para o lote 1, em diferentes condições de armazenamento

Tabela 3.1 - Áreas médias obtidas para dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado em 280 e 254 nm, respectivamente.

Tabela 3.2b - Dados obtidos em CLAE para a quantificação do derivado do ácido benzóico no produto

Tabela 3.3a - Dados obtidos em CLAE para a quantificação do dilapiol

Tabela 3.3b - Dados obtidos em CLAE para a quantificação do derivado do ácido benzóico

Tabela 4.1 - Dados de  $t_R$ ,  $IR_{\text{calculado}}$  e  $IR_{\text{literatura}}$  para os componentes do óleo essencial de *P.aduncum*

Tabela 4.2 - Dados médios obtidos para as três localidades coletadas

Tabela 4.3 - Dados de área e área percentual para o dilapiol obtidos da análise do CG-DIC, colunas apolar (HP-5) e polar (INNOWAX)

## FIGURAS

Figura 1 - Taxas de crescimento anual por região do mercado de medicamento fitoterápico

Figura 2 - Produto Dermodialpiol (a); *Piper aduncum*(b) e cultivo de *P. aduncum* em Itacoatiara (c)

Figura 3 - Algumas substâncias isoladas em espécie de *P. aduncum*

Figura 4 - Algumas substâncias isoladas de *P. aduncum* com propriedades antimicrobianas comprovadas

Figura 1.1 - Cromeno e derivado do ácido benzóico isolados de *P. aduncum*

Figura 1.2 - Coluna cromatográfica da fração 44-7

Figura 1.3 - Dilapiol e alguns isômeros naturais

Figura 2.1 - Derivado do ácido benzóico prenilado (aduncumeno)

Figura 2.2 - Fenilpropanóides

Figura 2.3 - 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona

Figura 2.4 - Derivados do ácido benzóico isolados de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada

Figura 2.5 - Flavonóides isolados de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada

Figura 2.6 - Cromenos isolados de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada

Figura 2.7 - Fenilpropanóide isolado de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada

Figura 3.1 - Cromatogramas de 32 extratos de *Erigeron brevescapus* analisados em CLAE e detectados em 280 nm

Figura 3.2 - Espectros de UV do dilapiol e derivado do ácido benzóico, em etanol (200-400 nm)

Figura 3.3 - Tratamento do produto

Figura 3.4 - Perfil cromatográfico da Fr. CHCl<sub>3</sub> (Lote 2), 254 e 280 nm

Figura 3.5 - Cromatogramas após a coinjeção dos marcadores isolados na Fr. CHCl<sub>3</sub> (lote 2), em 254 e 280nm

Figura 3.6 - Cromatogramas dos lotes 1-4 analisados nos comprimentos de onda 280nm; 254nm e 265nm

Figura 3.7 – Cromatogramas das frações obtidas no tratamento do produto, 254 e 280 nm

Figura 3.8 – Curvas de calibração para o marcador dilapiol a 280 nm e o marcador derivado do ácido benzóico prenilado a 254 nm

Figura 3.9 - Concentração do dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado no produto

Figura 3.10 – Concentração de dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado nas frações clorofórmicas

Figura 4.1 – Precipitação em Manaus nos anos 2003 e2004

Figura 4.2 – Coleta no Campus/INPA (março/2004)

Figura 4.3 – Cromatograma do óleo essencial de *P. aduncum* obtido em CG-EM

Figura 4.4 – Variação do teor de umidade

Figura 4.5 – Rendimento do óleo essencial nos indivíduos coletados e precipitação

Figura 4.6 – Comparação das análises nas colunas polar e apolar e avaliação dos perfis cromatográficos obtidos

Figura 4.7 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna HP-5 e correlação com fator temperatura média mensal e temperatura máxima diária.

Figura 4.8 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna INNOWAX e correlação com fator temperatura média mensal e temperatura máxima diária.

Figura 4.9 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna HP-5 e correlação com o fator precipitação mensal e diária.

Figura 4.10 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna INNOWAX e correlação com o fator precipitação mensal e diária.



## **ESQUEMAS**

Esquema 1.1 - Partição líquido-líquido do produto Dermodialpiol (Lote 1) e valores de inibição das frações e produto nos ensaios antimicrobianos

Esquema 1.2 – Separação cromatográfica da fração clorofórmica

Esquema 1.3 - Separação cromatográfica da fração 44-7

Esquema 1.4 - Separação cromatográfica da fração 55-3

Esquema 1.5 - Separação cromatográfica da fração 55-4

Esquema 1.6 - Separação cromatográfica da fração 55-5

Esquema 1.7 - Separação cromatográfica da fração 55-9

## APÊNDICE – ESPECTROS

Apêndice 1 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do dilapiol

Apêndice 2 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do dilapiol

Apêndice 3 - Cromatograma CG do dilapiol

Apêndice 4 – Espectro de massas do dilapiol

Apêndice 5 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da miristicina

Apêndice 6 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da miristicina

Apêndice 7 - Espectro de RMN DEPT 135 da miristicina

Apêndice 8 - Espectro de massas da miristicina

Apêndice 9 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da diidroflavocavina B

Apêndice 10 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  diidroflavocavina B

Apêndice 11 - Espectro de RMN DEPT 135 da diidroflavocavina B

Apêndice 12 - Cromatograma CG e espectro de massas da diidroflavocavina B

Apêndice 13 - Espectro de RMN COSY HH da diidroflavocavina B

Apêndice 14 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila

Apêndice 15 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila

Apêndice 16 - Espectro de RMN DEPT 135 de 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila

Apêndice 17 - Cromatograma CG e espectro de massas do 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila

Apêndice 18 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da sacuranetina

Apêndice 19 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da sacuranetina

Apêndice 20 - Espectro de RMN DEPT 135 da sacuranetina

Apêndice 21 - Cromatograma CG e espectro de massas da sacuranetina

Apêndice 22 - Espectro de RMN COSY HH da sacuranetina

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	deslocamento químico
$\lambda$	comprimento de onda
<b>ACN</b>	acetonitrila
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>CC</b>	coluna cromatográfica
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
$\text{CHCl}_3$	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
cm	centímetro
<b>COSY</b>	correlation spectroscopy
<i>d</i>	dubleto
<b>DCM</b>	diclorometano
<i>dd</i>	duplo dubleto
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DCM	diclorometano
<i>di</i>	diâmetro interno
<i>dt</i>	duplo tripleto
EM	espectro de massas
Fr.	fração
$\text{H}_2\text{O}$	água
<b>HBBD</b>	hydrogen broad-bondenig decoupled
Hex	hexano
<b>Hid.</b>	hidroalcoólica
<b>HMBC</b>	heteronuclear multiple bond coherence
Int. rel.	intensidade relativa

i-PrOH	iso-propanol
IV	Infravermelho
<b>J</b>	constante de acoplamento
<b>m</b>	multiplete
<b>m/z</b>	relação massa/carga
<b><i>M</i><sup>+</sup></b>	pico do íon molecular
<b>MeOH</b>	metanol
<b>N.H</b>	número de hidrogênio
<b>NOESY</b>	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
<b>OAcEt</b>	acetato de etila
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ppm</b>	partes por milhão
<b>RMN</b>	ressonância magnética nuclear
<b>s</b>	singleto
<b>sl</b>	singleto largo
<b>t</b>	triplete
<b>TFA</b>	ácido trifluoracético
<b>TOCSY</b>	total correlation spectroscopy

## RESUMO

O trabalho relata o isolamento e identificação estrutural de 2 fenilpropanóides (dilapiol, miristicina), 1 derivado do ácido benzóico prenilado (3-3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila), 1 chalcona (diidroflavocavina B) e 1 flavanona (sacuranetina) presentes no produto fitoterápico Dermodilapiol produzido a partir das partes aéreas da espécie vegetal *Piper aduncum*. O isolamento dos marcadores químicos foi realizado a partir da fração ativa do produto, obtida através do processo de partição líquido-líquido, a qual foi então submetida a diferentes técnicas cromatográficas resultando nas substâncias isoladas.

A caracterização química (perfil cromatográfico) e o doseamento dos marcadores químicos foram realizados para quatro lotes do produto, através da cromatografia líquida de alta eficiência, na qual foram desenvolvidos dois métodos, sendo um método mais longo para a análise de perfil cromatográfico e um método mais curto para a quantificação dos marcadores. Pôde-se observar uma constância na quantidade produzida dos marcadores dilapiol e do derivado do ácido benzóico prenilado. Também observou-se uma constância dos constituintes presentes na fração ativa, acompanhada pela constância da atividade antimicrobiana do produto.

Paralelamente foi realizado o acompanhamento do óleo essencial das folhas de três indivíduos, localizados em três diferentes localidades na cidade de Manaus. Esse trabalho foi realizado durante o período de um ano, que revelou que o óleo é composto majoritariamente do constituinte dilapiol. Observou-se apenas variação significativa na produção de óleo total, aparentemente relacionado com o período de chuvas da região.

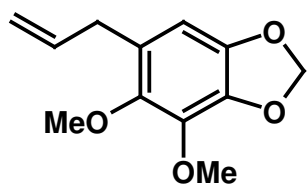
## ABSTRACT

This work describes the isolation and structure elucidation of two phenylpropanoids (dillapiol and myristicin), one prenylated benzoic acid derivative (methyl 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-benzoate), one chalcone (dihydroflavokawin B) and one flavanone (sakuranetin) from the phytoterapeutical product Dermodilapiol, produced from the aerial parts of *Piper aduncum*. The isolation of the chemical markers has been done from its active fraction, obtained from a liquid-liquid partition and further chromatographic steps.

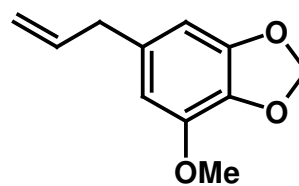
Four different lots of the product have been analysed by high performance liquid chromatography using two different methods. A longer method was used to describe the chromatographic profiles of each lot and a shorter method was used to quantify two of the chemical markers in the product. In both cases, it could be observed a correlation between the chemical composition and biological activity.

It has also been studied the essential oil production of leaves of *P. aduncum* collected in three different places in Manaus for a period of one year. During this period, dillapiol has always been the major component. A small chemical variability was observed to all specimens studied and apparently was correlated to the rainy season of the city.

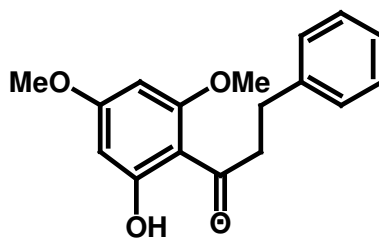
## SUBSTÂNCIAS ISOLADAS



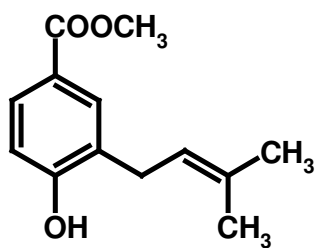
[ 1 ]



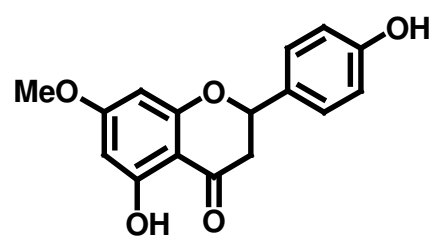
[ 2 ]



[ 3 ]



[ 4 ]



[ 7 ]

## I - INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20 % do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais (FARNSWORTH, 1990; BAKER *et al.*, 1995; KINGHORN e SEO, 1996). Essa afirmação é facilmente comprovada ao se analisar a tabela abaixo constituída de medicamentos que foram desenvolvidos a partir de produtos naturais.



**Tabela 1 - Alguns exemplos de medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais**

<b>Fármaco</b>	<b>Uso Terapêutico</b>	<b>Fonte</b>
ciclosporina	imunossupressor	<i>Tolypocladium inflatum</i>
cromolina	antiasmático	<i>Ammi visnaga</i>
digoxina	insuficiência cardíaca	<i>Digitalis purpurea</i>
artemisinina	antimalárico	<i>Artemisia annua</i>
captopril	antihipertensivo	<i>Bothrops jararaca</i>
escopolamina	doença de Parkinson	<i>Datura spp.</i>
etoposídeo	câncer (testículo, pulmão)	<i>Podophyllum spp.</i>
galantamina	doença de Alzheimer	<i>Galanthus nivalis</i>
irinotecam	câncer (coloretal)	<i>Camptotheca acuminata</i>
morfina	analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
paclitaxel	câncer (ovário)	<i>Taxus brevifolia</i>
pilocarpina	glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
quinina	antimalárico	<i>Cinchona spp.</i>
vimblastina	câncer (mama)	<i>Catharanthus roseus</i>
vincristina	câncer (leucemia)	<i>Catharanthus roseus</i>

Fonte: Calixto (2003)

As plantas portanto constituem-se numa fonte imediata e viável de medicamentos. Todavia, existem inúmeras dificuldades para o desenvolvimento de um novo medicamento, alopático ou fármaco. Da fase inicial até que seja colocado no mercado demanda-se um tempo longo de pesquisa (7 a 20 anos) e custo alto para o seu desenvolvimento, que pode chegar a US\$ 600 milhões de dólares/medicamento (FERREIRA, 1998).

Por outro lado, vários pesquisadores afirmam que quando um medicamento é originado de uma planta medicinal, o custo pode ser bem menor. McChesney (1993) mostrou que um produto desenvolvido na Universidade do Mississippi custou US\$ 35 milhões.

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS) entre 65 e 80% da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura de terapias alternativas para muitas doenças (FARNSWORTH, 1985 e AKERELE, 1988).

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, a tal ponto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 22 bilhões de dólares por ano (YUNES, 2001; PINTO, 2002), conforme é apresentado na Figura 1. Dentre os fatores importantes para explicar esse dinamismo estão a preferência dos consumidores por terapias naturais, como alternativa aos medicamentos sintéticos; a preocupação em relação aos efeitos colaterais freqüentemente observados com os medicamentos sintéticos; a crença errônea de que os medicamentos fitoterápicos não possuem efeitos colaterais e o alto custo dos medicamentos sintéticos se comparados aos desenvolvimentos dos medicamentos fitoterápicos (CALIXTO, 2001).

<b>Região</b>	<b>Crescimento 1985-1991 (%)</b>	<b>Crescimento 1991-1992 (%)</b>	<b>Crescimento 1993-1998 (%)</b>
EUA	10	12	12
União Européia	10	5	8
Resto da Europa	12	8	12
Japão	18	15	15
Sudeste da Ásia	15	12	12
Índia e Paquistão	12	15	15

Fonte: Ferreira (1998).

**Figura 1 - Taxas de crescimento anual por região do mercado de medicamentos fitoterápicos**

Medicamentos fitoterápicos são preparações padronizadas contendo extratos de uma ou mais plantas comercializados em países pobres ou ricos (YUNES, 2001).

De acordo com a definição proposta pela OMS, os fitoterápicos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado (WHO, 1993).

Segundo a Resolução (RDC Nº48/2004) da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde do Brasil, a definição de produto fitoterápico deixa entrever que a transformação de uma planta em medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico (DOU, 18/03/2004). Portanto, no Brasil, o registro de um medicamento fitoterápico necessita de estudos científicos que comprovem a qualidade, eficácia e segurança de uso.

A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos. Já a segurança é determinada pelos ensaios que comprovem a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde, como, por exemplo, metais pesados, agrotóxicos, microorganismos e seus produtos de degradação entre outros (FARIAS, 2002).

O controle de qualidade de fitoterápicos não se verifica apenas na análise do produto acabado, mas também na obtenção da espécie vegetal desde a sua

identificação, cultivo, colheita, beneficiamento, armazenamento até a forma farmacêutica final (BACCHI, 1996).

Logo, para o desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico são necessários estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimentos de metodologias analíticas e tecnológicas (PETROVICK *et al.*,1997). Conseqüentemente estudos fitoquímicos, especialmente aqueles envolvendo estudos de atividade biológica, são de fundamental importância no processo de desenvolvimento de um produto fitoterápico.

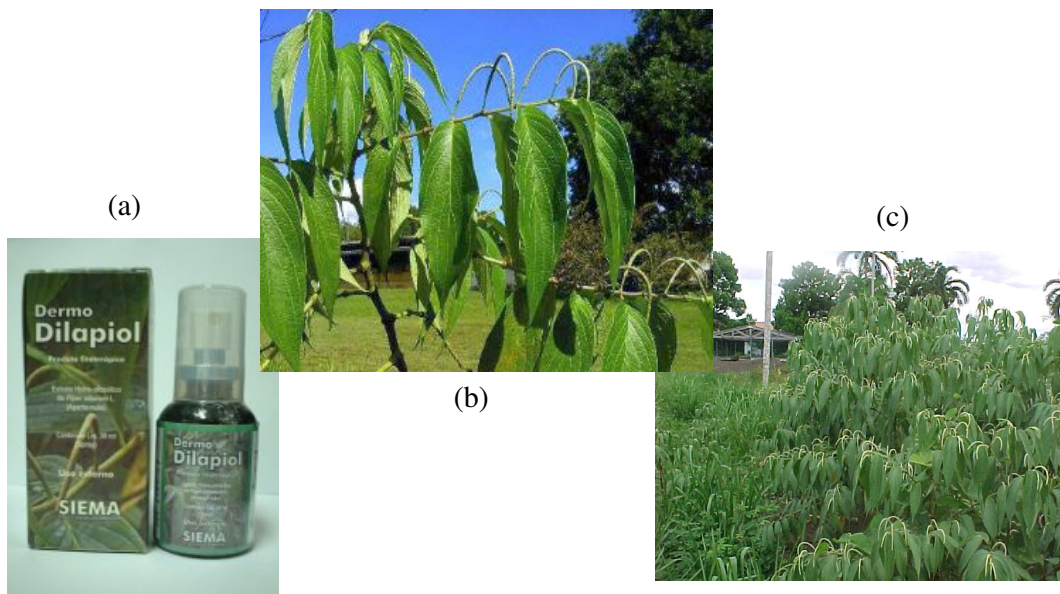
Com os avanços ocorridos nos procedimentos analíticos que permitem o isolamento e a caracterização de metabólitos secundários de plantas é atualmente possível estabelecer a caracterização dos fitoconstituintes de um produto fitoterápico, os chamados marcadores químicos, indispensáveis para o planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica e para os estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final (YUNES, 2001; SIMÕES *et al.*, 2001).

De acordo com a RDC Nº 48/2004, marcadores químicos são constituintes quimicamente definidos, presente na matéria-prima vegetal, preferencialmente, os próprios princípios ativos, destinados ao controle de qualidade da matéria-prima vegetal, dos preparados fitoterápicos intermediários e dos produtos fitoterápicos, os quais segundo Farias (2002), são selecionados segundo a sua abundância, facilidade de detecção e doseamento.

Com isso, este trabalho visou descrever alguns métodos analíticos utilizados na garantia de qualidade no processo de desenvolvimento do produto fitoterápico DERMODILAPIOL, através da caracterização química, identificação e doseamento dos marcadores químicos de acordo com as exigências da ANVISA.

O DERMODILAPIOL (Figura 2a) é um produto destinado ao uso dermatológico no tratamento de micoses e é produzido no Estado do Amazonas. Foi desenvolvido pela empresa SIEMA Eco Essências da Amazônia LTDA e necessita ser registrado junto à Agência de Vigilância Sanitária para fins de comercialização. Não é considerado um fitoterápico tradicional e, portanto deve atender todas as exigências descritas na RDC 48 para um fitoterápico novo.

Esse medicamento é produzido a partir do extrato das partes aéreas da espécie vegetal, *Piper aduncum* (Piperaceae), (Figura 2b), que pode ser encontrada naturalmente, em todo o Brasil, com frequência na região de Manaus e em regiões degradadas da Amazônia. Essa espécie já está sendo cultivada pela empresa SIEMA, pois este é um fator crucial para melhorar e garantir a qualidade da matéria-prima e, conseqüentemente, o produto final acabado (Figura 2c).



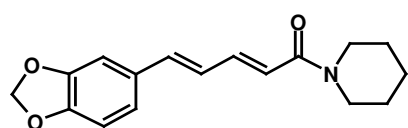
**Figura 2 - produto Dermo Dilapiol (a); *Piper aduncum* (b) e cultivo de *P. aduncum* em Itacoatiara (c)**

A família Piperaceae compreende 12 gêneros e aproximadamente 1400 espécies com distribuição pantropical (MAIA, 1998), as quais possuem importância econômica, comercial e medicinal (PARMAR, 1997).

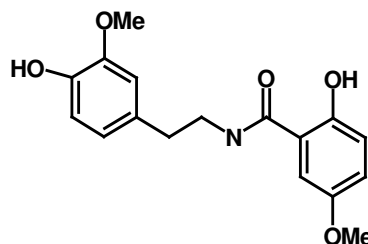
*Piper*, um amplo gênero de Piperaceae constituído de mais de 700 espécies, das quais 170 crescem em campos do Brasil, está distribuído em toda a região tropical e subtropical do mundo (SENGUPTA, 1987), sendo esse um gênero bem conhecido por produzir um largo número de compostos fisiologicamente ativos e comumente usado na medicina popular da América Latina e das Índias Ocidentais (OKUNADE, 1997).

A pesquisa por constituintes ativos das diferentes espécies de *Piper* surgiu desde 1819, quando Oestred isolou a piperina, o princípio picante dos frutos de *Piper nigrum*, usada como condimento.

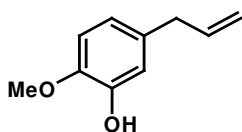
Estudos realizados com espécies de *Piper* têm revelado a ocorrência de uma variedade de substâncias. Parmar *et al.* (1997) listaram aproximadamente 600 constituintes químicos pertencentes a diferentes classes de compostos bioativos isolados desse gênero, tais como, amidas, alcalóides, fenilpropanóides, lignanas, terpenos, esteróides, chalconas, flavonas e etc, Figura 3.



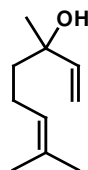
piperina (*P. nigrum*)



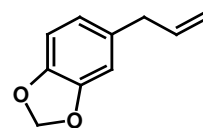
aduncamida (*P. aduncum*)



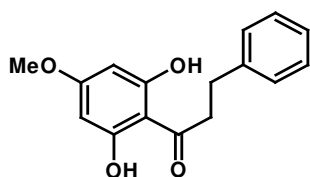
eugenol (*P. cavalcantei*)



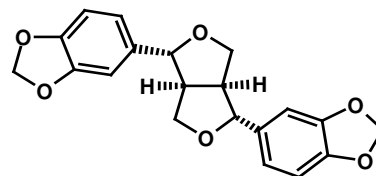
linalol (*P. marginatum*)



safrol (*P. callosum*)



2',6'- dihidroxi-4'-  
metoxidihidrochalcona  
(*P. aduncum*)



sesamina (*P. longum*)

**Figura 3 – Algumas substâncias isoladas em espécies de *Piper*.**

Em todo o mundo, espécies de *Piper* têm sido usadas tradicionalmente contra pestes. Por exemplo, a espécie amazônica, *Piper rotundistipulum* é usada

localmente como inseticida e veneno para peixe (SCHULTES e RAFFAUF, 1990). *P. guineense* e *P. nigrum* são utilizadas como inseticida e moluscicida em várias partes da África (SU e HORWAT, 1981; IVBIJARO e BOLAJI, 1990) e as folhas de *P. hispidum* e *P. auritum*, espécies nativas da América Central e do noroeste da bacia amazônica, são utilizadas pelos indígenas para prevenir a malária e remover piolhos (SCHULTES, 1975).

Espécies do gênero *Piper* também são fontes de óleos essenciais bioativos de grande importância para as indústrias farmacêuticas (SILVA e MACHADO, 1999). Por exemplo, o óleo volátil extraído das folhas e frutos de *Piper marginatum* apresenta atividade contra *Schistosoma mansoni*. Essa espécie também é utilizada como anti-séptica, repelente, no tratamento de erisipela e a decocção das raízes apresenta propriedade antimalárica (MORS *et al.*, 2000; MILLIKEN, 1997).

Com relação à espécie *P. aduncum*, existem vários artigos científicos que demonstram claramente o potencial de extratos e substâncias isoladas dessa espécie como agente antibacteriano, antifúngico e antiprotozoário (GOODMAN e GILMAN, 1996; NAIR e BURKE, 1990 e ORJALA *et al.*, 1994).

*P. aduncum* é um arbusto comum da região tropical, que cresce em solo argiloso e areno-argiloso, com ocorrência em áreas tipos savanas e floresta secundária, sendo considerada uma espécie invasora que emerge de rodovias recém-abertas em áreas de floresta firme. No sudeste, é uma planta de ocorrência em pastagens, onde é considerada “planta daninha” (MAIA, 1998). Ocasionalmente é cultivada com fins ornamentais, contudo é na medicina tradicional, que sua popularidade é maior.



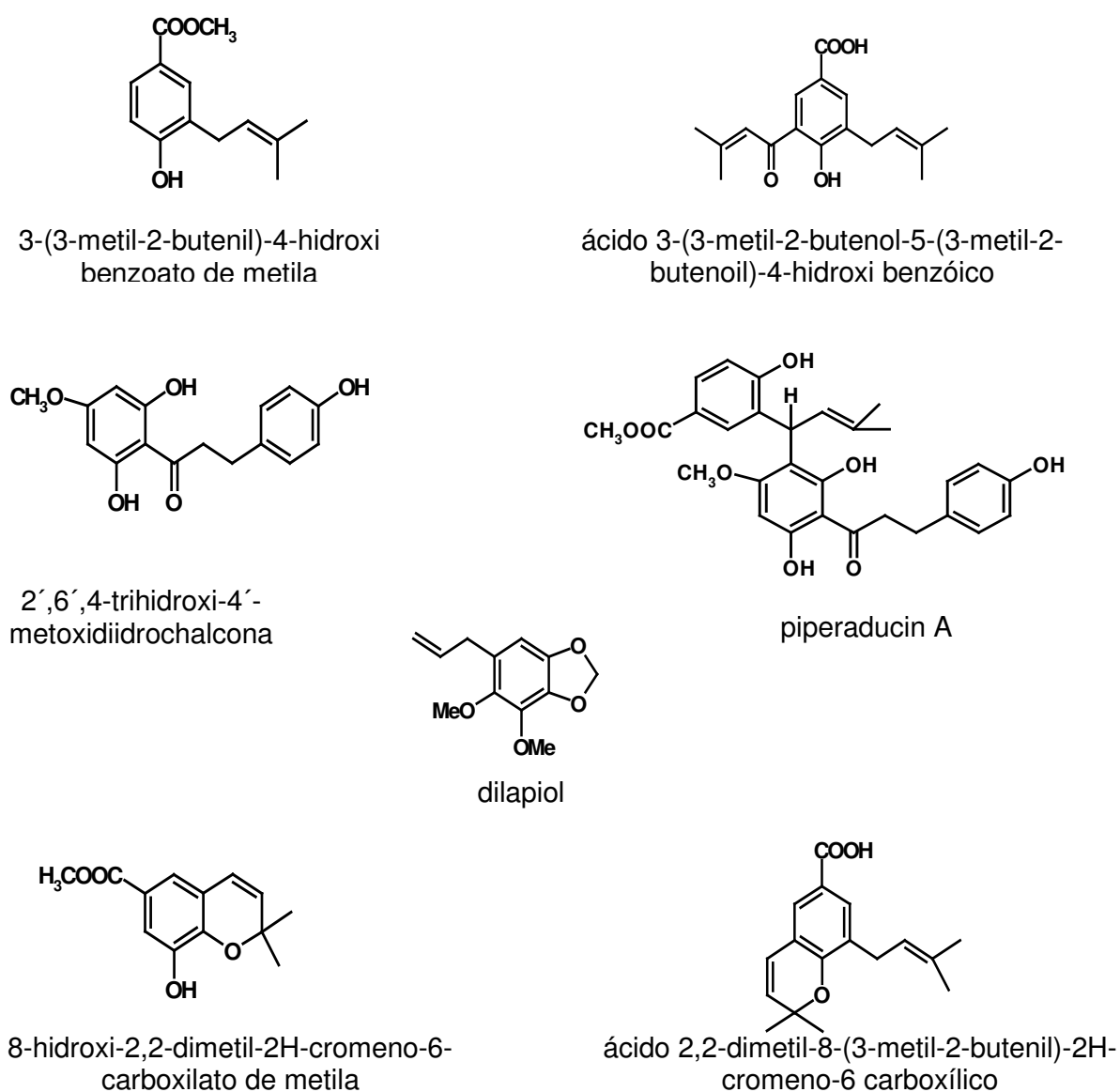
Popularmente é conhecida como pimenta-longa, pimenta-de-macaco, aperturão, tapa-buraco, pimenta-de-fruto-ganchoso e matico-falso, e possui inúmeras indicações, tais como, anti-séptico para cortes na pele, diarreia, gonorréia, carminativo, em males ginecológicos e desordens intestinais (ORJALA *et al.*, 1993a; MAIA, 1998; CICCÍO,1997).

Van den Berg (1993) relata que o chá ou infusão alcóolica de folhas, raízes e frutos é empregado como tônico, carminativo, antiespasmódico, contra blenorria e para afecções do fígado, vesícula e baço. Segundo Mors *et al.* (2000), as raízes possuem ação eficaz contra picada de cobra, as quais são descritas por Lainetti e Brito (1980), como tóxicas.

Em Honduras, *P. aduncum* é considerada uma planta medicinal com diferentes usos como dores estomacais, úlceras e desordens femininas como cólicas menstruais, hemorragia e parto (LENTZ, 1998). Segundo Morton (1981), na Guatemala e México essa espécie é popularmente utilizada como adstringente, estimulante digestivo e diurético. Em Cuba, é utilizada como hemostático, no tratamento de hemorróidas, leucorréia e em formas de banhos para o tratamento de doenças externas, como exemplo, a erisipela. Em outras localidades da América Central, Ciccío (1997) relata usos semelhantes.

Segundo Orjala *et al.* (1994), a decocção das folhas é usada no Peru para o tratamento de diarreia e em Papua Nova Guiné, as folhas frescas são usadas, em forma de bandagem, como anti-séptico no tratamento de ferimentos.

Estudos químicos realizados nessa espécie revelaram a ocorrência de uma variedade de compostos como os fenilpropanóides miristicina e dilapiol, derivados do ácido benzóico, cromenos e flavonóides (BURKE e NAIR,1986; ORJALA *et al.*, 1993a; 1993b; MOREIRA, GUIMARÃES e KAPLAN, 1998), cujas propriedades antifúngicas (Figura 4), citotóxica, bactericida e moluscicida foram comprovadas em diversos trabalhos científicos.



**Figura 4 - Algumas substâncias isoladas de *P. aduncum* com propriedades antimicrobianas comprovadas.**

O óleo essencial, extraído das folhas e frutos dessa espécie, também foi bastante estudado do ponto de vista químico e farmacológico, sendo a identificação dos constituintes majoritários determinados em espécies de diferentes localidades.

Smith e Kassim (1979) relataram que os constituintes majoritários do óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas frescas de espécies coletadas na Ilhas Fiji são dilapiol (58%) e piperitona (4%). Gottlieb *et al.* (1981) estudaram os componentes das variedades brasileiras, *P. aduncum var. aduncum* e *P. aduncum var. cordulatum*, encontrando dilapiol 74,5% e 88,4%, respectivamente.

Gupta *et al.* (1983) encontraram uma percentagem de 90% de dilapiol presente no óleo extraído de folhas coletadas no Panamá. Na Colômbia, Diaz *et al.* (1984) identificaram como constituintes majoritários o dilapiol, a miristicina e piperitona.

Os estudos realizados por Maia *et al.* (2003), para a comprovação da atividade biológica de óleos essenciais extraídos de espécies aromáticas, apresentaram resultados satisfatórios para o óleo de *P. aduncum*, o qual apresentou um amplo espectro de ação, com propriedades inseticidas, moluscicida, fungicida, larvicida e bactericida. Como exemplo, temos o teste contra *Crinipellis perniciososa*, o fungo conhecido como vassoura-de-bruxa, inibindo 100% de sua germinação (SANTOS, 1997).

Bastos (1997) testou esse óleo essencial contra fungos e bactérias patogênicas, bem como em inseto fitófagos que infestam culturas tradicionais, tais como cacau,

seringa, pimenta-do-reino e banana, sendo que uma baixa concentração do óleo foi suficiente para inibir totalmente o crescimento dessas pragas.

Em resumo, o presente trabalho tem como objetivo o estudo dos seguintes tópicos:

- a) isolamento e identificação dos marcadores químicos do produto Dermodilapiol;
- b) quantificação dos marcadores químicos do produto Dermodilapiol;
- c) avaliação do efeito sazonal e do efeito localidade geográfica para o marcador químico dilapiol no óleo essencial, obtido das folhas.

# **CAPÍTULO 1 - ESTUDO FITOQUÍMICO: ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS MARCADORES**

## **1.1 - Introdução**

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As mais diversas enfermidades têm sido tratadas com chás (infusos, decoctos e macerados), sucos, tinturas, banhos e unguentos, preparados a partir de diferentes partes das plantas (ROBERTS *et al.*, 1996; ALMEIDA, 1993; FERNANDEZ *et al.*, 1982; ORLANDI e VERVELOET, 1983).

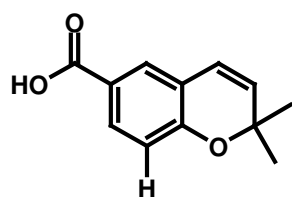
Segundo Haensel, Sticher e Steinegger (1999), as plantas são consideradas um laboratório biossintético de constituintes químicos, tais como proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos, lipídios, etc; substâncias do metabolismo básico ou primário e do metabolismo secundário, os quais são responsáveis pelas propriedades terapêuticas das plantas.

A partir do século XIX, a química vem desempenhando um papel importante e inquestionável, levando a descoberta e ao desenvolvimento de novos compostos com uma ampla gama de aplicações. Como base para esse sucesso, a química tem desenvolvido uma série de métodos confiáveis de isolamento, identificação e quantificação de substâncias, gerando resultados com maior confiabilidade, rapidez e baixo custo (MARASCHIN e VERPOORTE, 2001). Como exemplo, o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (NOESY, TOCSY, DQF-COSY, HMBC, ETC.), as quais em conjunto com as técnicas espectrais tradicionais de UV, IV, RMN ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e EM, tornaram possível elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificadas (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

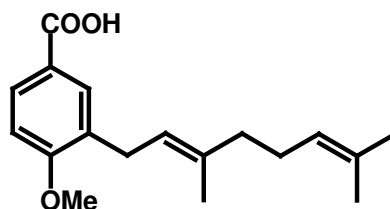
Existem vários trabalhos realizados com a espécie *Piper aduncum*, cujo perfil fitoquímico é caracterizado pela produção de classes típicas de compostos tais como as amidas, derivados do ácido benzóico e cromenos, além de lignanas, neolignanas e alguns alcalóides (PARMAR, *et al.*, 1997 e WU *et al.*, 1997).

Orjala *et al.* (1993b) isolaram das folhas secas, o ácido nervogênico (derivado do ácido benzóico); dilapiol e miristicina (fenilpropanóides); humuleno e os óxidos de cariofileno e humuleno (sesquiterpenos). Assim como, isolaram as chalconas substituídas por terpenos (ORJALA, 1993a).

O cromeno 2,2 dimetil-2H-1-cromeno-6- ácido carboxílico e o derivado do ácido benzóico, 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metóxi ácido benzóico (Figura 1.1) foram isolados pela primeira vez nessa espécie por Baldoqui (1999).



2,2 dimetil-2H-1-cromeno-6- ácido carboxílico



3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metóxi ácido benzóico

**Figura 1.1 – Cromeno e derivado do ácido benzóico isolados de *P. aduncum***

No presente trabalho, o isolamento fitoquímico foi realizado conjuntamente com ensaios de atividade biológica a partir do extrato do produto, o qual foi submetido a diferentes técnicas cromatográficas de isolamento e espectroscópicas para elucidação estrutural.

## 1.2 - Equipamentos e materiais utilizados

O isolamento dos constituintes químicos foi realizado a partir do fracionamento do produto Dermodilapiol, lote 1 – produzido em agosto de 2001.

Os seguintes equipamentos e acessórios foram utilizados no decorrer do trabalho:

- Balanças analíticas - Mettler-Toledo Modelo AB204 e Ohaus Modelo Explorer e semi-analíticas – Quimis Modelo QISA 210.

- Evaporador rotativo Fisatom 802.

O grau de pureza dos solventes utilizados variou de acordo com a finalidade. Para as extrações, partições e sistemas cromatográficos utilizaram-se solventes de grau P. A., das marcas Merck, Synth e grau técnico submetido à destilação fracionada.

Utilizou-se sulfato de sódio, sulfato de magnésio ou cloreto de cálcio anidros para a secagem dos solventes.

O tipo de fase estacionária utilizada variou de acordo com a separação desejada:

- Para a cromatografia em coluna filtrante utilizou-se sílica Si 60 da Merck, com partículas de 0,063 - 0,200 mm;

- Cromatografia em coluna de fase reversa com adsorvente de sílica gel 60 derivatizada RP-18, com partículas de 0,025-0,040 mm;

- Cromatografia em coluna tipo "flash", sob vácuo, utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 da Merck, com partículas de 0,040-0,063 mm;

- Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) de fase normal com cromatoplasmas de sílica gel 60 em alumínio com indicador de fluorescência F<sub>254</sub> da Merck;



- CCDC de fase reversa em cromatoplasas em alumínio com sílica derivatizada RP-18 da Merck com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>;

- CCDP com placas de sílica gel 60 PF<sub>254</sub> da Merck, com espessura de 1,0 mm, preparadas a partir de uma suspensão em água;

- Para as revelações dos cromatogramas obtidos em placas comparativas utilizaram-se irradiação no UV (254 e 366 nm), vapores de iodo, solução de anisaldeído, solução de cloreto férrico (10%) e/ou Reagente de Dragendorff.

- Os espectros de ressonância magnética foram registrados no Instituto de Química da Universidade São Paulo (USP) utilizando-se espectrômetros Bruker AC-200 operando em 200 MHz (RMN <sup>1</sup>H) e Bruker AC-300 operando, respectivamente, a 300 (RMN <sup>1</sup>H) e 75 MHz (RMN <sup>13</sup>C), utilizando como solvente CDCl<sub>3</sub> da Aldrich.

- Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro HP 5988A Hewlett Packard (quadropolo), utilizando-se a técnica de impacto eletrônico a 70eV. As amostras foram injetadas via cromatógrafo gasoso (Modelo Hewlett Packard, coluna DB-5, 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno, acoplado ao espectrômetro de massas.

## **1.3 - Experimental**

### **1.3.1 - Análises preliminares do Produto por Lote**

A avaliação da densidade do produto foi realizada em duplicata, entre 28 e 29 °C, utilizando balões volumétricos de 500 mL previamente aferidos. Após a pesagem dos balões obtém-se a densidade média do produto (gravidade específica).

Para a determinação da concentração, o volume medido no balão volumétrico foi transferido, cuidadosamente, para um balão de fundo redondo, previamente pesado, e então concentrado em rotaevaporador até ficar livre de solvente. A concentração final foi determinada sem a utilização de liofilização.

### **1.3.2 - Fracionamento Preliminar**

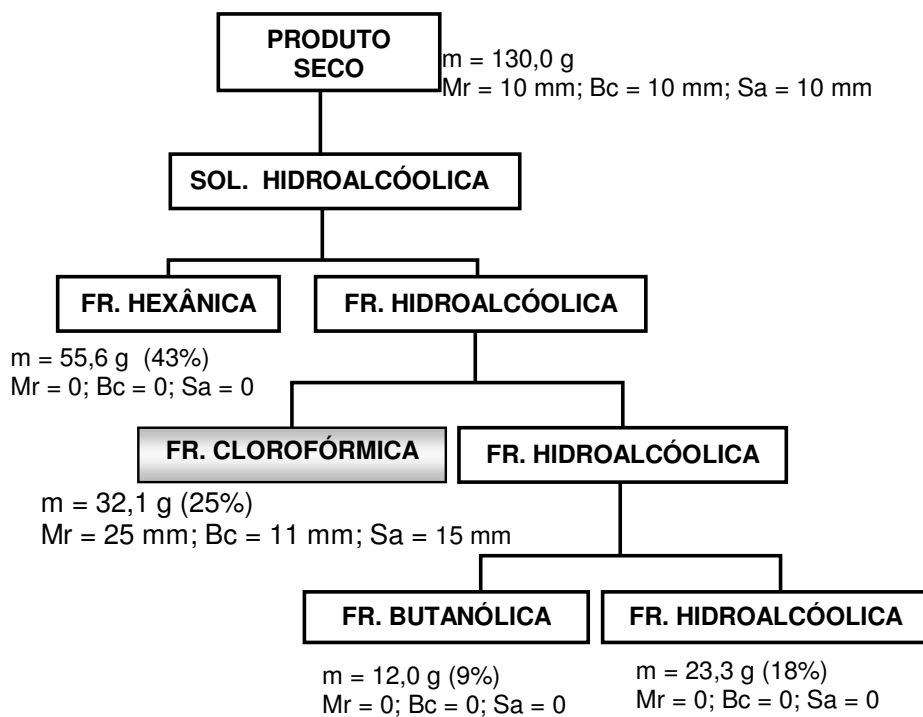
Inicialmente o produto Dermodilapiol foi concentrado até evaporação total do solvente, utilizando rotaevaporador, sob vácuo. Após liofilização, obteve-se o extrato com massa igual a 130 g.

Uma vez obtido o extrato, o mesmo foi submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, visando uma pré-purificação das substâncias, através de seus diferentes coeficientes de partição (solubilidade).

Para esse fracionamento preliminar, o extrato foi ressolubilizado em MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1) no volume de 1300 mL e efetuou-se a extração com hexano (1000 mL) por duas vezes. Por diferença de densidade separou-se a fração hexânica da fração hidroalcóolica.

À fração hidroalcóolica resultante adicionou-se 370 mL de água destilada, obtendo-se uma proporção de 7:3 de MeOH:H<sub>2</sub>O. Extraíu-se por duas vezes com 1000 mL de clorofórmio. Separou-se a fração clorofórmica e à fração hidroalcóolica resultante foi adicionada mais água até a separação de fases, após a adição de 1000 mL de butanol.

Realizou-se nova extração líquido-líquido e ao final, resultaram quatro frações, as quais foram concentradas em rotaevaporador, sob vácuo (Esquema 1.1).



**Esquema 1.1 – Partição líquido-líquido do produto Dermodilapiol (Lote 1) e valores de inibição das frações e produto nos ensaios antimicrobianos**

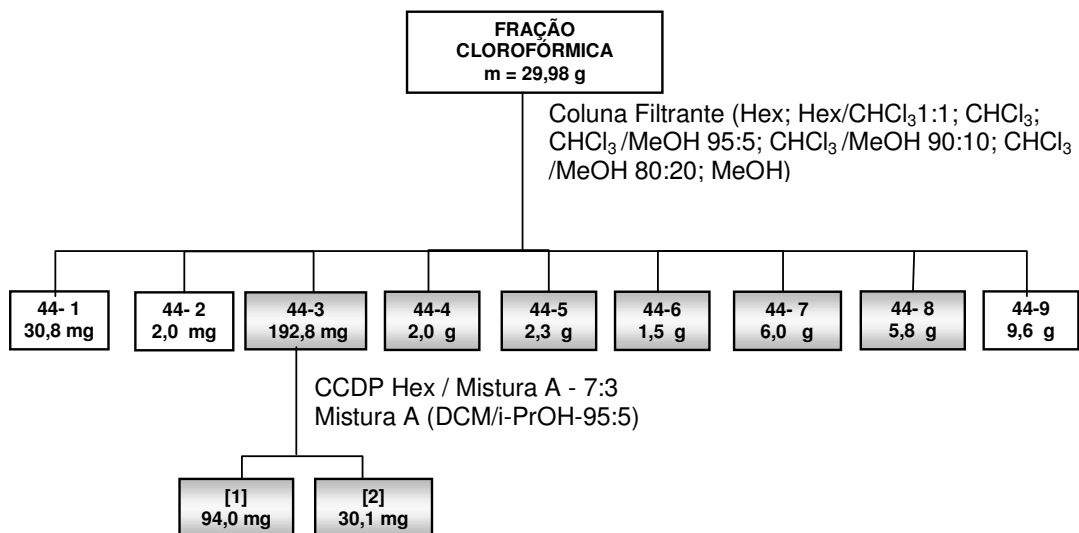
Um procedimento de partição líquido-líquido foi realizado para 4 (quatro) lotes do produto.

Para localizar os princípios ativos, todas as frações obtidas, juntamente com o produto, foram enviadas para testes de atividade antimicrobiana (*Micrococcus roseus*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*), os quais foram realizados em parceria com o grupo de pesquisa do Dr. Fernando Pagnocca da UNESP – Rio Claro. A fração mais ativa foi submetida a procedimentos cromatográficos para o isolamento dos constituintes químicos.

### **1.3.3 – Separação cromatográfica do Extrato Clorofórmico**

Uma vez identificada, a fração ativa foi submetida à cromatografia em coluna aberta (CC) com fase estacionária sílica gel, sendo eluída com uma mistura de solventes que foi previamente determinada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), conforme procedimento abaixo.

29,98 g do extrato clorofórmico foram fracionadas em coluna filtrante sílica gel ( $m = 425,71$  g;  $h = 10,0$  cm e  $di = 10,2$  cm), utilizando como eluentes: Hexano (100%) → Hex/CHCl<sub>3</sub> (1:1) → CHCl<sub>3</sub> (100%) → CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5) → CHCl<sub>3</sub>/MeOH (90:10) → CHCl<sub>3</sub>/MeOH (80:20) → MeOH (100%), utilizando o volume de 1 L para cada sistema de eluentes. Resultaram 13 frações as quais foram agrupadas em 9 frações, segundo seu perfil cromatográfico verificado após CCDC (Esquema 1.2).



**Esquema 1.2 – Separação cromatográfica da fração clorofórmica**

A fração 44-3 foi fracionada por cromatografia em camada delgada preparativa de sílica gel, utilizando como fase móvel o sistema de solventes Hex: Mistura (DCM/i-PrOH – 95:5) – 7:3, fornecendo os compostos [1] e [2], cujas massas estão apresentadas no Esquema 1.2.

As frações de 44-3 a 44-8 foram enviadas para testes de atividade biológica e os resultados são descritos na tabela 1.1.

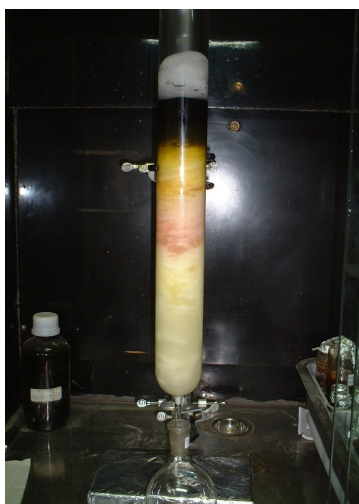
**Tabela 1.1 - Atividade antimicrobiana do estudo biomonitorado**

CÓDIGO	Microorganismos		
	Sa (mm)	Bc (mm)	Tc (mm)
1LCPO 44-3	N.I	N.I	11
1LCPO 44-4	N.I	N.I	8
1LCPO 44-5	N.I	N.I	7
1LCPO 44-6	8	7	8
1LCPO 44-7	10	9	N.T
1LCPO 44-8	9	8	N.T

Bc: *Bacillus cereus*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Tc: *Trichosporon cutaneum*;  
N.I – Não inibe ; N. T – Não testada

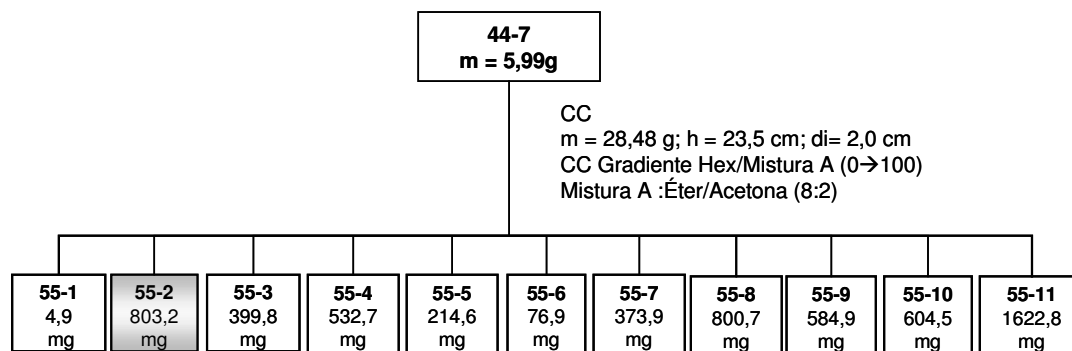
### 1.3.4 – Separação cromatográfica da Fração 44-7

Por apresentar atividade antimicrobiana e maior massa (quando comparada às demais frações), a fração 44-7 ( $m = 5,9958 \text{ g}$ ) foi cromatografada em coluna (Figura 1.2), utilizando sílica gel (0,063-0,200 mm;  $m = 402,65 \text{ g}$ ;  $h = 59 \text{ cm}$ ;  $d_i = 5,8 \text{ cm}$ ) e eluída com Hex:Mistura (Éter/Acetona – 8:2), iniciando com 100% de hexano, aumentando-se gradativamente a polaridade até 100% da mistura (Éter/Acetona-8:2). O volume utilizado para cada sistema de solvente foi de 1 L e o volume coletado 300 mL.



**Figura 1.2 – Coluna Cromatográfica da Fração 44-7.**

Resultaram 37 frações iniciais que após análise em CCDC, foram reunidas em 11 frações. O composto [1] foi novamente isolado na fração 55-2. As massas das frações obtidas estão apresentadas no Esquema 1.3.

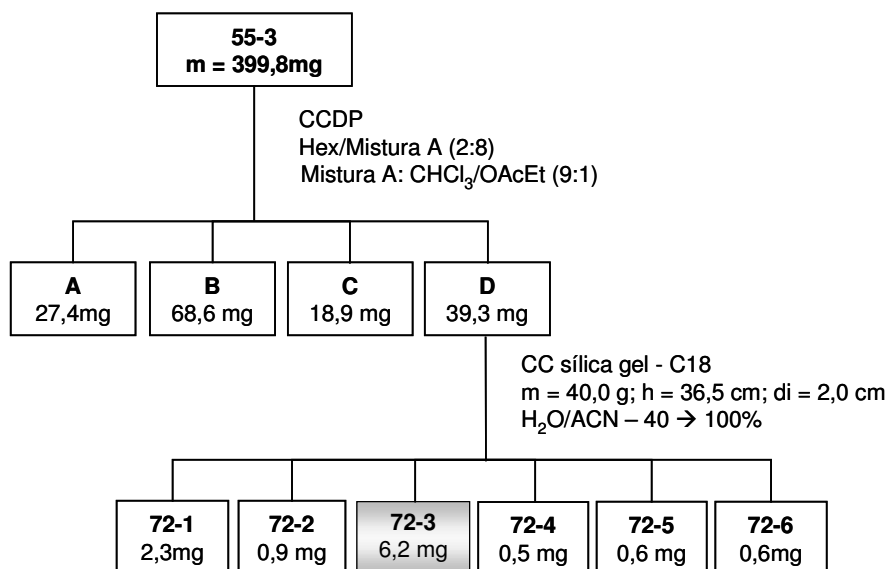


**Esquema 1.3 – Separação cromatográfica da fração 44-7**

### 1.3.5 - Separação cromatográfica da Fração 55-3

A fração 55-3 (399,8 mg) foi cromatografada em CCDP utilizando como eluente o sistema de solvente Hex:Mistura ( $\text{CHCl}_3/\text{OAcEt}$  – 9:1) – 2:8 e através da absorção no UV (254 nm) quatro regiões foram destacadas.

A fração 55-3D resultante foi fracionada em coluna utilizando sílica em fase reversa C-18 (m = 28,48 g; h = 23,5 cm; di = 2,0 cm), sendo eluída em  $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitrila}$ , aumentando-se gradativamente a proporção de acetonitrila. Preparou-se um volume de 200 mL para cada sistema de solvente, coletando-se aproximadamente 25 mL em cada fração. Resultaram 36 frações, que após análise em CCDC foram recombinaadas em 6 frações, cujas massas podem ser observadas no Esquema 1.4. A fração 72-3 resultou na substância [3].



**Esquema 1.4 – Separação cromatográfica da fração 55-3**

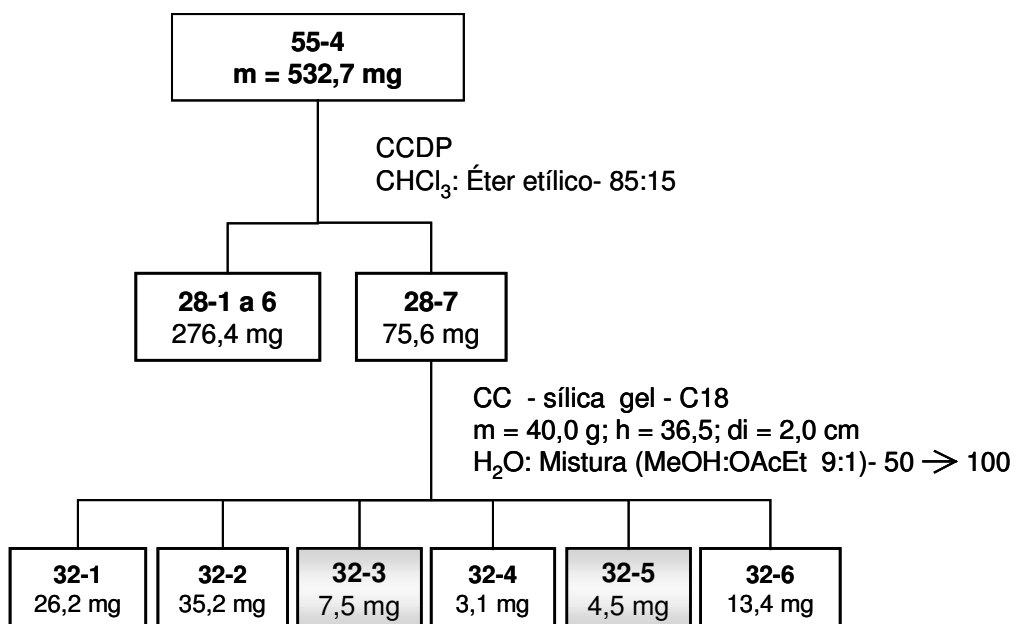
### 1.3.6 - Separação cromatográfica da Fração 55-4

A fração 55-4 (532,7 mg) foi submetida a CCDP utilizando como fase móvel a mistura de CHCl<sub>3</sub>:Éter etílico - 85:15, obtendo-se 7 frações, após visualização no UV 254 nm.

A fração 28-7 resultante foi cromatografada em CC de fase reversa C-18, (m = 40,0 g; h = 36,5 cm; di = 2,0 cm) e eluída em H<sub>2</sub>O: Mistura (MeOH:OAcEt – 9:1) – 50 → 100, num volume de 200 mL para cada sistema de solventes, sendo coletadas frações de 25 mL. Resultaram do fracionamento 6 frações, obtendo-se na fração 32-



3 o composto [4] e na fração 32-5 isolou-se a substância [5], cujas massas estão apresentadas no Esquema 1.5.



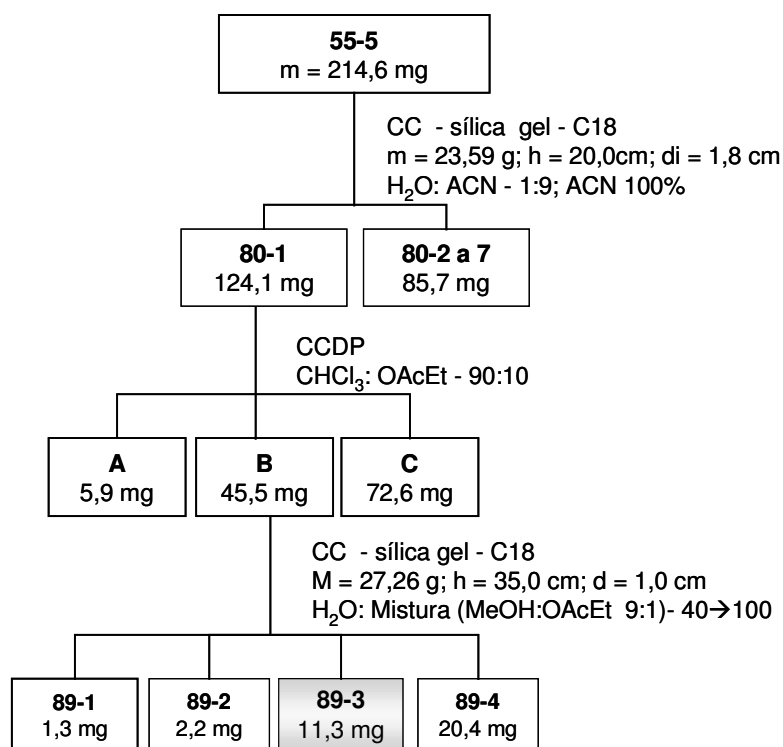
**Esquema 1.5 – Separação cromatográfica da fração 55-4**

### 1.3.7 - Separação cromatográfica da Fração 55-5

Realizou-se fracionamento em coluna, utilizando fase reversa, (m = 23,69 g; h = 20 cm; di = 1,8 cm), utilizando 600 mL do sistema H<sub>2</sub>O/ACN (1:9) → 200 mL de ACN (100%), sendo coletadas 26 frações de 25 mL, as quais foram analisadas em CCDC e agrupadas em 7 frações.

A fração 80-1 (124,0 mg) foi cromatografada então por CCDP, utilizando como eluente  $\text{CHCl}_3/\text{OAcEt} - 9:1$  e a separação das frações foi efetuada através da absorção UV 254 e 366 nm. Foram obtidas 3 frações.

A fração 80-1B foi submetida em CC em fase reversa – C18 ( $m = 27,26$ ;  $h = 35$  cm;  $di = 1,0$  cm) e eluída em  $\text{H}_2\text{O}$ :Mistura ( $\text{MeOH}:\text{OAcEt} - 9:1$ ), iniciando com uma proporção de 40 % da mistura. Para cada sistema de eluentes empregou-se um volume de 100 mL, coletando-se 20 mL de cada fração. Ao final, obteve-se 28 frações, as quais foram reunidas por semelhança observada em CCDC em 4 frações. Novamente foi isolado o composto [4] na fração 89-3. Todo o fracionamento efetuado e as massas estão descritos no Esquema 1.6.

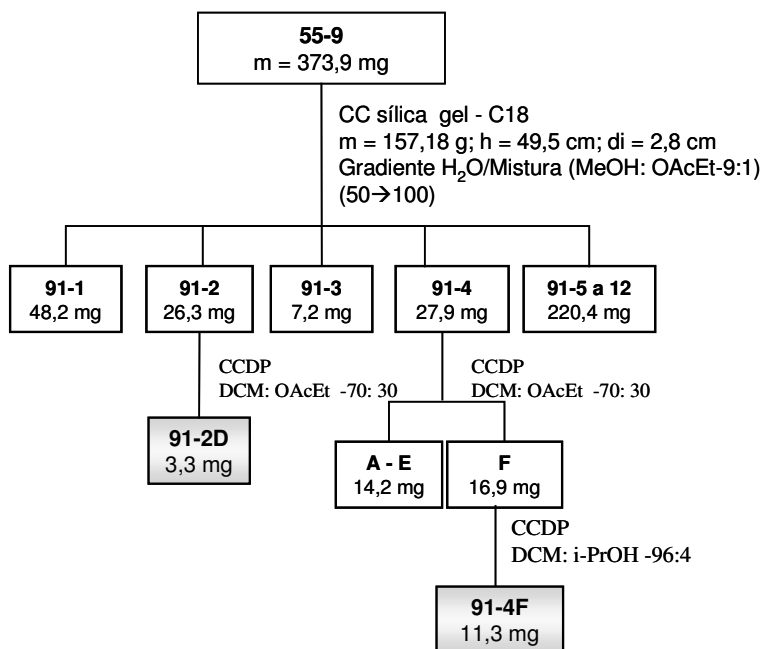


**Esquema 1.6 – Separação cromatográfica da fração 55-5**

### 1.3.8 - Separação cromatográfica da Fração 55-9

373,9 mg da fração 55-9 foram fracionadas em coluna cromatográfica com sílica de fase reversa ( $m = 157,1$  g;  $h = 49,5$  cm;  $d_i = 2,8$  cm). O sistema de solvente utilizado foi  $H_2O$ / Mistura (MeOH:OAcEt – 9:1) num volume de 400 mL, na proporção inicial de 50% → 100% da mistura. O volume de coleta foi 50 mL. Resultaram 56 frações, que após CCDC foram agrupada em 5 frações.

Em análise por CCDC, verificou-se a relativa pureza das frações 91-2 e 91-4, as quais foram submetidas à CCDC utilizando o sistema de solvente DCM:OAcEt – 7:3, sendo purificada a fração 91-2, a substância [6]. Do procedimento cromatográfico da fração 91-4, obteve-se 6 sub-frações, a fração F foi novamente cromatografada em CCDC resultando no isolamento do composto [7] na fração 91-4F, conforme observado no Esquema 1.7.



Esquema 1.7 – Separação cromatográfica da fração 55-9

## 1.4 - Resultados e Discussão

### 1.4.1 - Análise Preliminares

A tabela 1.2 nos mostra os resultados de densidade, concentração e massas das frações obtidas após partição, por lote. O lote 1, não atendia as especificações de concentração e densidade. Contudo, a partir do controle realizado, já se conseguiu manter o produto dentro das especificações, em torno de 20 g/L. É importante salientar que o percentual dos constituintes químicos solúveis na  $\text{CHCl}_3$  foi mais ou menos constante.

**Tabela 1.2 – Resultados preliminares de densidade, concentração e partição, por lote do Produto Dermodilapiol.**

Lote	C (g/L)	d (g/L)	Fr. Hex (g)	Fr. $\text{CHCl}_3$ (g)	Fr. Hid. (g)
1	15,27	0,7788	55,6560 (43%)	32,0678 (25%)	35,2937* (27%)
2	21,20	0,8271	3,5202 (35%)	2,3301 (23%)	3,0708 (30 %)
3	21,32	0,8272	3,3600 (33,6%)	1,9713 (20%)	3,3448 (33%)
4	21,72	0,8309	3,6993 (37%)	2,5640 (26%)	3,6634 (37%)

\* -  $\Sigma$  Fr. n-BuOH + Fr. Hid.

As frações clorofórmicas foram testadas numa concentração única de 1000  $\mu\text{g}/\text{disco}$  e todas apresentaram atividade.

## 1.4.2 – Elucidação Estrutural dos marcadores isolados

### 1.4.2.1 – Fenilpropanóides

#### 1.4.2.1.1 – Fenilpropanóide [1]

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Apêndice 1) obtido para o fenilpropanóide [1] evidenciou a existência do anel aromático pela presença do singleto em  $\delta$  6,35, atribuído ao próton aromático. Os sinais observados em  $\delta$  4,01 e 3,75 são relativos aos hidrogênios das metoxilas. A existência do grupo metilenodióxi ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ) foi confirmada pelo singleto, com deslocamento químico característico em  $\delta$  5,88.

Os sinais observados em  $\delta$  5,80 (*m*,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ),  $\delta$  5,07 e 5,01 (*m*,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) foram atribuídos aos prótons de carbonos olefínicos.

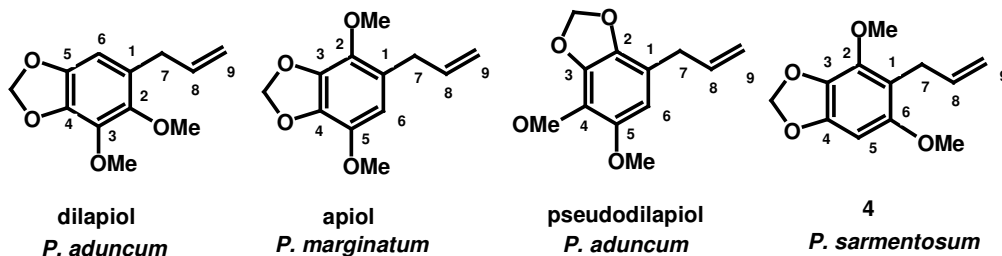
O deslocamento em  $\delta$  3,30 é oriundo de protons de carbono benzílico e alílico. Os dados estão dispostos na tabela 1.3.

**Tabela 1.3 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para o fenilpropanóide [1] ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)**

<i>H</i>	$\delta_{\text{obs}}$	mult.	J (Hz)	N.H	$\delta_{\text{LIT}}$	mult.	J (Hz) (300 MHz)	N.H
H-6	6,35	s	-	1	6,23	s	-	1
H-8	5,80	m	-	1	5,81	m	-	1
$\text{OCH}_2\text{O}$	5,88	s	-	2	5,88	s	-	2
H-9	5,07	dd	1,32; 5,26	1	4,97	dd	1,5; 15,4	1
H-9	5,01	d	1,32	1	4,96	dd	1,5; 9,0	1
OMe	4,01	s	-	3	3,80	s	-	3
OMe	3,75	s	-	3	3,78	s	-	3
H-7	3,30	dt	1,32; 5,92	2	3,24	dd	1,5; 6,6	2

Lit. Benevides, Sartorelli e Kato (1999)

Somente com os dados obtidos de RMN de  $^1\text{H}$  não é possível confirmar a estrutura do fenilpropanóide [1], devido à presença dos isômeros do dilapiol, apiol e pseudodilapiol já isolados de *P. aduncum* (MAIA, 2002), Figura 1.3.



**Figura 1.3 – Dilapiol e alguns isômeros naturais**

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (HBBB – Apêndice 2) estão presentes 12 sinais, que por comparação com o espectro DEPT 135 foi possível observar a presença de 5 carbonos quaternários, 2 carbonos metínicos, 3 carbonos metilênicos e 2 carbonos metílicos.

Os sinais em  $\delta$  102,8, 144,6, 136,0, 137,7, 144,2 e 126,1 são deslocamentos químicos característicos de anel aromático tetraoxigenado.

Foi confirmada a presença do grupo metilenodióxi pelo sinal em  $\delta$  101,1, assim como, as metoxilas com sinais em  $\delta$  61,2 e 59,9. Além desses sinais, observou-se a presença dos sinais em  $\delta$  33,5 ( $\text{CH}_2$ ), 115,3 ( $\text{CH}_2$ ) e 137,4 ( $\text{CH}$ ), que evidenciam tratar-se de um alilfenol.

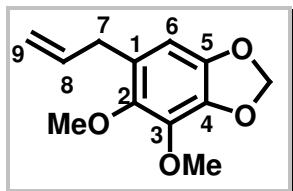
Quando comparados os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 1.4) com os dados da literatura para as possíveis substâncias, foi possível, pela análises dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel aromático, identificar a substância [1] como sendo o dilapiol.

**Tabela 1.4 – Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para o fenilpropanóide [1], (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)**

Carbono	$\delta_{\text{obs.}}$	mult.	$\delta_{\text{Lit. dilapiol}}$ (50 MHz)	$\delta_{\text{Lit. pseudo}}$ (75 MHz)	$\delta_{\text{Lit. apiol}}$ (100 MHz)	$\delta_{\text{Lit. 4}}$ (100 MHz)
C <sub>1</sub>	126,1	C	125,9	113,3	110,8	112,9
C <sub>2</sub>	136,0	C	135,8	146,8	136,5	142,0
C <sub>3</sub>	137,7	C	137,5	137,2	139,0	130,8
C <sub>4</sub>	144,6	C	144,5	131,9	135,2	147,5
C <sub>5</sub>	144,2	C	144,2	140,4	139,2	89,4
C <sub>6</sub>	102,8	C	102,6	104,9	108,5	152,4
C <sub>7</sub>	33,9	CH <sub>2</sub>	33,8	32,9	34,3	27,6
C <sub>8</sub>	137,4	CH	137,3	135,0	137,6	137,4
C <sub>9</sub>	115,3	CH <sub>2</sub>	115,3	115,4	115,6	113,4
-OCH <sub>2</sub> O-	101,1	-OCH <sub>2</sub> O-	100,9	100,7	101,7	100,5
- OMe	61,2	- OMe	61,0	58,1	60,4	56,6
- OMe	59,9	- OMe	59,7	56,3	57,1	59,7

Lit.: Santos *et. al.*, 1998; Masuda *et.al.*,1991; Burke e Nair, 1986; Benevides, Sartorelli e Kato (1999)

Os demais dados espectroscópicos obtidos CG (Apêndice 3) e EM (Apêndice 4), valores abaixo citados, estão de acordo com os dados publicados por Bernhard e Thiele, 1978, para o dilapiol.

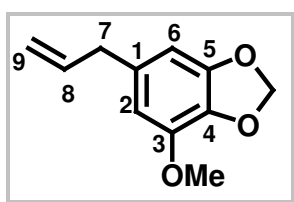


EM (70 eV) m/z (Int. Rel. %): 222 [M]<sup>+</sup> (100), 195 (6), 191 (7), 177 (41), 149 (28), 121 (18), 106 (19), 91 (13), 77 (26), 65 (18), 53 (17)  
C<sub>12</sub>O<sub>4</sub>H<sub>14</sub>

UV:  $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$  210 e 287 nm

### 1.4.2.1.2 – Fenilpropanóide [2]

Com os dados obtidos nos espectros RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e EM, e por comparação com os dados previamente publicados, foi possível identificar o fenilpropanóide [2] como sendo a miristicina.



No espectro de EM (Apêndice 8) observa-se:

EM (70 eV) m/z (Int. Rel. %): 192 [ $\text{M}]^+$  (100), 165 (26), 161 (23), 147 (17), 131 (25), 119 (30), 91 (50), 65 (42), 39 (47)

$\text{C}_{11}\text{O}_3\text{H}_{12}$

Estando esses dados em acordo com Yakushijin *et al.*, (1983)

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  apêndice 5, (Tabela 1.5) observa-se na região dos protons aromáticos, dois singletos largos em  $\delta$  6,37 e 6,34, correspondente aos hidrogênios H-2 e H-6. Os sinais em  $\delta$  5,92 e  $\delta$  3,87 evidenciam a presença do grupo metilenodióxi e metoxila, respectivamente.

**Tabela 1.5 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para o fenilpropanóide [2] ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)**

H	$\delta_{\text{obs}}$	mult.	J (Hz)	N.H	$\delta_{\text{LIT}}$	mult.	J (Hz) (300 MHz)	N.H
H-2	6,37	s	-		6,32	d	1,4	1
H-6	6,34	s	-	1	6,28	d	1,4	1
OCH <sub>2</sub> O	5,92	s	-	2	5,86	s	-	2
H-8	5,9	m	-	1	5,85	m	-	1
H-9b	5,09	m	-	1	5,01	dd	1,7; 17,1	1
H-9a	5,02	sl	-	1	4,99	dd	1,7; 8,0	1
OMe	3,87	s	-	3	3,81	s	-	3
H-7	3,28	d	6,58	2	3,22	d	6,7	2

Lit.: Benevides, Sartorelli e Kato (1999)



Os deslocamentos em  $\delta$  5,09 e 5,02 foram atribuídos aos hidrogênios de dupla terminal  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ . O sinal em  $\delta$  5,90 é o deslocamento característico do CH de dupla olefínica  $-\text{CH}=\text{CH}_2$  e o sinal observado em  $\delta$  3,28 corresponde ao grupo metileno de um alilfenol.

Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (HBBD - Apêndice 6 e DEPT 135 – Apêndice 7) foi possível identificar sinais correspondentes a 4 carbonos quaternários, 3 carbonos metínicos, 3 carbonos metilênicos e 01 carbono metílico.

O grupo metilenodióxi foi observado em  $\delta$  101,2 e a metoxila em  $\delta$  56,5. Além desses sinais, observou-se sinal em  $\delta$  115,8 e 137,3 provenientes de  $-\text{CH}=\text{CH}_2$  terminal e o  $\delta$  40,2 corresponde tipicamente a um metileno de uma cadeia alílica (Tabela 1.6).

Os sinais em  $\delta$  148,8, 143,5, 134,6, 133,5, 107,7 e 102,7 foram atribuídos aos carbonos aromáticos de um anel trioxigenado.

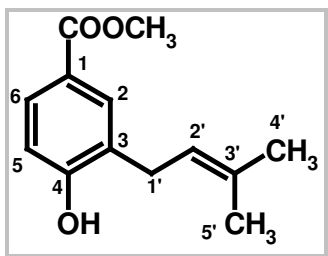
**Tabela 1.6 – Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para o fenilpropanóide [2], ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)**

Carbono	$\delta$ (ppm) obs.	mult.	$\delta$ (ppm) Lit.
C <sub>1</sub>	133,5	C	134,3
C <sub>2</sub>	107,7	CH	107,6
C <sub>3</sub>	143,5	C	143,2
C <sub>4</sub>	134,6	C	134,3
C <sub>5</sub>	148,8	C	148,6
C <sub>6</sub>	102,7	CH	102,5
C <sub>7</sub>	40,2	CH <sub>2</sub>	40,1
C <sub>8</sub>	137,3	CH	137,0
C <sub>9</sub>	115,8	CH <sub>2</sub>	115,6
OCH <sub>2</sub> O	101,2	OCH <sub>2</sub> O	101,0
OMe	56,5	OCH <sub>3</sub>	56,4

Lit.:Yakushijin *et. al.*, 1983

### 1.4.2.2 – Derivado do ácido benzóico prenilado [4]

A substância [4] teve a sua estrutura elucidada com base nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ , sendo identificada como o 3-3-metil-2-butenil-4-hidroxi benzoato de metila.



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Apêndice 14) revelou a presença de um grupo prenila, evidenciado pela presença de um sinal correspondente a um hidrogênio em  $\delta$  5,31, relativo ao próton da dupla olefínica, acoplado com um metileno em  $\delta$  3,38 e a presença de duas metilas em singlete a  $\delta$  1,77.

O singlete em  $\delta$  7,83 atribuído ao H-2, e sinais em  $\delta$  7,81 (*d*) e  $\delta$  6,83 (*d*) evidenciaram a existência de um anel aromático com os últimos dois hidrogênios em posição orto. O singlete com integração para três hidrogênios, observado em  $\delta$  3,88 corresponde aos protons da metoxila.

O singlete largo observado em  $\delta$  6,13 foi atribuído à hidroxila fenólica. Os dados espectroscópicos observados estão apresentados na Tabela 1.7.

**Tabela 1.7 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para o derivado do ácido benzóico prenilado [4] ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)**

H	$\delta_{\text{obs}}$	mult.	J (Hz)	N.H	$\delta_{\text{Lit}}$	mult.	J (Hz) (400 MHz)	N.H
H-2	7,83	s	-	1	7,82	d	2,0	1
H-6	7,81	d	6,6	1	7,81	dd	8,5; 2,0	1
H-5	6,83	d	8,8	1	6,83	d	8,5	1
OH	6,13	sl	-	1	-	-	-	-
H-2'	5,31	t	7,0	1	5,31	qqt	1,5; 7,0	1
OMe	3,88	s	-	3	3,88	s	-	3
H-1'	3,38	d	7,0	2	3,38	d	:1,5; 7,0	2
H-4' H-5'	1,77	s	-	6	1,78	s	-	6

Lit.: Bohlmann e Anderberg, 1991

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (HBBD – Apêndice 15 e DEPT 135 – Apêndice 16), apresentados na Tabela 1.8, revelaram a presença de 5 carbonos quaternários, 4 carbonos metínicos, 1 carbono metilênico e 3 carbonos metílicos. O sinal em  $\delta$  167,1 revelou a presença de carbonila típica de éster.

**Tabela 1.8 – Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para o derivado do ácido benzóico prenilado [4], ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)**

Carbono	$\delta$ (ppm) obs.	mult.	$\delta$ (ppm) Lit.
C-1	126,8	C	127,4
C-2	131,9	CH	131,7
C-3	122,6	C	121,9
C-4	158,6	C	158,9
C-5	115,5	CH	115,2
C-6	129,7	CH	129,5
C-1'	29,6	$\text{CH}_2$	29,6
C-2'	121,1	CH	121,2
C-3'	135,5	C	134,6
C-4'	25,8	$\text{CH}_3$	25,7
C-5'	17,9	$\text{CH}_3$	17,8
COOR	167,1	COOR	167,7
$\text{COOCH}_3$	51,8	$\text{COOCH}_3$	52,0

Lit.: Orjala *et.al.*, 1993b

A presença da isoprenila foi confirmada através dos deslocamentos  $\delta$  121,1 (CH) e 135,5 (C) correspondentes ao C-2' e C-3', respectivamente.

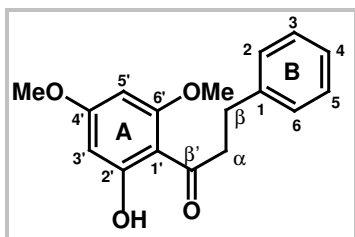
Os sinais em  $\delta$  126,8, 131,9, 122,6, 158,6 , 115,5 e 129,7 são deslocamentos característico de anel aromático. Os sinais observados estão de acordo com os dados publicados previamente por Orjala *et al.* (1993b).

O espectro de massa (Apêndice 17) revelou o íon molecular  $[m]^+$  220 com intensidade relativa de 48,79%, com pico base em 165 (100), e principais fragmentos em 161 (27), 133 (29), 105 (40), apresentando fórmula molecular  $C_{13}O_3H_{16}$ . Esses dados estão de acordo com os relatos da literatura para miristicina (BOHLMANN e ANDERBERG, 1991).

### 1.4.2.3 – Flavonóides

#### 1.4.2.3.1 - Chalcona [3]

A comparação dos dados espectrais de RMN de  $^1H$  , de  $^{13}C$  (HBBD e DEPT 135) e EM obtidos para a substância [3] com os dados da literatura permitiu identificá-la como sendo a 2'-hidroxi-4'-6' dimetoxi- $\beta$ '- chalcona (diidroflavocavin B).



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Apêndice 9) revelou sinais de dois metilenos adjacentes em  $\delta$  2,99 e 3,30, e dois sinais em  $\delta$  3,82 e 3,83 de metoxilas.

Foram observados sinais correspondentes aos dois anéis aromáticos do flavonóide. Um par de dubletos em  $\delta$  6,07 e 5,92, com constante de acoplamento 2,2 Hz, típicos de hidrogênios aromáticos meta-acoplados, atribuídos a H-3' e H-5'. Estes dados aliados à presença de um sinal de próton quelado em  $\delta$  14,0 caracterizam o anel A. O multiplete em  $\delta$  7,20 correspondente aos hidrogênios de um sistema aromático mono substituído, justificou a presença do anel B.

Os dados apresentados na Tabela 1.9 evidenciaram tratar-se de uma chalcona.

**Tabela 1.9 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para a chalcona [3] ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)**

H	$\delta_{\text{obs}}$	mult.	J (Hz)	N.H	$\delta_{\text{LIT}}$	mult.	J (Hz)	N.H
OH	14,0	s	-	1	14,0	s	-	1
<i>Ph</i>	7,20	m	-	5	7,20	s	-	5
H-3'	6,07	d	2,2	1	6,04	d	3,0	1
H-5'	5,92	d	2,2	1	5,88	d	3,0	1
OMe	3,83	s	-	3	3,76	s	-	6
OMe	3,82	s	-	3				
C- $\alpha$	3,30	m	-	2	3,28	t	7,0	2
C- $\beta'$	2,99	m	-	2	2,94	t	7,0	2

Lit.: Itokawa, Morita e Mihashi, 1981

Com os dados obtidos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Apêndice 10) e apresentados na Tabela 1.10, (HBBD e DEPT 135 – Apêndice 11), foi possível identificar a presença de 6 carbonos quaternários, 7 carbonos metínicos (CH), 2 carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) e 2 carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ).

**Tabela 1.10 – Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  para a chalcona [3], ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)**

ORDEM	$\delta$ (ppm) obs.	mult.	$\delta$ (ppm) Lit.
C-1	141,3	C	141,7
C-2/C-6	128,5	CH	128,3
C-3/C-5	128,4	CH	128,3
C-4	125,9	CH	125,9
C-1'	105,4	C	105,7
C-2'	166,0	C	165,9
C-3'	90,9	CH	90,8
C-4'	167,7	C	167,6
C-5'	93,7	CH	93,8
C-6'	162,7	C	162,6
OMe	55,6	$\text{CH}_3$	55,5
OMe	55,5	$\text{CH}_3$	55,5
C- $\alpha$	45,7	$\text{CH}_2$	45,7
C- $\beta$	30,7	$\text{CH}_2$	30,7
C- $\beta'$	204,5	C	204,3

Lit.: Itokawa, Morita e Mihashi, 1981

O sinal com  $\delta$  204,5 corresponde ao sinal da carbonila cetônica. Observa-se sinais para duas metoxilas em  $\delta$  55,5 e 55,6 e sinais em  $\delta$  30,7 e 45,7 correspondentes aos carbonos metilênicos adjacentes C- $\beta$  e C- $\alpha$ , respectivamente.

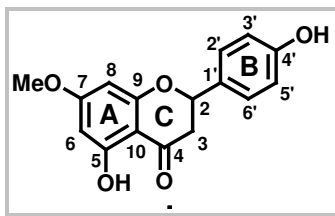
Os sinais em  $\delta$  141,3, 128,5, 128,4, e 125,9 correspondem aos carbonos aromáticos C-1, C-2/C-6, C-3/C-5 e C-4 do anel B da chalcona. Já os sinais observados em  $\delta$  105,4, 166,0, 90,0, 167,7, 93,7 e 162,7 correspondem aos carbonos do anel A com padrão de substituição meta trioxigenado, característico de flavonóides.

Os espectros obtidos nos mostram que a substância apresentava-se com uma pequena impureza.

No espectro de massas (Apêndice 12) obtido observou-se o íon molecular  $[M]^+$ , com  $m/z$  (intensidade relativa) 286 (18), pico base 181 (100) e fragmentos 154 (23), 91 (12) e 65 (7), os quais estão em acordo com os publicados na literatura (Itokawa, Morita e Mihashi, 1981)

#### 1.4.2.3.2 – Flavanona [7]

Por comparação dos dados obtidos no espectro de RMN de  $^1H$  (mono e bidimensionais), RMN de  $^{13}C$  e EM, com os dados previamente publicados, identificou-se a substância [7] como sendo a flavanona sacuranetina (5-4'-diidroxí-7-metoxi-flavanona).



No espectro de RMN de  $^1H$  (Apêndice 18) observa-se sinais para 4 prótons de anel aromático na região entre  $\delta$  6,0-8,0. O conjunto de sinais em  $\delta$  5,36, 3,10 e 2,80 são relativos aos hidrogênios alifáticos que acoplam diferentemente entre si e com os hidrogênios vizinhos gerando duplo dubleto, os quais correspondem ao H-2, H-3a e H-3b evidenciando tratar-se de uma flavanona.

No espectro homonuclear (COSY – Apêndice 22) obtido para essa substância, observa-se a correlação entre os hidrogênios com deslocamentos químicos  $\delta$  5,36,  $\delta$  2,80 e 3,10. Observa-se também a correlação de  $\delta$  2,80 com  $\delta$  3,10, assim como a correlação de  $\delta$  6,89 com  $\delta$  7,83.

O sinal em  $\delta$  12,02 é característico de hidrogênio fenólico próximo a carbonila, gerando próton quelado. O deslocamento em  $\delta$  3,81 corresponde aos hidrogênios do grupo metoxila.

**Tabela 1.11 - Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  para a flavanona [7] ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)**

H	$\delta_{\text{obs}}$	mult.	J (Hz)	N.H	$\delta_{\text{LIT}}$	mult.	J (Hz) (400 MHz)	N.H
OH	12,02	s	-	1	12,04	s	-	1
H-2'/H-6'	7,33	d	8,3	2	7,34	d	8,5	2
H-3'/H-5'	6,89	d	8,8	2	6,91	d	8,5	2
H-6	6,04	d	2,2	1	6,08	d	7,23	2
H-8	6,08	d	2,2	1				
H-2	5,36	dd	3,1; 13,0	1	5,37	dd	3,1; 13,0	1
OMe	3,81	s	-	3	3,82	s	-	3
H-3a	3,10	dd	13,0; 17,1	1	3,10	dd	13,0; 17,0	1
H-3b	2,78	dd	3,1; 17,1	1	2,81	dd	17,0; 3,1	1

Lit.: Morales *et. al.*, 2003

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (HBBD – Apêndice 19) observam-se 16 sinais, que por comparação com os sinais do espectro de DEPT 135 (Apêndice 20), indicaram a presença de 7 carbonos quaternários, 7 carbonos metínicos (CH), 1 carbono metilênico ( $\text{CH}_2$ ) e 1 carbono metílico ( $\text{CH}_3$ ). Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  estão apresentados na Tabela 1.12, juntamente com os dados disponíveis na literatura para a sacuranetina.



**Tabela 1.12 – Deslocamento químico de  $^{13}\text{C}$  para flavanona [7], ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)**

<b>Carbono</b>	<b><math>\delta</math> (ppm) obs.</b>	<b>mult.</b>	<b><math>\delta</math> (ppm) Lit.</b>
C-2	79,0	CH	80,2
C-3	43,2	$\text{CH}_2$	43,8
C-4	196,0	C	197,9
C-5	164,1	C	164,9
C-6	95,1	CH	95,7
C-7	168,0	C	169,1
C-8	94,3	CH	95,0
C-9	162,9	C	164,3
C-10	103,1	C	103,8
C-1'	130,6	C	130,7
C-2'/C-6'	127,9	CH	128,9
C-3'/ C-5'	115,7	CH	116,3
C-4'	156,1	C	158,7
OMe	55,7	$\text{OCH}_3$	56,1

Lit.: Morales *et. al.*, 2003

O sinal da carbonila de cetona em  $\delta$  196,0 assim como os sinais para 2 carbonos alifáticos ( $\text{C}_2$  e  $\text{C}_3$ ) em  $\delta$  43,2 e 79,0, respectivamente, indicam a presença de uma flavonona.

Os deslocamentos em  $\delta$  94,3, 95,1, 103,1, 162,9, 164,1 e 168,0 correspondem aos carbonos aromáticos do anel A trioxigenado e os sinais em 115,7, 127,9, 130,6 e 156,1 foram atribuídos ao anel B monooxigenado.

O espectro de massas (Apêndice 21) apresenta pico base com  $m/z$  167 (100) e íon molecular  $[\text{M}]^{+}$  com  $m/z$  286 (98), consistente com a fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ . Os principais fragmentos com os respectivos valores de intensidade relativa (%) são apresentados: 269 (6), 193 (34), 180 (41), 138 (23), 120 (39), 95 (31) e 69 (20), os quais corroboram a identificação da sacuranetina.

As substâncias [5] e [6] não foram identificadas devido à necessidade de isolar quantidade suficiente e com maior pureza.

## **CAPÍTULO 2 – ATIVIDADE BIOLÓGICA**

### **2.1 - Introdução**

Uma planta é uma verdadeira usina química que pode produzir milhares de substâncias diferentes, onde poucas, senão apenas uma, é responsável pela atividade terapêutica ou farmacológica (HOSTETTMANN e HAMBURGER, 1991).

Uma planta é considerada medicinal quando em sua composição química ocorrem substâncias biologicamente ativas (FAGAN *et al.* [s.d]). Para localizar a atividade procurada no extrato da planta e nas frações obtidas nas diferentes etapas de separação é crucial dispor de testes biológicos ou farmacológicos relativamente simples (HOSTETTMANN, QUEIROZ e VIEIRA, 2003)

Espécies de Piperaceae têm sido extensivamente investigadas como fonte de novos produtos naturais com potencial antitumoral, antifúngico e inseticida. De acordo com o levantamento bibliográfico foram comprovadas as atividades antibacteriana e antifúngica de extratos, frações e substâncias isoladas de *P. aduncum*.

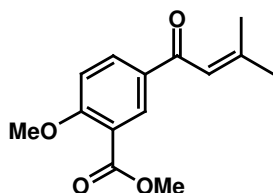
Na medicina popular de Papua Nova Guiné, as folhas de *P. aduncum* são usadas em ferimentos e os cromenos e derivados do ácido benzóico, isolados após fracionamento cromatográfico do extrato das folhas, apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Mycrococcus luteus* e atividade antifúngica contra *Penicillium oxalicum* (ORJALA *et al.*, 1993a).

O fracionamento do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> das folhas, também realizado por Orjala *et al.* (1994), forneceu diidrochalconas com propriedade antibacteriana para os microorganismos *Bacillus subtilis*, *Mycrococcus luteus* e *Escherichia coli*, bem como atividade citotóxica moderada contra células cancerígenas e, ainda, atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*.

Chalconas são flavonóides presentes em uma variedade de espécies vegetais, com ampla faixa de efeitos biológicos, tais como antibactericida, antitumoral, antifúngico (ANTO *et al.*, 1995; OKUNADE *et al.*, 1997), antiviral e antiplasmódica (DEWINDT, 1994; KHARAZMI, 1997).

Okunade *et al.* (1997) mostraram que o extrato etanólico de *P. aduncum* apresentou boa atividade inibitória contra os patógenos relacionados à AIDS como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Mycobacterium intracellulare*. Também extratos e frações foram avaliados para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Aduncumeno (figura 2.1), um derivado do ácido benzóico prenilado, isolados por Lagos *et al.* em 2004 apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.



**Figura 2.1 – Derivado do ácido benzóico prenilado (aduncumeno)**

Lentz *et al.* (1998), estudando plantas medicinais de Honduras quanto à atividade biológica, mostrou que *P. aduncum* exibiu um amplo espectro de ação contra fungos e bactérias, conforme resultado mostrado tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Atividade antimicrobiana das plantas medicinais de Honduras (LENTZ *et al.*, 1998)

Plant Taxon	Antibacterial activities					Antifungal activities					
	<i>Ec</i>	<i>Sa</i>	<i>Bs</i>	<i>Pa</i>	<i>Mi</i>	<i>Cn</i>	<i>Ca</i>	<i>Afl</i>	<i>Afu</i>	<i>Tm</i>	<i>Sc</i>
<i>A. arvensis</i>	—	—	—	—	3	—	—	—	—	3	4
<i>A. cumanaensis</i>	—	—	—	—	—	6	—	—	—	5	4
<i>A. purpurea</i>	—	4	3	2	—	—	3	—	—	—	—
<i>A. scabra</i>	—	2	4	2	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. curassavica</i>	—	—	—	2	—	5	—	—	—	—	—
<i>D. arboreus</i>	—	5	—	—	2	2	6	—	—	—	—
<i>D. drakena</i>	—	±	2	±	—	—	4	—	—	—	—
<i>F. cotinifolia</i>	—	5	—	±	2	2	—	—	—	—	—
<i>F. maxima</i>	—	2	—	—	±	±	—	—	—	4	5
<i>G. ulmifolia</i>	—	—	±	—	3	±	5	—	—	—	—
<i>H. longipes</i>	—	±	—	2	5	±	—	—	—	—	—
<i>H. capitata</i>	—	2	2	—	4	±	—	—	—	—	—
<i>H. verticillata</i>	—	—	—	2	—	—	—	—	—	8	—
<i>J. curcas</i>	—	5	—	—	2	—	—	—	—	4	—
<i>M. micrantha</i>	—	6	NT	NT	5	4	—	—	—	—	—
<i>M. pudica</i>	—	—	±	—	5	±	—	—	—	3	—
<i>N. psychotrioides</i>	—	2	5	2	±	±	—	—	—	—	—
<i>N. lobata</i>	—	±	—	±	13	±	—	—	±	4	—
<i>P. rosea</i>	—	±	2	±	—	—	—	—	—	5	3
<i>P. obtusifolia</i>	—	3	4	2	—	—	—	—	—	—	—
<i>P. alliacea</i>	—	2	2	2	7	5	3	—	—	—	—
<i>P. popenoei</i>	—	2	±	2	2	2	—	—	—	—	—
<i>P. aduncum</i>	±	7	7	—	22	2	4	4	±	12	10
<i>P. hispidum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	2
<i>P. calomelanos</i>	—	5	4	5	—	3	3	—	—	4	4
<i>P. paniculata</i>	—	—	2	—	7	—	—	—	—	5	2
<i>P. triseriale</i>	—	—	2	—	4	—	—	—	—	—	—
<i>P. guajava</i>	±	7	7	±	7	±	—	—	±	5	2
<i>S. nudum</i>	—	4	2	2	2	2	—	—	—	—	—
<i>S. torvum</i>	—	—	2	2	5	±	—	4	5	3	2
<i>S. friedrichsthallii</i>	—	6	—	±	2	±	—	—	—	—	—
<i>S. cassythoides</i>	—	4	±	±	—	±	—	—	—	—	—
<i>T. ahouai</i>	—	2	—	—	—	3	4	—	—	—	—

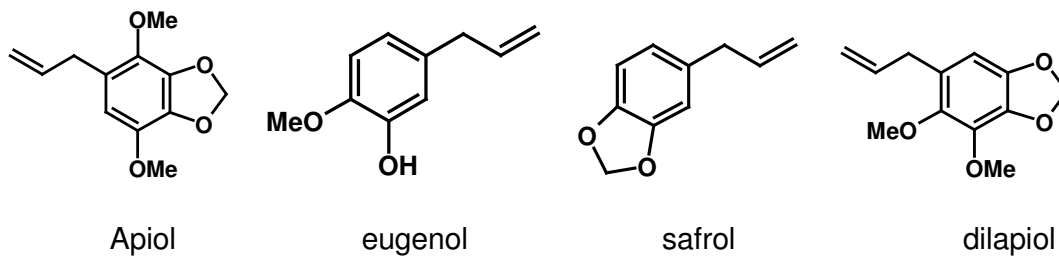
All plants listed in were screened, but only those showing signs of activity are listed here.

*Ec*, *Escherichia coli*; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Bs*, *Bacillus subtilis*; *Pa*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Mi*, *Mycobacterium intracellulare*; *Cn*, *Cryptococcus neoformans*; *Ca*, *Candida albicans*; *Afl*, *Aspergillus flavus*; *Afu*, *Aspergillus fumigatus*; *Tm*, *Trichophyton mentagrophytes*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Valores: halos de inibição; - não inibiu; ± inibição questionável

Sabe-se que fenilpropanóides, por exemplo, apiol, safrol, eugenol, entre outros (Figura 2.2), são substâncias de ocorrência comum em espécie de *Piper* e apresentam várias atividades biológicas. Orjala *et al.* (1993b) relatam, pela primeira

vez, a atividade moluscicida para o dilapiol e que o extrato de éter de petróleo das folhas dessa espécie apresentou forte atividade contra *Biomphalaria glabrata*, o vetor da esquistossomose.



**Figura 2.2 - Fenilpropanóides**

O óleo essencial de *P. aduncum* apresentou efeito tóxico sobre fungos fitopatogênicos (*Crinipellis pernicioso*) por Bastos, 1997.

Na Guatemala, o uso tradicional de preparações com ervas é freqüente para o tratamento de doenças sexualmente transmissíveis. Cáceres *et al.* (1995), realizaram testes *in vitro* contra *Nisseria gonorrhoeae*, onde 46 extratos de plantas foram testados e *P. aduncum* apresentou o melhor resultado com zona de inibição 80% nas linhagens testadas.

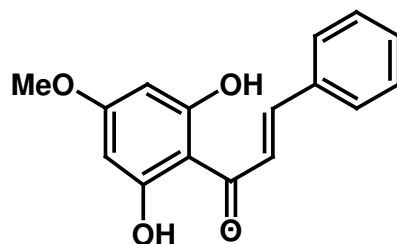
A decocção das folhas é usada, em Cuba, no tratamento de úlcera e o efeito positivo da atividade antiulcerogênica foi comprovada por Álvares (1994).

A atividade inseticida também foi comprovada para o extrato etanólico de *P. aduncum*, o qual foi então fracionado fornecendo o fenilpropanóide dilapiol como princípio ativo, causando 92% de mortalidade no bioensaio com larvas do mosquito *Ostrinia nubilialis* (Lepidoptera: Piralidae Hübner) na concentração de 0,1 ppm (BERNARD *et al.*, 1995).

O derivado do ácido benzóico prenilado, 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila, isolado neste trabalho e anteriormente por Pereda-Miranda *et al.* (1997) de *Piper guanacastensis* (espécie endêmica da Costa Rica) apresentou propriedade inseticida (LC<sub>50</sub> 20,5 µg/mL) frente às larvas do mosquito *Aedes atropalpus* L. (Diptera: Culicidae). Fujimura, Sawada e Yamahara (1987), que sintetizaram essa substância a partir do precursor ácido benzóico, relatam o efeito inibitório de úlcera e a eficácia no tratamento de hepatites para a mesma.

A flavanona sacuranetina, isolada no presente trabalho, foi anteriormente isolada por Danelutte *et al.* (2003) da espécie *Piper crassinervium* e sua atividade fungicida foi avaliada contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*; apresentando inibição na quantidade mínima de 1 µg. Ribeiro *et al.* (1997) comprovaram a atividade desta mesma flavanona contra *Trypanosoma cruzi*, o parasita causador da doença de Chagas.

Torres e Santos (1999b) relatam o efeito seletivo de uma chalcona ativa, 2', 6'-diidroxí-4'-metoxichalcona, (Figura 2.3), purificada da inflorescência de *P. aduncum*, a qual apresentou significativa atividade *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*.



**Figura 2.3 - 2', 6'-diidroxi-4'-metoxichalcona**

O isolamento de marcadores químicos foi realizado em parte, através do fracionamento biomonitorado dos extratos brutos e frações. A avaliação da atividade biológica foi realizada na UNESP-Rio Claro, pelo grupo de pesquisa do Dr. Fernando Pagnocca.

Na tabela 2.2 estão apresentadas algumas das principais classes de substâncias isoladas de *P. aduncum*, cujas atividades biológicas foram comprovadas.



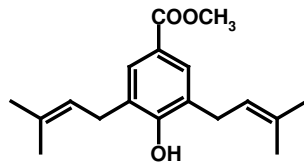
**Tabela 2.2 - Principais substâncias isoladas de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada.**

Substância	Classe de substância	Antibacteriana					Antifúngica			Referências	
		Bs	Ec	MI	Mi	Pa	Sa	Ca	Cn		Po
Ácido nervogênico	Deriv. Ác. Benzóico	++	-	NT	++	++	+++	+	+	NT	Okunade <i>et al.</i> , 1997
3,5-bis (3-metil-2-butenil)- 4-hidroxi benzoato de metila	Deriv. Ác. Benzóico	++	-	-	+	++	++	++	+	NT	Okunade <i>et al.</i> , 1997
3-(6-hidroxi-3,7-dimetil-2,7-octadienil)-4-metoxi-benzoato de metila	Deriv. Ác. Benzóico	+	-	+	NT	NT	NT	NT	NT	-	Orjala <i>et al.</i> , 1993a
3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila	Deriv. Ác. Benzóico	+	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993b
3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-4-hidroxibenzoato de metila	Deriv. Ác. Benzóico	+	-	+	NT	NT	NT	NT	NT	-	Orjala <i>et al.</i> , 1993a
3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de 1-[1-metil-etil]-4-metil-3-ciclohexenila]	Deriv. Ác. Benzóico	+	-	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993b
ácido 3-(3-metil-2-butenol-5-(3-metil-2-butenoil)-4-hidroxi benzóico	Deriv. Ác. Benzóico	++	-	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993b
2',6',4-triidroxi-4'-metoxidiidrochalcona	Flavonóide	++	+	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1994
2'-6'-diidroxi-4'-metoxidiidrochalcona	Flavonóide	++	+	++	+	++	NT	++	++	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1994
Piperaducina A	Flavonóide	+	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1994
Piperaducina B	Flavonóide	++	+	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1994
Piperaducina C	Flavonóide	+	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1994

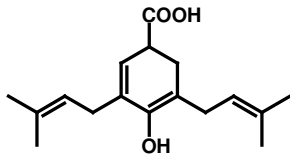
“Continuação”

Substância	Classe de substância	Antibacteriana						Antifúngica			Referências
		Bs	Ec	MI	Mi	Pa	Sa	Ca	Cn	Po	
Aduntina B	Flavonóide	-	-	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993c
Aduntina C	Flavonóide	-	-	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993c
Aduntina D	Flavonóide	-	-	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993c
Metilindaretina	Flavonóide	-	-	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993c
8-8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila	Cromeno	+	+	+	NT	NT	NT	NT	NT	+	Orjala <i>et al.</i> , 1993; Baldoqui <i>et al.</i> , 1999
ácido 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-cromeno-6-carboxílico	Cromeno	++	-	NT	++	++	++	++	++	NT	Okunade <i>et al.</i> , 1997
2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-cromeno-6-carboxilato de metila	<i>Cromeno</i>	+	-	+	NT	NT	NT	NT	NT	+	Moreira, Guimarães e Kaplan, 1998
Dilapiol	<i>Fenilpropanóide</i>	+	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	Orjala <i>et al.</i> , 1993b

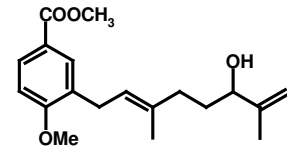
Bs: *Bacillus subtilis*; Ec: *Escherichia coli*; MI: *Micrococcus luteus*; Mi: *Mycobacterium intracellulare*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ca: *Candida albicans*; Cn: *Cryptococcus neoformans*; Po: *Penicillium oxalicum* (+) **Fraca**; (++) **Moderada**; (+++) **Boa**; (NT) **Não testada**



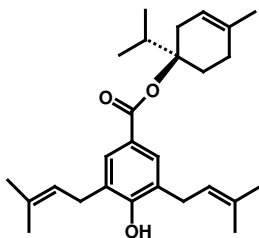
3,5-bis (3-metil-2-butenil)- 4-hidroxi benzoato de metila



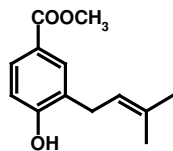
ácido nervogênico



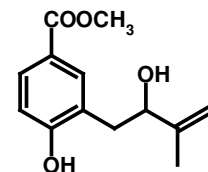
3-(6-hidroxi-3,7-dimetil-2,7-octadienil)-4-metoxi-benzoato de metila



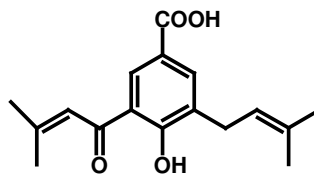
3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de 1-[1-metil-etil]-4-metil-3-ciclohexenila]



3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila

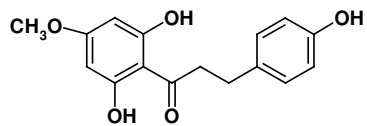


3-(2-hidroxi-3-metil-3-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila

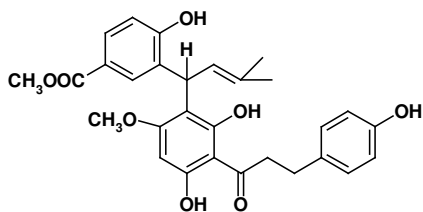


ácido 3-(3-metil-2-butenol-5-(3-metil-2-butenol)-4-hidroxi benzóico

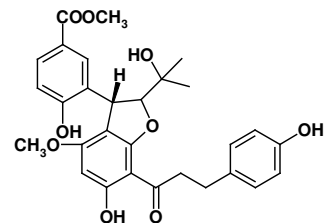
**Figura 2.4 -Derivados do ácido benzóico isolados de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada**



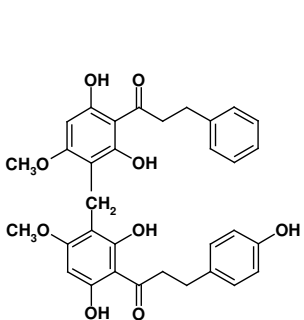
2',6',4-trihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona



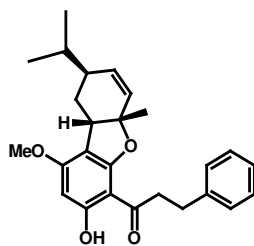
piperaducina A



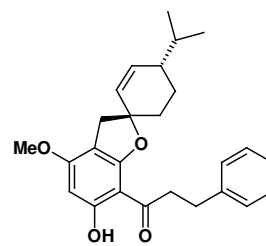
piperaducina B



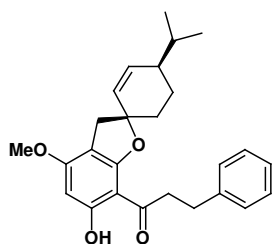
piperaducina C



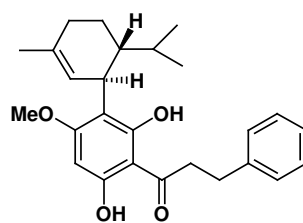
aduntina B



aduntina C

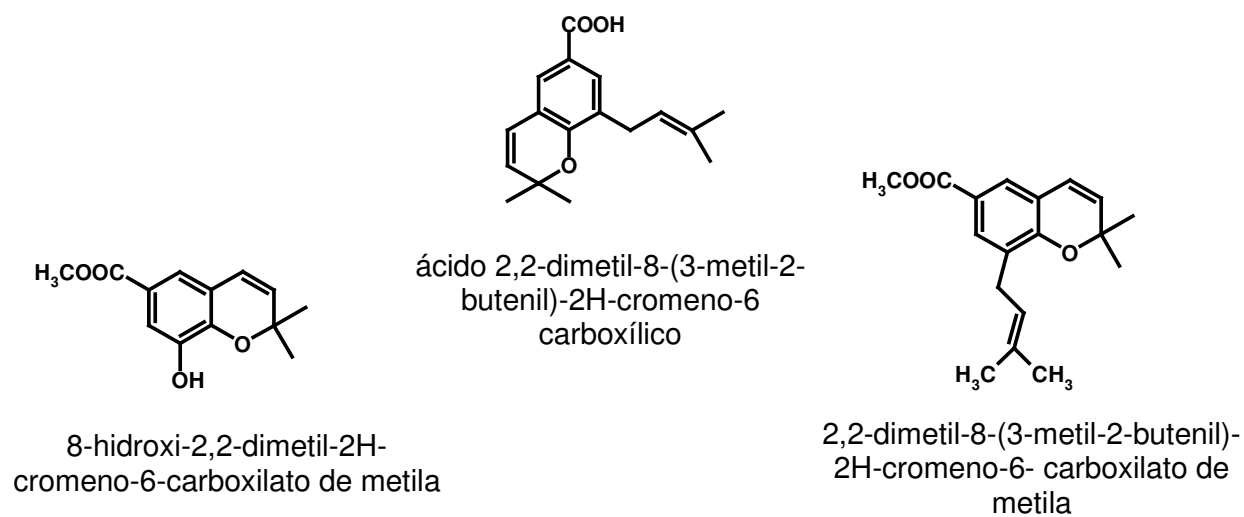


aduntina D

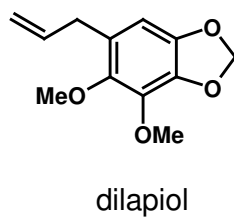


metilindaretina

Figura 2.5 - Flavonóides isolados de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada



**Figura 2.6 - Cromenos isolados de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada**



**Figura 2.7 - isolado de *P. aduncum* com atividade biológica comprovada**

## 2.2 – Experimental

O método utilizado para avaliação da atividade biológica dos diferentes lotes do produto foi o método de difusão descrito por Bauer *et al.* (1966). Segundo esse método, o extrato da planta ou substância teste é colocada em contato com um meio sólido (Agar) inoculado com um determinado fungo ou bactéria.

Os testes foram realizados frente às bactérias *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC/6538), *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* (CCT/1457) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC/15442) e para os fungos *Candida albicans* (RJ/50008) e *Trichosporon cutaneum* (UCD/121).

Foram pesados 20 mg de cada extrato e redissolvidos em 1 mL da mistura DCM:MeOH na proporção 1:1, obtendo-se a concentração de 20 mg/ mL. Alíquotas desse material foram então aplicadas aos discos de papel, aguardando-se a evaporação total do solvente entre as aplicações, sendo aplicado ao final, 1 mg/disco do material. Como controle positivo, empregou-se a tetraciclina (17 µg/mL) e a nistatina (10 µg/mL), sendo a tetraciclina usada como controle para *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto a nistatina para os demais microorganismos.

Os resultados foram expressos em mm do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos, após três repetições.

Após um tempo adequado de incubação, mediu-se o diâmetro ou raio da zona clara, onde não houve crescimento do microorganismo, em volta do disco de papel.

### **2.3 - Resultados e Discussão**

Os resultados dos ensaios microbiológicos do produto, extrato e fração estão apresentados na Tabela 2.3 e mostrados no Esquema 1.1 (Cap. 1; p. 20)

**Tabela 2.3 – Resultados de atividade biológica para o produto e frações (lotes 1-3)**

DESCRIÇÃO	Microorganismos		
	Mr (mm)	Sa (mm)	Bc (mm)
Produto Lote 1	10	10	10
Lote 1 - Fr.CHCl <sub>3</sub>	25	11	15
Lote 1 – Fr. Hexânica	0	0	0
Lote 1 – Fr. BuOH	0	0	0
Lote 1 – Fr. Hidroalcóolica	0	0	0
Produto Lote 2	N.T	>7	>7
		MIC = 1000 µg/mL	MIC = 500 µg/mL
Lote 2 - Fr.CHCl <sub>3</sub>	N.T	10	10
Produto Lote 3	N.T	>7	>7
		MIC = 1000 µg/mL	MIC = 500 µg/mL
Lote 3 - Fr.CHCl <sub>3</sub>	N.T	9	10

*Mr: Micrococcus roseus; Sa: Staphylococcus aureus e Bc: Bacillus cereus*

NT: Não testada

**Tabela 2.4 - Medidas dos halos de inibição em milímetros dos discos contendo substâncias (antibióticos) controle**

CONTROLES	<i>M. roseus</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
TETRACICLINA OU NISTATINA	32/31	30/28	16/18	25/22	20/20	12/14	24/24

O resultado obtido no presente trabalho mostrou que somente o produto e a fração clorofórmica apresentaram atividade moderada para *Micrococcus roseus*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* dentre os microorganismos testados.

A fração clorofórmica apresentou halos de inibição de 25 mm para *Micrococcus roseus*, sendo esse resultado duas vezes maior que aquele observado para o produto. Os halos observados de 11 mm e 15 mm para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foram também superiores ao do produto seco.

Esses resultados indicaram que os princípios ativos do produto foram concentrados na fração clorofórmica, estando os mesmos em acordo com a literatura que descreve as propriedades de substâncias de médias polaridades isoladas de *P. aduncum* e que ajudaram a direcionar o trabalho.

Após fracionamento da fração ativa (Esquema 1.2, p. 22), as sub-frações foram avaliadas e os resultados estão apresentados na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5 - Resultados da atividade antimicrobiana do estudo biomonitorado**

CÓDIGO	Microorganismos		
	Sa (mm)	Bc (mm)	Tc (mm)
1LCPO 44-3	N.I	N.I	11
1LCPO 44-4	N.I	N.I	8
1LCPO 44-5	N.I	N.I	7
1LCPO 44-6	8	7	8
1LCPO 44-7	10	9	N.T
1LCPO 44-8	9	8	N.T

Bc: *Bacillus cereus*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Tc: *Trichosporon cutaneum*

N.I – Não inibe ; N. T – Não testada

Substância controle: nistatina = 25 mm



As frações 44-6, 7 e 8 apresentaram atividade para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, 44-6 também apresentou atividade para *Trichosporon cutaneum* com halo de inibição de 8 mm, assim como as frações 44-3, 4 e 5 com halos de 11, 8 e 7 mm, respectivamente.

Realizou-se o biomonitoramento do produto (Lote 1), após 1 ano de armazenamento, o qual foi exposto a diferentes condições (produto tambor de aço em condições de temperatura inadequada; produto armazenado no freezer e produto exposto a luz) e os resultados apresentados na tabela 2.6 mostraram a perda de atividade do produto observada inicialmente na tabela 2.3.

**Tabela 2.6 – Resultados de atividade antimicrobiana do produto (lote 1) em diferentes condições de armazenamento**

DESCRIÇÃO	Microorganismos		
	Mr (mm)	Sa (mm)	Bc (mm)
Prod. armazenado tambor	0	0	7
Prod. envazado freezer	10	8	8
Prod. envazado exposto à luz	0	10	0

Observou-se portanto que em condições adequadas é possível garantir a eficácia do produto por pelo menos um ano, especialmente quando preveniu-se o produto da ação da luz e do ar.

## **CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE MARCADORES QUÍMICOS**

### **3.1 - Introdução**

Para uma utilização segura de qualquer planta medicinal como medicamento é necessária sua padronização para garantir sua qualidade e a concentração dos princípios ativos, permitindo assim estabelecer doses/efeitos para o mesmo.

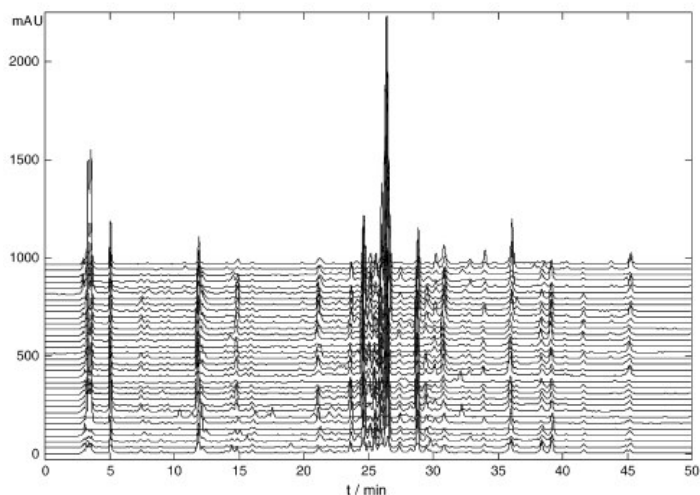
Métodos cromatográficos podem ser aplicados para o controle de qualidade de plantas medicinais devido as suas muitas vantagens tais como alta eficiência, velocidade e a possibilidade de utilização em sistemas automatizados têm sido cada vez mais empregados (CELEGHINI *et al.*, 2001).

O controle de qualidade pode ser efetuado, a partir do perfil cromatográfico obtido com o auxílio de técnicas espectroscópicas, as quais são fortemente recomendadas para a determinação do controle de qualidade de plantas medicinais. Esse perfil deve representar apropriadamente os constituintes químicos, onde um ou mais

marcadores ou componentes farmacologicamente ativos (princípios ativos) em planta e/ou mistura de plantas são empregados para avaliar a autenticação e a identificação do produto oriundo da planta, com base no conceito de fitoequivalência (LIANG, XIE e CHAN, 2004).

Os métodos de controle de qualidade envolvem normalmente inspeção sensorial (examinação macro e microscópica), enquanto a inspeção analítica emprega técnicas experimentais tais como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), infravermelho próximo, etc (CHOI, 2002).

Como exemplo, pode-se mencionar a avaliação de 33 extratos metanólicos da espécie medicinal *Erigeron brevescapus*, realizada em CLAE, onde o cromatograma ou perfil cromatográfico obtido mostra que a fitoequivalência é claramente observada para essa espécie (Figura 3.1).



**Figura 3.1 – Cromatogramas de 32 extratos de *Erigeron brevescapus* analisados em CLAE e detectados em 280 nm (LIANG, XIE e CHAN, 2004).**

Os recentes avanços no emprego da cromatografia hifenada a técnicas espectroscópicas, tais como CLAE-DAD (detecção de ultravioleta por varredura de diodo), eletroforese capilar-DAD, CLAE-EM e CLAE-RMN, têm fornecido informações espectrais adicionais, as quais são muito úteis em análises qualitativas e ainda na elucidação estrutural "on line" de extratos (LIANG, XIE e CHAN, 2004).

Por outro lado, os métodos de extração e preparação de amostra também são de grande importância no preparo de um perfil cromatográfico de plantas medicinais. Sabe-se que em qualquer extrato de planta medicinal existem centenas de componentes desconhecidos e muitos deles estão em pequenas quantidades. Além disso, freqüentemente existe a variabilidade química da espécie vegetal (BAUER, 1998). Conseqüentemente para obter um perfil cromatográfico seguro que represente os componentes farmacologicamente ativos e quimicamente característicos não é um trabalho fácil. A cromatografia, em especial a cromatografia líquida, oferece uma grande capacidade de separação e sensibilidade.

As farmacopéias também recomendam a utilização de métodos cromatográficos para a análise de produtos naturais de origem vegetal e dentre essas técnicas importantes pode-se citar a CLAE (GYÉRESI, KELEMEN e KATA, 1997).

CLAE é uma técnica freqüentemente empregada na análise de plantas medicinais por tratar-se de uma técnica fácil de se usar e não limitada pela volatilidade ou estabilidade (térmica) de substâncias numa amostra. Em geral, pode ser usada para analisar quase todas as substâncias de uma planta, sendo possível otimizar um sistema de separação, através da combinação correta entre as diversas

fases móveis e estacionárias disponíveis. É necessário notar que as condições ótimas de separação envolvem muitos fatores, tais como seleção de coluna, as diferentes composições da fase móvel, ajustes no pH, uso de estabilizantes, etc.

A vantagem da CLAE sobre outras técnicas cromatográficas reside no fato de que as fases estacionária e móvel são disponíveis para uma ampla faixa de polaridade, de modo que, a seletividade no processo de separação pode ser ajustada. Uma segunda vantagem refere-se à necessidade de um menor volume de trabalho para o pré-tratamento das amostras, em diversos casos.

A RDC nº 48/2004 reconhece a utilização de CLAE para a determinação do perfil cromatográfico no controle de qualidade do produto acabado. No presente trabalho, o método empregado para a caracterização química e análise dos marcadores químicos do produto Dermodilapiol foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada com detector de ultravioleta.

### **3.2 - Equipamentos e materiais utilizados**

A determinação dos perfis cromatográficos dos marcadores e sua quantificação foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido da Shimadzu, modelo LC-10, equipado com bomba quaternária, detector de ultravioleta SPD-10AVP válvula de injeção Rheodyne e Chemstation (CLASS-VP, versão 6.1)

Foram utilizados uma coluna de fase reversa Shim-Pack ODS 5  $\mu\text{m}$  (250 x 4,6 mm) e somente solventes de grau cromatográfico da Merck e EM Science ultrafiltrados e água ultrapura e ultrafiltrada (Milli-Q)

O preparo das amostras foi realizado utilizando-se filtro de membrana de PVDF da Millipore (0,2  $\mu\text{m}$ ) ou cartucho de Seppak (Waters) de fase reversa.

Espectros de ultravioleta foram obtidos num espectrofotômetro UV/VIS modelo FEMTO 800XI, para a determinação dos comprimentos de onda máximos dos marcadores químicos isolados.

Pipetas automáticas (Gilson P1000 e Eppendorf P200 e P20);

Balões volumétricos aferidos;

Balança analítica Ohaus modelo Explorer;

Microseringa de 100 $\mu\text{L}$  SGE para CLAE;

Cubetas de quartzo;

Seringa hipodérmica de vidro de 3 mL com saída Luer-Lock;

Vidraria diversa.

### **3.3 - Experimental**

No presente trabalho foram desenvolvidos dois métodos em CLAE, sendo um método para a determinação do perfil cromatográfico da fração clorofórmica obtida de cada lote do produto com tempo de análise mais longo e um outro para a análise quantitativa dos marcadores do produto nos quatro lotes do produto e fração clorofórmica, com tempo de análise mais curto.

#### **3.3.1 – Determinação do perfil cromatográfico**

##### **3.3.1.2 – Preparo das amostras**

As amostras foram preparadas em balão de 10 mL aferido, na concentração de 1 mg/mL utilizando-se metanol.

##### **3.3.1.3 – Desenvolvimento do método**

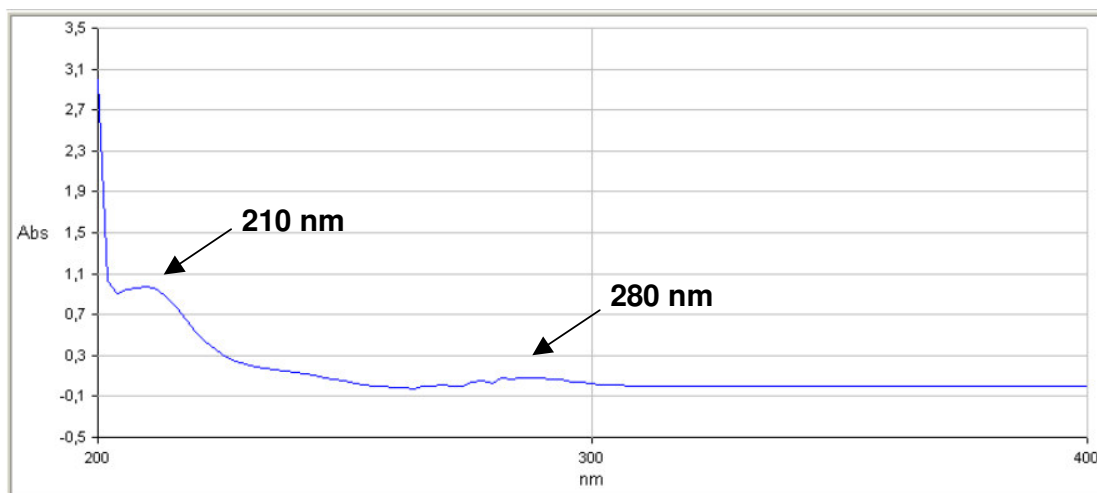
Para determinar o método, em CLAE, que melhor representasse os constituintes químicos presentes na fração ativa do produto, inúmeras análises foram realizadas obtendo-se, ao final, o seguinte método:

Sistema de solvente - ACN: Sol. aquosa de TFA (0,05%), no modo de análise gradiente, aumentando-se gradativamente a proporção de ACN nos tempos de: 0 min - 20:80 → 15 min - 30:70 → 18 min - 40:60 → 25 min - 43:57 → 27 min - 53:47 → 35 min - 66:34 → 43 min - 66:34 → 45 min - 100:0 → 53 min - 100:0. O fluxo programado foi de 1 mL/min e tempo de análise de 53 min.

O volume injetado foi o volume de "loop" (20 µL).

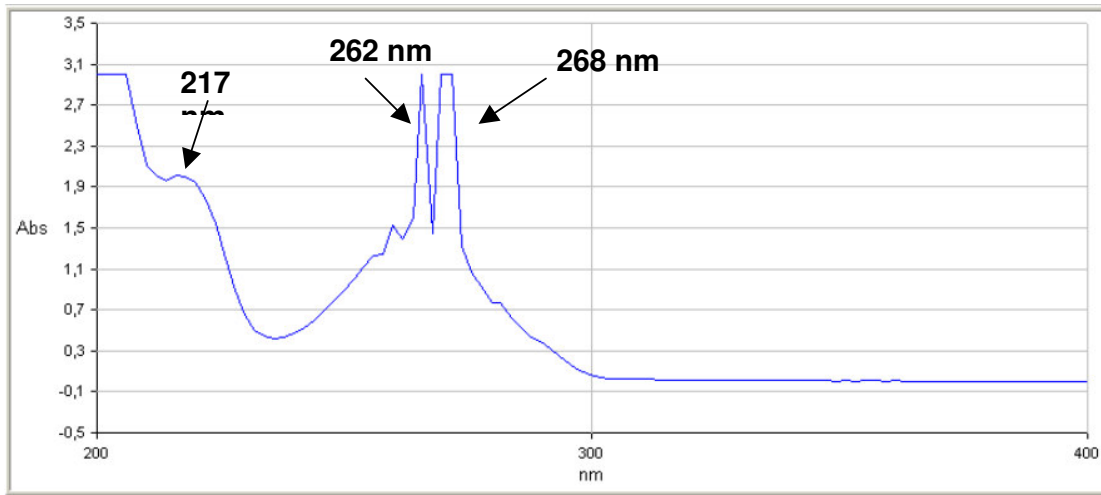
Os comprimentos foram determinados a partir da análise no ultravioleta das substâncias dilapiol [1] e o derivado do ácido benzóico prenilado [4], onde quantidades mínimas dessas substâncias foram diluídas em etanol e analisadas no espectrofotômetro UV/VIS, sendo observados nos espectros abaixo seus comprimentos de onda máximos (Figura 3.2).

#### Dilapiol





## Derivado do ácido benzóico prenilado



**Figura 3.2 – Espectros de ultravioleta do dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado, em etanol (200-400 nm).**

Os comprimentos de onda adotados foram de 254 nm, 265 nm e 280nm.

Uma vez determinado o método de análise, injetou-se no volume de “loop” as frações clorofórmicas e efetuou-se a coinjeção das substâncias isoladas para a caracterização da fração ativa do produto.

### 3.3.2 – Análise Quantitativa

#### 3.3.2.1 – Desenvolvimento do método

Após a realização de várias análises decidiu-se pela quantificação dos marcadores dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado utilizando o sistema de solvente ACN: Solução aquosa de TFA (0,05%) nas seguintes condições: 0 min – 49:51 → 10 min – 49:51 → 12 min – 65:35 → 25 min – 65:35 → 30 min – 100:0, fluxo de 1mL/min e tempo de análise de 30 min.

Após a determinação do método, analisou-se o produto e as frações clorofórmicas, lotes 1-4, após o tratamento dos mesmos, com um volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  (loop), conforme mostrados a seguir:

### **3.3.2.2 – Tratamento do produto**

Antes da injeção do produto Dermopilapiol em CLAE, realizou-se um tratamento das amostras, onde 100  $\mu\text{L}$  do produto (balão 5 – Figura 3.3) foi diluído em 900  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e filtrado em cartucho Seppak (Waters) de fase reversa.

O cartucho foi lavado então com água até completar o volume de 5 mL no balão volumétrico aferido, obtendo-se as substâncias polares (balão 1 – Figura 3.3).

As substâncias retidas no Seppak foram eluídas com 10 mL de ACN, na qual foi adicionado 10 mL de água antes da injeção no CLAE (balão 2 – Figura 3.3). Obtendo-se, assim, uma fração com substâncias de média polaridade (substâncias de interesse), sendo essa 200 vezes mais diluída, em relação ao produto. Para garantir que toda as substâncias de interesse fossem eluídas do Seppak, lavou-se novamente o cartucho com 10 mL de ACN em outro balão (balão 3 – Figura 3.3)



**Figura 3.3 – Tratamento do produto**

Injetou-se, no volume do Loop (20  $\mu$ L), em triplicata, cada uma das frações de interesse obtidas nesse tratamento para os lotes 1-4.

### **3.3.2.3 – Tratamento da Fração Clorofórmica**

As amostras da fr.  $\text{CHCl}_3$  foram preparadas na concentração de 1 mg/mL utilizando-se metanol. Em seguida, efetuou-se uma diluição de 6 vezes, resultando na concentração final de 166  $\mu$ g/mL, as quais foram analisadas no método definido para a quantificação.

### **3.3.2.4 – Preparo de soluções dos marcadores químicos para quantificação em CLAE.**

A quantificação foi realizada pelo método do padrão externo, o qual se compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas desta mesma substância em soluções padrões em concentrações conhecidas.

Preparou-se soluções-padrão dos marcadores dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado, em diferentes concentrações e injetou-se cada uma, em triplicata, no método definido para a quantificação.

### **3.3.3 - Resultados e Discussão**

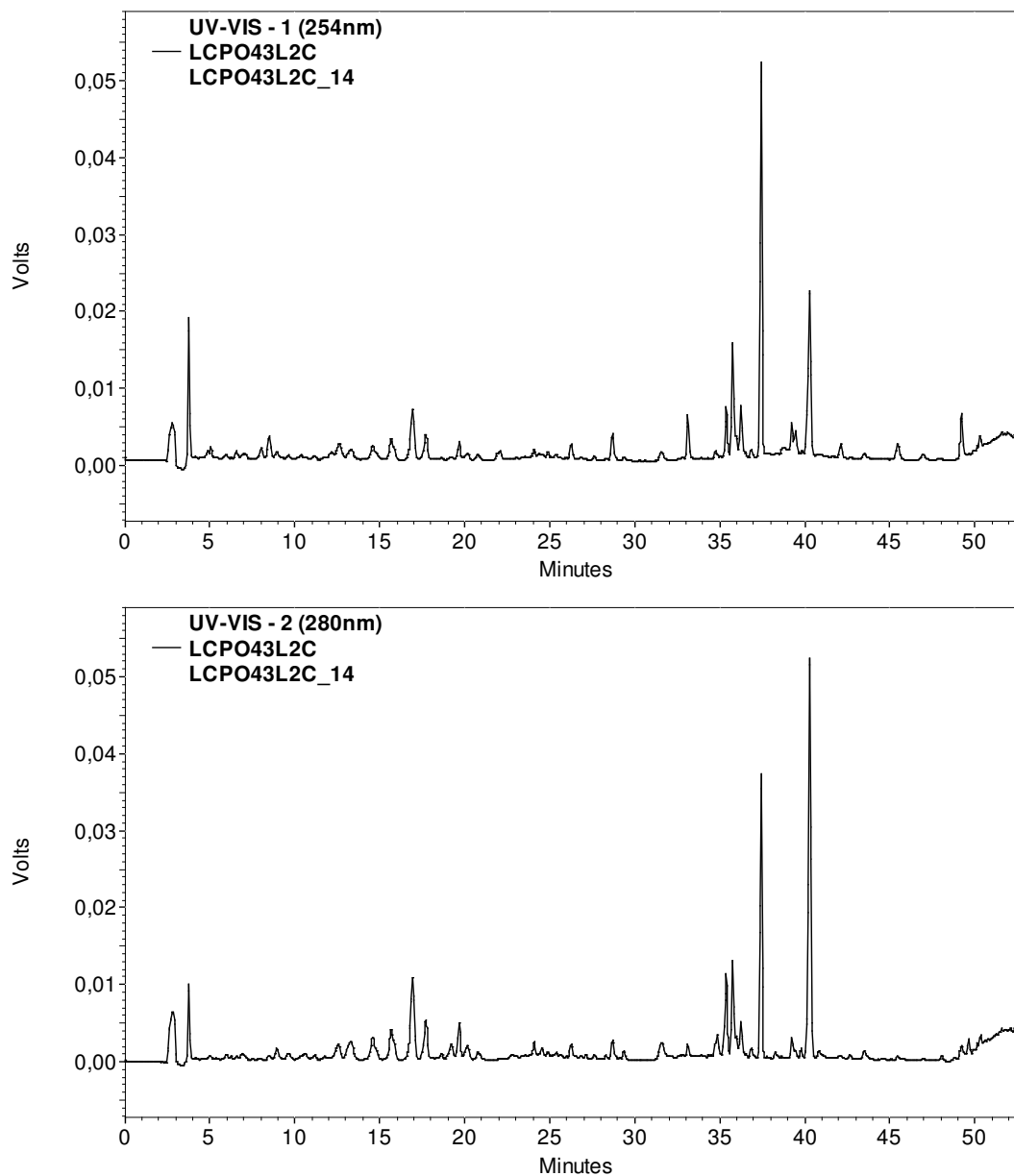
#### **3.3.3.1 – Perfis Cromatográficos**

O método determinado para análise do perfil cromatográfico mostrou-se reprodutível, com boa separação dos constituintes da fr.  $\text{CHCl}_3$  de cada lote.

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana (Capítulo 2, página 57) e o levantamento realizado (Capítulo 2, páginas 48-49), indicaram que os princípios ativos estão concentrados na fração clorofórmica. Foi decidido então o emprego de um método de análise mais longo nesse caso, para uma melhor caracterização química dos constituintes presentes pela obtenção dos perfis cromatográficos. O tempo de análise foi de 53 min.

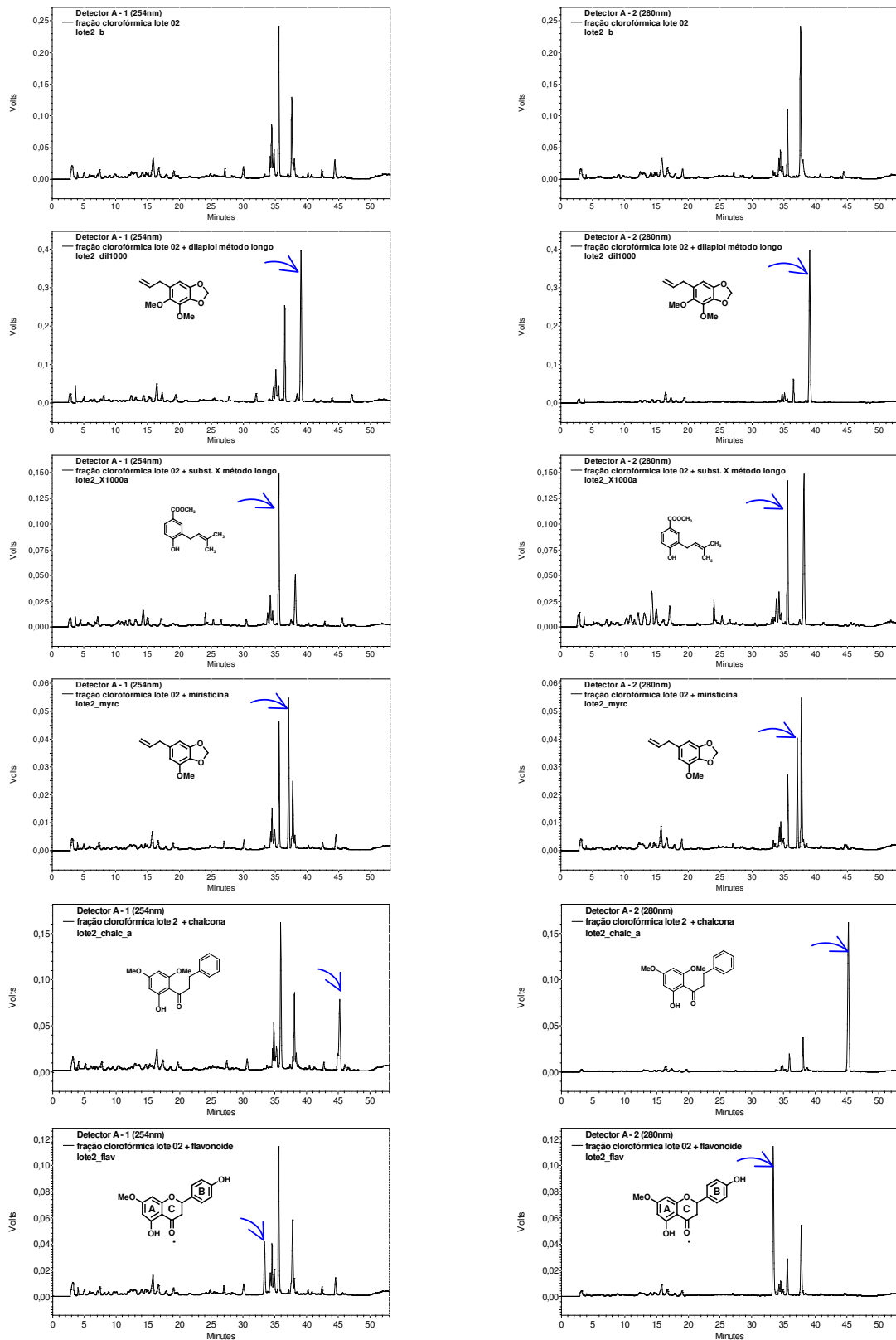
A utilização de água acidificada melhorou a resolução dos picos (simetria dos mesmos). O TFA foi utilizado por ser transparente ao ultravioleta, isto é, não interfere na detecção por sua baixa absorção, não alterando a linha base e também por sua acidez sendo necessário quantidades mínimas para alcançar o pH desejado.

Nos cromatogramas apresentados na Figura 3.4, observa-se a presença de duas substâncias majoritárias e os demais constituintes encontram-se em concentrações menores.



**Figura 3.4 – Perfil cromatográfico da Fr.  $\text{CHCl}_3$  (Lote 2), 254 e 280 nm**

Com a coinejeção das substâncias isoladas, mostradas nos cromatogramas (Figura 3.5), foi possível identificar os marcadores isolados na fração ativa do produto.



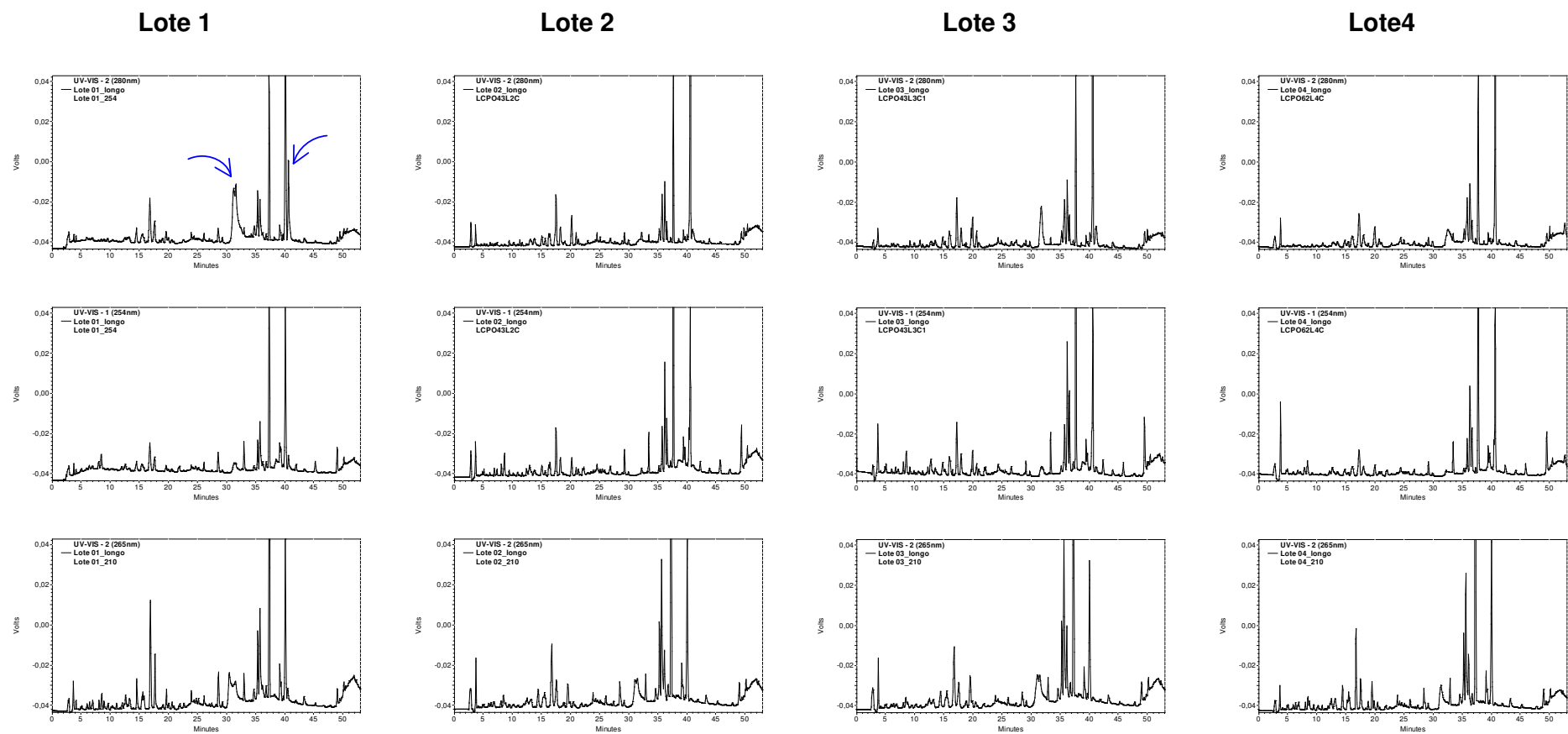
**Figura 3.5 – Cromatogramas após a coinjeção dos marcadores isolados na Fr.  $\text{CHCl}_3$  (lote 2), em 254 (esquerda) e 280 nm (direita)**

Como já descrito na literatura para a espécie em estudo, foi confirmada a substância majoritária como sendo o dilapiol, com tempo de retenção médio de 39,1 min, no método de análise mais longo.

O derivado do ácido benzóico prenilado, com tempo de retenção médio de 35,6 min., é o segundo constituinte majoritário, conforme observado no cromatograma obtido a 280 nm. Constatou-se que em 254 nm, o derivado do ácido benzóico prenilado possui maior absorção que para o dilapiol.

A miristicina eluiu no tempo médio de 37,1 min e possui maior absorção também em 254 nm. Por outro lado, a sacuranetina e a diidroflavocavina B eluíram nos tempos médios de 33,4 e 45,5 min, respectivamente, e possuem absorção maior em 280 nm.

Na comparação dos perfis cromatográficos dos diferentes lotes a 254, 265 e 280 nm, observa-se diferenças para o lote 1, principalmente, nos tempos de retenção 31,3 e 40,6 min, onde observou-se um pico bem intenso quase não observado nos lotes 2-4, conforme apontados nos cromatogramas (Figura 3.6).



**Figura 3.6 - Cromatogramas dos lotes 1-4, analisados nos comprimentos de onda 280, 254 e 265 nm**



A explicação mais provável para esse fato é que o lote 1 (o mais antigo), provavelmente sofreu a degradação de seus constituintes. Testes de atividade antimicrobiana realizados para esse lote, comprovaram a perda da atividade (tabela 2.6, pág.58).

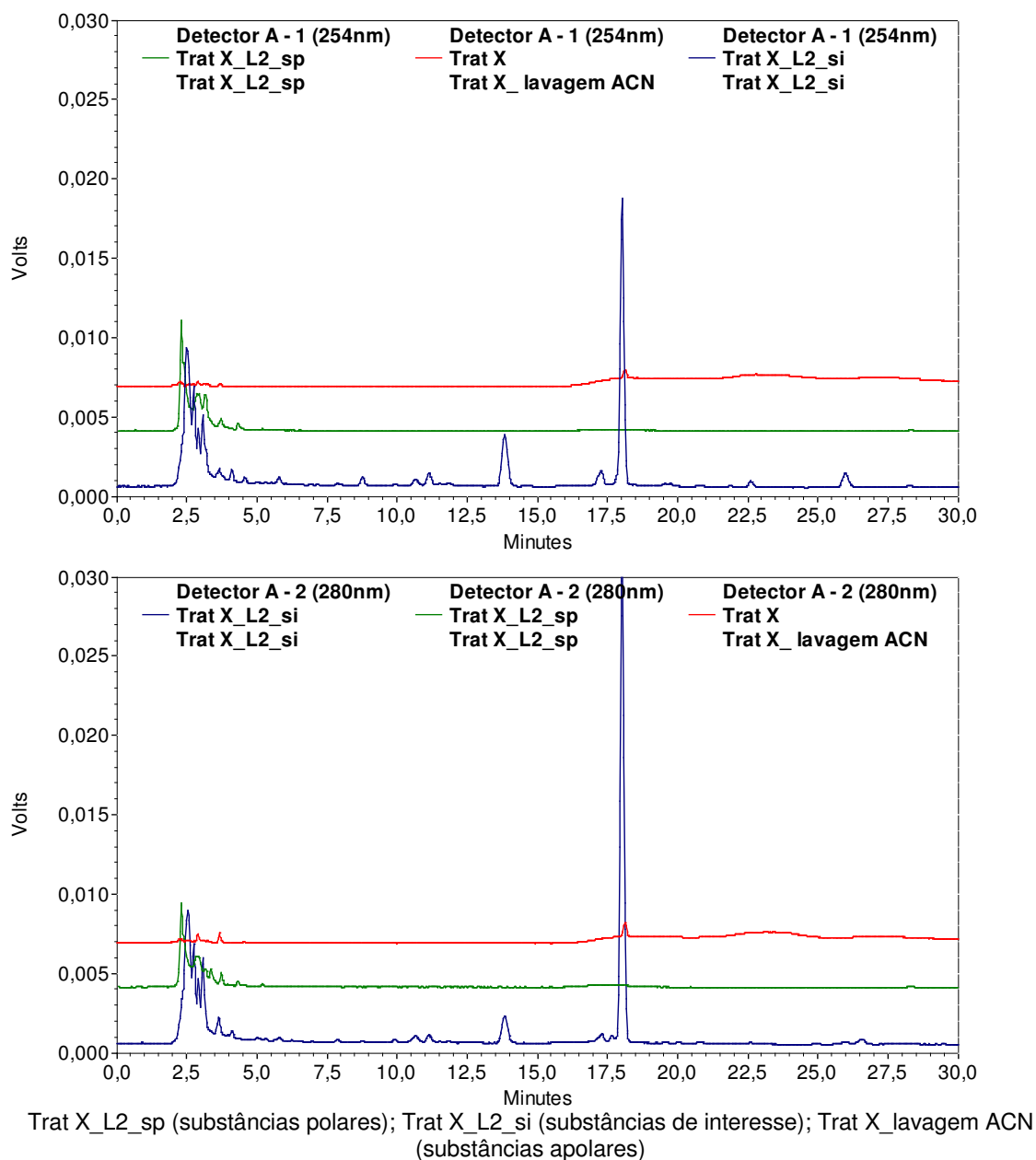
Já os demais lotes, que possuem perfil cromatográfico bem semelhante, todos apresentaram atividade antimicrobiana (Tabela 2.3, pág. 56)

Esses resultados demonstram que o método empregado pode ser utilizado na análise de controle de quantidade do produto. Contudo, observa-se um grande número de constituintes presentes na fração ativa, conseqüentemente, o isolamento de um maior número de marcadores seria necessário para a padronização do extrato, tomando como exemplo o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761), cujo controle de qualidade é feito através dos flavonóides e das lactonas terpênicas.

### **3.3.3.2 – Quantificação dos marcadores químicos**

O método desenvolvido para a quantificação foi um método mais curto, com um tempo de análise de 30 min, devido à necessidade do número de injeções a serem realizadas; uma vez que, a análise quantitativa foi realizada tanto para as frações clorofórmicas do produto quanto para o próprio produto, nos lotes 1-4.

O tratamento realizado com amostras do produto foi considerado bom, pois as substâncias de interesse foram concentradas numa única fração, pois não se observou a presença de dilapiol e do derivado de ácido benzóico prenilado nas demais frações (Figura 3.7). Quantificou-se os marcadores químicos dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado.



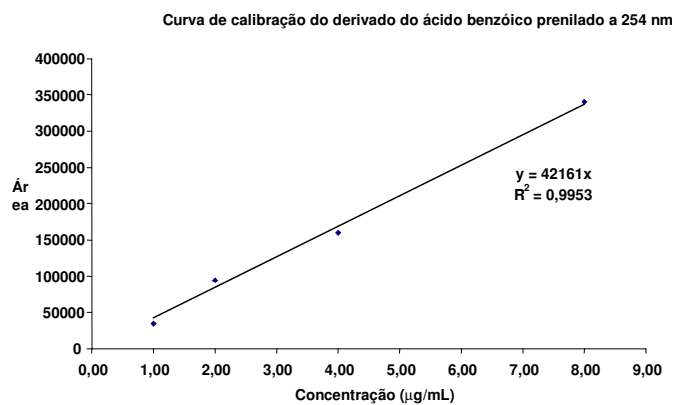
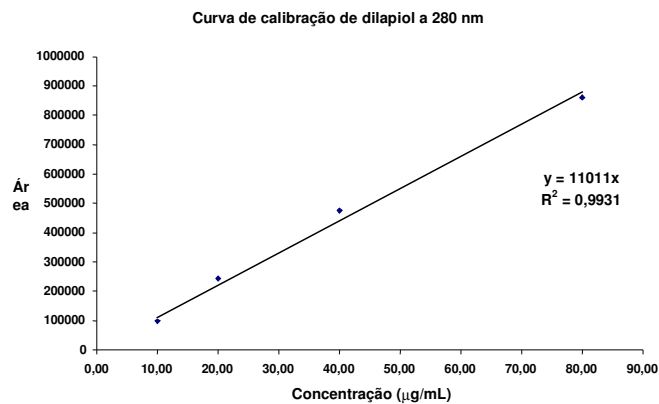
**Figura 3.7 – Cromatogramas das frações obtidas no tratamento do produto, 254 e 280 nm**

### 3.3.3.2.1 – Curvas de calibração

As curvas de calibração (Figura 3.8) foram construídas a partir dos dados obtidos (Tabela 3.1) nas análises efetuadas para o dilapiol nas concentrações 10, 20, 40 e 80 µg/mL e para o derivado do ácido benzóico prenilado na concentrações 1, 2, 4 e 8 µg/mL, os quais foram quantificados nos comprimentos de ondas 280 e 254 nm, respectivamente, por possuírem máximos de absorção próximos a esses comprimentos de onda.

**Tabela 3.1 – Áreas médias obtidas para dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado em 280 e 254 nm, respectivamente.**

Dilapiol (280 nm)				Derivado do ácido benzóico prenilado (254 nm)			
Conc (µg/mL)	Área média	Desvio padrão	Erro relativo (%)	Conc (µg/mL)	Área média	Desvio padrão	Erro relativo (%)
10,00	98222	5123	5,22	1,00	34055,00	501	1,47
20,00	242900	3249	1,34	2,00	94257,33	1136	1,21
40,00	474633	1895	0,40	4,00	160018,33	2566	1,60
80,00	859602	16159	1,88	8,00	340126,67	3377	0,99



**Figura 3.8 – Curvas de calibração para o marcador dilapiol a 280 nm e o marcador derivado do ácido benzóico prenilado a 254 nm**

Ambas as curvas obtidas indicaram excelente linearidade ( $R^2 = 0,9931$  e  $0,9953$ ) nas faixas de concentração analisadas. Durante as injeções das soluções padrões observou-se também uma boa reprodutibilidade, com erros abaixo de 2 %, com exceção do dilapiol a  $10 \mu\text{g/mL}$ . Como as soluções foram obtidas por diluição, é comum que as concentrações inferiores apresentem erros maiores.

### 3.3.3.2 Quantificação do marcador dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado no produto Dermodilapiol

A extrapolação das áreas médias, obtidas para o dilapiol e o derivado do ácido benzóico prenilado em cada lote do produto analisado em triplicata, (Tabelas 3.2a-b) nas curvas de calibração forneceu as concentrações desses marcadores no produto, as quais foram multiplicadas pelo fator de diluição 200 (tratamento da amostra), obtendo-se assim a concentração desses marcadores no produto Dermodilapiol.

**Tabela 3.2a – Dados obtidos em CLAE para a quantificação do dilapiol no produto**

<b>TRATAMENTO (280nm)</b>	<b>Área média</b>	<b>DesvPad</b>	<b>Erro (%)</b>	<b>Conc (mg/mL) diluído</b>	<b>Conc (mg/mL)</b>	<b>mg/mg do produto seco</b>
<b>Lote 01 – 1<sup>a</sup></b>	250096	4470	1,79	0,023	4,54	0,30
Lote 01 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 01 – 3 <sup>a</sup>						
<b>Lote 02 – 1<sup>a</sup></b>	280399	2298	0,82	0,025	5,09	0,24
Lote 02 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 02 – 3 <sup>a</sup>						
<b>Lote 03 – 1<sup>a</sup></b>	264897	3580	1,35	0,024	4,81	0,23
Lote 03 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 03 – 3 <sup>a</sup>						
<b>Lote 04 – 1<sup>a</sup></b>	223216	915	0,41	0,020	4,05	0,19
Lote 04 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 04 – 3 <sup>a</sup>						

**Tabela 3.2b – Dados obtidos em CLAE para a quantificação do derivado do ácido benzóico no produto**

<b>TRATAMENTO (254nm)</b>	<b>Área média</b>	<b>DesvPad</b>	<b>Erro (%)</b>	<b>Conc (µg/mL) diluído</b>	<b>Conc (mg/mL)</b>	<b>µg/mg do produto seco</b>
Lote 01 – 1 <sup>a</sup>	40808	419	1,03	0,97	0,19	12,7
Lote 01 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 01 – 3 <sup>a</sup>						
Lote 02 – 1 <sup>a</sup>	46364	82	0,18	1,10	0,22	10,4
Lote 02 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 02 – 3 <sup>a</sup>						
Lote 03 – 1 <sup>a</sup>	46962	1347	2,87	1,10	0,22	10,4
Lote 03 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 03 – 3 <sup>a</sup>						
Lote 04 – 1 <sup>a</sup>	46579	380	0,82	1,10	0,22	10,2
Lote 04 – 2 <sup>a</sup>						
Lote 04 – 3 <sup>a</sup>						

A razão da concentração dos marcadores dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado pela concentração do produto para cada lote (listados na tabela 1.2, pág. 30), forneceu a proporção desse marcador no produto seco (relação peso/peso) (Figura 3.9).

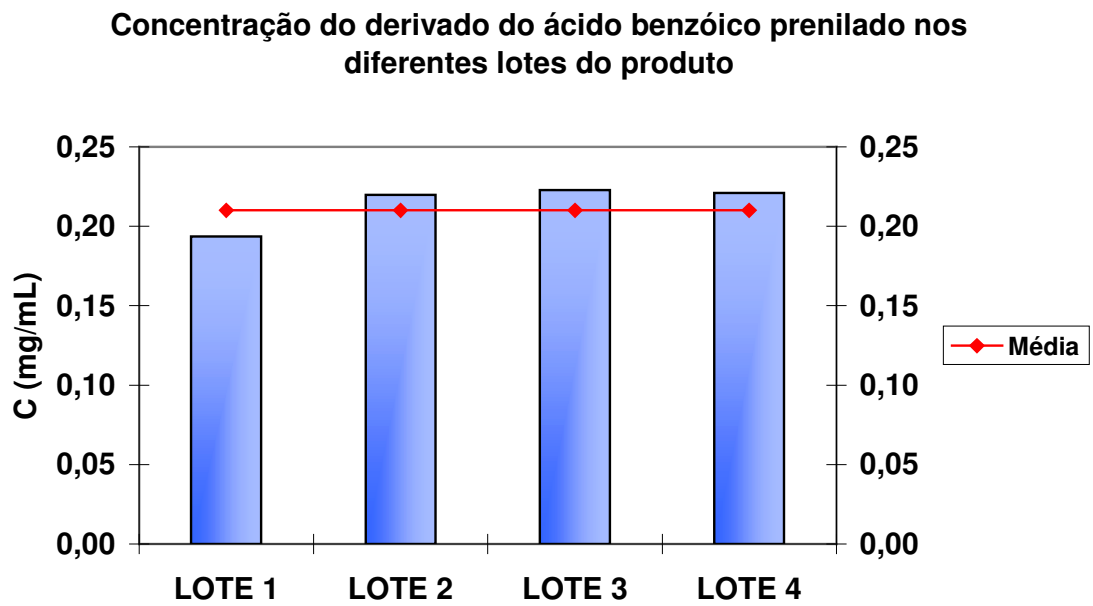
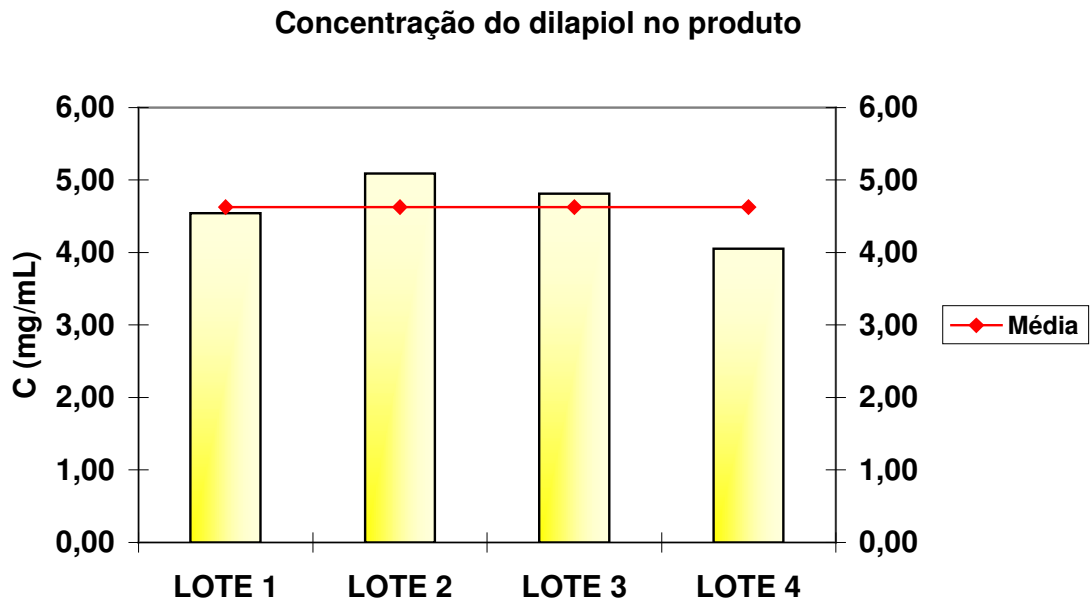


Figura 3.9 - Concentração do dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado no produto

Com base nos resultados, verificou-se que dilapiol nos lotes 2 e 3, é respectivamente 12 e 6% maior que o teor de dilapiol do lote 1. O mesmo observa-se para a quantidade do derivado do ácido benzóico nos lotes 2-3, que são 14 % maiores em relação ao lote 1, lembrando que esse lote perdeu a atividade antimicrobiana.

No lote 4, a quantidade de dilapiol é 12,5 % menor em relação a média dos lotes, já o derivado do ácido benzóico prenilado é igual aos lotes 2-3. Porém não foi possível testar o lote 4 para a atividade antimicrobiana, para se afirmar se existe relação entre a concentração do marcador e a atividade antimicrobiana.

O doseamento desses dois marcadores não é suficiente para a padronização do produto referente à dose/efeito, pois apesar de serem os constituintes majoritários do produto esses possuem pouca atividade (ORJALA *et al.*, 1993b;), sendo necessário para um trabalho completo o monitoramento de outras substâncias que em conjunto atribuem à atividade ao produto.

Entretanto, dilapiol é um bom marcador destinado ao controle da matéria-prima, pois essa não é uma substância comum em outras espécies de *Piper*, quase que apenas restrito à espécie *Piper aduncum*.



### 3.3.3.2.3 – Quantificação do marcador dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado na fração clorofórmica

As quantificações do dilapiol e do derivado do ácido benzóico prenilado nas frações clorofórmicas foram realizadas após injeção das amostras na concentração de 166 µg/mL obtidas a partir de diluição de uma solução de 1mg/mL, a fim de utilizarmos a mesma curva de calibração construída para análise de produto. Os resultados estão apresentados nas tabelas 3.3a-b.

**Tabela 3.3a – Dados obtidos em CLAE para a quantificação do dilapiol**

TRATAMENTO (280nm)	Área média	DesvPad	Erro (%)	Conc (µg/mL)	µg/mg na fr. CHCl <sub>3</sub>
Lote 1-CHCl <sub>3</sub> -1 <sup>a</sup>	476184	13676	2,87	43,25	260,5
Lote 1-CHCl <sub>3</sub> -2 <sup>a</sup>					
Lote 1-CHCl <sub>3</sub> -3 <sup>a</sup>					
Lote 2-CHCl <sub>3</sub> -1 <sup>a</sup>	387016	5056	1,31	35,15	211,7
Lote 2-CHCl <sub>3</sub> -2 <sup>a</sup>					
Lote 2-CHCl <sub>3</sub> -3 <sup>a</sup>					
Lote 3-CHCl <sub>3</sub> -1 <sup>a</sup>	431837	7855	1,82	39,22	236,3
Lote 3-CHCl <sub>3</sub> -2 <sup>a</sup>					
Lote 3-CHCl <sub>3</sub> -3 <sup>a</sup>					
Lote 4-CHCl <sub>3</sub> -1 <sup>a</sup>	448722	5235	1,17	40,75	245,5
Lote 4-CHCl <sub>3</sub> -2 <sup>a</sup>					
Lote 4-CHCl <sub>3</sub> -3 <sup>a</sup>					

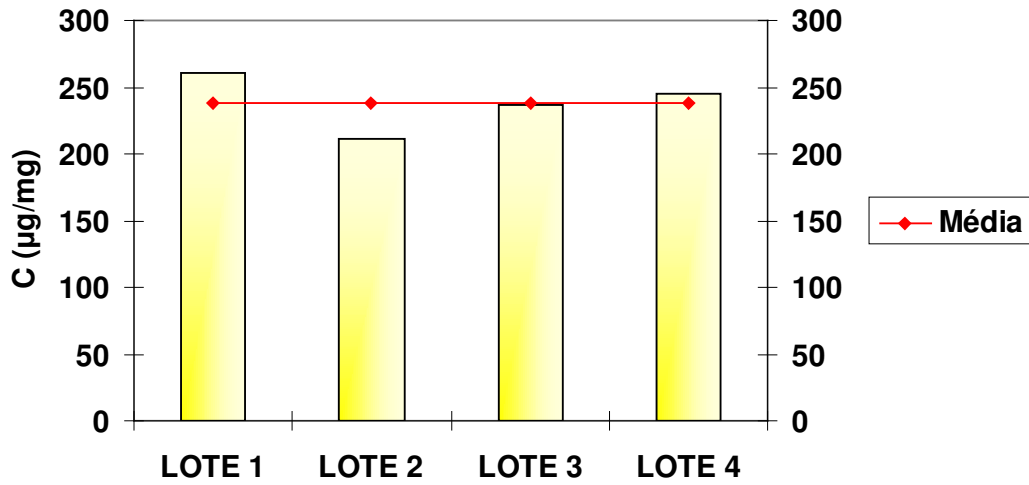
**Tabela 3.3b – Dados obtidos em CLAE para a quantificação do derivado do ácido benzóico**

<b>TRATAMENTO (254nm)</b>	<b>Área média</b>	<b>DesvPad</b>	<b>Erro (%)</b>	<b>Conc (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><math>\mu\text{g/mg}</math> na fr. <math>\text{CHCl}_3</math></b>
Lote 1- $\text{CHCl}_3$ -1 <sup>a</sup>	318164	9219	2,90	45,28	45,48
Lote 1- $\text{CHCl}_3$ -2 <sup>a</sup>					
Lote 1- $\text{CHCl}_3$ -3 <sup>a</sup>					
Lote 2- $\text{CHCl}_3$ -1 <sup>a</sup>	339364	5821	1,72	48,29	48,49
Lote 2- $\text{CHCl}_3$ -2 <sup>a</sup>					
Lote 2- $\text{CHCl}_3$ -3 <sup>a</sup>					
Lote 3- $\text{CHCl}_3$ -1 <sup>a</sup>	435182	7080	1,63	61,93	62,17
Lote 3- $\text{CHCl}_3$ -2 <sup>a</sup>					
Lote 3- $\text{CHCl}_3$ -3 <sup>a</sup>					
Lote 4- $\text{CHCl}_3$ -1 <sup>a</sup>	341536	1976	0,58	48,60	48,79
Lote 4- $\text{CHCl}_3$ -2 <sup>a</sup>					
Lote 4- $\text{CHCl}_3$ -3 <sup>a</sup>					

As concentrações foram obtidas após extrapolação das áreas médias nas curvas de calibração (Figura 3.8).

A razão da concentração obtida em  $\mu\text{g/mL}$  pela concentração da fração  $\text{CHCl}_3$  em  $\text{mg/mL}$  forneceu a proporção peso/peso ( $\mu\text{g/mg}$ ) desses marcadores na fração clorofórmica, as quais apresentadas na Figura 3.10.

### Concentração do dilapiol nas fr. clorofórmicas



### Concentração do derivado do ácido benzóico prenilado nas fr. clorofórmicas

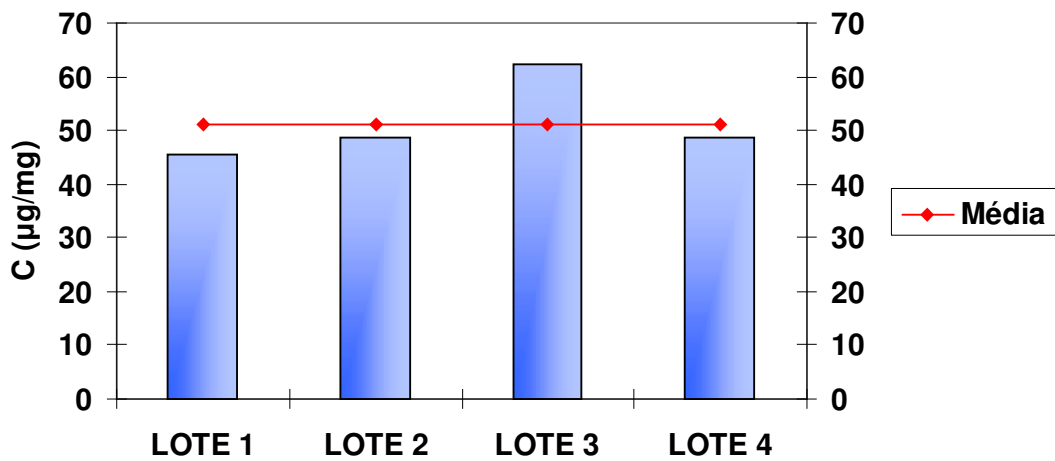


Figura 3.10– Concentração de dilapiol e derivado do ácido benzóico prenilado nas frações clorofórmicas

Os resultados não mostraram correlação com os resultados obtidos na quantificação dos marcadores no produto e nem nos resultados de atividade biológica, provavelmente pelo processo de obtenção da fração clorofórmica adotado partição líquido-líquido. Considerando que num processo de partição líquido-líquido, as substâncias distribuem-se de acordo com os seus respectivos coeficientes de partição, provavelmente tanto o dilapiol como o derivado do ácido benzóico prenilado devem ter se distribuído nas frações hexânicas e hidroalcóolica (vide Esquema 1.1). Já no caso do tratamento via extração fase sólida, observou-se claramente que dilapiol e o derivado do ácido benzóico prenilado concentraram-se unicamente na fração analisada. Portanto a quantificação é melhor realizada com o tratamento do produto via Seppak.

Entretanto, a análise da fração clorofórmica foi importante para descrever o perfil cromatográfico da fração ativa do produto, conforme resultados dos testes de atividade antimicrobiana. O emprego da partição líquido-líquido justifica-se quando da necessidade de se trabalhar com uma quantidade maior de material (isolamento de fitoconstituintes) ou mesmo pela disponibilidade de material para a realização de separação por fase sólida (Seppak).

## **CAPÍTULO 4 – ÓLEOS ESSENCIAIS**

### **4.1 - Introdução**

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, os quais são usados para conferir aroma e odores especiais a diversos produtos alimentícios e de perfumaria. Também é grande o seu uso como medicamentos analgésicos, anti-sépticos, sedativos, expectorantes, estimulantes, estomáquicos, etc. (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

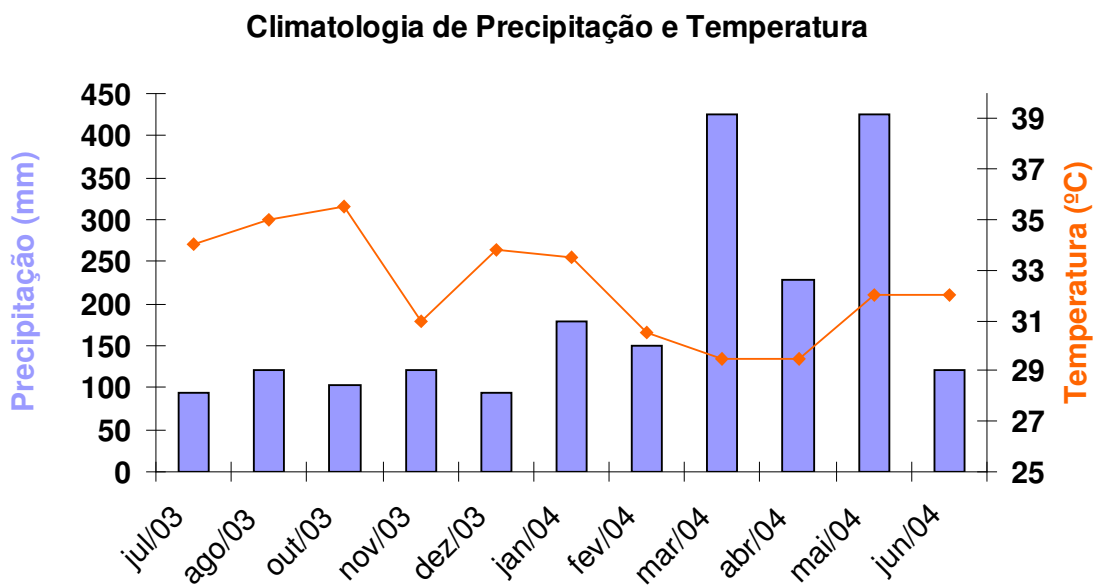
Segundo Simões e Spitzer (2003), a grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados de fenilpropanóides e terpenóides, sendo que esses últimos preponderam, constituindo uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo os mais freqüentes nos óleos essenciais os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos essenciais) e os sesquiterpenos.

Existem trabalhos demonstrando que a toxicidade de alguns componentes dos óleos essenciais constitui uma proteção contra predadores e infestantes. Mentol e mentona, por exemplo, são inibidores do crescimento de vários tipos de larvas (KESLEY et al., 1984).

A composição química de um óleo essencial, extraído de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas (temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos) e de solo (grau de hidratação do terreno e a presença de micronutrientes).

A Amazônia apresenta durante o ano, duas estações bem características: o inverno e o verão. O inverno, conhecido como a época das águas, tem início em outubro e termina em março, quando os níveis dos rios começam a baixar. O verão, por sua vez, é considerado o período de “seca” e compreende os meses de abril a setembro.

A precipitação pluviométrica na cidade de Manaus nos períodos de 2003 e 2004 está apresentada nos gráficos da figura 4.1.



**Figura 4.1 - Precipitação em Manaus nos anos de 2003 e 2004**

No presente trabalho, realizou-se a avaliação do teor do dilapiol no óleo essencial de *Piper aduncum* coletadas em três diferentes localidades de Manaus, com o intuito de observar o efeito sazonalidade e efeito da localidade geográfica na síntese/acúmulo para esse marcador no óleo essencial. Considerando a volatilidade dessa substância, optou-se por sua análise pela extração do óleo essencial, pela facilidade de extração e quantificação.

O método de escolha para separar e quantificar o dilapiol no óleo essencial foi a cromatografia gasosa. Apesar do seu alto poder de separação é um método simples de se usar. A identificação das substâncias pode ser realizada, através da comparação dos índices de Kovats. O índice de Kovats ou índice de retenção relaciona o tempo de retenção da substância ao tempo de retenção de uma série de

hidrocarbonetos saturados homólogos. Como duas substâncias diferentes podem ter o mesmo índice de retenção em uma dada condição é recomendável analisar uma determinada mistura em duas colunas de polaridades diferentes. (DAVIES, 1990).

Fórmula do índice de retenção de Kovats

$$IR_K = 100. n [(tR_{subs} - tR_{hidant}) / (tR_{hidpost} - tR_{hidant})] + 100. n^{\circ} C_{hidant}$$

Onde:

$IR_k$ : Índice de retenção de Kovat's

$n$  : diferença entre o número de carbonos imediatamente anterior e posterior a substância que se quer determinar

$tR_{subs}$ : tempo de retenção da substância

$tR_{hidant}$ : tempo de retenção do hidrocarboneto anterior

$tR_{hidpost}$ : tempo de retenção do hidrocarboneto posterior

Para ter mais segurança na identificação dos picos individuais, é recomendável analisar também o óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Esse acoplamento fornece adicionalmente aos índices de retenção o espectro de massas para cada pico. A análise do espectro de massas geralmente fornece a massa molecular e o padrão de fragmentação, o qual pode ser comparado com aqueles constantes em bibliotecas de massas (NIST, por exemplo).



## 4.2 – Equipamentos e materiais utilizados

Cromatógrafo Gasoso de Alta Resolução, modelo HP 6890 Plus, Marca HEWLETT-PACKARD, equipado com sistema “dual-column” acoplado a dois detectores de ionização de chama, utilizando colunas capilares HP-5 (30 m x 0,320 mm e filme 0,25  $\mu\text{m}$ ) e INNOWAX (30m x 0,320 mm e filme 0,25  $\mu\text{m}$ ) e gás de arraste hidrogênio.

Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas da Shimadzu, modelo CGMS-QP2010, com injetor automático (modelo AOC-20). Coluna DB-5MS (25m x 0,25 mm e filme 0,25  $\mu\text{m}$ ) e gás de arraste hélio.

Solventes grau espectroscópico da Merck e OmniSolv.

Seringa Hamilton 10  $\mu\text{L}$  para CG;

Micropipetadores Gilson (P1000) e Eppendorf (P20 e P200);

A secagem do material vegetal foi realizada utilizando estufa (FANEM, modelo 315 SE), com temperatura ajustada entre 40-50  $^{\circ}\text{C}$ .

Aparelhagem de Clevenger modificada;

Centrífuga

### 4.3 – Experimental

Realizou-se a coleta de *P. aduncum*, partes aéreas, no período de Jul/2003 a Jun/2004, no 23º dia de cada mês no período da tarde, em três diferentes localidades na cidade de Manaus: Campus (área interna do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia); Aleixo (Conjunto Colina do Aleixo, local de coleta da empresa SIEMA para a produção do produto Dermodilapiol) e Distrito Industrial (Figura 4.2).



**Figura 4.2 - Coleta no campus/INPA (março, 2004)**

Imediatamente à coleta, as folhas foram separadas, pesadas e secas em estufa na temperatura entre 40-50 °C, sendo diariamente pesadas até peso constante. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada localidade. Ao final, obteve-se o percentual de perda de água para cada espécie coletada.

Uma vez secas, as folhas foram trituradas e seu óleo essencial foi extraído, através da hidrodestilação utilizando extrator Clevenger modificado num período de 4 horas.

O óleo obtido foi separado do hidrolato por extração com DCM, em funil de separação. Utilizou-se centrífuga para facilitar a separação das fases e, finalmente sulfato de sódio anidro para eliminar toda a água residual.

#### **4.3.1 – Caracterização do óleo por CG-EM**

A análise em CG-EM foi realizada no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

Para a realização da análise em CG, o óleo essencial foi diluído em n-hexano numa concentração final de 1 mg/mL.

A temperatura inicial da coluna foi programada para 120 °C com gradiente linear de 2 °C/min até 160 °C, variando o gradiente linear para 10 °C/min até 240 °C. As temperaturas do injetor e detector foram 240 °C e 270 °C, respectivamente. O volume de injeção foi de 1 µL, no modo split 20:1. O tempo total de análise foi de 28 minutos.

Os espectros de massas foram obtidos a cada segundo e a ionização ocorreu através do impacto de elétrons a 70 eV.

Os componentes da amostra foram identificados através da comparação dos espectros de massas com aqueles constantes na biblioteca Wiley7.Lib. e também da comparação dos índices de Kovats obtidos e constantes na literatura (ADAMS, 1995 e DAVIES, 1990) para cada componente principal do óleo.

#### **4.3.2 – Avaliação sazonal do teor de dilapiol por CG-DIC**

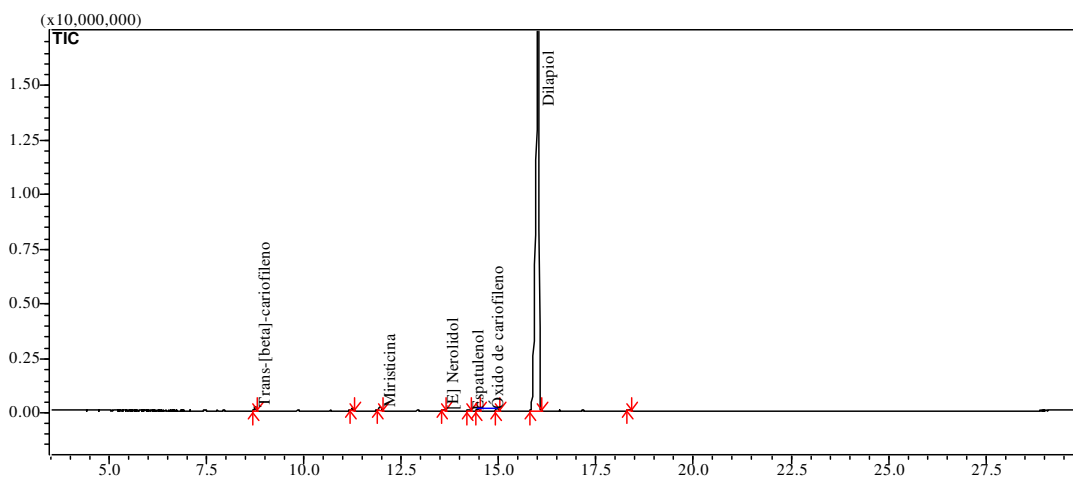
Uma vez obtida a caracterização dos principais constituintes do óleo essencial no CG-EM, realizou-se o estudo da avaliação sazonal e localização geográfica quanto à variação do teor de dilapiol presente no óleo essencial, utilizando CG-DIC com duas colunas cromatográficas (apolar e polar) e no mesmo método de análise empregado na análise por CG-EM.

Efetou-se a análise de todas as amostras de óleo essencial obtidas nas coletas (Aleixo, Campus e Distrito).

## 4.4 - Resultados e discussão

### 4.4.1- Análise em CG-EM

O cromatograma (Figura 4.3) obtido nos mostra que o óleo essencial de *P. aduncum* é relativamente simples, constituído de poucos constituintes, onde se observa a presença de um componente majoritário, o dilapiol.



**Figura 4.3 - Cromatograma do óleo essencial de *P. aduncum* obtido em CG-EM**

A comparação dos espectros de massas obtidos com os presentes na biblioteca Wiley7.Lib e a confirmação dos índices de retenção calculado com os índices tabelados por Adams (1995) e Davies (1990), permitiram identificar os componentes do óleo essencial, conformes dados apresentados na tabela 4.1.

**Tabela 4.1 - Dados de  $t_R$ , IR calculado e IR literatura para os componentes do óleo essencial de *P. aduncum*.**

$t_R$ (min)	IR <sub>calculado</sub>	IR literatura Adams (1995)	IR literatura Davies (1990)	Substância
8,79	1424	1418	1428	[E]- cariofileno
12,01	1517	1520	-	miristicina
13,63	1557	1564	1553	[E]- nerolidol
14,28	1573	1576	-	espatulenol
14,52	1579	1581	1576	óxido de cariofileno
16,03	1629	1622	-	dilapiol

O resultado obtido está de acordo com a literatura (GOTTLIEB *et al.*, 1981), a qual apresenta o dilapiol como constituinte majoritário do óleo. Por tratar-se do principal componente do óleo e um importante marcador do produto e da matéria-prima, resolveu-se acompanhar sua variação no óleo, através da avaliação sazonal a partir das coletas realizadas em três diferentes localidades na cidade de Manaus, num período de 1 ano.

#### **4.4.2 - Avaliação sazonal**

O óleo essencial foi obtido, a partir de folhas secas e realizou-se previamente uma avaliação da umidade presente através de pesagem do material fresco e seco (até peso constante).

#### **4.4.2.1 – Análise de umidade e rendimento do óleo**

A tabela 4.2 apresenta os valores médios obtidos nas análises preliminares como massa fresca, massa seca, perda de umidade e rendimento do óleo para as espécies de *P. aduncum* coletadas nas três localidades: Aleixo, Campus e Distrito.

**Tabela 4.2 - Dados médios obtidos para as três localidades coletadas**

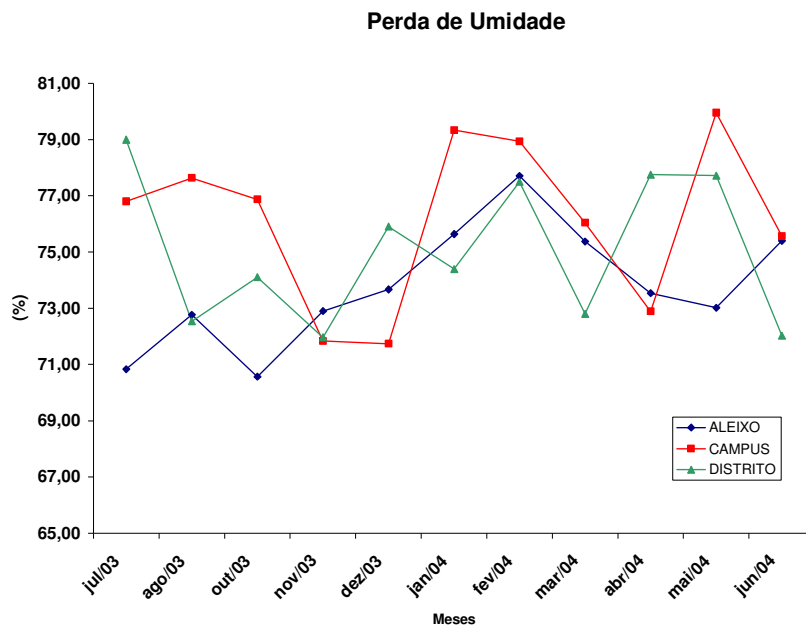
Período	Peso Fresco (g)			Peso Seco (g)			% Umidade			Massa do óleo (mg)			Rendimento (%) g/g		
	A	C	D	A	C	D	A	C	D	A	C	D	A	C	D
Julho	36,40	35,84	33,95	10,61	8,31	7,12	70,84	76,80	79,03	182,5	131,7	114,9	1,72	1,58	1,61
Agosto	34,41	34,09	38,18	9,37	7,59	10,48	72,77	77,72	72,55	101,3	79,2	194,3	1,08	1,04	1,85
Setembro	25,19	12,95	25,64	18,78	10,01	18,96	25,42	22,72	26,05	111,1	45,3	75,1	0,59	0,45	0,40
Outubro	25,53	16,43	25,92	7,51	3,80	6,71	70,60	76,88	74,10	56,5	28,6	39,7	0,75	0,75	0,59
Novembro	35,19	37,02	28,83	9,54	10,43	8,08	72,90	71,84	71,99	533,0	412,8	290,1	5,59	3,96	3,59
Dezembro	35,71	35,55	35,62	9,39	10,05	8,57	73,70	71,72	75,93	250,3	281,6	187,2	2,66	2,80	2,18
Janeiro	35,2	35,2	35,3	9,42	7,28	9,04	73,26	79,31	74,39	306,1	302,4	379,2	3,25	4,15	4,19
Fevereiro	39,9	40,1	39,8	8,90	8,44	8,94	77,71	78,94	77,52	256,2	301,0	445,2	2,88	3,56	4,98
Março	36,5	36,4	36,3	8,98	8,72	9,89	75,37	76,06	72,79	325,0	321,7	333,2	3,62	3,69	3,37
Abril	37,42	37,24	37,52	9,90	10,10	8,35	73,54	72,89	77,76	310,9	169,8	425,7	3,14	1,68	5,10
Maio	37,40	37,26	37,49	10,09	7,47	8,36	73,02	79,95	77,71	234,1	197,5	219,9	2,32	2,64	2,63
Junho	37,63	37,68	37,49	9,29	8,45	10,48	75,31	77,57	72,05	274,1	291,1	519,3	2,95	3,44	4,96

A: Aleixo; C: Campus e D: Distrito



No mês de setembro, o material vegetal foi perdido devido à contaminação fúngica, logo esses resultados foram descartados.

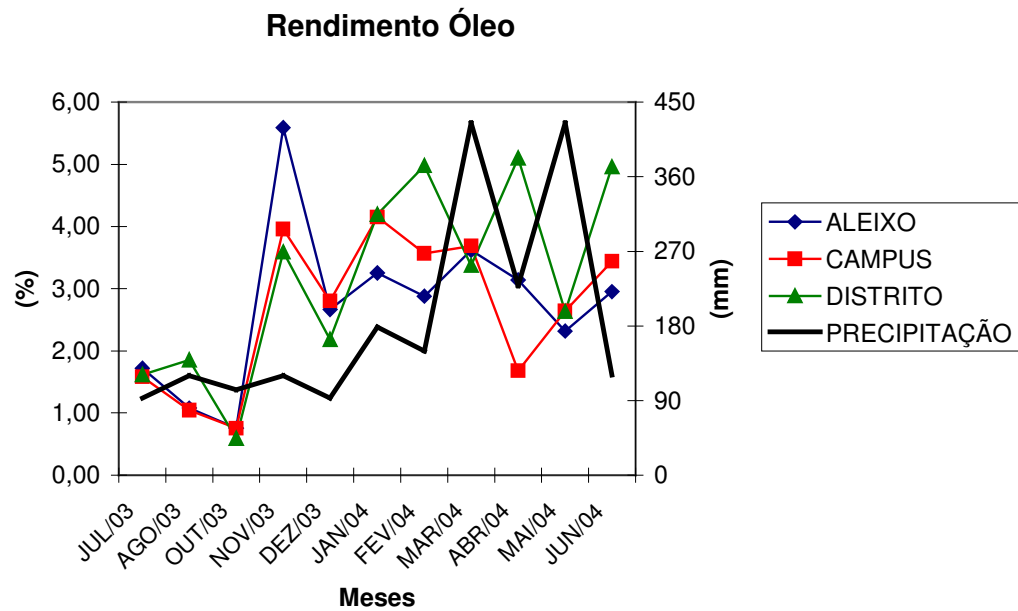
O gráfico observado na Figura 4.4 mostra variação na faixa entre 70 a 80% de perda de água, observando-se quase nenhuma diferença, em relação às localidades coletadas.



**Figura 4.4 - Variação do teor de umidade**

Campus apresentou um teor de água maior que os outros indivíduos. Provavelmente pelo fato desse indivíduo estar localizado em área mais sombreada, ao contrário do indivíduo Aleixo, que se encontrava em área de pleno sol e apresentou menores teores de umidade.

Os indivíduos coletados apresentaram uma variação semelhante no rendimento de óleo. Nos meses de Jul/03 a out/03 observa-se um baixo rendimento de óleo (Figura 4.5), que ao compararmos com os dados de pluviometria, observa-se que esses meses foram os meses mais quentes e com pouca chuva.



**Figura 4.5 - Rendimento do óleo essencial nos indivíduos coletados e precipitação**

#### 4.4.2.2 – Avaliação sazonal do teor de dilapiol por CG-DIC

O método desenvolvido para a avaliação do dilapiol no óleo essencial de *P. aduncum* foi um método considerado bom, com um tempo curto de análise e com boa separação da substância de interesse.

Foi analisado um total de 33 amostras de óleo essencial, cujos resultados de área e percentual por área do dilapiol, colunas apolar e polar, estão apresentados na Tabela 4.3.

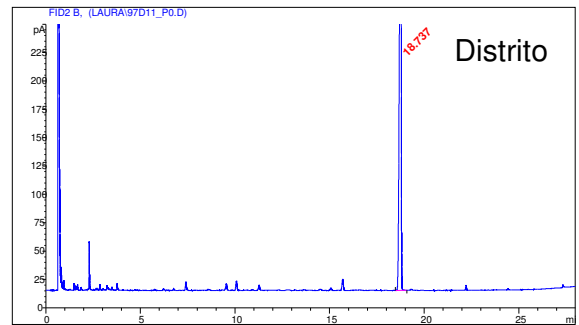
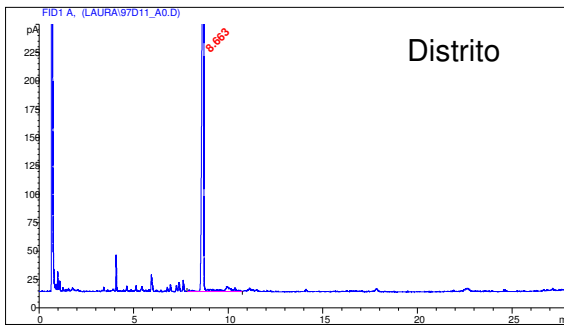
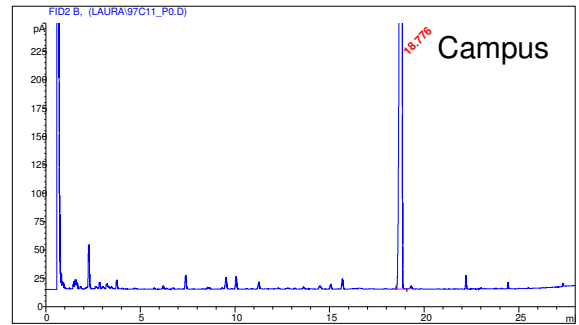
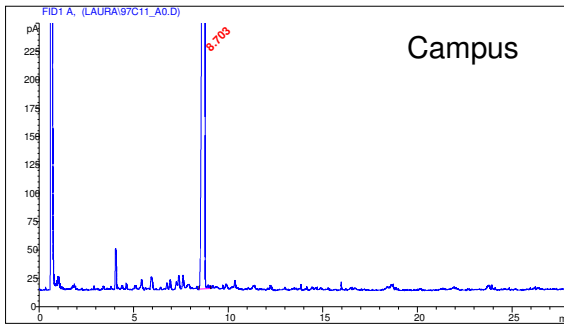
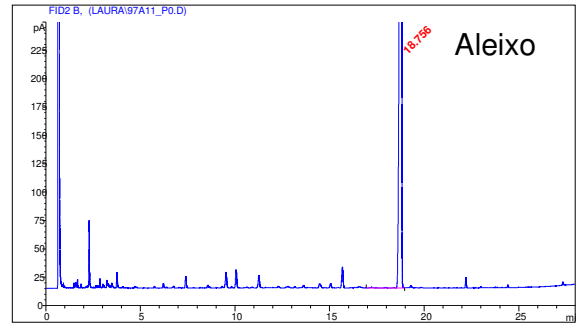
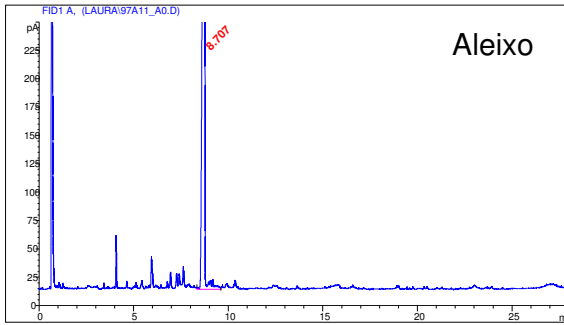
**Tabela 4.3 - Dados de área e área percentual para o diluente obtidos da análise do CG-DIC, colunas apolar (HP-5) e polar (INNOWAX).**

PERÍODO	ALEIXO				CAMPUS				DISTRITO			
	Área (polar)	A(%)	Área (apolar)	A(%)	Área (polar)	C(%)	Área (apolar)	C(%)	Área (polar)	D(%)	Área (apolar)	D(%)
JUL/03	1608,4	95,3	1570,6	95,6	2115,3	95,1	2077,3	93,8	4625,1	91,1	4534,0	89,7
AGO/03	2710,8	87,9	2663,8	84,8	2111,2	88,4	2075,9	87,4	2659,8	94,2	2601,3	93,0
OUT/03	1751,4	92,8	1674,9	94,7	884,5	88,8	854,8	76,4	2045,2	94,1	1995,2	89,5
NOV/03	4530,0	93,2	4477,5	87,2	4247,0	95,2	4197,0	92,6	2773,7	95,1	2748,5	91,0
DEZ/03	5357,7	89,6	5294,7	88,1	3342,7	93,1	3302,0	91,0	3228,0	93,8	3195,6	92,6
JAN/04	5488,9	89,2	5397,3	86,0	3098,8	93,7	3052,3	92,1	2974,2	93,2	2923,0	91,9
FEV/04	5859,5	86,7	5781,2	72,0	7454,3	88,9	7301,9	79,2	3049,8	88,0	3014,0	75,5
MAR/04	9305,3	88,2	9207,7	88,8	7515,6	91,2	7411,9	91,1	5513,8	91,0	5442,4	90,4
ABR/04	3517,2	91,1	3496,2	86,1	3168,4	88,7	3119,5	83,6	3246,9	91,8	3203,8	82,5
MAI/04	7143,6	88,5	7063,4	89,5	6429,5	93,0	6313,4	93,0	4652,9	92,7	4585,5	91,6
JUN/04	4494,6	92,5	4442,2	91,5	5197,9	92,7	5133,0	92,0	7398,7	88,1	7318,3	87,8

A vantagem de se utilizar duas colunas de polaridades diferentes está na confiabilidade dos resultados, uma vez que, se obtém a confirmação de que a substância de interesse não está eluindo com um outro constituinte presente no óleo.

A comparação dos teores de dilapiol no óleo essencial, nas duas colunas mostrou diferenças significantes, sendo estes valores superiores na coluna polar e, provavelmente, o dilapiol não deve estar puro como na coluna apolar. Os indivíduos Aleixo, Campus e Distrito no mês de fevereiro tiveram maior diferença nos resultados das duas colunas, variando em 14,10 e 13,5 %, respectivamente.

Nos cromatogramas apresentados na Figura 4.6, observa-se as diferenças entre as colunas polar e apolar, onde os tempos de retenção para dilapiol são 18,8 e 8,7 min, respectivamente. Também é possível observar o mesmo perfil cromatográfico para cada indivíduo coletado.



Cromatogramas do óleo Aleixo, Campus e Distrito (fev/04) - análise em coluna apolar

Cromatogramas Aleixo, Campus e Distrito (fev/04) - análise em coluna polar

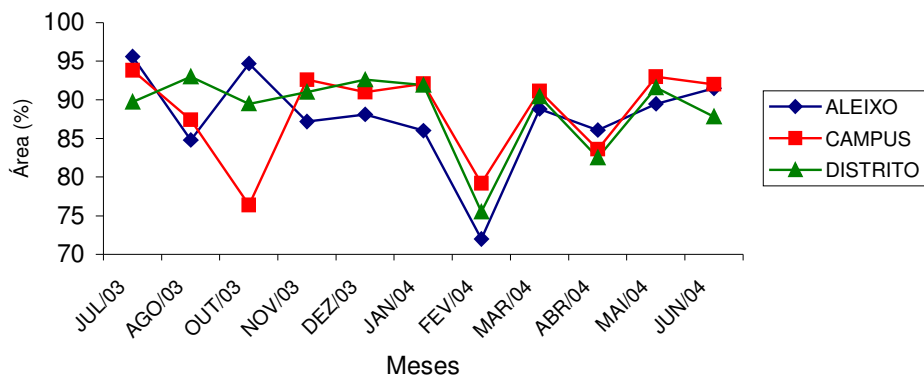
**Figura 4.6: Comparação das análises nas colunas polar e apolar e avaliações dos perfis cromatográficos obtidos**

Nos gráficos abaixo, estão apresentados os gráficos de teor de dilapiol nas colunas apolar (Figura 4.7) e polar (Figura 4.8), nos quais observa-se pouca mudança e não há uma variação clara entre o teor de dilapiol com a temperatura máxima mensal e diária ou com a precipitação mensal e diária (Figura 4.9).

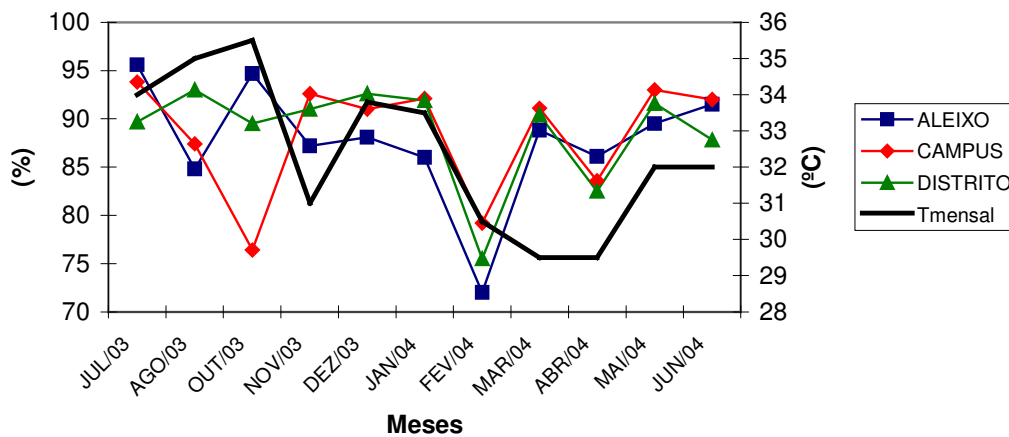
As variações observadas em outubro/03 (indivíduo Campus) e em fevereiro/04 (indivíduos Aleixo e Campus) podem ter resultado da variação climática no momento da coleta, pois tínhamos dias chuvosos e outros com pleno sol.

Vale ressaltar também que o indivíduo Campus era mais jovem que os demais indivíduos, com menor porte e com um número de folhas reduzido. Ao contrário, o indivíduo Aleixo já era bem desenvolvido e ficava diretamente exposto ao sol, e para este observa-se quase sempre um teor de dilapiol inferior.

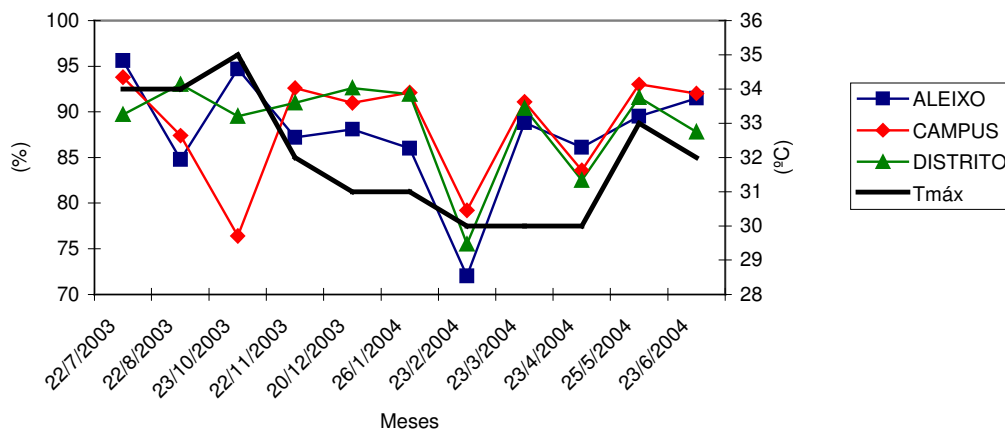
**Teor do dilapiol no óleo de P. aduncum (HP-5)**



**Teor de dilapiol X Tmensial (HP-5)**

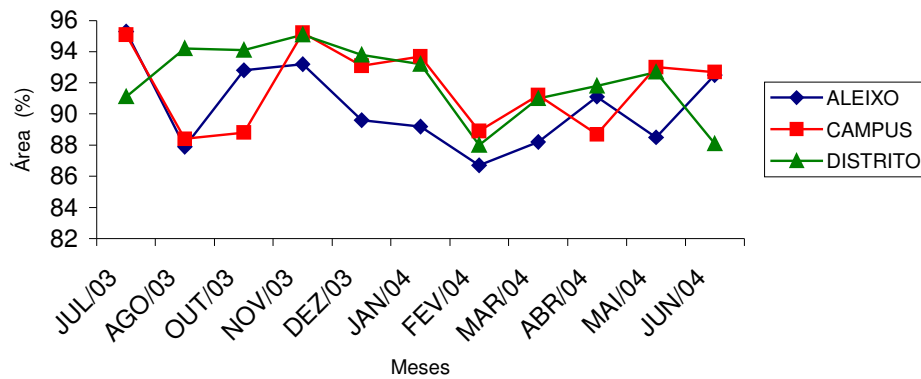


**Teor do dilapiol X Tmáx diária (HP-5)**

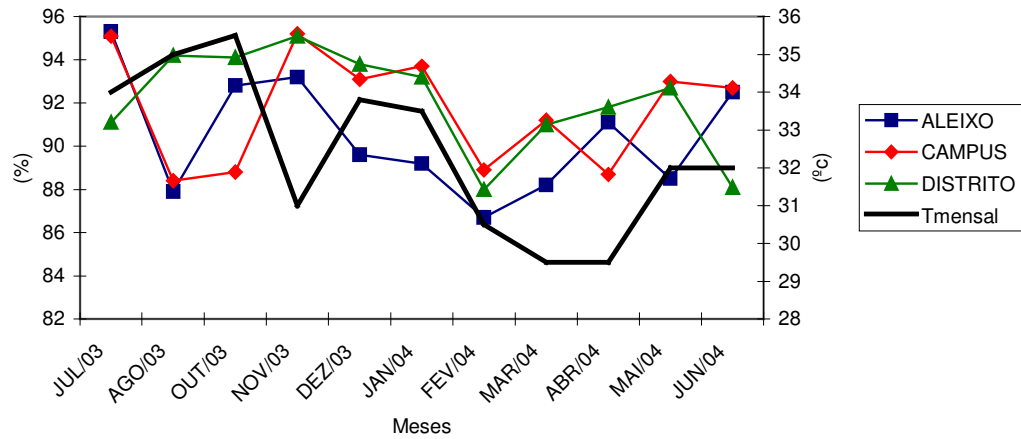


**Figura 4.7 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna HP-5 e correlação com fator temperatura média mensal e temperatura máxima diária.**

Teor do dilapiol no óleo de P. aduncum (INNOWAX)



Teor de dilapiol X Tmensal (INNOWAX)



Teor de dilapiol X Tmáx diária (INNOWAX)

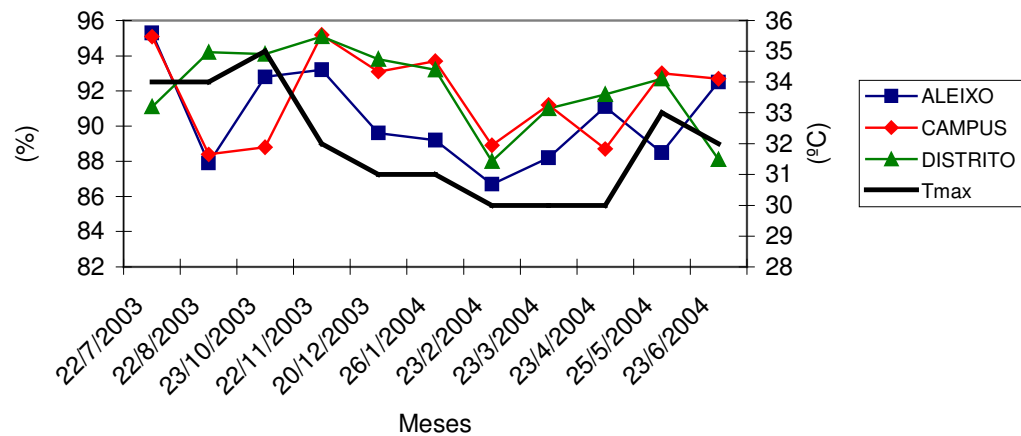
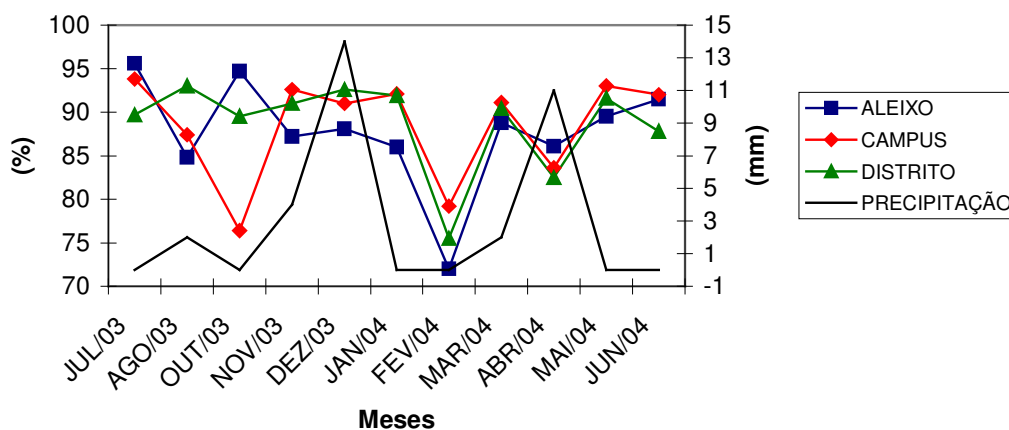


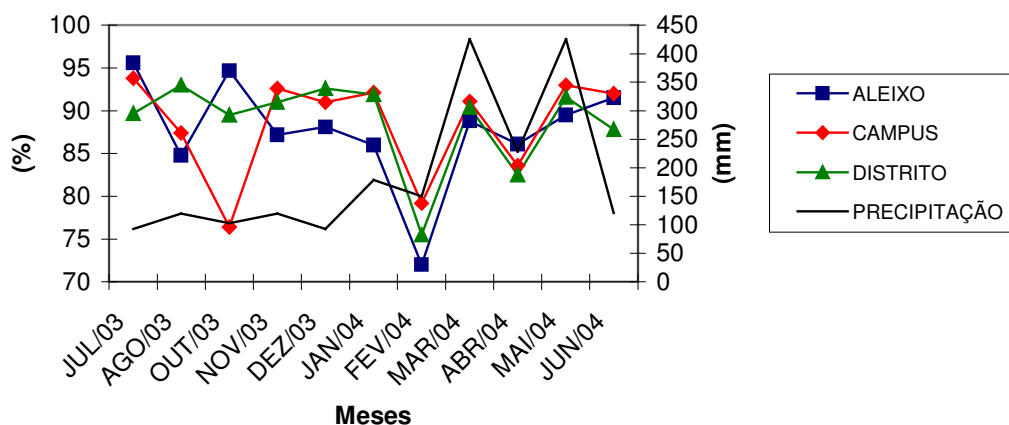
Figura 4.8 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna INNOWAX e correlação com fator temperatura média mensal e temperatura máxima diária.



**Teor de dilapiol X Precipitação diária (HP-5)**

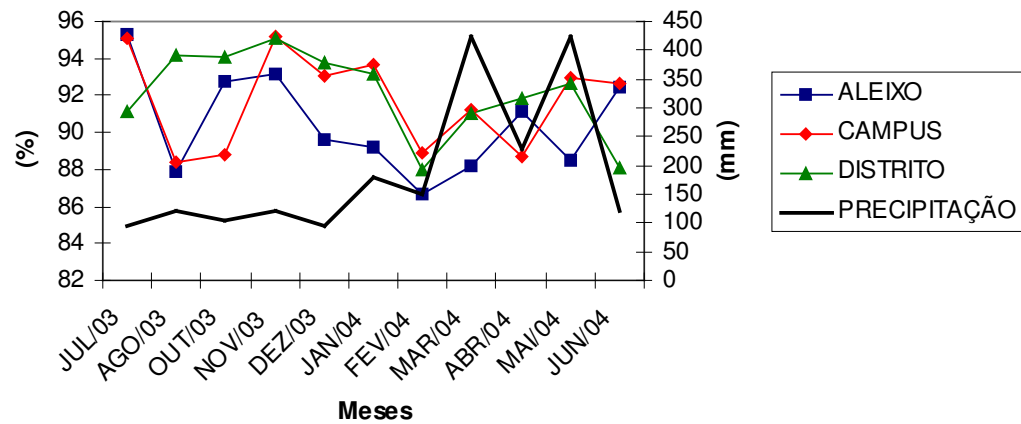


**Teor de dilapiol X Precipitação mensal (HP-5)**

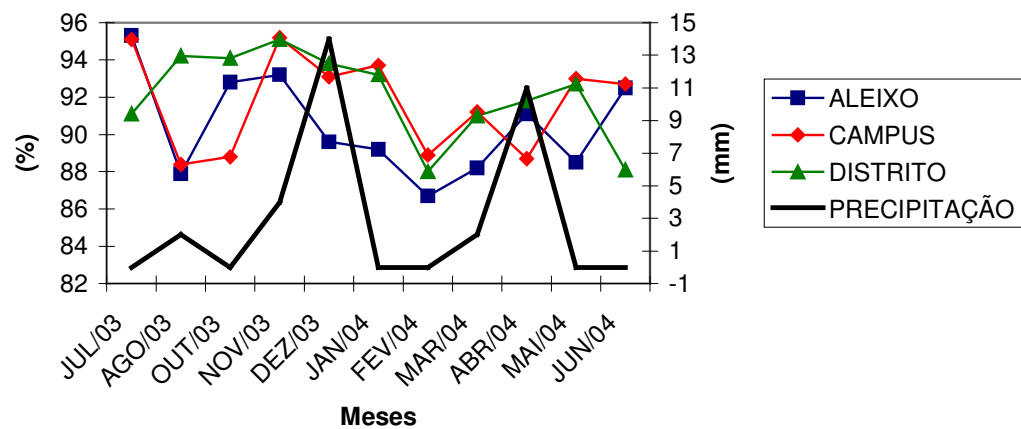


**Figura 4.9 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna HP-5 e correlação com o fator precipitação mensal e diária.**

### Teor de dilapiol X Precipitação mensal (INNOWAX)



### Teor de dilapiol X Precipitação diária (INNOWAX)



**Figura 4.10 – Gráficos do teor de dilapiol na coluna INNOWAX e correlação com o fator precipitação mensal e diária.**

Com a observação dos gráficos obtidos para o teor de dilapiol para cada indivíduo coletado e correlacionando com os fatores temperatura e precipitação observou-se que o teor de dilapiol não está correlacionado com esses fatores. Provavelmente esses fatores obtidos (temperatura, stress hídrico) não influenciam na biossíntese do dilapiol.

## II – CONCLUSÃO GERAL

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade do planeta e estudos etnobotânicos comprovam que a sua população faz uso de plantas medicinais há séculos. Conseqüentemente existe um enorme potencial, quanto à exploração da sua rica flora medicinal no desenvolvimento da indústria fitoterápica nacional.

Contudo um dos maiores entraves existentes é a insuficiência de informações que correlacionem para uma dada espécie vegetal, a atividade biológica preconizada e a sua constituição química; de forma a permitir garantir a eficácia e segurança de um produto fitoterápico.

Neste trabalho, procurou-se estabelecer parâmetros e métodos de controle de qualidade para o produto antimicótico Dermodilapiol, produzido a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *Piper aduncum*.

O estudo foi iniciado com o fracionamento e isolamento de constituintes químicos associados com a atividade antimicrobiana, de onde pôde-se obter uma única fração ativa (fração clorofórmica). A partir dessa fração ativa, realizou-se o isolamento de

cinco constituintes químicos, dois fenilpropanóides (dilapiol e miristicina), um derivado de ácido benzóico prenilado, uma flavanona (sacuranetina) e uma chalcona (diidroflavocavina B).

A partir do isolamento desses constituintes, procurou-se verificar o seu emprego como marcadores químicos em estudos de controle de qualidade de matéria-prima e produto final. Para essa finalidade, foram definidos parâmetros simples de controle de qualidade (concentração, densidade e % fração ativa) e mais complexos como a definição de perfis cromatográficos da fração ativa, por cromatografia líquida de alta eficiência.

Pôde-se verificar que os perfis cromatográficos das diferentes frações ativas analisadas, obtidas de diferentes lotes do produto, eram muito semelhantes entre si. Por outro lado, pôde-se também associar a perda da atividade antimicrobiana de um dos lotes analisados, com a mudança do perfil cromatográfico verificado.

Realizou-se então estudos de quantificação de dois constituintes químicos isolados, o dilapiol e o derivado do ácido benzóico prenilado, também por cromatografia líquida de alta eficiência. Apesar dos estudos publicados na literatura indicarem que a atividade do produto não esteja correlacionada com a presença de um único princípio ativo, mas sim de um conjunto; pôde-se observar nos estudos de quantificação, uma correlação entre a atividade observada e a concentração do derivado do ácido benzóico prenilado no produto final.

Portanto dentre os constituintes químicos isolados e analisados, podemos considerar o derivado do ácido benzóico prenilado como um bom marcador químico para caracterização da matéria-prima e do produto final, pois além da correlação observada, possui atividade biológica comprovada na literatura e é um dos componentes majoritários da fração ativa.

Por sua vez, o fenilpropanóide dilapiol, mostrou-se apenas um bom marcador químico para o controle da matéria-prima, pois possui pouca atividade biológica e mostrou pouca correlação entre a concentração e a atividade observada no produto. Contudo por se tratar de uma substância pouco comum em espécies do gênero *Piper*, quase que exclusivamente produzida por *Piper aduncum*; pode auxiliar na distinção rápida e segura da matéria-prima, especialmente na etapa da coleta (distinção botânica) e processamento do material vegetal.

A chalcona diidroflavocavina B e a flavanona sacuranetina podem também ser considerados bons marcadores químicos, pois existem relatos na literatura descrevendo a sua atividade antimicrobiana. Contudo um estudo mais aprofundado para estabelecer a concentração presente e a atividade observada ainda se faz necessário.

As análises dos óleos essenciais obtidos de três indivíduos de *Piper aduncum* coletados em três diferentes localidades indicaram uma constância nos perfis obtidos, porém uma significativa variação na quantidade produzida do marcador dilapiol. Aparentemente a quantidade está relacionada com o período de chuvas da região. Esse fato indica que pode estar ocorrendo uma variabilidade química e

conseqüentemente variação na eficácia do produto. Esses resultados estão de acordo com a premissa geral que o cultivo da espécie medicinal é fundamental no desenvolvimento de produtos fitoterápicos com eficácia e segurança garantida.

### III - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, P.K.; BANSAL, M.C. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier Press: New York, p.104 e p. 402, 1989.

ADAMS, R. P. **Identification of Essencial oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publ Corp., Carol Stream, Il, 469 p., 1995.

AKERELE, O. Medicinal Plants And Primary Healthy Care: An Agenda For Action. **Fitoterapia**, v. LIX, p. 355-363, 1988.

ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras**. São Paulo:Hermes, p. 341, 1993.

ALVAREZ, A.; LARIONOVA, M. Valoración de la actividad antiulcerosa de varias plantas medicinales. **Revista Cubana de Farmácia**, vol.28, p.138-141, 1994.

ANTO, R. J.; SUKUMARAN, K.; KUTTAN, G.; RAO, M. N.; SUBBARAJU, V. and KUTTAN, R. Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds. **Cancer Letters**, vol. 97; p. 33-37, 1995.

BACHI, E. M. **Controle de qualidade de fitoterápico**. In: DI STASI, L. C. (org.). **Plantas Medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, p. 16-197, 1996.

BAKER, J.T. et al. Natural Product Drug Discovery and Development: new perspectives on international collaboration. **Journal of Natural Products**, vol. 58, p. 1325-1357, 1995.

BALDOQUI, D.C.; KATO, M.J.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M. A. chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, vol. 51, p.899-902, 1999.

BARREIRO, E.J. **Desenho de Fármacos a Partir de Produtos Naturais**. In: YUNES, A.R. e CALIXTO, J.B.(orgs.). Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, p. 237-297, 2001.

BASTOS, C.N. Potencial do óleo essencial de *Piper aduncum* para o controle de *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.441-443, 1997.

BAUER, A. W.; KIRBY, W.M.M.; SERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Technical Bulletin of the Registry of Medical Technologists**, vol. 36. p.49-52, 1966.

BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? **Drug Information Journal**, vol. 32. p.101, 1998.

BENEVIDES, P.J.C.; SARTORELLI, P. e KATO, M.J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**. v.52, p. 339-343, 1999.

BERNARD, C.B.; KRISHNAMURTY, H.G.; CHAUNET, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B.J.R.; SANCHEZ-VINDAS, P.; HASBUN, C.; POVEDA, L.; ROMAN, L.S. and ARNASON, J.T. – Insecticidal Defenses of *Piperaceae* from the neotropics. **Journal of Chemical Ecology**. vol.21, p.801-814, 1995.

BERNHARD, H. O. und THIELE, K. Isolierung von 1-Allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylendioxybenzol (= Dill-Apiol) aus *Heckeria umbellata* (L.) Kunth (Piperaceae). **Helvetica Chimica Acta**, vol. 6, p. 2274, 1978.



BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RDC N.º48, de 18 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, mar. 2004

BURKE, B. and NAIR, M. Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican *Piper* species. **Phytochemistry**, vol. 25, p. 1427-1430, 1986.

CÁCERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B.E.; JAUREGUI, E.; PERALTA, E. and CARRILLO, G. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 48, p.85-88, 1995.

CALIXTO, J.B. **Medicamentos Fitoterápicos**. In: YUNES, A.R. e CALIXTO, J.B.(org). Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, p. 297-317, 2001.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como Fonte de Medicamentos. **Ciência e Cultura**, vol. 55, p. 37-39, 2003.

CECHINEL FILHO, V. e YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade. **Química Nova**, vol. 21, p. 99-105, 1998.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y. and LANÇAS, F.M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng. (“guaco”) Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 12, p.706-709, 2001.

CHOI, D.W.; KIM, J.H.; CHO, S.Y.; KIM, D.H. and CHANG, S.Y. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, vol. 181-182, p. 581-586, 2002.

CICCIÓ, J. F. & BALLESTERO, C. M. Constituyentes volátiles de las hojas y espigas de *Piper aduncum* (Piperaceae) de Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, vol. 45, p. 783-790, 1997.

CRAVEIRO, A.A. **Óleos de Plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, p.210, 1981.

DANELUTTE, A.P.; LAGO, J.H.G.; YOUNG, M.C.M. e KATO, M.J. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth, **Phytochemistry**, vol. 64, p.555-559, 2003.

DAVIES, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, vol. 503, p. 1-24, 1990.

DEWINDT, B., VAN EEMEREN, K. and ANDRIES, K. Antiviral capsid-binding compounds can inhibit the adsorption of minor receptor rhinoviruses. **Antiviral Research**, vol. 25, p. 67-72, 1994.

DIAS, P.P.; MALDONADO, E. e OSPINA, E. Aceite esencial de *Piper aduncum* L. **Revista Latinoamericana de Química**, vol. 15, p.136-138, 1984.

FAGAN, C.; RAMIREZ, A.C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. & STANGARLIN, J.R. **Efeito do Extrato Bruto de *Laurus nobilis* e *Zingiber officinale* no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos**, [s.d.]. Disponível em:<<http://www.cca.uem.br/anu7000.htm>> Acessado em: 29/01/2005

FARIAS, M.R. **Avaliação de Qualidade de matérias-primas vegetais**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 197-220, 2002.

FARNSWORTH, N.R. et al. Medicinal Plants in Therapy. In: **Bulletin of the World Health Organization**, [s.l.], p. 965-981, 1985.

FARNSWORTH, N.R. **The Role of Ethnopharmacology in Drug Development.** In: D.J. Chardwick and J. Marsh (ed.), *Bioactive Compounds from Plants*. John Wiley & Sons Ltda., Chichester, p. 2-21, 1990.

FERNADEZ, M.; NIETO, A.. **Plantas Medicinales.** Pamplona: Navarra, 1982.

FERREIRA, S.H. (org). **Medicamentos a partir de Plantas Mediciniais no Brasil.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciência, 132 p., 1998.

FUJIMURA, H.; SAWADAT,T. e YAMAHARA, J. **Chemical Abstracts**, 107, 1987, 191022u.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **The Pharmacological Basis Of Therapeutics.** 9.ed. Nova York: McGraw-Hill, 1905 p., 1996.

GOTTLIEB, O.R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M.T.; MAIA, J.G.S.; MENDES, P.H.; ROCHA, A.I.; SILVA, M.L. and WILBERG, V.C. **Acta Amazônica**, vol.11, p. 143-148, 1981.

GUPTA, M.P.; ARIAS, T.D. & SMITH, R.M. The composition of the essential oil of *Piper aduncum* L. from Panamá. **Revista Latinoamericana de Química**, vol. 14, p. 36-37, 1983.

GYÉRESI, A.; KELEMEN, H.; KATA, M. Summary of the Chromatographic Methods Recommended by Pharmacopoeias for Analysis of Medicinal Plants and their Products. **Journal of Planar Chromatography**, vol. 10, p. 172-177, 1997.

HAMBURGER, M.;HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, vol. 30, p. 3864, 1991.

HANSEL, R.; STICHER, O.; STEINEGGER, E. **Pharmakognosie-Phytopharmazie**, Springer, Berlin, 1999. In: NYIREDY, S. Separation strategies of plant constituents – current status. *Journal of Chromatography B*, 812, p. 35-51, 2004

HONDA, G., KOEZUKA, Y. and TABATA, M. Isolation of Dillapiol from a Chemotype of *Perilla frutescens* as an active principle for prolonging Hexobarbital-Induced Sleep. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol.36, p. 3153-3155, 1988.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EDUFSCar, 152 p., 2003.

HUFFORD, C.D. and OGUNTIMAIN, B.O. Dihydrochalcones from *Uvaria angolensis*. **Phytochemistry**, vol. 19, p. 2036-2038, 1980.

IVBIJARO, M.F. and BOLAJI, O.O. Effects of cypermethrin + dimethoate and extracts of *Piper guineense* and *Azadirachta indica* on the pests and Yield of cowpea *Vigna unguiculata*. **Journal Agricultural Science**, vol. 115, p. 227-231, 1990.

ITOKAWA, H.; MORITA, M. and MIHASHI, S. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, vol. 20, p. 2503-2506, 1981.

KESLEY, R. G.; REYNOLDS, G. W. e RODRIGUEZ, E. **The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes**, 1984. In: RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P.L. Biology and chemistry of plant trichomes. New York: Plenum, 1984.

KHARAZMI, A.; CHEN, M.; THEANDER, T. G. and CHRISTENSEN, S. B. Discovery of oxygenated chalcones as novel antimalarial agents. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 91; p. S91-S95; 1997.

KINGHORN, A.D.; SEO, E.K. **Plants as sources of drugs**. In: ACS Symposium Series 647, Agricultural Materials as Renewable Resources: nonfood and industrial applications. Washington: American Chemical Society, p. 179-193, 1996.

LAGO, J.H.G.; RAMOS, C.S.; CASANOVA, D.C.C.; MORANDIM, A.A.; BERGAMO, D.C.B.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E.F.; YOUNG, M.C.M. e KATO, M.J. Benzoic Acid Derivatives from *Piper Species* and Their Fungitoxic Activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **Journal of Natural Products**, Vol. 67, p. 1783-1788, 2004.

LAINETTI, R. & BRITO, N.R.S. **A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro**. Ed. Tecnoprint Ltda, Rio de Janeiro, p. 163, 1980.

LAPA, A.J. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 181-196, 2001.

LENTZ, D.L.; CLARCK, A.M.; HUFFORD, C.D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C.M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A.L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 63, p.253-263, 1998.

LIANG, Y; XIE, P. and CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of the Chromatography B**, vol. 812, p.53-70, 2004.

LORENZI, H & MATOS, J. A. **Plantas Medicinais: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 512p. ,2002.

MAIA, J. G. S.; ZOHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.;SILVA, M.H.L; LUZ, A.I.R. e BASTOS, C.N. - Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, vol.13, p. 269-272, 1998.

MAIA, J. G. **Plantas aromáticas da Amazônia: propriedades inseticida, fungicida e usos na mediação do controle biológico**, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/pdf/livro137.pdf>> Acesso em: 13/12/2004.

MARASCHIN, M. e VERPOORTE, R. **Aplicações da cromatografia líquida e espectrometria de massas na análise de metabólitos secundários vegetais e em biomedicina** In: CALIXTO, J.B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, A.R. e CALIXTO, J.B.(org). **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 147-193, 2001.

MASUDA, T; INAZUMI, A.; YAMADA, Y.; PADOLINA, W.G.; KIKUZAKI, H. and NAKATANI, N. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. **Phytochemistry**, vol. 30, p. 3227-3228, 1991.

McCHESNEY, James. **Biological And Chemical Diversity And Search For New Pharmaceuticals And Other Bioactive Natural Products**. In: ACS Symposium Series 534, Human Medicinal Agents from Plants. Washington, . p. 38-47, 1993.

MILLIKEN, W. **Plants for malaria. Plants for fever: Medicinal species in Latin America - a bibliographic survey**. The Royal Botanic Gardens, Kew: The European Union, p. 83-86, 1997.

MORALES, G.; SIERRA, P.; MANCILLA, A.; PAREDES, A.; GALLARDO, O. and BORQUEZ, J. Secondary metabolites from four medicinal plants from Northern Chile: Antimicrobial activity and biotoxicity against *Artemia salina*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, vol 48, p.13-18 ,2003.

MOREIRA, D.L.; GUIMARÃES, E.F.; KAPLAN, M.A.C. A chromene from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.48, p. 1075-1077, 1998.

MORS, W. B.; RIZZINI, C.T. e PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Reference Publications, Agonac, p. 272-273, 2000.

MORTON, J.F. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**. Charles C. Thomas, Springfield, p.1420, 1981.

NAIR, M.G. e BURKE, B.A. Antimicrobial *Piper* Metabolite And Related Compounds. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, v. 38, p. 1093-1096, 1990.

OESTRED, Schweigger's Journal. v. 29, p.80. 1819. In: SENGUPTA, S. e RAY, A.B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**. vol. LVIII, p. 147-166, 1987.

OKUNADE, A.L.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M. and LENTZ, D. Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum* L. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 142-144, 1997.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T. and STICHER, O. Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum* L. **Phytochemistry**, v. 34, p. 813-818, 1993a.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D.; RALI, T. and STICHER, O. Five new prenylated *p*-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. **Planta Medica**, v. 59, p.546-551, 1993b.

ORJALA, J.; ERDELMEIER, C. A. J.; WRIGHT, A. D. and STICHER, O. New monoterpene substituted dihydrochalcones from *Piper aduncum* L. **Helvetica Chimica Acta**, v. 76, p.1481-1488, 1993c.

ORJALA, J.; WRIGHT, A. D.; BEHREND, H.; FOLKERS, G. and STICHER, O. Cytotoxic and Antibacterial Dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p.18-26, 1994.

ORLANDI, O.; VERVLOET, A. E. **Homeopatia ou Alopacia?** Rio de Janeiro, Marco, 1983.

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

PEREDA-MIRANDA, R.; BERNARD, C.B; DURST, T. e ARNASON, J.T. Methyl 4-hidroxy-3-(3'-methyl-2'-butenilbenzoato, major insecticidal principle from *Piper guanacastensis*. **Journal Natural Products**, vol. 60, p. 282-284, 1997.

PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V. L. From a Medicinal Plant to a Pharmaceutical Dosage Form. A (still) Logm Way for the Brazilian Medicinal Plants. **Ciência e Cultura**, vol. 29, p. 1015-1025, 1999.

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

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. V. I. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

RIBEIRO, A.; PILÓ-VELOSO, D.; ROMANHA, A. J. and ZANI, C. L. Trypanocidal Flavonoids from *Trixis vauthieri*. **Journal of Natural Products**, 1997. v. 60, p. 836-838.

ROBERTS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**, Williams & Williams, Baltimore, 338 p., 1996.

SANTOS, B.V.O.; DA-CUNHA, E.V.L; CHAVES, M. C. O. and GRAY, A. I. Phenylalkanoids from *Piper marginatum*. **Phytochemistry**, vol. 49, p. 1381-1384, 1997.

SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G. & PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 181-196.

SCHULTES, R.E. **De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentations CII. Notes on byodynamic Piperaceous plantis**. Rhodora, vol.77, p.165-170, 1975.

SCHULTES, R.E. and Raffauf, R.F. **Medicinal and toxic plants of Northwest Amazonia, in The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazon**. Ethno - & Economic Botany Series, vol.2, p.362-368, 1990.

SENGUPTA, S. e RAY, A.B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**. vol. LVIII, p. 147-166, 1987.

SILVA, E.M.J. e MACHADO,S.R.S. Structure and development of the secretory trichomes in leaves of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *Regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, vol. 22, p. 117-124; São Paulo, 1999.



SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. E PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 821 p., 2001.

SIMÕES, C. M. O. e SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 467-495, 2003.

SMITH, R.M. and KASSIM, H. The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji. **New Zealand Journal of Science**, vol. 22, p. 127-128. 1979.

STICHER, O. Quality of Ginkgo Preparations. **Planta Medica**. v. 59, p.2-11, 1993.

SU, H. C. F. and HORWAT, R. Isolation, identification and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. **Journal the Agriculture and Food Chemistry**, vol. 29, p. 115-118, 1981.

TORRES-SANTOS, E.C.; RODRIGUES, J.M.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; and ROSSI-BERGMANN, B. Improvement of *In Vitro* and *In Vivo* Antileishmanial Activities of 2', 6'- Dihydroxy-4'- Methoxychalcone by Entrapment in Poly (D,L-Lactide) Nanoparticles – **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 43, p.1776-1778, 1999a.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C.; MEIRELLES, M.N. and ROSSI-BERGMANN, B. Selective Effect of 2', 6'- Dihydroxy-4'- Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis* – **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.1234-1241, 1999b.

VAN DEN BERG, M.E. **Plantas medicinais na Amazônia – contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém, PR/MCT/CNPq, *Piperaceae*. p. 55-66, 1993.

YAKUSHIJIN, K.; TOHSHIMA, T.; SUZUKI, R.; MURATA, H.; LU, S.T. and FURUKAUA, H. Studies on the constituents of the plants *Illicium* species. II. Structure of phenolic components. **Chemical Pharmaceutical and Bulletin**, Vol. 31, nº 8, p. 2879-2883, 1983.

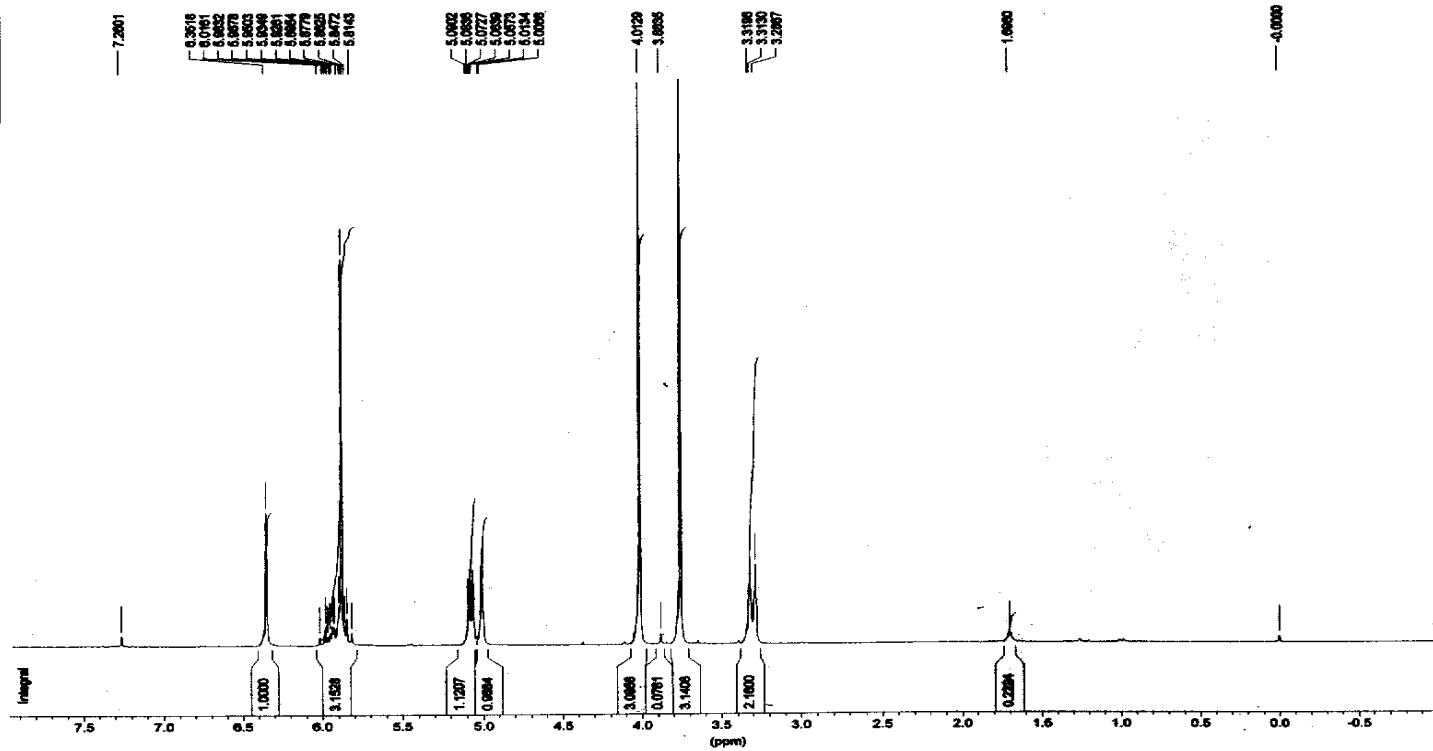
YUNES, R.A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitofármacos no Brasil, **Química Nova**, Vol. 24, 147-152, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory Situation of Herbal Medicines: A Worldwide review**. Geneve: 1993.

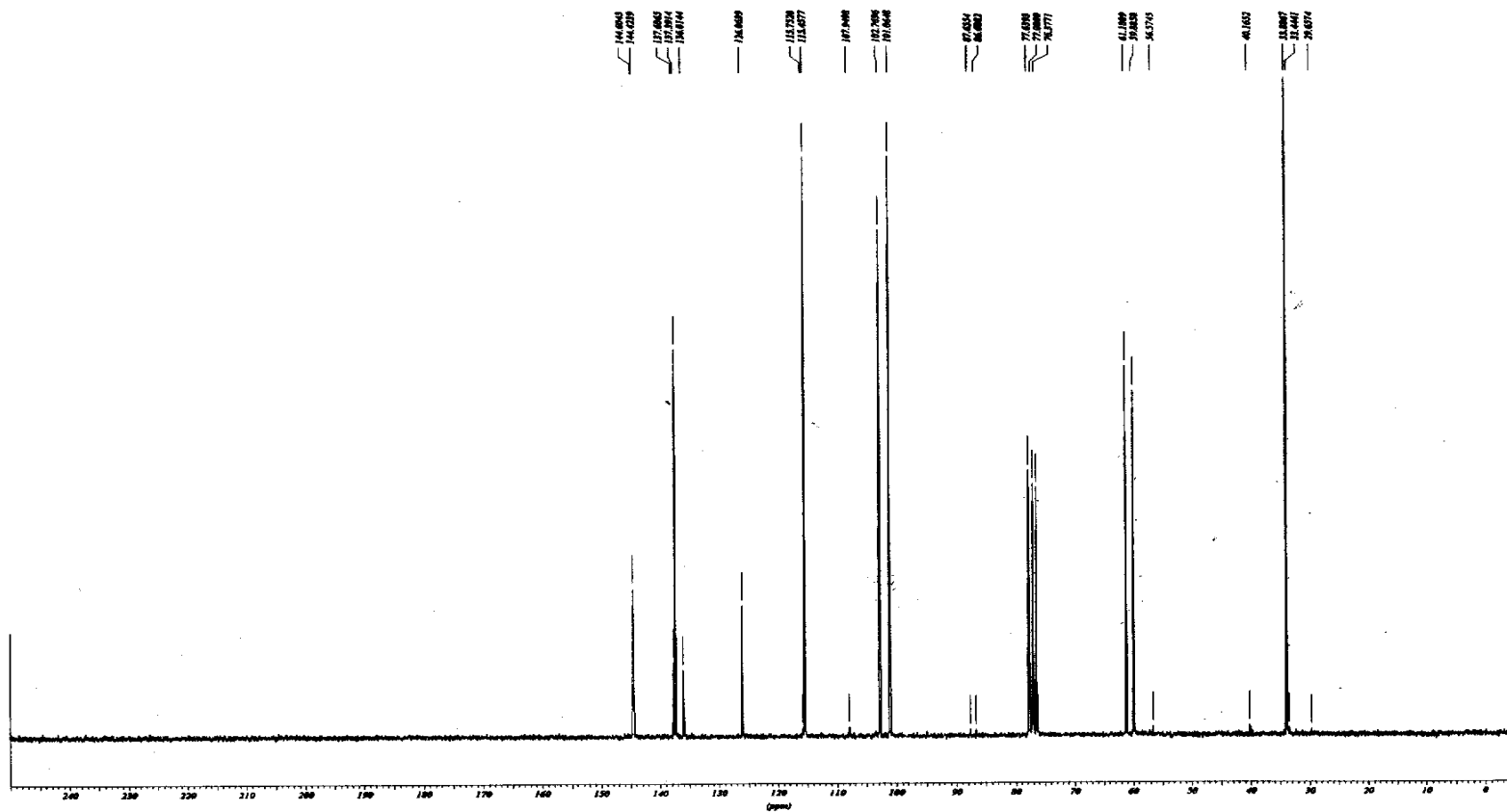
WU, Q.; WANG, S.; TU, G.; FENG, Y.; YANG, J. **Phytochemistry**. vol. 44, p.727-730, 1997.

ZDERO, C.; BOHLMANN, B. and ANDERBERG, A. Kaurane succinates and prenylated aromatics from *Odixia angusta* and *Ozothamnus obcordatus*. **Phytochemistry**, vol. 30, p. 2703-2706, 1991.

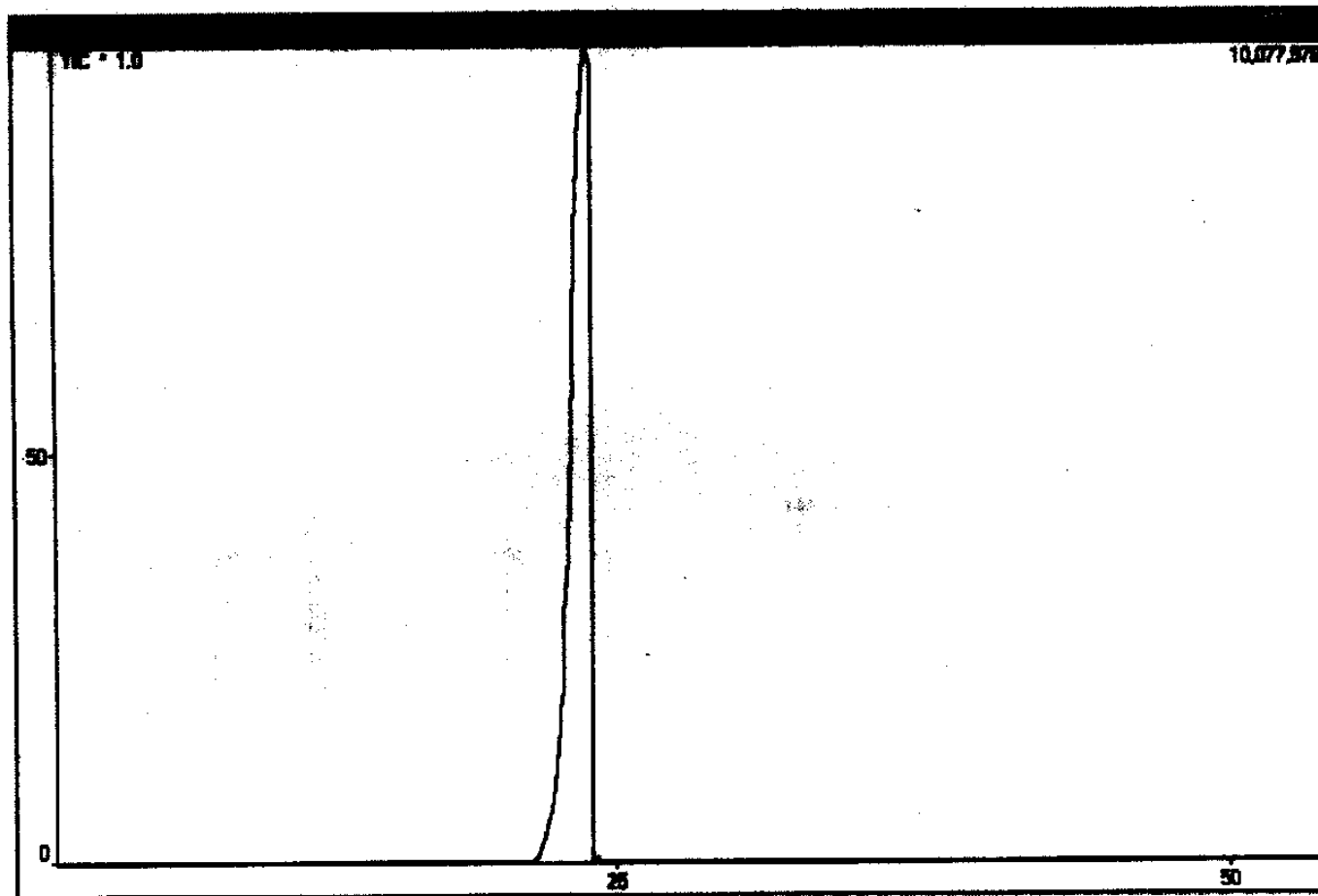
## **APÊNDICE – ESPECTROS DE RMN E CROMATOGRAMAS**



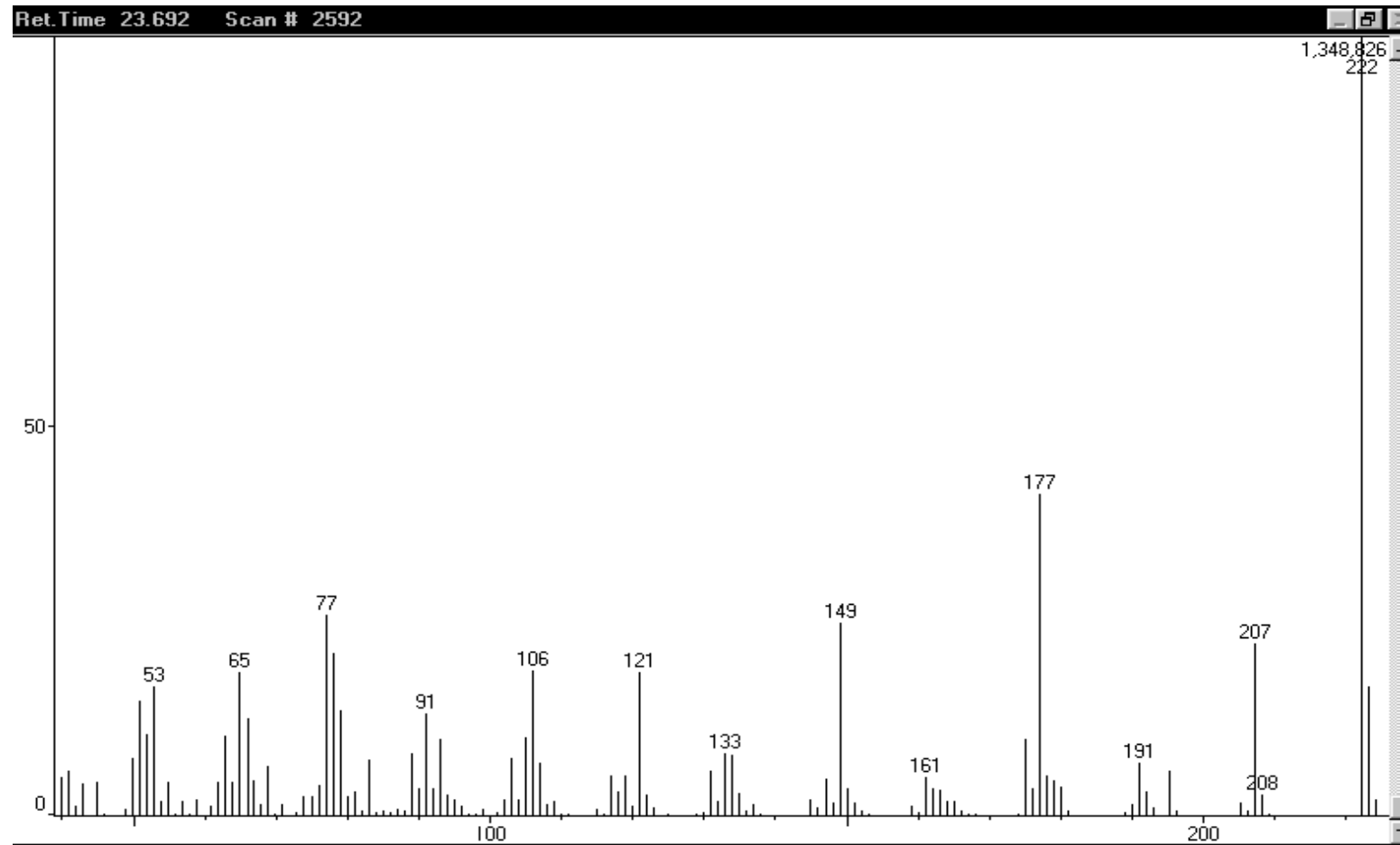
Apêndice 1 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do dilapiol



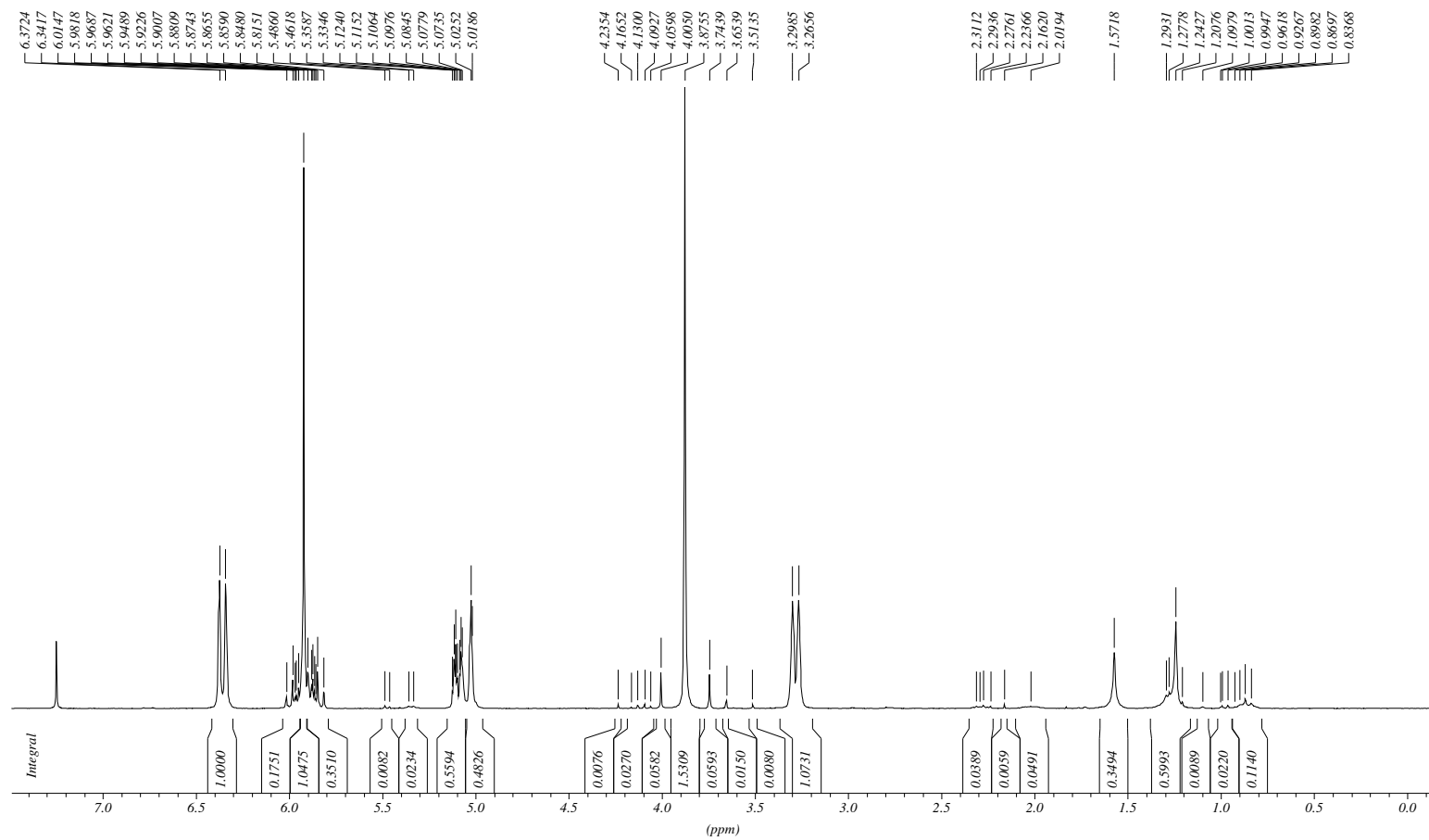
Apêndice 2 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C do dilapiol



Apêndice 3 – Cromatograma CG do dilapiol

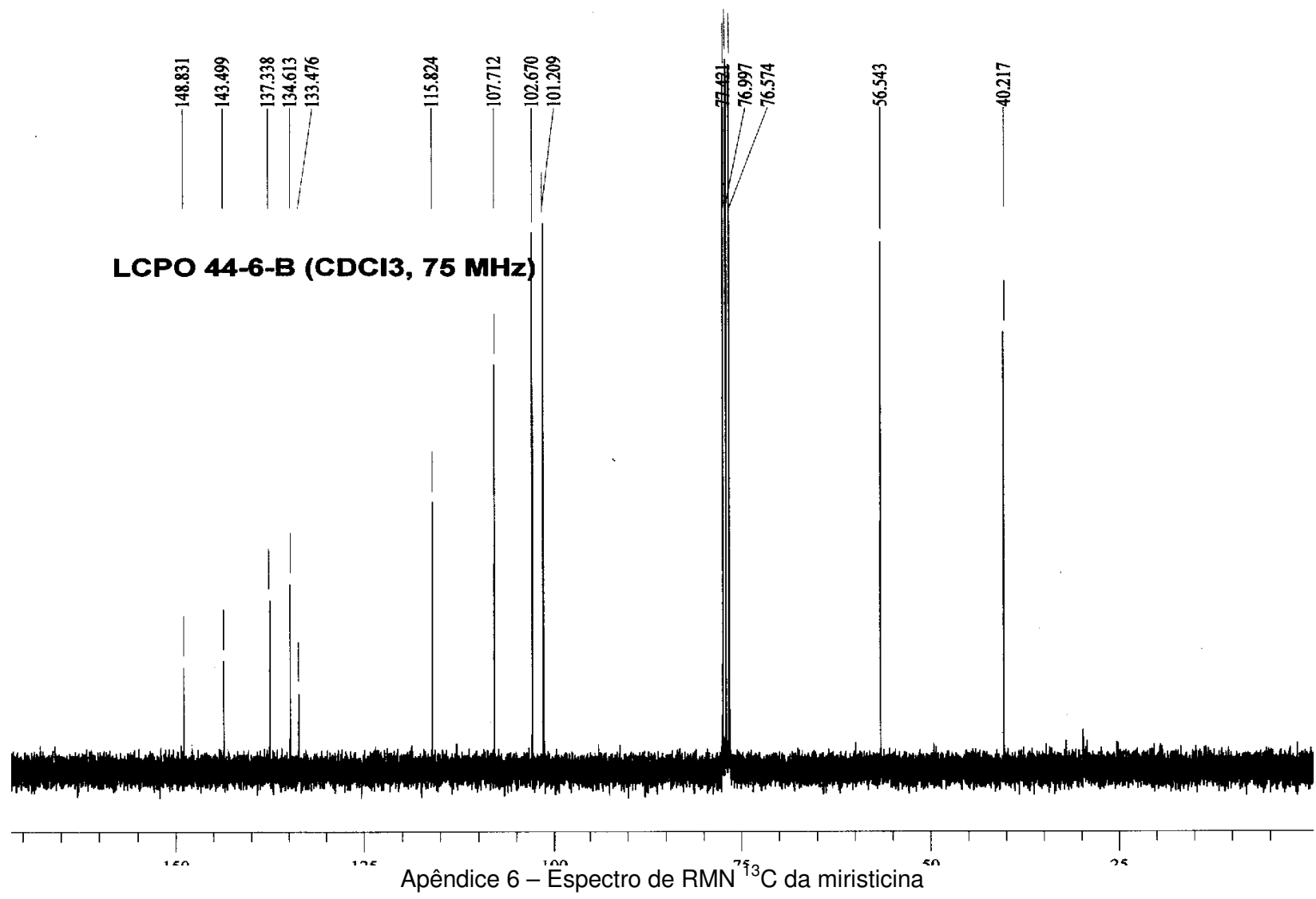


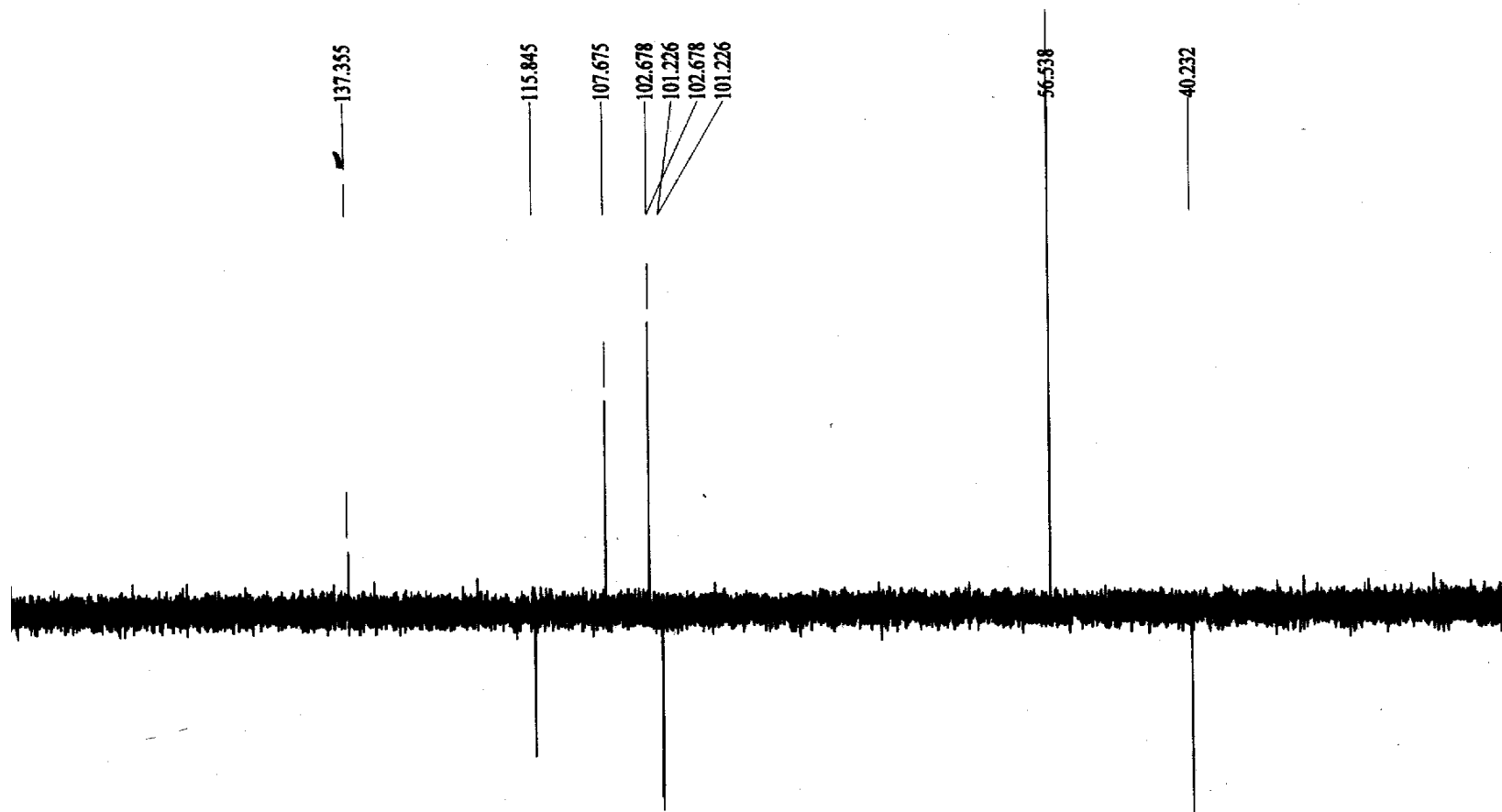
Apêndice 4 – Espectro de massas do dilapiol



Apêndice 5 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da miristicina

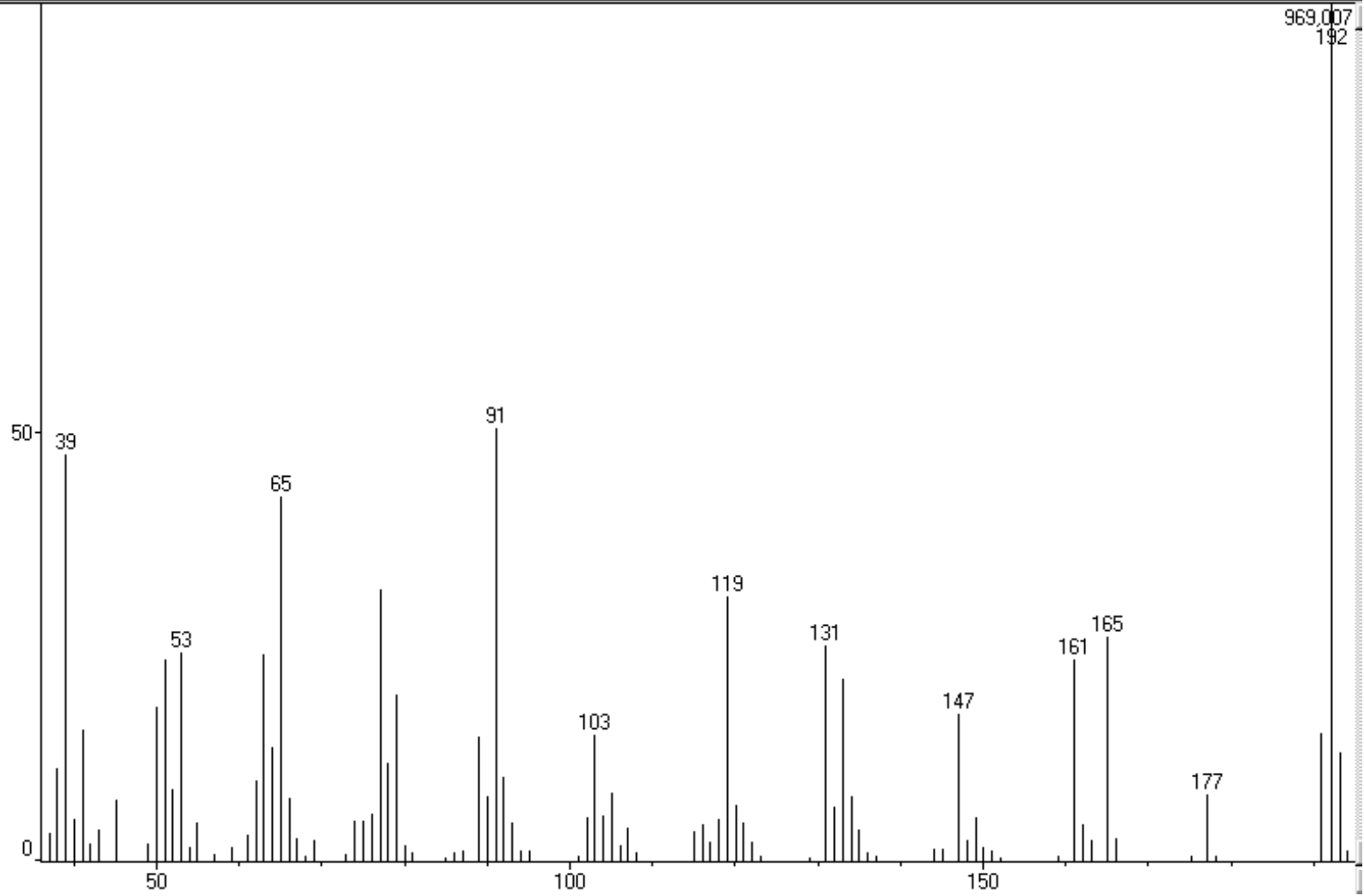




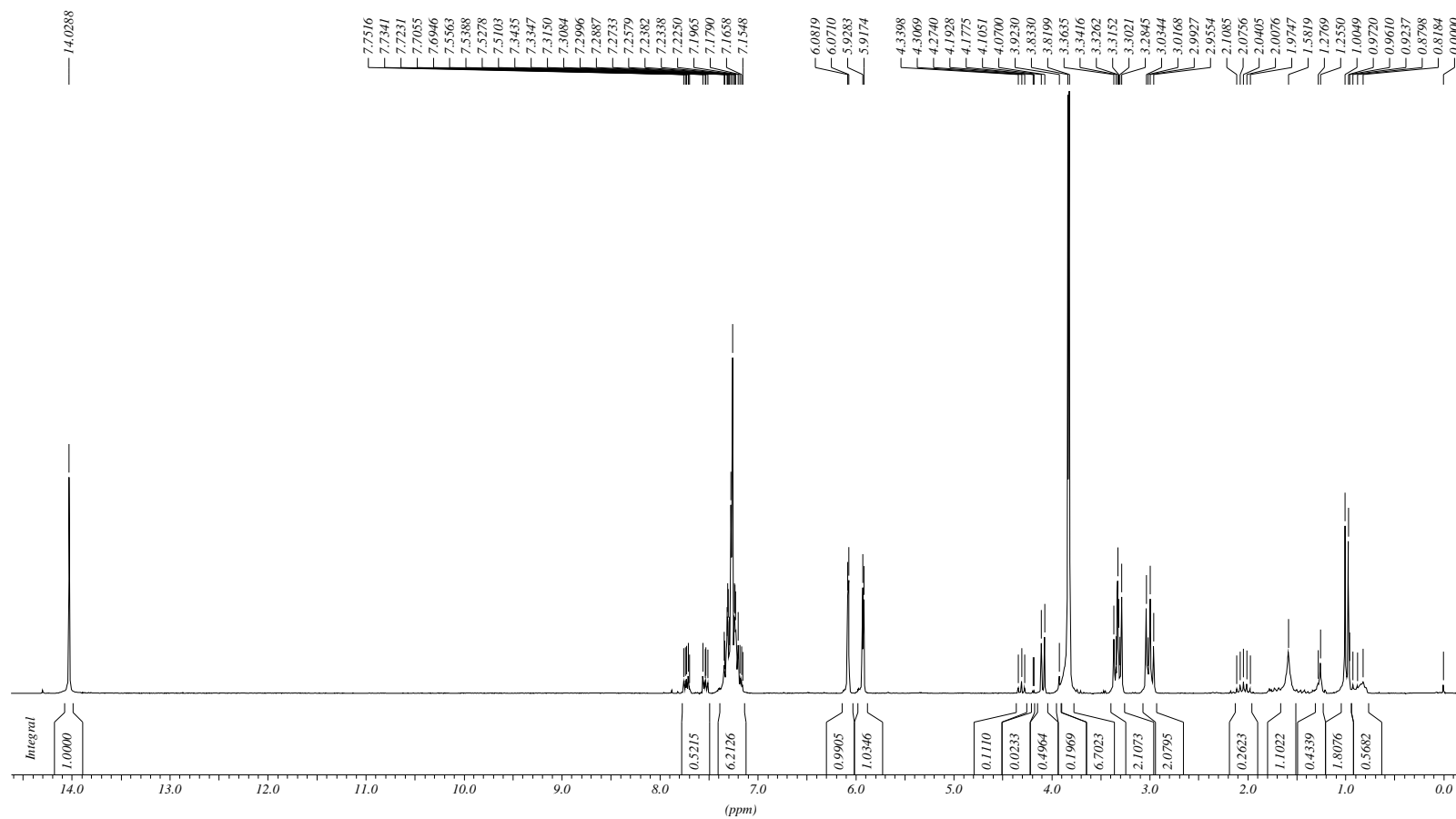


Apêndice 7 – Espectro de RMN DEPT 135 da miristicina

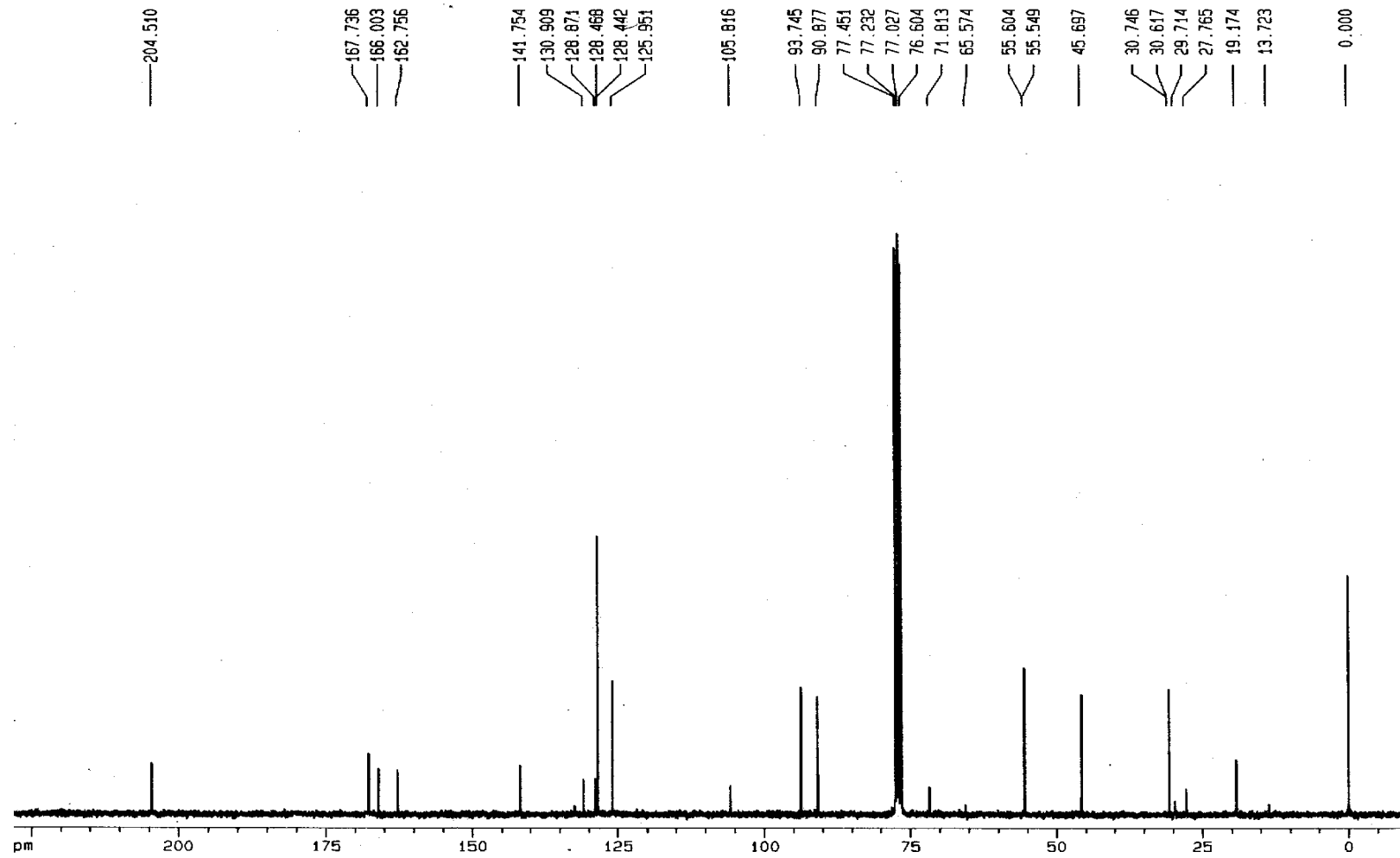
Ret. Time 9.333 Scan # 869



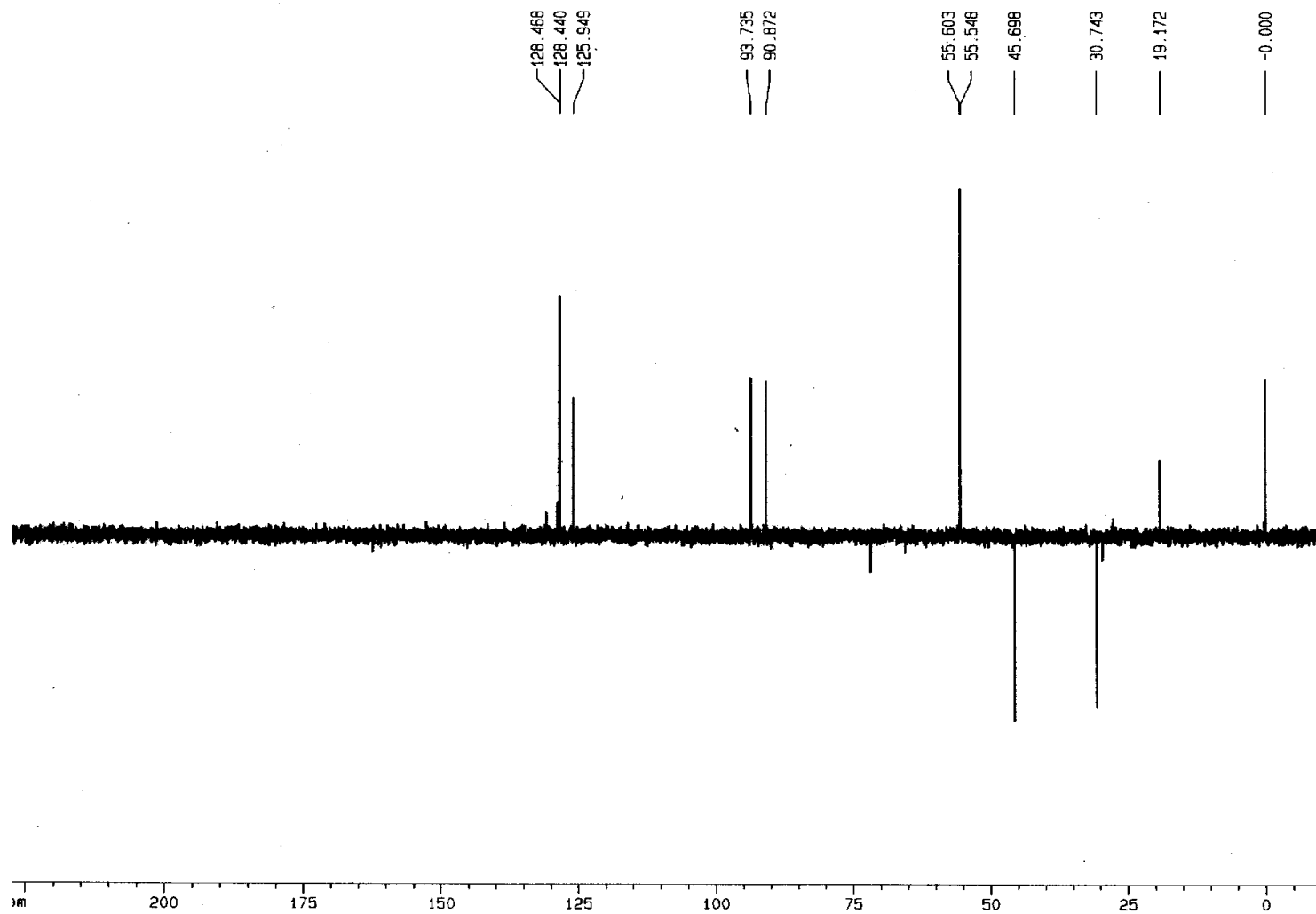
Apêndice 8 - Espectro de massas da miristicina



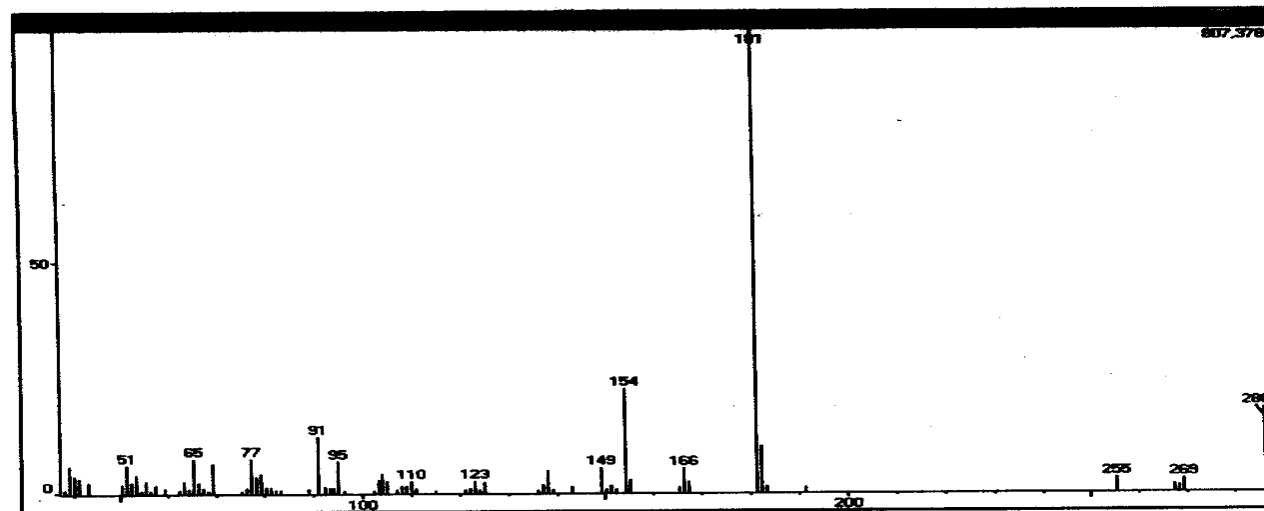
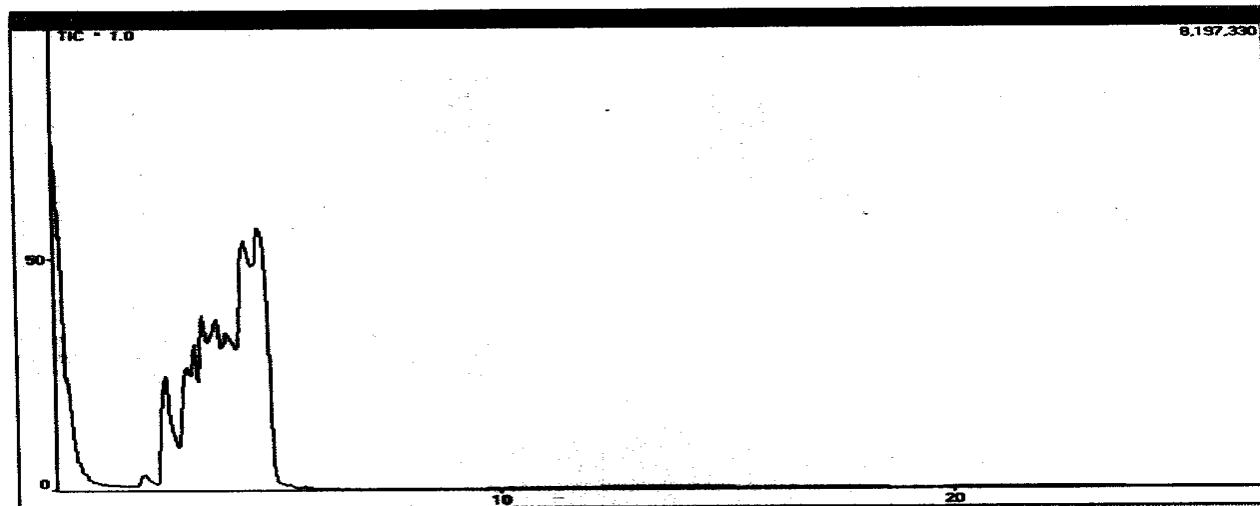
Apêndice 9 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da diidroflavocavina B



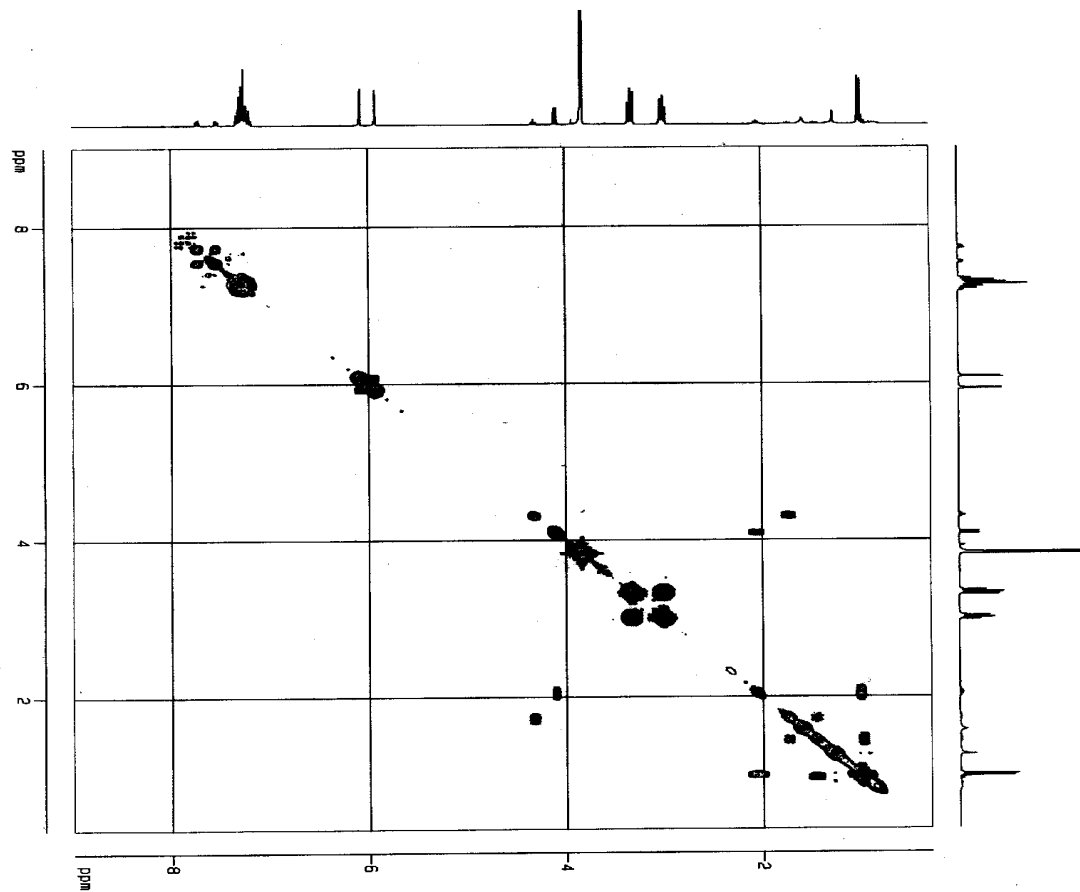
Apêndice 10 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C diidroflavocavina B



Apêndice 11 – Espectro de RMN DEPT 135 da diidroflavocavina B

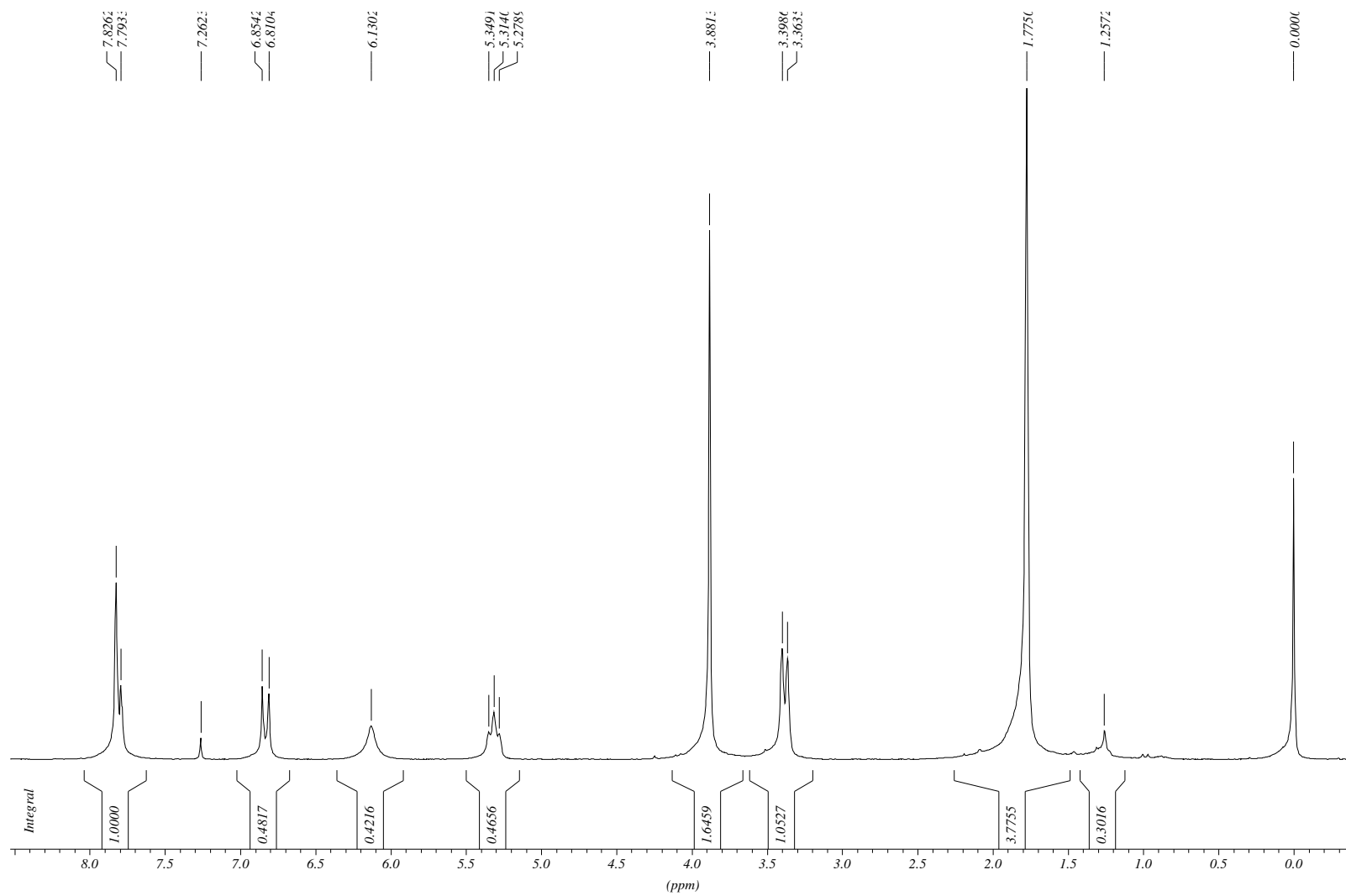


Apêndice 12 – Cromatograma CG e espectro de massas da diidroflavocavina B

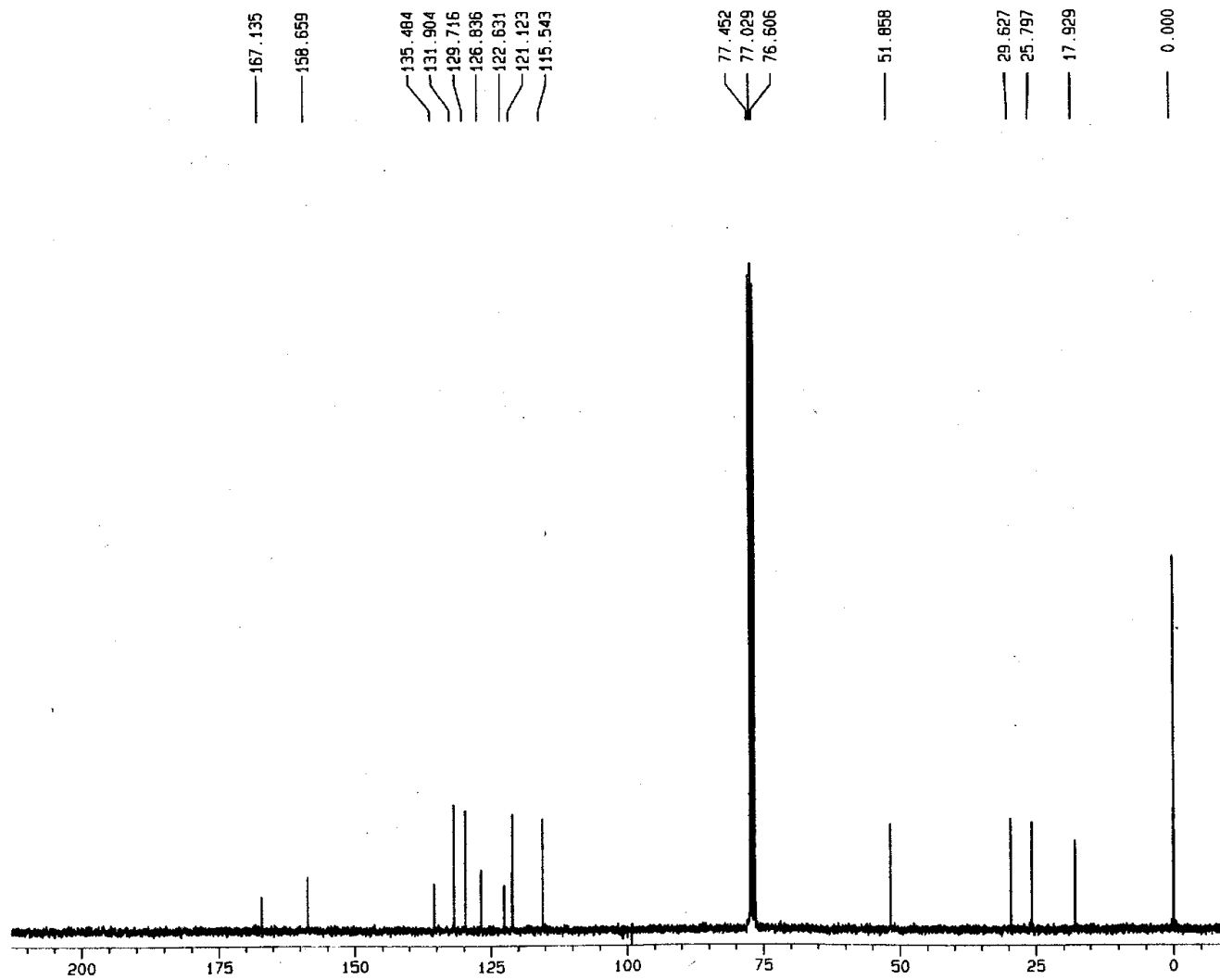


Apêndice 13 - Espectro de RMN COSY HH da diidroflavocavina B

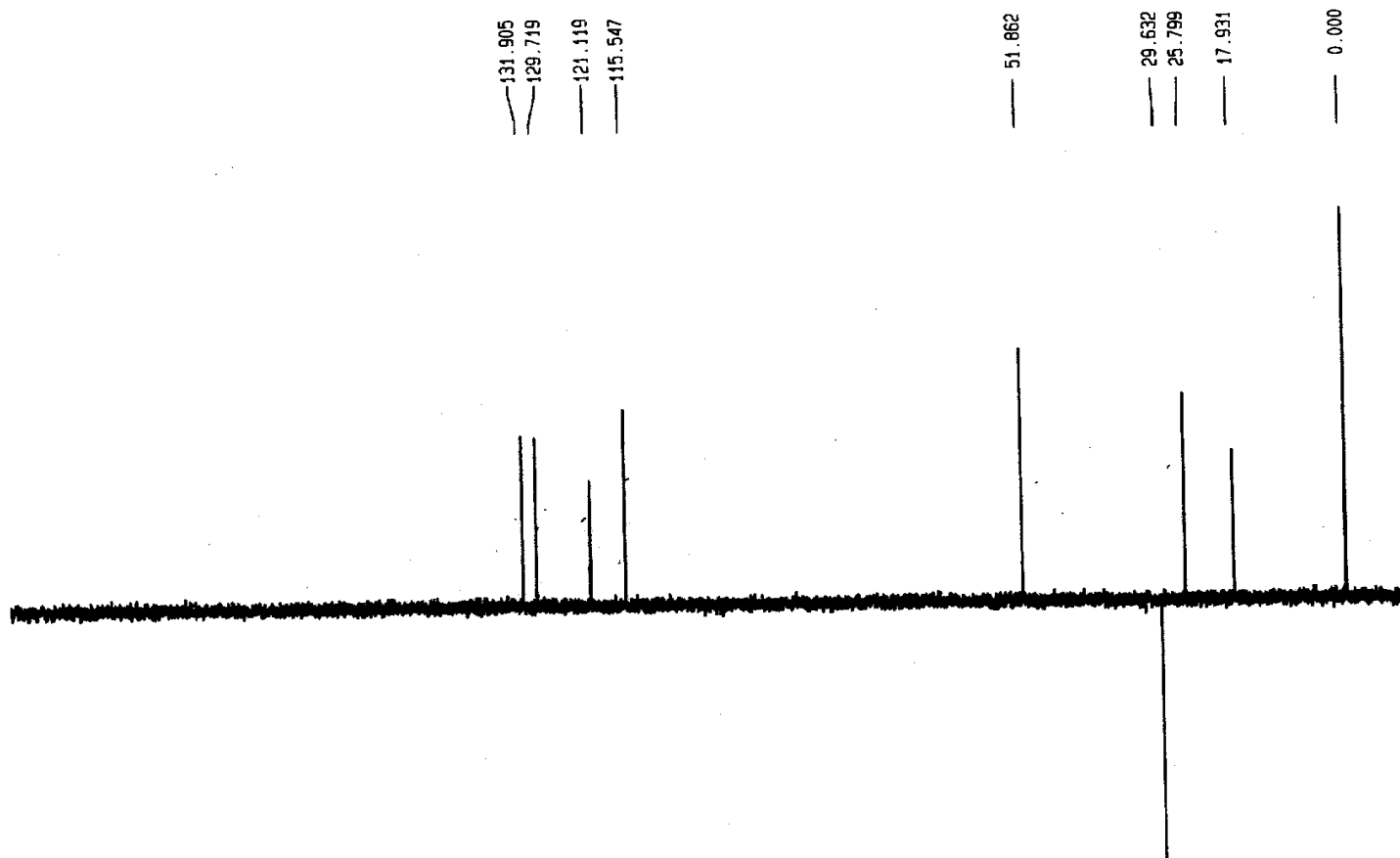




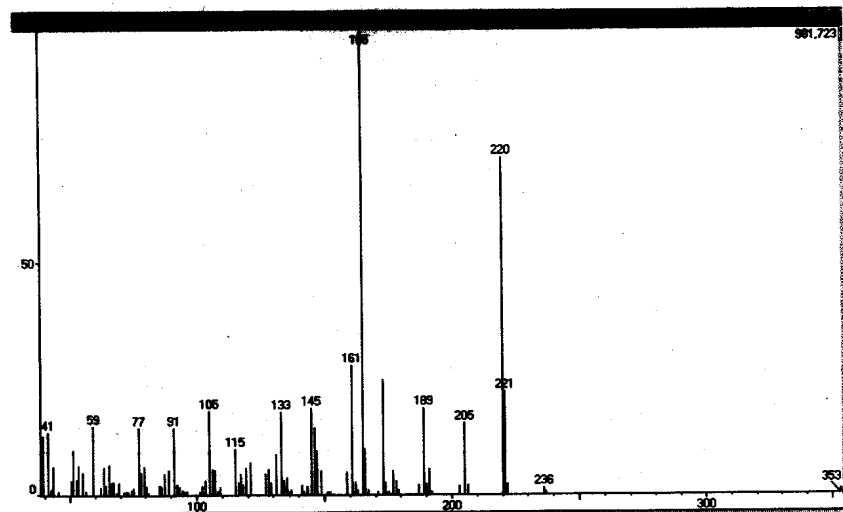
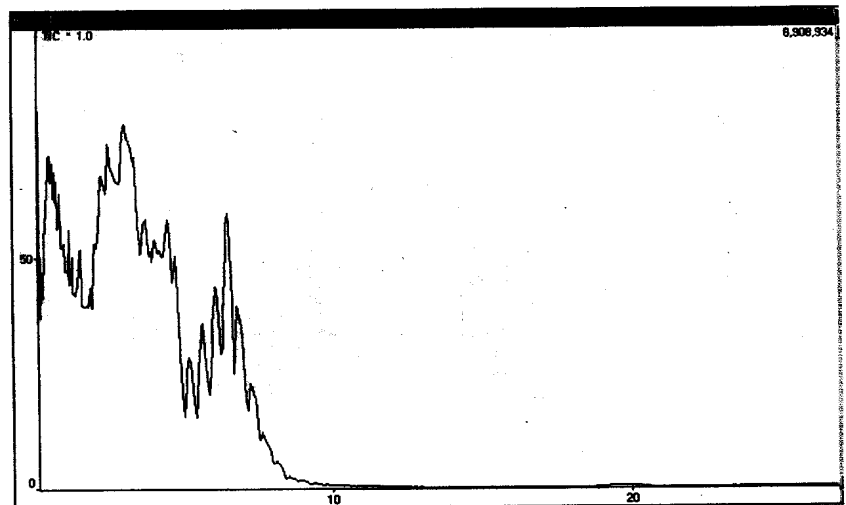
Apêndice 14 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H do 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila



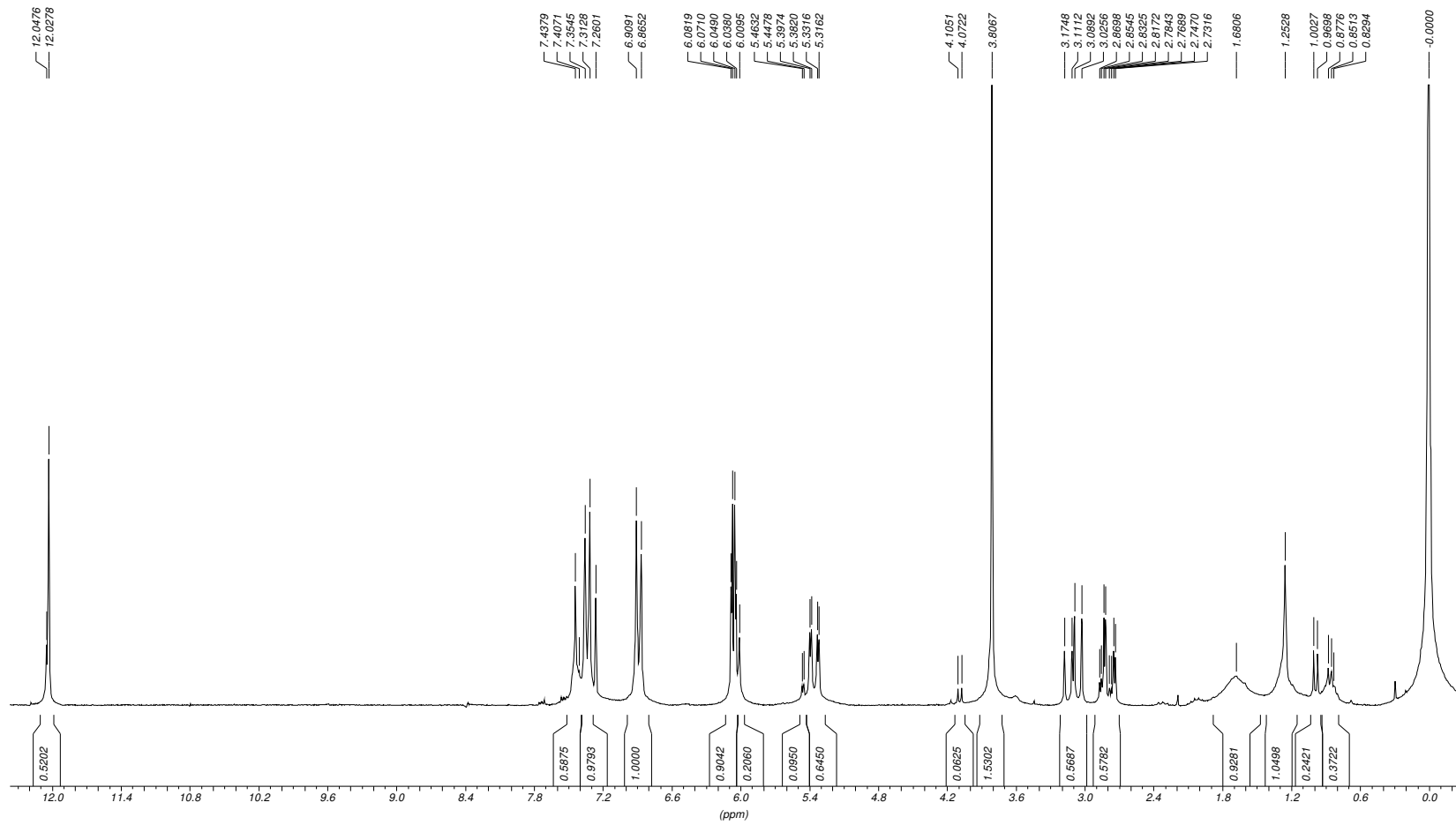
Apêndice 15 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila



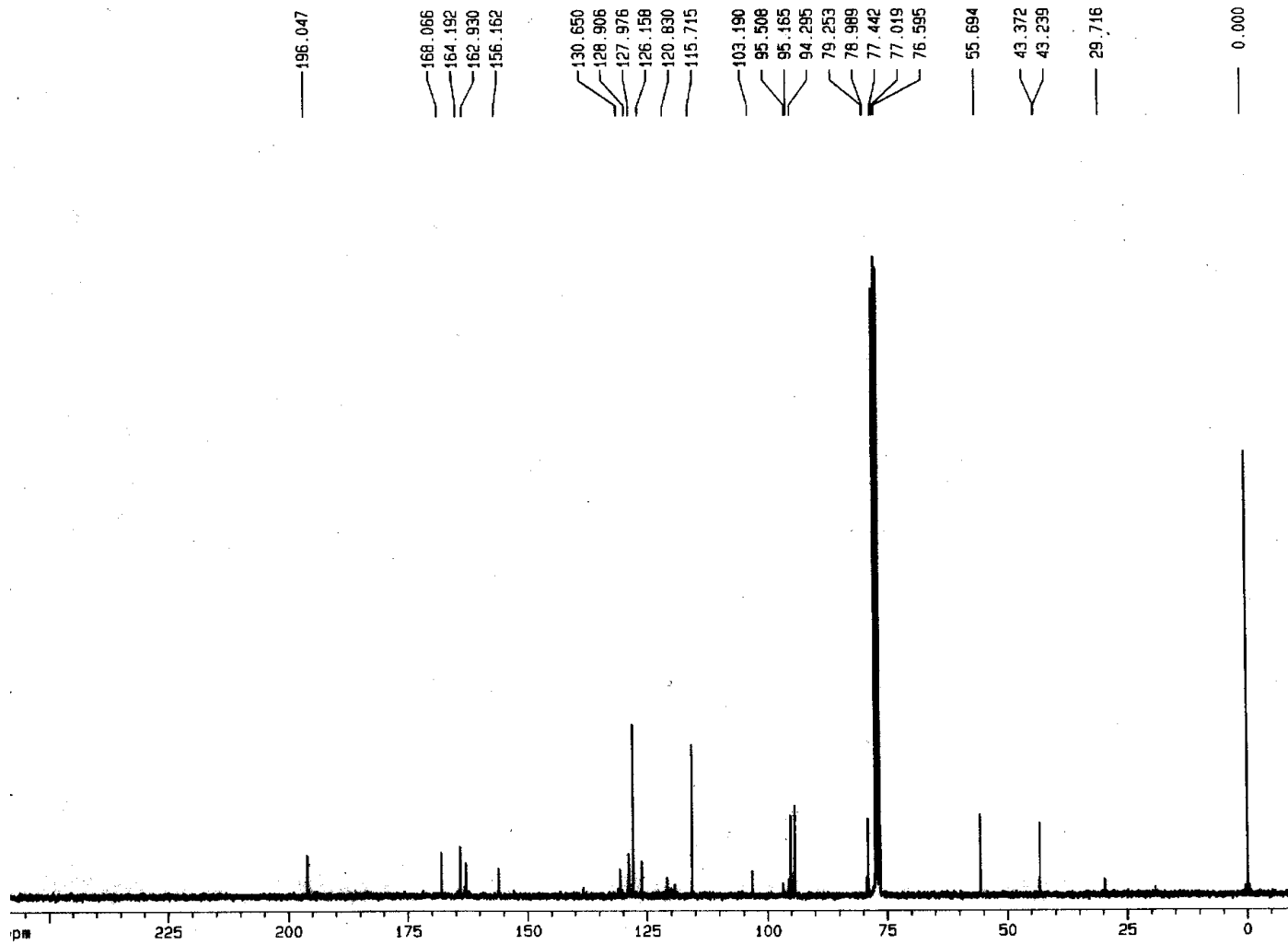
Apêndice 16 – Espectro de RMN DEPT 135 do 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila



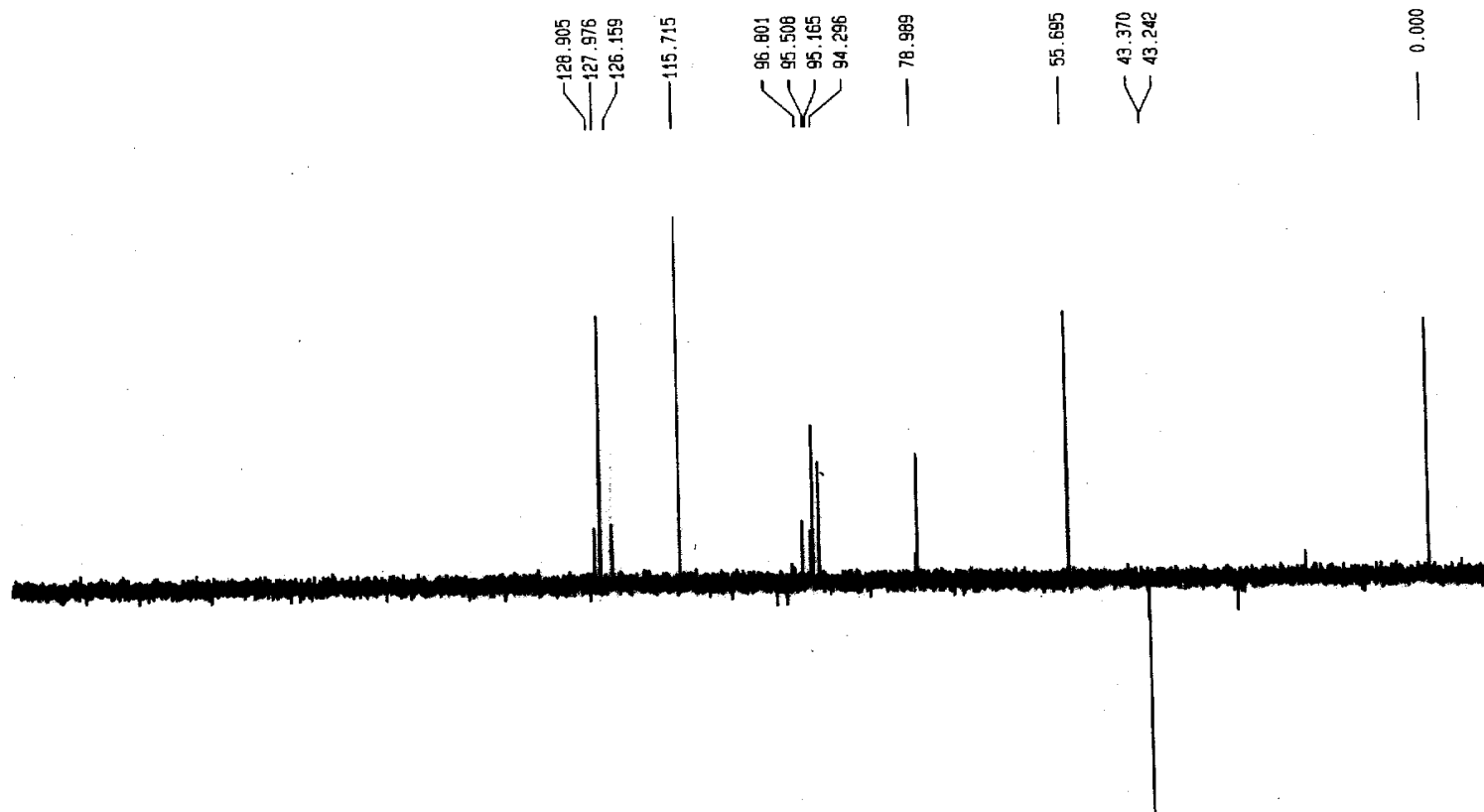
Apêndice 17 – Cromatograma CG e espectro de massas do 3-(3-metil-2-butenil)-4-hidroxi benzoato de metila



Apêndice 18 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H da sacranetina

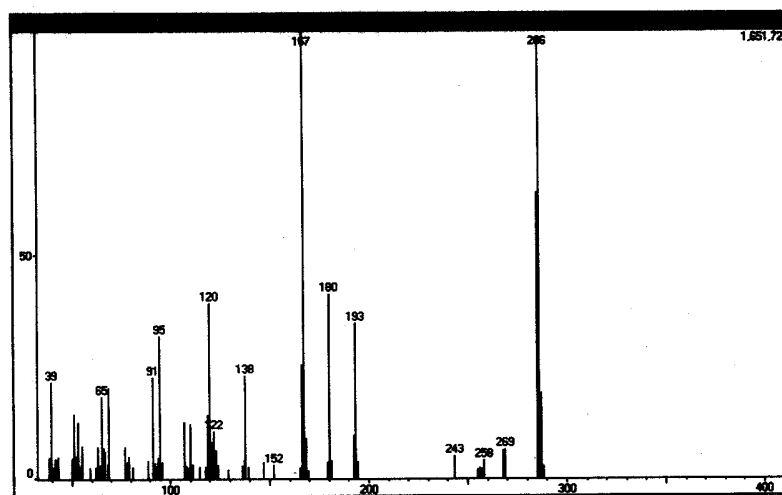
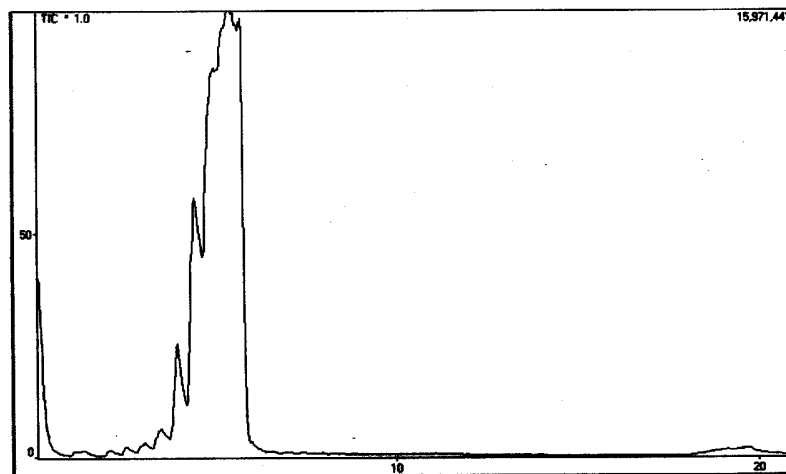


Apêndice 19 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da sacuranetina



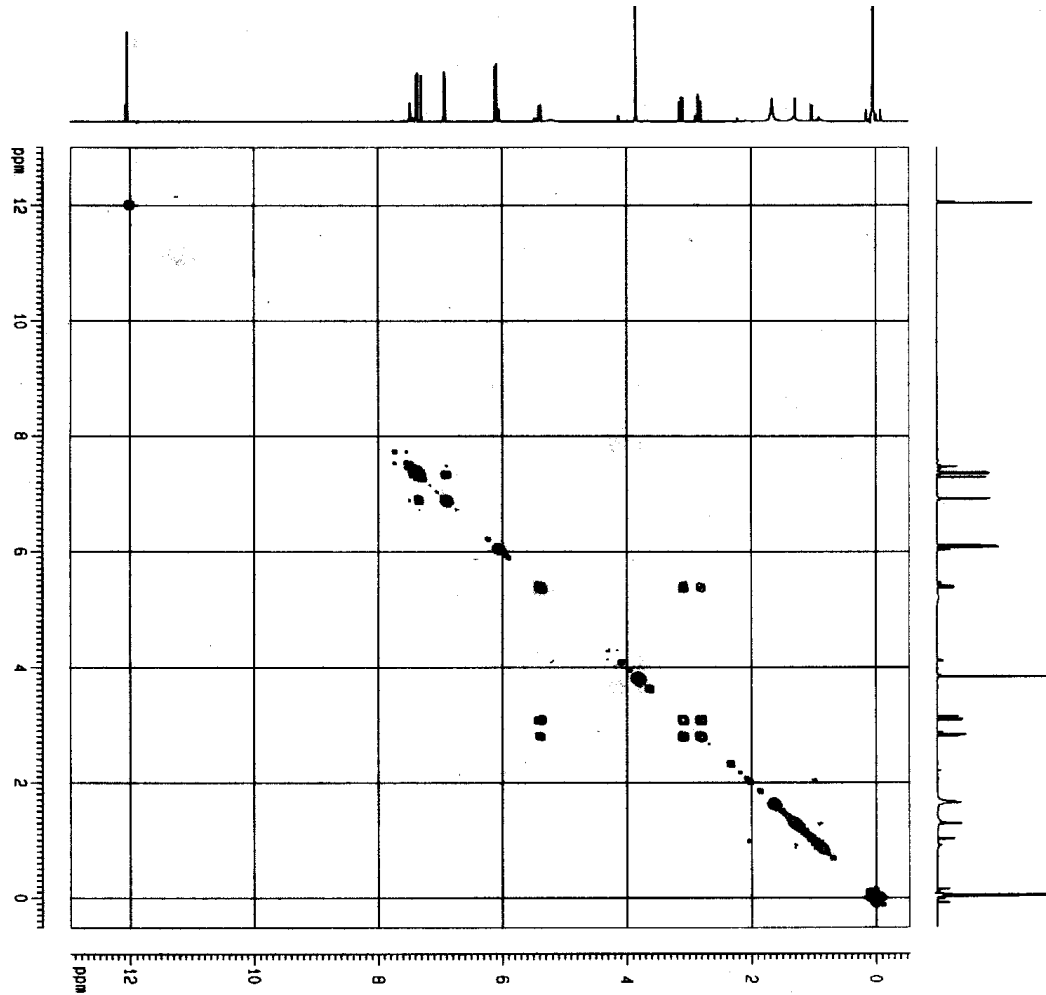
Apêndice 20 – Espectro de RMN DEPT 135 da sacranetina

91-41



Apêndice 21 – Cromatograma CG e espectro de massas da sacuranetina





Apêndice 22 - Espectro de RMN COSY HH da sacranetina