

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BARBARA MORIEL

**MORFOANATOMIA, PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE
Peperomia armondii Yunki, PIPERACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tomoe Nakashima

CURITIBA

2012

Moriel, Bárbara

Morfoanatomia, prospecção fitoquímica e biológica de *Peperomia armandii* Yunki, Piperaceae/ Bárbara Moriel – Curitiba, 2012.

97 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Tomoe Nakashima

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Morfoanatomia. 2. Fitoquímica. 3. Atividade biológica. 4. *Peperomia armandii*. I. Tomoe Nakashima. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 583.925

TERMO DE APROVAÇÃO

BÁRBARA MORIEL

Título: **PROSPEÇÃO MORFOANATÔMICA,
FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA DE PEPEROMIA ARMONDII
YUNCK, PIPERACEAE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Profª. Dra. Tomoe Nakashima
Orientadora


Profª. Dra. Elisa Perez
Universidade Estadual do Centro-Oeste e


Prof. Dr. Massuo Jorge Kato
Universidade de São Paulo

Dedicatória

A quem eu dedico,

A todos aqueles que acreditaram em minhas idéias e que de alguma forma me ajudaram a concretizá-las.

Agradecimentos

A Prof^a Dr^a Tomoe Nakashima pela oportunidade e aceitar ser minha orientadora.

Ao Departamento de Microtécnica da Universidade Federal do Paraná pela confecção das lâminas permanentes.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná por permitir a análise do material botânico.

A Prof^a Dra^a Elizabeth Santin do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da Universidade Federal do Paraná por ceder seu laboratório para a realização dos testes antimicrobianos.

A técnica Graça Toledo da Central Analítica da Universidade Federal do Paraná pela paciência e grande ajuda na análise das amostras.

Ao meu namorado Douglas A. Schmidt por estar ao meu lado nos momentos de dificuldade, sempre tentando torna-los mais agradáveis.

Aos meus pais pela ajuda durante todos os anos até que chegasse aqui.

Aos companheiros de laboratório por toda ajuda, pelos momentos de descontração e amizade.

A amiga Camila M. Accardo pela grande ajuda durante os longos anos de nossa amizade, algumas delas essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste projeto.

Epígrafe

It is a mistake to think you can solve any major problems
just with potatoes.

Douglas Adams

Sumário

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL	5
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 HISTÓRICO DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS	6
3.1.1 O INÍCIO	6
3.1.2 AS PLANTAS MEDICINAIS E A BOTÂNICA	6
3.1.3 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL	6
3.1.4 O PERÍODO DE DECADÊNCIA	7
3.1.5 A VOLTA À FITOTERAPIA	7
3.2 FAMÍLIA PIPERACEAE	7
3.3 GÊNERO <i>Peperomia</i>	8
3.4 PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS NO GÊNERO <i>Peperomia</i>	9
3.4.1 ÓLEO ESSENCIAL	9
3.4.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	11
3.4.3 CROMONAS	14
3.4.4 OUTROS METABÓLITOS	15
3.5 MICRO-ORGANISMOS	17

3.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	21
4.1.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	21
4.1.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA	21
4.2	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	22
4.2.1	EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	22
4.2.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	23
4.2.3	MARCA SISTEMÁTICA FITOQUÍMICA	23
4.2.4	DOSAGEM DE FENÓIS TOTAIS	29
4.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	30
4.3.1	PREPARO DAS FRAÇÕES	30
4.3.2	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	30
4.3.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	35
5.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	35
5.2.1	DIAGNOSE MACROSCÓPICA	35
5.2.2	DIAGNOSE MICROSCÓPICA	35
5.3	ESTUDO FITOQUÍMICO	42
5.3.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO	42
5.3.2	ÓLEO ESSENCIAL	44
5.3.3	FENÓIS TOTAIS.....	48
5.4	BIOATIVIDADES.....	50
5.4.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	50
5.4.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	69
6	CONCLUSÕES	73
7	PERSPECTIVAS.....	75
	Referências Bibliográficas	76

Anexo A – Primeiro anexo	86
---------------------------------------	-----------

Lista de Figuras

Figura 3.1	EXEMPLOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Peperomia</i> UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR.	8
Figura 3.2	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS OXIGENADOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.	10
Figura 3.3	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE SESQUITERPENOS RAROS ISOLADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Peperomia oreophila</i>	11
Figura 3.4	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS DE <i>Peperomia obtusifolia</i>	12
Figura 3.5	REPRESENTAÇÃO DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONOIDES E SUA NUMERAÇÃO.	12
Figura 3.6	REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS FLAVONOIDES ISOLADOS DE <i>Peperomia blanda</i>	13
Figura 3.7	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO FLAVONOIDE DIHIDROOROXILINA ISOLADO DE <i>Peperomia serpens</i>	14
Figura 3.8	REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DE CROMONAS ISOLADAS DE <i>Peperomia vulcanica</i>	14
Figura 3.9	ESTRUTURAS E POSSÍVEL ROTA BIOGENÉTICA DE CROMENAS ISOLADAS DE <i>Peperomia villipetiola</i>	15
Figura 3.10	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DAS CROMONAS ISOLADAS DE <i>Peperomia blanda</i>	15
Figura 3.11	PROVÁVEL ROTA BIOGENÉTICA DE CROMONAS ISOLADAS DE <i>Peperomia serpens</i>	16
Figura 3.12	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO CLUSIFOLIOL ISOLADO DE <i>Peperomia clusiifolia</i>	16

Figura 3.13 REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS SECOLIGNANAS, PEPEROMINAS E E F, ISOLADAS DE <i>Peperomia dindigulensis</i>	17
Figura 3.14 TIPOS DE FUNGOS.	18
Figura 3.15 REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE LIGNANAS TETRAHIDROFURANAS ISOLADAS DE <i>Peperomia blanda</i>	20
Figura 4.1 LOCAL DE COLETA E MATERIAL BOTÂNICO EM ESTUDO.	21
Figura 4.2 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA DE METABÓLITOS BIOATIVOS.	25
Figura 4.3 ORGANIZAÇÃO DAS MICROPLACAS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	33
Figura 5.1 ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE <i>Peperomia armondii</i>	36
Figura 5.2 (a) E (b) EPIDERME EM CORTE TRANSVERSAL. (c) E (d) EPIDERME EM VISTA FRONTAL.	36
Figura 5.3 CUTÍCULA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	37
Figura 5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS ESTÔMATOS ANISOCÍTICOS NA FACE ABAXIAL.	37
Figura 5.5 TRICOMAS TECTORES MULTICELULARES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. A, B e C - FACE ABAXIAL; D, E e F - FACE ADAXIAL	38
Figura 5.6 LÂMINA FOLIAR EM CORTE TRANSVERSAL	39
Figura 5.7 MESOFILO <i>Peperomia armondii</i> Yunck.	39
Figura 5.8 NERVURA CENTRAL FOLIAR. ABREVIACÕES – x: XILEMA, f: FLOEMA e cc: CÉLULAS COLENQUIMÁTICAS.	40
Figura 5.9 CAULE EM CORTE TRANSVERSAL	40

Figura 5.10 FOLHA EM CORTE TRANSVERSAL CORADO COM SUDAM III.	41
Figura 5.11 FOLHA EM CORTE TRANSVERSAL CORADO COM LUGOL.	41
Figura 5.12 FOLHA EM CORTE TRANSVERSAL CORADO COM CLORETO FÉRRICO.	41
Figura 5.13 CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE CAULE IDENTIFICADO POR ESPECTÔMETRO DE MASSAS.	45
Figura 5.14 CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE FOLHAS IDENTIFICADO POR ESPECTÔMETRO DE MASSAS.	46
Figura 5.15 GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO RUTINA PARA DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS.	49
Figura 5.16 GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO NO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	50
Figura 5.17 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE CAULE E FOLHAS FRENTE PADRÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	51
Figura 5.18 GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO RUTINA NO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	53
Figura 5.19 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	54
Figura 5.20 REAÇÃO ENTRE DPPH· E O ANTIOXIDANTE PARA A FORMAÇÃO DE DPPH	56
Figura 5.21 VARREDURA EM ESPECTROFOTÔMETRO DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE DPPH A 40µg/ml.	57
Figura 5.22 GRÁFICO ANALÍTICO DO DPPH.	57
Figura 5.23 CINÉTICA DO REAGENTE DPPH.	59

Figura 5.24 GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODODO DO DPPH.	60
Figura 5.25 CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO.	61
Figura 5.26 GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DPPH.	62
Figura 5.27 CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO RUTINA.	63
Figura 5.28 GRÁFICO ANALÍTICO DO CAULE PELO MÉTODO DO DPPH.	64
Figura 5.29 CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAULE.	65
Figura 5.30 GRÁFICO ANALÍTICO DAS FOLHAS PELO MÉTODO DO DPPH.	66
Figura 5.31 CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS.	67
Figura 5.32 GRÁFICO DA MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS DO CAULE, DAS FOLHAS E DO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO DPPH.	68

Lista de Tabelas

Tabela 4.1	LISTA DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO TESTE ANTIMICROBIANO.	32
Tabela 5.1	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Peperomia armondii</i> .	42
Tabela 5.2	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Peperomia armondii</i> .	42
Tabela 5.3	TEOR DE SÓLIDOS EXTRAÍDOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (%) DO CAULE E FOLHAS DE <i>P. armondii</i> .	42
Tabela 5.4	BIOATIVOS DETECTADOS NOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E/OU FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE <i>Peperomia armondii</i> .	43
Tabela 5.5	METABÓLITOS VEGETAIS DETECTADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CAULE DE <i>Peperomia armondii</i> .	44
Tabela 5.6	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E CAULE FRESCOS EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.	45
Tabela 5.7	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CAULE DE <i>Peperomia armondii</i> .	46
Tabela 5.8	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Peperomia armondii</i> .	46
Tabela 5.9	FENÓLICOS TOTAIS DE CAULE E FOLHAS DE <i>Peperomia armondii</i> .	49
Tabela 5.10	TESTE DA HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DO CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	51
Tabela 5.11	ANOVA DAS AMOSTRAS DE CAULE FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	52

Tabela 5.12 ANOVA DAS AMOSTRAS DE FOLHAS FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	52
Tabela 5.13 TESTE DE BARTLETT PARA AS AMOSTRAS DE CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO.	52
Tabela 5.14 TESTE DA HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DO CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO	54
Tabela 5.15 ANOVA DAS AMOSTRAS DE CAULE FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	54
Tabela 5.16 ANOVA DAS AMOSTRAS DE FOLHAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	55
Tabela 5.17 TESTE DE BARTLETT PARA AS AMOSTRAS DE CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA.	55
Tabela 5.18 IC ₅₀ TEÓRICO DOS PADRÕES E AMOSTRAS PELO MÉTODO DO DPPH	67
Tabela 5.19 TESTE DA HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS.	68
Tabela 5.20 TABELA DO ANOVA PARA AS AMOSTRAS DE CAULE.	68
Tabela 5.21 TABELA DO ANOVA PARA AS AMOSTRAS DE FOLHAS.	69
Tabela 5.22 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DAS AMOSTRAS FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS TESTADOS.	70
Tabela 5.23 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DO CAULE.	71
Tabela 5.24 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DE FOLHAS.	71

Resumo

Descrita por Paul Dietrich Giseke a família Piperaceae possui três mil espécies divididas em oito gêneros cujos principais são *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*. Dos cinco gêneros desta família aproximadamente 460 mil espécies podem ser encontradas no Brasil, principalmente na Mata Atlântica onde são várias e abundantes. O material botânico foi coletado em Sapopema, estado do Paraná, identificado e armazenado no Herbário da Universidade Estadual de Londrina, coleção B. Moriel *et al.*, número 2 (FUEL 44.424). A prospecção fitoquímica foi realizada com 20g de folhas e caule. Para o extrato hidroalcoólico foi utilizado 100ml de álcool 70% (v/v em água), para o extrato aquoso 100ml de água destilada. Para a análise morfoanatômica partes do caule e folhas foram fixadas em FAA 70%, seccionados a mão livre e por micrótomo. Os componentes do óleo essencial foram identificados por cromatografia gasosa - espectrômetro de massas, FID e comparação com dados de literatura. O extrato bruto, suas frações e o óleo essencial foram testados frente aos micro-organismos *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231), a atividade biológica foi determinada pelo teste de microdiluição. A atividade antioxidante do extrato bruto do caule e folhas foi avaliado pelos métodos do DPPH e fosfomolibdênio. A epiderme foliar é uniseriada coberta por uma fina camada de cutícula. Em vista frontal, as células epidérmicas apresentam formato poligonal em ambas as faces. A face abaxial apresenta estômatos anisocíticos. O mesofilo dorsiventral é composto por uma camada de parênquima paliádico e 14 camadas de parênquima lacunoso. Na nervura central há uma feixe colateral oposto ao floema e células colenquimáticas, além de tricomas multicelulares. Nos testes fitoquímicos foram encontrados esteroides, triterpenos e alcaloides nas folhas, glicosídeos antocianicos nos caules, bem como a presença de flavonoides e aminogrupos em ambos. Os principais compostos encontrados no óleo essencial do caule foram β -pineno (18,59%), germacreno D (13,5%), α -pineno (13,48%), ácido carbâmico (13,06%) e dilapiol (11,6%). No óleo essencial das folhas foram germacreno D (28,66%), β -elemeno (27,31%), apiol (13,79%) e dilapiol (11,12%). O extrato bruto e suas frações apresentaram atividade moderada a boa contra os micro-organismos testados, os valores de CIM variam de 500 a 62,5 μ g/ml e tiveram efeito bactericida. O óleo essencial não apresentou atividade na concentração testada. O extrato bruto apresentou boa atividade antioxidante pelos métodos avaliados.

Palavras-chave: Morfoanatomia; fitoquímica; atividade biológica; *Peperomia armondii*.

Abstract

Described by Paul Dietrich Giseke Piperaceae family has three thousand species divided in eight genera whose main are *Piper*, *Peperomia* and *Pothomorphe*. From five genera of this family almost 460 thousand species can be found in Brazil, mainly in Atlantic Forest where they are abundant and varied. Botanical material was collected in Sapopema, state of Paraná, identified and placed in Herbarium of State University of Londrina, B. Moriel *et al.* collection, number 2 (FUEL 44.424). Phytochemistry prospecting had been done with 20g of leaves and stems. For hydroalcoholic extract was used 100ml of alcohol 70% (v/v in water), for aqueous extract 100ml of distilled water. For morphoanatomy, leaves and stems parts were fixed in FAA 70%, sectioned by hand and by microtome. Essential oil compounds were identified by gas chromatography/mass spectrometry, FID and compared with literature data. Crude extract, fractions and essential oil were tested against *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) and *Candida albicans* (ATCC 10231), biological activity was evaluated by microdilution test. Antioxidant activity of crude extract from stem and leaves was evaluated by DPPH and phosphomolibdenum methods. Leaf epidermis is uniseriate coated with a thin cuticle layer. In front view, epidermis cells show polygonal shape in both faces. Abaxial face presents anisocytic stomata. Dorsiventral mesophyll is composed by one layer of palisade parenchyma and by fourteen layers of spongy. In the midrib, there is a collateral beam, opposite to phloem and there is collenchymatic cells in addition to multicellular trichomes. In phytochemical tests have been found steroids, triterpenes and alkaloids in leaves, anthocyanin glycosides in stems, as well as presence of flavonoids and aminogroups in both. Main compounds found in stem essential oil were β -pinene (18,59%), germacrene D (13,5%), α -pinene (13,48%), carbamic acid (13,06%) e dillapiol (11,6%). In leaves essential oil were germacrene D (28,66%), β -elemene (27,31%), apiol (13,79%) e dillapiol (11,12%). Crude extract and fractions showed moderate to good activity against microorganisms tested, MIC values range 500 to 62,5 μ g/ml and it had bactericidal effect. Essential oil has presented no activity in the concentration tested. Crude extract also showed good antioxidant activity according to the methods used.

Key-words: Morphoanatomy; phytochemistry; biological activity; *Peperomia armondii*.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Anvisa, fitoterápicos são medicamentos obtidos através de plantas medicinais, utilizando unicamente derivados da droga vegetal como extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco entre outros. Assim como todo medicamento, os fitoterápicos devem ofertar garantia de qualidade, comprovação de seus efeitos terapêuticos, padronização da composição e ser seguro para o consumo da população (ANVISA, 2010). A segurança e eficácia devem ser legitimadas por meio de levantamentos bibliográficos e ensaios práticos que buscam resultados quanto a aspectos etnofarmacológicos, agronômicos, fitoquímicos, farmacêuticos, além de ensaios biológicos pré-clínicos e clínicos, os quais avaliam a atividade biológica da espécie vegetal (MIGUEL, 1999).

O emprego de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças encontra-se bem difundido em alguns países, dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que na China cerca de 30 a 50% de todos os medicamentos utilizados são obtidos a partir de drogas de origem vegetal, sendo que na Alemanha esse índice chega aos 90%. Cerca de 50% da população européia e norte americana já fizeram uso de medicamentos fitoterápicos (WHO, 2003).

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a própria civilização, relatos do seu uso são encontrados em documentos da população chinesa e indiana (CORDELL, 1995; YAMADA, 1998). Para a maioria da população mundial o uso de plantas medicinais é quase que a única fonte de fármacos e cura. Mais de 80% da população mundial utiliza as plantas no tratamento de doenças sendo que em muitos países a medicina tradicional possui reconhecimento (CORDELL, 1995).

O potencial das plantas superiores como fonte de medicamento é pouco explorado, estima-se que haja cerca de 250.000 a 500.000 plantas no mundo, sendo o estudo fitoquímico realizado em uma parcela muito pequena (HAMBURGER, 1991). Estima-se que existam de 25.000 a 75.000 espécies vegetais utilizadas na medicina popular em todo o mundo, destas apenas cerca de 1% possuem seu valor terapêutico comprovado por estudos científicos quando administradas em seres humanos (PRIMACK, 1993).

A comprovação científica da eficácia e segurança na utilização de plantas medicinais levou a um aumento na prescrição médica destas. Na Europa, a fitoterapia já tem seu espaço na medicina alopática, onde extrato de plantas, compostos ativos e produtos medicinais acabados estão descritos em várias literaturas (PINTO, 2002). No Brasil a utilização de plantas medicinais está restrita ao uso popular, sendo poucas as espécies descritas na farmacopeia brasileira (YUNES, 2001).

O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de 22 bilhões de dólares por ano, e a cada vez mais o interesse dos países desenvolvidos torna-se crescente nesse segmento. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos Estados Unidos, US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo

a Alemanha o maior mercado mundial de produtos fitoterápicos. No Brasil, as pesquisas estão voltadas a investigação de novos princípios ativos derivados de produtos naturais, fator bastante importante em termos de exportação de produtos naturais de origem brasileira. O país exporta cerca de US\$ 7 milhões de extratos vegetais, entre eles o de catuaba, aloés, bardana, ipeca e quina, porém importa uma boa quantidade de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de origem natural, um fato contraditório para um país que possui uma das maiores biodiversidades vegetais do planeta (PINTO, 2002).

A má administração de antibióticos fez com que um grande número de patógenos se tornassem resistentes, além do aumento da incidência de infecções microbianas. Como nenhuma nova classe de antibióticos foi produzida nos últimos anos, é possível o retorno à época em que não existiam antibióticos (BAQUERO, 1997). Nesse contexto as plantas medicinais ganharam importância na busca de novas substâncias antimicrobianas. Assim, uma boa parte da população brasileira faz uso de tratamentos alternativos para o tratamento de doenças, sendo a fitoterapia o principal deles, devido a presença de dados etnofarmacológicos sobre as plantas, a grande aceitação populacional pela medicina tradicional e o fácil acesso às plantas medicinais (CALIXTO, 2000).

Os produtos naturais de origem vegetal são uma alternativa para renovação farmacêutica, visando sua aplicação como fármaco, assim como seu papel como protótipos moleculares para o desenvolvimento de novos medicamentos. Em 1992, das 42 novas substâncias descobertas, as quais possuíam importantes atividades biológicas, um total de 18 eram produtos naturais ou seus derivados. Embora um grande número de compostos vegetais já sejam conhecidos, cerca de 100 mil substâncias, a possibilidade de se identificar e obter novos metabólitos bioativos a partir de material vegetal ainda continua a ser grande (OLIVEIRA, 2003; BRAGA, 1976).

A utilização de fitoterápicos é recomendada pela Organização Mundial da Saúde com a finalidade de reduzir os custos para os programas de saúde pública, facilitar o acesso a populações pouco favorecidas tanto de países em desenvolvimento como em subdesenvolvidos (SILVA, 2002).

Os estudos baseados em plantas medicinais possuem grande importância, pois podem ser uma fonte para a produção de novos medicamentos, em especial para doenças hospitalares causadas por microrganismos multirresistentes como os *Staphylococcus aureus* resistente a metilina - MRSA (SILVA, 2003). Além disso são utilizadas em sinergismo a outras formas de tratamento como no caso do *Viscum album* L., Santalaceae (iscador) e do chá verde, (KAEGI a, KAEGI b, 1998), que são utilizados de forma complementar ao tratamento do câncer, amenizando os efeitos da quimioterapia e da radioterapia, melhorando desta maneira a qualidade de vida do paciente, através do fortalecimento do sistema imunológico, evitando perda de cabelo e vômitos, entre outras manifestações (CHERNYSHOV, 2000).

Outras plantas além do *Viscum album* podem ser empregadas para melhorar a qualidade de vida da população como a soja *Glycine max* (L.) Merr., Fabaceae, indicada na reposição hormonal para mulheres que estão na fase da menopausa, bem como a redução dos sintomas climatéricos, como suor excessivo, insônia, irritação e as "ondas de calor" (BLECHER, 1999). Seu efeito é tão considerável que atualmente é comercializada pela indústria farmacêutica na forma de comprimidos para administração oral e uso adulto, composta por 40% de isoflavona de soja e excipientes.

Muitos trabalhos científicos buscam isolar princípios ativos de plantas medicinais, já que elas são muito utilizadas pela população para o tratamento de enfermidades. No século

XIX foi isolado o primeiro princípio ativo a partir de plantas medicinais, um exemplo destes é o alcaloide morfina (HOSTETTMANN, 2003).

Nos últimos anos, vários estudos tem-se baseado na investigação de atividades biológicas e no isolamento de diversos constituintes obtidos de produtos naturais vegetais. Um desses estudos é relacionado aos alcaloides vimblastina e vincristina ambos isolados de *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae) (NEUSS, 1964), e por possuírem atividade antitumoral, são comercializados atualmente.

Há também compostos sintéticos os quais são baseados em produtos naturais, é o caso do Etoposide (VePesid[®]) isolado de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae). Esta espécie vegetal é utilizada tradicionalmente no combate ao câncer e o etoposide vem sendo usado no tratamento de tumores de testículo e pulmão, sendo menos tóxico e mais eficaz que o composto natural do qual é derivado (KINGHORN, 1987).

Muito embora os benefícios associados ao emprego de plantas medicinais no tratamento de doenças, seu uso rotineiro, negligente e sem as devidas recomendações médicas, é o resultado de seu uso inadequado. Os órgãos governamentais recomendam o estabelecimento da fitoterapia como um recurso terapêutico para atender as necessidades básicas dos serviços de saúde, desde que os parâmetros de eficácia e segurança sejam atendidos conforme preconiza a lei do país (SOUZA, 2003). Assim, estudos científicos que analisem e assegurem a qualidade dos extratos, a segurança e eficácia, por meio de experimentos que comprovem sua ação farmacológica e toxicológica em animais, além da sua eficácia e segurança quando administrados em humanos (MELLO, 2000).

A ordem Piperales apresenta cinco famílias botânicas: Hydnoraceae, Lactoridaceae, Saururaceae, Aristolochiaceae e Piperaceae, sendo as duas últimas de importância medicinal (APG II; STASI, 2002). A família Piperaceae é uma das mais primitivas entre as Angiospermas, possui um metabolismo secundário especial, formando vários metabólitos secundários entre eles muitos possuem atividade biológica significativa. Descrita por Paul Dietrich Giseke, esta família possui três mil espécies distribuídas entre oito gêneros, cujos principais são *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe* (MABBERLEY, 1997). Embora distintos morfologicamente, não existe evidências moleculares para sustentar a diferenciação entre os gêneros *Piper*, *Ottonia* e *Pothomorphe*, sendo as espécies atualmente reconhecidas em *Piper*. Desta forma no Brasil, atualmente são reconhecidos três gêneros: *Manekia*, *Piper* e *Peperomia* (SOUZA, 2008).

Quanto a sua característica botânica geralmente apresentam-se como plantas arbustivas, lianas (nome genérico de trepadeiras das zonas tropicais), epífitas (vegetal que cresce sobre outro), ervas e pequenas árvores sempre aromáticas que normalmente apresentam células com óleos essenciais. Esta família apresenta grande importância na farmacologia pois é fonte de substâncias ativas, com ênfase no gênero *Piper*, mais estudado e conhecido quimicamente, dando destaque para espécie vegetal como a Pimenta, *Piper nigrum* L., além de espécies medicinais como *Piper betle* L. (betel), *Piper angustifolium* L., *Piper longum* L., *Piper cubeba* L., *Piper methysticum* G. Forst. e outras de grande importância na medicina chinesa e aiurvédica. As espécies dessa família apresentam difícil identificação taxonômica devido às características das inflorescências, muitos semelhantes entre si (STASI, 2002).

Diferentemente do que ocorre com o gênero *Piper*, as espécies do gênero *Peperomia* são pouco conhecidas tanto comercialmente como na medicina tradicional. A espécie mais conhecida e estudada é a *Peperomia pellucida* L., chamada popularmente por erva-de-jaboti ou comida-de-jaboti no Brasil e como *corazon de hombre* e *yerba de la plata* em Cuba

(GUIMARÃES, 2004). Esta espécie vegetal é administrada da forma de chá ou infusão, suas folhas e raízes são utilizadas popularmente na região amazônica no combate a dor de garganta e tosse, bem como também é consumida na forma de salada. Dentre seus efeitos medicinais ela é empregada por ter atividade anti-inflamatória, digestiva, diurética e contra a hipertensão (GUIMARÃES, 2004).

Embora este gênero apresente mais de 1.500 espécies descritas, os estudos fitoquímicos disponíveis na literatura ainda são bem escassos quando comparamos com o gênero *Piper*. Dentre os metabólitos secundários relatados os mais comuns são derivados fenólicos prenilados, policetídeos, cromenos, secolignanas e dímeros de estireno (KATO, 2007). Entre as espécies estudadas podemos citar a *Peperomia proctorii* (SEERAM, 2000), *Peperomia galiodes* (MAHIU, 1995), *Peperomia dindigulensis* (GOVINDACHARI, 1998; WU, 2006), *Peperomia pellucida* (XU, 2006) e *Peperomia vilipetiola* (SALAZAR, 2005).

A espécie vegetal *Peperomia armondii*, a ser estudada neste trabalho, não apresenta nenhuma pesquisa referente a sua atividade biológica contra microrganismos, bem como a sua constituição química. Assim, os dados apresentados por esse trabalho possuem caráter inédito, contribuindo com as linhas de pesquisa relacionadas a produtos naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação morfoanatômica, o estudo fitoquímico e as atividades biológicas do extrato e do óleo essencial da espécie vegetal *Peperomia armondii*, Yunck pertencente a família Piperaceae.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar o material botânico;
- Preparar uma exsicata para identificação da espécie vegetal;
- Obter o extrato etanólico;
- Obter o óleo essencial;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato e óleo essencial;
- Avaliar a atividade antifúngica do extrato e óleo essencial;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto de caule e folhas;
- Identificar os compostos químicos do óleo essencial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS

3.1.1 O INÍCIO

Há muito tempo o homem tem buscado na natureza recursos para melhorar a sua condição de vida, aumentando assim, sua longevidade. As plantas foram, e ainda são, utilizadas na forma de alimento, servindo como matéria-prima para a confecção de roupas e ferramentas, além de servir como combustível para o fogo (LORENZI, 2008).

Ao longo dos anos, alguns observadores notaram que certas plantas que induziam a sonolência poderiam ser utilizadas como calmante em dosagens menores, assim como ervas com efeito laxante seriam utilizadas para regular intestino preguiçoso e outras com efeitos para aliviar a dor de doentes agonizantes. Essas informações foram passadas oralmente por várias gerações e formaram parte importante das culturas locais (LORENZI, 2008).

3.1.2 AS PLANTAS MEDICINAIS E A BOTÂNICA

A história da botânica está associada com a busca de plantas medicinais, os primeiros trabalhos que procuravam nomear e categorizar os vegetais tinham como objetivo catalogar plantas de importância medicinal. O grego Dioscórides publicou a obra "*De Materia Medica*" em que catalogou e ilustrou aproximadamente 600 plantas com efeito medicinal, sendo que alguns nomes apresentados por ele ainda são utilizados atualmente. Esta obra perdurou como a principal referência para o ocidente até o Renascimento (LORENZI, 2008).

Durante os anos, a busca de novas plantas medicinais levou a descobertas de novas espécies botânicas, assim como novas espécies botânicas tiveram efeitos medicinais. Dessa maneira, muitas plantas foram nomeadas baseando-se em seu uso ou propriedade medicinal. A preocupação de fitoterapeutas com a descrição botânica está relacionada com a caracterização, já que pode haver a utilização de uma planta incorreta (LORENZI, 2008).

3.1.3 PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

Quando os primeiros europeus chegaram ao Brasil observaram a grande quantidade de plantas medicinais utilizadas pelas tribos que aqui habitavam, esse contato com os índios fez com que os novos conhecimentos da flora local fossem fusionados com os adquiridos na Europa. Com isso os europeus começaram a testar plantas nativas que se assemelhavam com

as europeias, para observar se possuíam o mesmo uso medicinal, a partir disso foi visto que muitas plantas nativas possuíam o mesmo princípio, sendo que em algumas delas poderia ser encontrado em maior quantidade como qualidade (LORENZI, 2008).

Os escravos africanos também contribuíram com o uso de plantas trazidas da África, sendo que muitas delas eram utilizadas em rituais religiosos, bem como medicamento. Com o auxílio da tradição africana no uso de plantas medicinais, o Brasil construiu suas bases na utilização de plantas para o tratamento de enfermidades (LORENZI, 2008).

3.1.4 O PERÍODO DE DECADÊNCIA

O Brasil era considerado um país essencialmente rural até o século XX, sendo as plantas medicinais extremamente utilizadas, tanto da flora nativa como da introduzida. Com o advento da industrialização e a urbanização das cidades, o uso tradicional das plantas foi deixado em segundo plano. Os medicamentos sintéticos ficaram mais acessíveis a população, assim, o conhecimento da flora medicinal representava um atraso tecnológico, estando ligada mais ao misticismo que a ciência (LORENZI, 2008).

3.1.5 A VOLTA À FITOTERAPIA

Atualmente com as tendências globais de preservação da biodiversidade e desenvolvimento sustentável colocaram os fitoterápicos em evidência. Foram introduzidas novas linhas de pesquisa nas universidades brasileiras, buscando bases sólidas para a validação científica do uso de plantas com efeito medicinal (LORENZI, 2008).

Esse destaque para a fitoterapia intensificou as pesquisas em botânica no Brasil, mostrando novamente que essas duas ciências caminham juntas com o propósito de fornecer melhorias na qualidade de vida da população (LORENZI, 2008).

3.2 FAMÍLIA PIPERACEAE

Considerada uma das maiores famílias dentre as angiospermas basais, descrita por Paul Dietrich Giseke, compreende cerca de 3.000 espécies divididas entre oito gêneros, cujos principais são *Piper*, *Peperomia* e *Pothomorphe*, apresenta distribuição pantropical e centro de diversidade nas Américas Central e do Sul e na Malásia (MONTEIRO, 2008). Embora distintos morfologicamente, não existem evidências moleculares para sustentar a diferenciação entre os gêneros *Piper*, *Ottonia* e *Pothomorphe*, sendo as espécies atualmente reconhecidas em *Piper*. Desta forma, no Brasil atualmente são reconhecidos três gêneros *Manekia*, *Piper* e *Peperomia* (SOUZA, 2008).

As espécies desta família são ervas, subarbustos, arbustos ou lianas, geralmente aromáticas e dotadas de glândulas translúcidas, com tipo de indumento variado. As folhas apresentam disposição alterna, oposta ou verticiladas, simples e inteiras, de forma, consistência, tamanho e padrão de nervação diversos, geralmente em perfis. As flores são aclamídeas, mínimas, andróginas, protegidas por uma bractéola de forma variada, dispostas esparsa ou densamente em racemos, espigas ou umbelas de espigas, eretas ou curvas, com estames geralmente 2 a 6,

anteras bitecas de deiscência rimosa, gineceu mono, tri ou tetracarpelar, sincárpico, unilocular, uniovular, com 1 a 4 estigmas, sendo o fruto uma baga de forma variada (MONTEIRO, 2007).

3.3 GÊNERO *Peperomia*

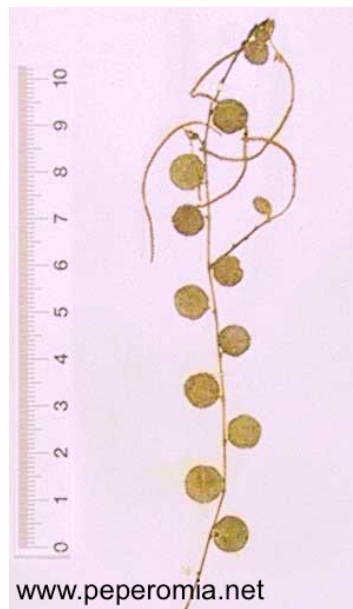
Este gênero apresenta aproximadamente 1.500 espécies, diversamente distribuídas na região do neotrópico, algumas são cultivadas como ornamentais, outras utilizadas na medicina popular, como por exemplo, *P. alata* (figura 3.1a) e *P. glabella* (figura 3.1b), ambas com ação antimalárica, a espécie *P. rotundifolia* (figura 3.1c) possui ação estomáquica, já *P. pellucida* (figura 3.1d) é utilizada na culinária (MONTEIRO, 2008; SAMAIN, 2009; ZANOTTI, 2010).



(a) *Peperomia alata*



(b) *Peperomia glabella*



(c) *Peperomia rotundifolia*



(d) *Peperomia pellucida*

Figura 3.1: EXEMPLOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Peperomia* UTILIZADAS NA MEDICINA POPULAR.

As *Peperomia* são ervas anuais ou perenes, terrestres ou epífitas, geralmente carnosas. Os caules são prostrados com numerosos ramos laterais ou eretos. As folhas são alternas,

opostas ou verticiladas, algumas vezes congestas próximo ao ápice do caule, com formatos variados, membranáceas, cartáceas, carnosas, quando secas coriáceas, apresentando pecilos sésseis ou longos (GUIMARÃES, 1984).

As espigas são auxiliares, terminais ou opostas às folhas, as flores congestas ou laxas, numerosas, dispostas geralmente em raque glabra ou pilosa, carnosas ou membranáceas, às vezes alada, constituídas de um ovário geralmente disposto numa depressão da raque, com dois estames laterais cujos estiletos geralmente não ultrapassam as anteras, brácteas arredondado-peltadas, drupa frequentemente provida de glândulas viscosas das mais variadas formas, globosa, ovoide, subcilíndrica a cilíndrica, podendo ser pontuda, mamiliforme ou provida de um escudo oblíquo ou rostrado no ápice, às vezes, em algumas espécies, os frutos são pedicelados (GUIMARÃES, 1984; LEI, 1999; MATHIEU, 2008).

Este gênero está subdividido em cinco subgêneros: *Acrocarpidium*, *Tildenia*, *Micropiper*, *Sphaerocarpidium* e *Rhyncophorum*, diferenciados pelo tipo de fruto que apresentam. O subgênero *Acrocarpidium* (Miq.) Dahlstedt possui o fruto de forma variada, estipitado, quando maduro, ápice obliquamente em forma de escudo agudo ou subestiloso. Já em *Tildenia* (Miq.) Dahlstedt, o fruto é globoso, ovoide ou subcilíndrico, basalmente preso, pseudocúpula ausente, apicalmente mais ou menos mamiliforme ou subestiloso, o estigma é apical ou levemente subapical. Em *Micropiper* (Miq.) Dahlstedt o fruto é de ovoide a sub-cilíndrico, basalmente preso, mais ou menos pontudo ou sub-estiloso com um pseudo-cúpula basal, liso, com estigma apical. *Sphaerocarpidium* Dahlstedt apresenta o fruto mais ou menos obliquamente globoso, ovoide, com o lado anterior arredondado, basalmente preso, ápice oblíquo mais ou menos pontudo e estigma sub-apical. *Rhyncophorum* (Miq.) Dahlstedt possui o fruto cilíndrico ou elipsoidal, algumas vezes espessado em direção à base, preso basalmente, o estigma é central no ápice do escudo ou na base de um bico mais ou menos rostrado (GUIMARÃES, 1984).

3.4 PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS NO GÊNERO *Peperomia*

Dentro da família Piperaceae, o gênero *Peperomia* é menos conhecido fitoquimicamente quando comparado aos extensos estudos realizados com o gênero *Piper* (SEERAM, 1998; MBAH, 2002; SALAZAR, 2005; VELOSO 2006, 2009).

3.4.1 ÓLEO ESSENCIAL

Durante o processo evolutivo as plantas desenvolveram vias metabólicas que lhes concederam a capacidade de sintetizar uma grande variedade de metabólitos secundários, com a finalidade de se adaptar ao meio em que viviam. Dentre estes metabólitos aqueles que apresentam baixo peso molecular, volatilidade e possuem aroma são usualmente designados de compostos aromáticos, mesma denominação empregada às plantas que sintetizam e acumulam este tipo de produto, sendo, portanto, chamadas de plantas aromáticas (CUNHA, 2010).

Os compostos aromáticos podem ser encontrados em todos os órgãos vegetais das plantas aromáticas, sendo produzidos e acumulados em estruturas secretoras especializadas. Por possuírem aspecto oleoso e serem voláteis também são designados de óleos essenciais. Os

óleos essenciais são misturas de vários compostos voláteis, os quais lhes conferem propriedades odoríferas (CUNHA, 2010).

Uma das importâncias dos óleos essenciais está em sua atividade biológica, principalmente em relação à ação antimicrobiana, podendo esta ser antibacteriana e/ou antifúngica. Os óleos essenciais com ação antimicrobiana têm sido utilizados na medicina tanto na aplicação direta como na incorporação em medicamentos antissépticos e desinfetantes de uso externo. Essa atividade está na maioria das vezes relacionada à presença de compostos oxigenados de tamanho molecular muito pequeno, que possuem a capacidade de formar ligações de hidrogênio e certa hidrossolubilidade, alguns exemplos são o carvacrol, o eugenol, o linalol, o geraniol, o aldeído cinâmico, o neral ou o geranial, as estruturas químicas estão representadas na figura 3.2. Estes compostos apresentam como mecanismo de ação a modificação da permeabilidade da membrana externa dos microrganismos, bem como a inibição de enzimas pertencentes à cadeia respiratória, comprometendo a produção de energia para o microrganismo (CUNHA, 2010).

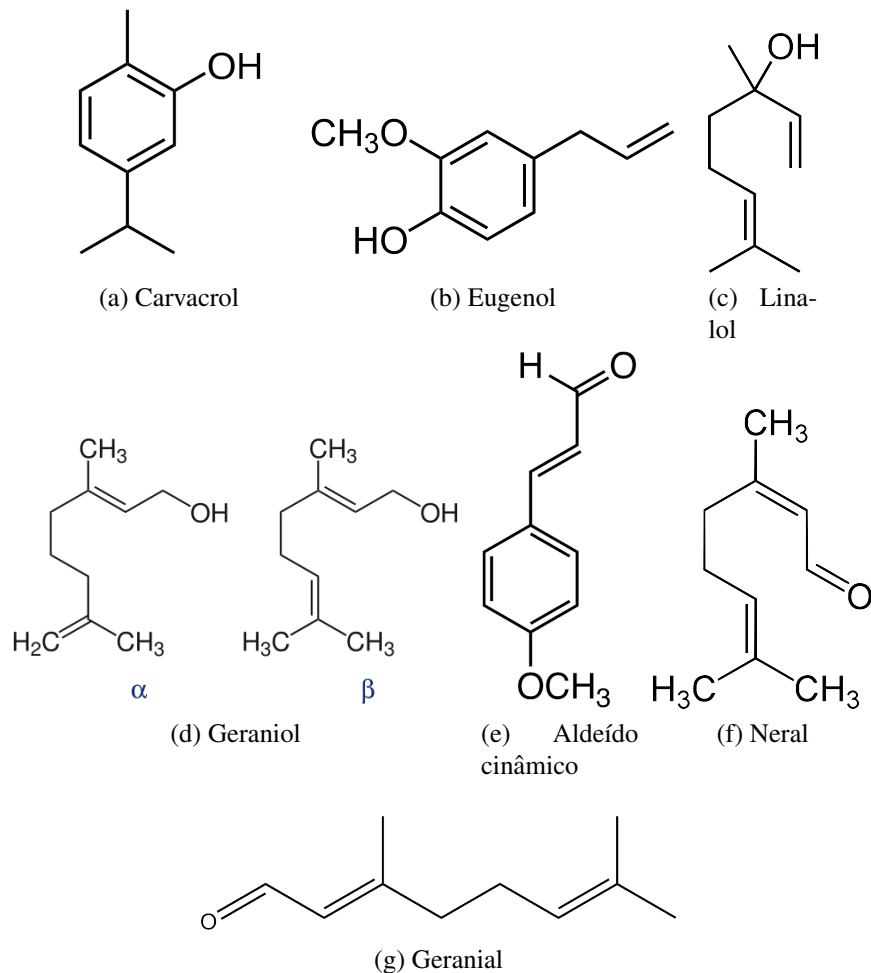


Figura 3.2: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS OXIGENADOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Em um estudo realizado por Silva e colaboradores (1999) teve como objetivo de investigar por cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massa (CG-MS) a composição do óleo essencial das espécies *Peperomia pellucida* Kunth e *P. circinnata* Link var. *circinnata*. Os compostos majoritários encontrados na espécie *P. pellucida* foram dilapiol (39,7%) e (E)-

cariofileno (10,7%), já para a espécie *P. circinnata* foram limoneno (13,5%), elemeno (11,7%), cubebol (9,7%) e mirceno (8,3%).

Santos *et al.* (2001) avaliaram a composição do óleo essencial de 10 espécies de Piperaceae, entre elas duas espécies de *Peperomia*, *P. blanda* Kunth e *P. rupestris* var. *rupestris* Humb. Bonpl. & Kunth. As estruturas foram elucidadas por cromatografia gasosa (CG) e CG-MS, bem como pela comparação dos valores de seus espectros de massa e do índice de retenção com dados de literatura. A composição volátil das espécies de *Peperomia* estudadas revelou que os monoterpenos se apresentavam em pouca quantidade (*P. blanda* - 3,20% e *P. rupestris* - 8,51%). Já os sesquiterpenos são a maior fração (*P. blanda* - 51,24% e *P. rupestris* var. *rupestris* - 65,89%). Os sesquiterpenos não oxigenados foram identificados como os compostos com maior abundância no óleo essencial de *P. blanda* (guaieno - 6,80%) e *P. rupestris* (germacreno D - 14,95%).

Segundo Lago e colaboradores (2007), no óleo essencial das folhas de *Peperomia oreophila* Hensch submetido ao fracionamento em gel de sílica, foi observado uma fração composta de uma mistura de hidrocarbonetos sesquiterpênicos identificada como β -elemeno, α -ilangeno, α -guaieno e β -selineno, bem como, o espatulenol e dois sesquiterpenos com raro esqueleto ishwarano, 3-ishwarol e 3-ishwarona, representados respectivamente na figura 3.3, sendo esta última o componente majoritário do óleo essencial bruto, correspondendo 78% em massa.

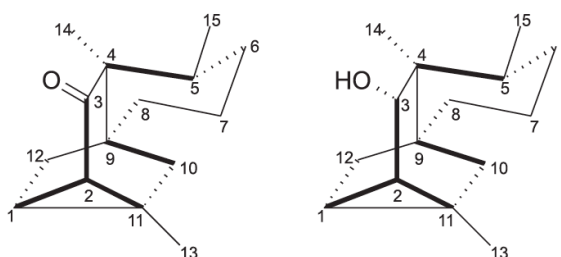


Figura 3.3: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE SESQUITERPENOS RAROS ISOLADOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Peperomia oreophila*. FONTE: LAGO, J. H. G. *et al.*, 2007.

3.4.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Poucas espécies de *Peperomia* foram estudadas fitoquimicamente, porém alguns compostos estruturalmente interessantes foram isolados como por exemplo, as secolignanas peperomina A-D da espécie *Peperomia japonica* Makino e de *P. glabella* (Sw.) A. Dieter, além de alguns fenóis prenilados com atividade anti-prasitária de *P. galioides* H.B.K. (TANAKA, 1998).

Das partes aéreas de *Peperomia obtusifolia* foram isolados cinco compostos fenólicos portando um grupo metil, isoprenil e geranil em um anel benzenico. O composto 1 foi identificado com sendo uma piperogalina, também isolada em *P. galioides*, para o composto 2 atribuiu-se o nome de peperobtusina A, o composto 3 isopeperobtusina A, já o composto 4 é uma *orto*-benzoquinona derivada do composto 2, o composto 5 2'-hidroxidi-hidrochalcona, uma di-hidrochalcona com uma simples e não usual substituição, representados na figura 3.4 (TANAKA, 1998).

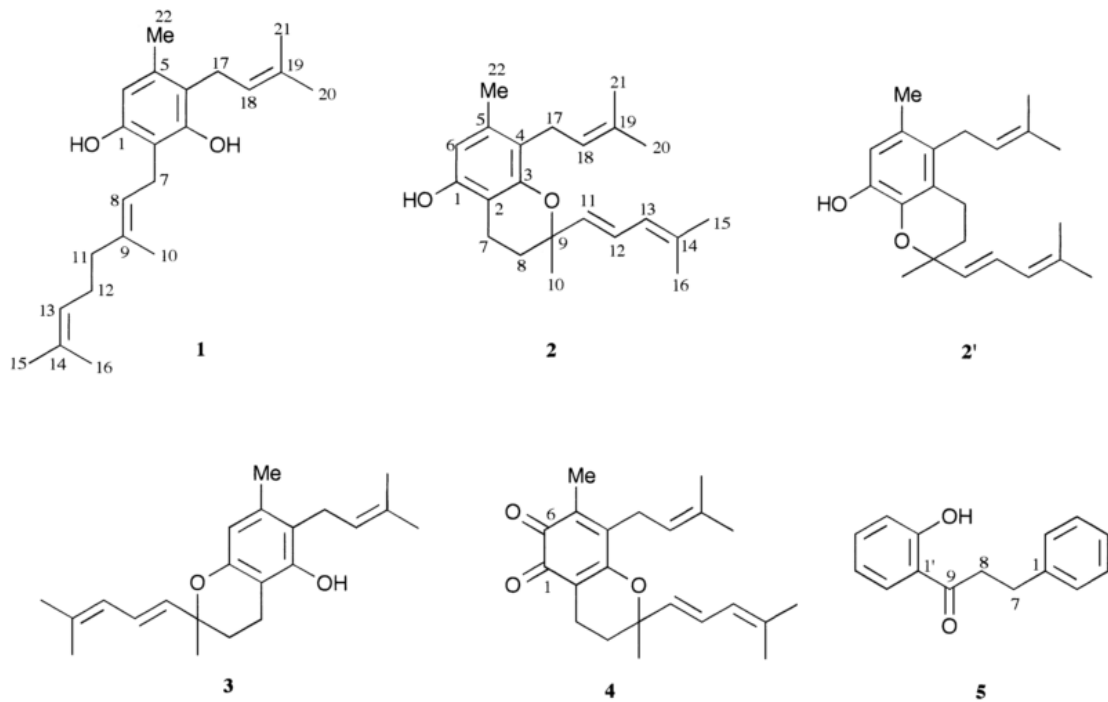


Figura 3.4: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS DE *Peperomia obtusifolia*. FONTE: TANAKA, T. *et al.*, 1998.

FLAVONOIDES

Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos mais importantes, diversificados e amplamente distribuído no reino vegetal. Podem-se encontrar flavonoides em pteridófitas, porém sua variabilidade estrutural é pequena. Em angiospermas são bastante abundantes e apresentam uma diversidade estrutural muito grande (SIMÕES, 2010).

Embora sejam diversos estruturalmente, a maioria dos flavonoides apresentam quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental, composto de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Em compostos tricíclicos, as unidades denominam-se núcleos A, B e C, os átomos de carbono recebem numeração ordinal nos núcleos A e C, já o núcleo B recebe numeração ordinal seguida de uma linha ('), a figura 3.5 ilustra a fórmula estrutural (SIMÕES, 2010).

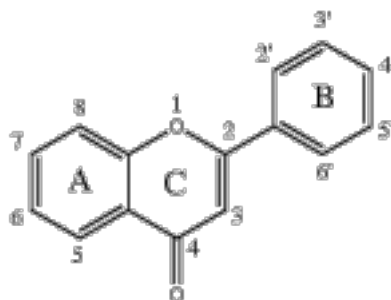


Figura 3.5: REPRESENTAÇÃO DO NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONOIDES E SUA NUMERAÇÃO.

Dentre principais classes de flavonoides podemos encontrar flavonóis, flavonas, chalconas, di-hidrochalconas, auronas, flavanonas, flavanas, catequinas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas, biflavonoides e neoflavonoides (SIMÕES, 2010).

Acredita-se que a síntese pelo metabolismo secundário está relacionada à suas funções como a proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, contra a incidência de raios ultravioleta, bem como, na atração de polinizadores, no controle de hormônios vegetais e atividade antioxidante (HARBORNE, 1989; HARBORNE & WILLIANS, 2000).

Estes compostos fenólicos são usualmente utilizados como marcadores taxonômicos pela sua abundância em quase a totalidade do reino vegetal, por sua especificidade em algumas espécies, pela facilidade de identificação e pela sua estabilidade relativa. Essas características podem facilitar a determinação do parentesco de híbridos e novos cultivares (HARBORNE, 1989; HARBORNE & WILLIANS, 2000).

Os flavonoides podem também interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres, conferindo, assim, atividade anti-oxidante, essa atividade resulta de um conjunto de propriedades, como a atividade quelante de ferro, o sequestro de radicais livres, a inibição das enzimas ciclogênase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e a estimulação de enzimas com atividade antioxidante como por exemplo, a catalase e a superóxido-dismutase. Alguns flavonoides podem atuar por meio de ligação à íons metálicos, impedindo-os de participar como catalisadores na produção de radicais livres (TRUEBA & SANCHEZ, 2001).

Poucos são os estudos fitoquímicos realizados com o gênero *Peperomia*, entre eles uma pesquisa realizada por Veloso *et al.* (2009) demonstrou a presença de flavonas no extrato metanólico de *Peperomia blanda*. Suas estruturas foram elucidadas por análises espectroscópicas, transformação química e comparação com dados de literatura. As estruturas dos novos flavonoides foram estabelecidas como 4'-metoxi-vitexina 7-O- β -D-xilopiranosídeo (1) e vicenina-2 (2), ilustrados na figura 3.6.

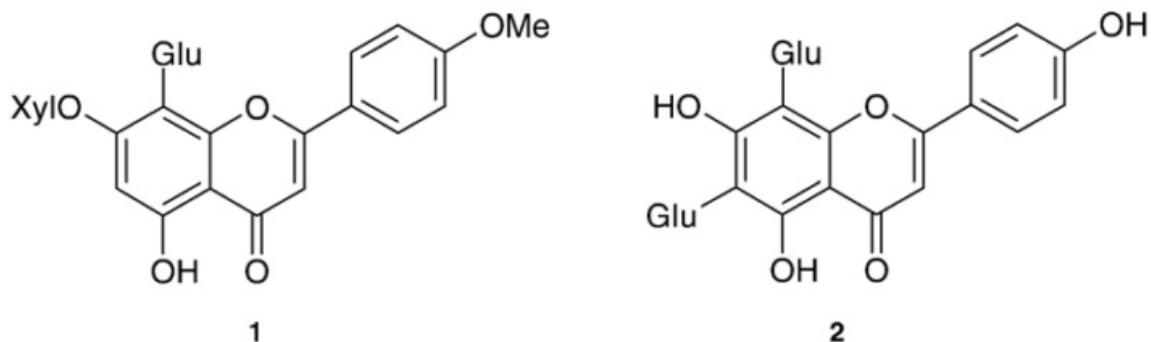


Figura 3.6: REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS FLAVONOIDES ISOLADOS DE *Peperomia blanda*. FONTE: VELOSO, L. S. M. *et al.*, 2009.

Segundo Kitamura *et al.* (2006) na extração com diclorometano das folhas de *Peperomia serpens* foi encontrado o flavonoide dihidrooroxilina, cuja estrutura está representada na figura 3.7.

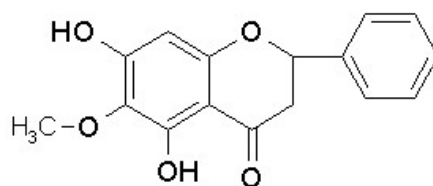


Figura 3.7: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO FLAVONOIDE DIHIDROOXILINA ISOLADO DE *Peperomia serpens*.

3.4.3 CROMONAS

As cromonas são um pequeno grupo de compostos químicos de origem natural, cujas estruturas são isômeras de cumarinas.

Algumas cromonas foram isoladas de espécies do gênero *Peperomia*, como peperovulcanona A (1) e peperovulcanona B (2) isoladas da fração hexano de *Peperomia vulcanica*, figura 3.8 (MBAH, 2002).

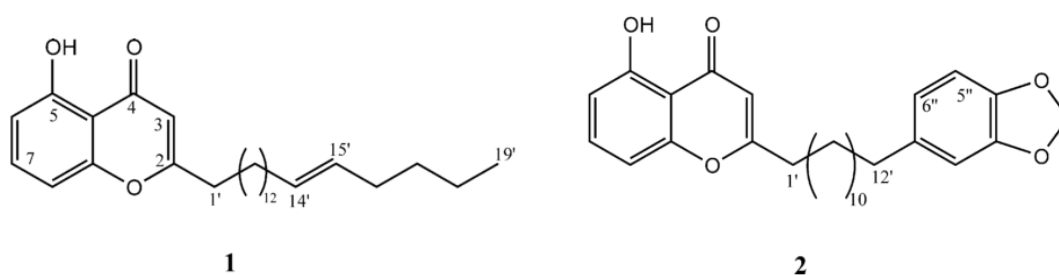


Figura 3.8: REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DE CROMONAS ISOLADAS DE *Peperomia vulcanica*. FONTE: MBAH, J. A. *et al.*, 2002.

Em outro estudo realizado por Salazar *et al.* (2005) foi observada nas partes aéreas de *Peperomia villipetiola* a presença de sete cromonas cujas estruturas (1 - 7) e sua possível rota biogenética estão respresentadas na figura 3.9.

Do extrato metanólico das partes aéreas de *Peperomia blanda* foram isoladas e caracterizadas duas cromonas incomuns, as quais receberam o denominação de blandacromona I e II, suas estruturas estão representadas respectivamente pela figura 3.10 (VELOSO, 2006).

Na pesquisa realizada por Kitamura e colaboradores (2006), no extrato em diclorometano das folhas de *Peperomia serpens* foi possível isolar e elucidar a estrutura de três cromonas, [5-hidroxi-8-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dienil)-2,2,7-trimetil-2*H*-1-cromona] (1), [5-hidroxi-8-(3'-metil-2'-butenil)-2,2,7-trimetil-2*H*-1-cromona-6-carboxílico ácido] (2) e [metil 5-hidroxi-2,2,7-trimetil-2*H*-1-cromona-6-carboxilato] (3), suas respectivas estruturas estão representadas na figura 3.11.

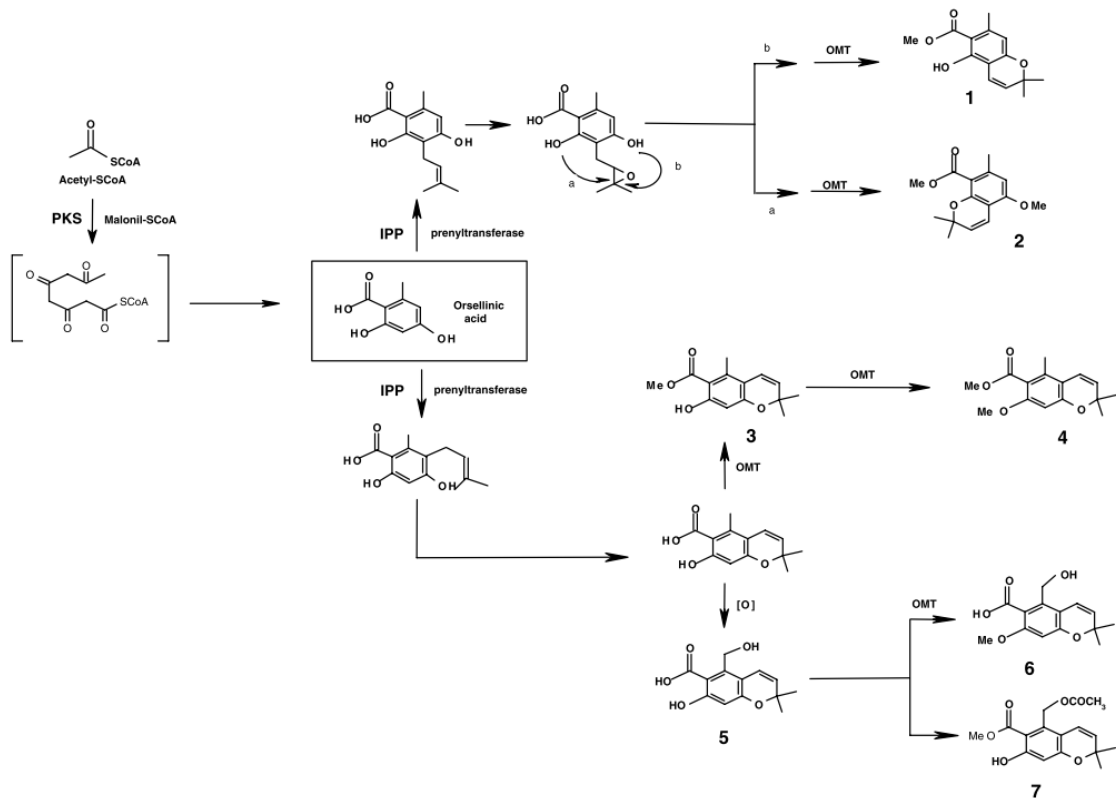


Figura 3.9: ESTRUTURAS E POSSÍVEL ROTA BIOGÊNICA DE CROMENAS ISOLADAS DE *Peperomia villipetiola*. FONTE: SALAZAR, K. J. M. *et al.*, 2005. ABREVIACÕES - PKS: policetídeo sintase, IPP: pirofosfato de isopentenila, OMT: *o*-metiltransferase.

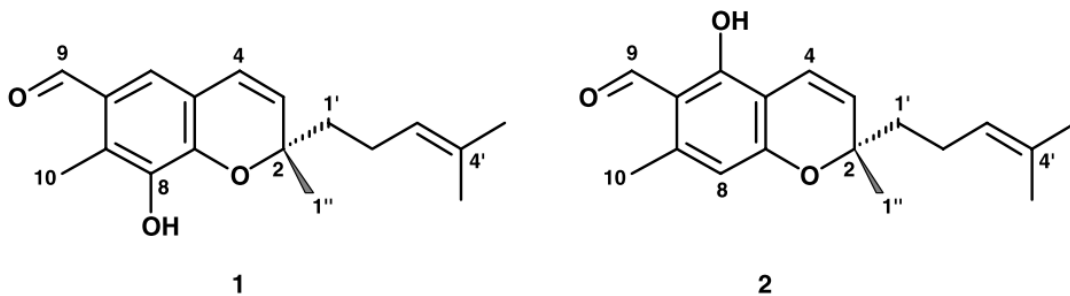


Figura 3.10: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DAS CROMONAS ISOLADAS DE *Peperomia blanda*. FONTE: VELOSO, L. S. M. *et al.*, 2006.

3.4.4 OUTROS METABÓLITOS

Vários outros compostos químicos derivados do metabolismo secundário podem ser encontrados no gênero *Peperomia* como o clusifoliol, um benzopirano prenilado, isolado das partes aéreas de *P. clusifolia*, sua estrutura química está apresentada na figura 3.12 (SEERAM, 1998).

Govindachari e colaboradores (1998) encontraram nas partes aéreas da espécie *Peperomia dindigulensis* duas novas secolignananas, chamadas de peperominas E (1) e F (2) (figura 3.13) além das já conhecidas peperominas A e B.

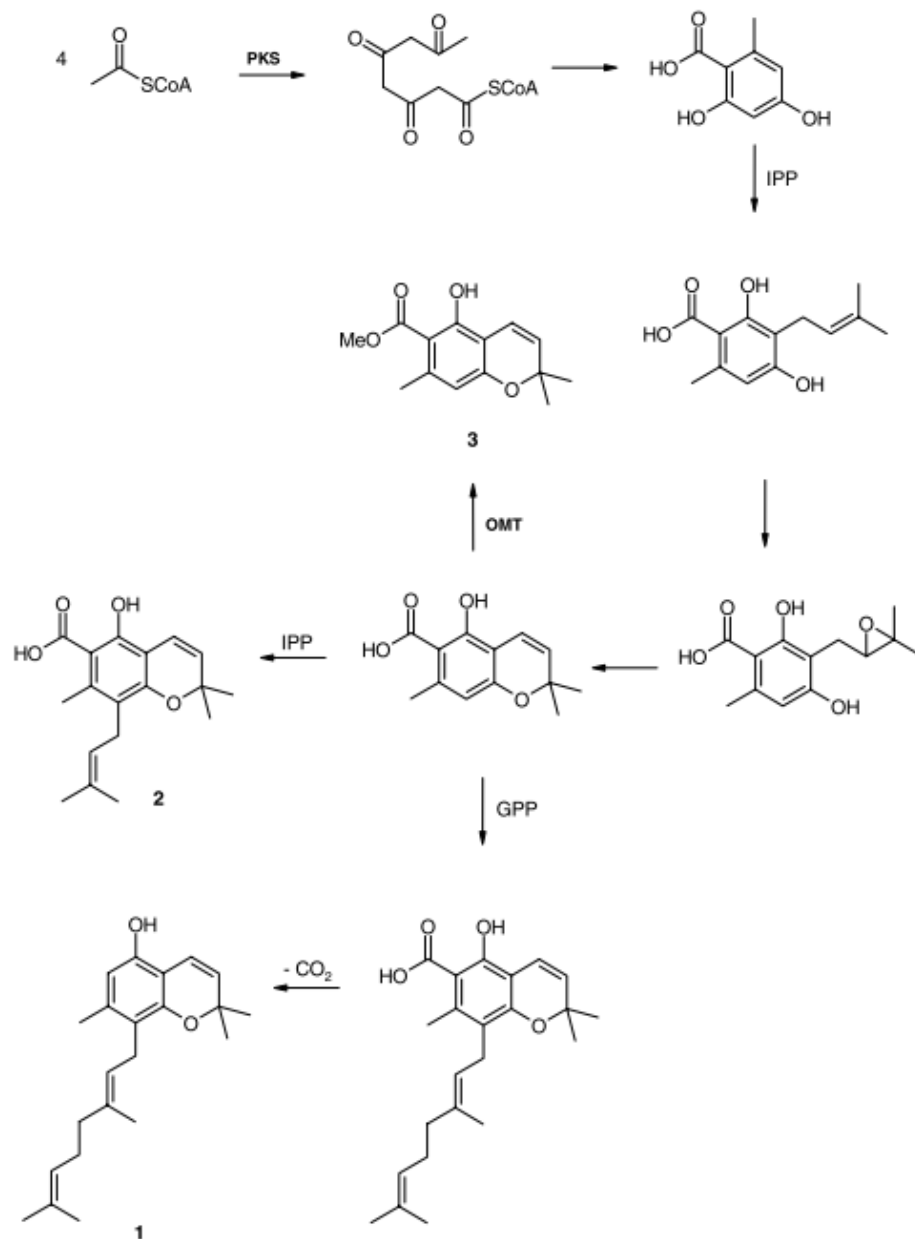


Figura 3.11: PROVÁVEL ROTA BIOGENÉTICA DE CROMONAS ISOLADAS DE *Peperomia serpens*. FONTE: KITAMURA, R. O. S. *et al.*, 2006. ABREVIACÕES - PKS: policetídeo sintase, IPP: pirofosfato de isopentenila, OMT: *o*-metiltransferase.

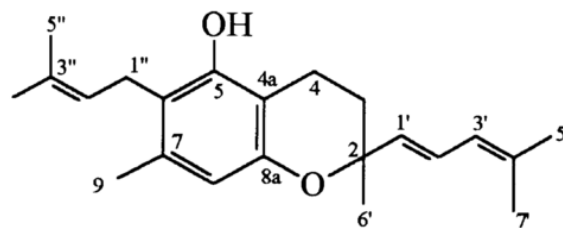


Figura 3.12: REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DECLUSIFOLIOL ISOLADO DE *Peperomia clusifolia*. FONTE: SEERAM, N. P. *et al.*, 1998.

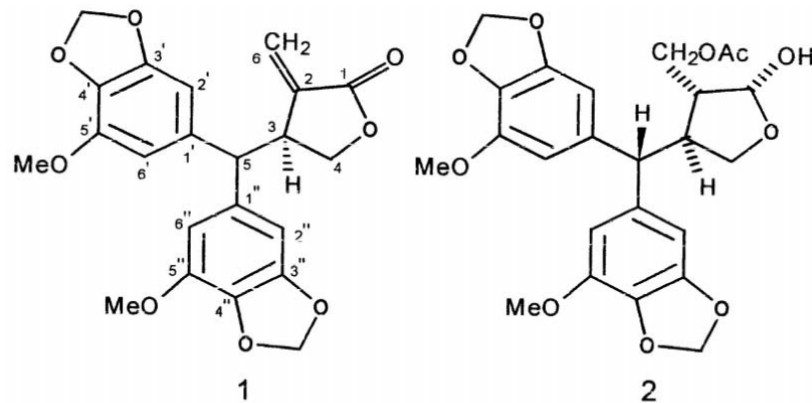


Figura 3.13: REPRESENTAÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS SECOLIGNANAS, PEPEROMINAS E E F, ISOLADAS DE *Peperomia dindigulensis*. FONTE: GOVINDACHARI, T. R. *et al.*, 1998

3.5 MICRO-ORGANISMOS

Um micro-organismo com a capacidade de produzir uma doença é definido com um patógeno. Os agentes de doenças infecciosas humanas pertencem a cinco grupos principais de organismos: bactérias, fungos, protozoários, helmintos e vírus. O processo infeccioso passa por cinco estágios: (a) entrada no hospedeiro com invasão da primeira linha de defesa; (b) adesão do micro-organismo às células do hospedeiro; (c) propagação do micro-organismo; (d) dano às células do hospedeiro por enzimas, toxinas ou uma resposta inflamatória; (e) evasão da segunda linha de defesa do hospedeiro (STROHL, 2001).

Bactérias são seres procariontes que não possuem membrana nuclear nem organelas citoplasmáticas e dividem-se por reprodução assexuada. Quanto a sua morfologia encontram-se principalmente nas formas esférica, de bastonetes e espiralada (PELCZAR, 1997).

A célula bacteriana pode apresentar externamente estruturas como flagelos e fímbrias aderidos à superfície composta por membrana celular, parede celular e uma cápsula. Internamente possui um região onde encontramos o material genético e ribossomos (PELCZAR, 1997).

Os organismos procariontes pertencentes ao gênero *Bacteria* podem ser divididos em dois grandes grupos, denominados gram-positivos e gram-negativos, a diferença entre esses dois grupos esta na estrutura de sua parede celular (MADIGAN, 2004).

Basicamente, a parede celular de gram-positivos é composta em sua maioria por peptidoglicanos, proteínas e ácido teicóico e/ou lipoteicóico. Enquanto a parede celular de gram-negativos corresponde a uma estrutura bastante complexa, formada por algumas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa. Há um espaçamento entre a membrana plasmática e a membrana externa denominado espaço periplasmático. Comparando com a parede celular das bactérias gram-positivas, a parede das gram-negativas é mais suscetível a quebras devido a menor quantidade de peptidoglicano (MADIGAN, 2004; TRABULSI, 2008).

Somente a partir de 1969 os fungos deixaram de ser classificados como vegetais e receberam um reino chamado *Fungi*. Seu conjunto de características como não produzir um pigmento fotossintético, não apresentar celulose na parede celular (com exceção de alguns fungos aquáticos) e não armazenar como substância de reserva o amido, contribuíram para essa

mudança na classificação (TRABULSI, 2008).

Os fungos são organismos eucariontes mononucleados como as leveduras (figura 3.14a) ou multinucleados como os fungos filamentosos ou bolores (figura 3.14b) e cogumelos (figura 3.14c). Diferente das bactérias os fungos apresentam organelas e núcleo, mas também possuem uma parede celular e membrana citoplasmática (TRABULSI, 2008).

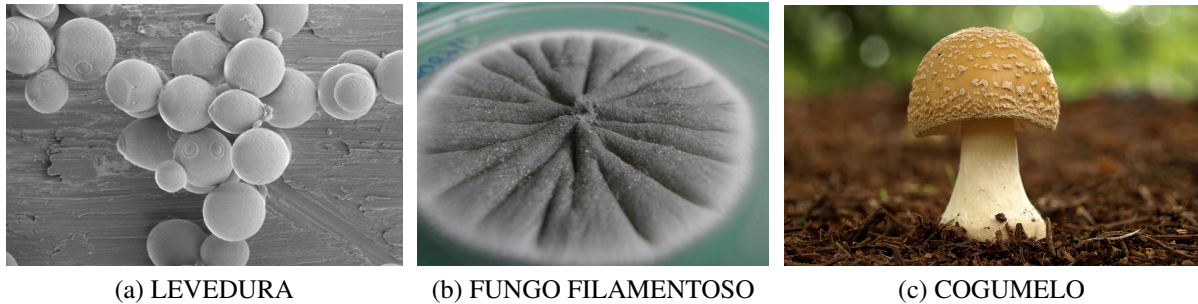


Figura 3.14: TIPOS DE FUNGOS.

3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Poucos são os estudos relacionados as atividades biológicas do gênero *Peperomia*, sendo a maioria efetuados com partes aéreas da espécie *Peperomia pellucida* H.B.K.

Empregada na medicina tradicional em feridas, na febre, abscessos, dores abdominais, cólica, gota, problemas nos rins, dor reumática fadiga, dores de cabeça (PERRY, 1980; de PAULA, 1999), para o tratamento de sarampo, varíola, impotência masculina, desordens mentais e câncer de mama (AZIBA, 2001). Alguns estudos relataram atividade analgésica em ratos (AZIBA, 2001), antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, bem como anti-mutagênica (de PAULA, 1999) e antifúngica contra fungos vegetais (SINGH, 1983).

Com a intenção de avaliar a atividade analgésica de *P. pellucida*, Aziba e colaboradores (2001) a partir do preparo do extrato metanólico das folhas secas, reproduziram o teste de contorcimento em camundongos, aos quais foram administrados 0,6% de ácido acético injetado por via intraperitoneal e o número de contorções foram contadas durante um período de 20 minutos. O tratamento foi administrado oralmente 15 min depois da injeção do ácido. O extrato metanólico de *P. pellucida* apresentou um efeito significativo e dose-dependente.

Khan (2002) realizou uma pesquisa para a investigação da atividade antibacteriana de *P. pellucida*. A partir das partes aéreas secas foi obtido o extrato metanólico bruto, posteriormente este foi fracionado com éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e butanol. O extrato bruto e suas respectivas frações foram analisados pelo método da difusão em disco frente bactérias gram-positivas e negativas, fungos e protozoário. As amostras analisadas não apresentaram atividade frente as fungos testados, já em relação as bactérias a fração butanólica apresentou boa atividade com uma zona de inibição entre 18-20mm, comparando-se ao cloranfenicol (18-24mm) utilizado como controle positivo no teste. Essa atividade possivelmente é oriunda da presença de flavonoides, saponinas e taninos na fração butanólica.

Em um estudo realizado por Arrigoni-Blank *et al.* (2004) buscou-se através do extrato

aquoso das partes aéreas de *P. pellucida* avaliar as atividades analgésica e anti-inflamatória em ratos e camundongos. Os testes anti-inflamatórios foram realizados pela indução de edema na pata de ratos tanto pela carragenina seguindo a metodologia de WINTER *et al.* (1962) como pelo ácido araquidônico, segundo DIMARTINO *et al.* (1987), a atividade analgésica foi avaliada por contorções abdominais usando ácido acético e pelo teste da placa quente em camundongos, conforme KOSTER, *et al.* (1959). A administração oral de 100, 200 e 400mg/kg do extrato aquoso de *P. pellucida* apresentou atividade anti-inflamatória dose dependente em todas as concentrações testadas (100, 200 e 400mg/kg), com nenhuma diferença significativa na concentração de 100mg/kg 4 horas depois da injeção de carragenina. O edema foi inibido pelo extrato a partir da primeira hora e durante todas as fases de inflamação, sugerindo que ele provavelmente inibe diferentes aspectos e mediadores químicos da inflamação. O extrato aquoso não bloqueou a formação do edema quando administrou-se ácido araquidônico via intraperitoneal, porém o edema foi inibido pelo ácido norhidroguaiarético (NDGA) utilizado como controle. Com base nesses dados pode-se supor que o extrato aquoso tem a atividade anti-inflamatória interferindo com a síntese de prostaglandinas. Em relação a atividade analgésica o extrato demonstrou um efeito significativo na dose de 400mg/kg, inibindo a dor em 50% comparando-se com o controle, enquanto doses mais baixas, 100 e 200mg/kg, a inibição não foi significativa, 22 e 27%, respectivamente. Esse efeito analgésico está relacionado ao mecanismo sintético de prostaglandina como no caso do processo anti-inflamatório induzido por carragenina, indicando a presença do processo de dor inflamatória. No teste da placa quente o efeito analgésico foi observado na concentração de 100 e 200mg/kg, indicando que o extrato possui atividade relacionada a dor inflamatória e não inflamatória. Desta maneira, o extrato aquoso de *P. pellucida* exibiu atividade anti-inflamatória e analgésica pelos modelos utilizados no estudo de Arrigoni-Blank *et al.* (2004), sugerindo que a ação anti-inflamatória do extrato interfere com a síntese de prostaglandinas.

Embora a espécie *Peperomia pellucida* apresente várias pesquisas relacionadas a atividades biológicas, ela não é a única espécie a ser estudada, como pode ser comprovado num trabalho realizado por Felipe *et al.* (2008), no qual o material vegetal utilizado foi *Peperomia blanda*. Este estudo teve como finalidade isolar lignanas desta espécie botânica e avaliar sua atividade tripanocida. O ensaio biológico foi realizado de acordo com o descrito por Bernacchi *et al.* (2002). Os compostos isolados (1-5), representados na figura 3.15 submetidos ao bioensaio contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y exibiram atividade potente quando comparados ao controle positivo benzonidazol, sendo que o composto 4 foi mais ativo que as outras lignanas com um ou nenhum grupo metilenedioxifenil.

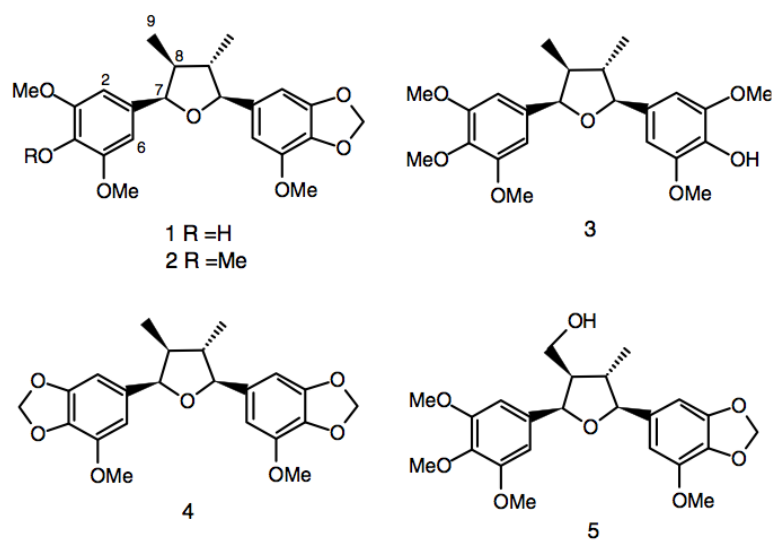


Figura 3.15: REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DE LIGNANAS TETRAHIDROFURANAS ISOLADAS DE *Peperomia blanda*. FONTE: FELIPPE *et al.*, 2008.

Segundo Kitamura e colaboradores (2006) os compostos presentes na fração diclorometano e cromanais isoladas das folhas de *Peperomia serpens*, demonstraram por meio de bioautografia atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, porém o extrato bruto apresentou maior atividade que os isolados. Outro estudo com cromanais, porém isoladas de *Peperomia villipetiola*, também demonstrou que estes compostos apresentaram atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (SALAZAR, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

4.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material botânico foi coletado no Salto das Orquídeas localizado no município de Sapopema (figura 4.1a), estado do Paraná - Brasil, durante o período da manhã, figura 4.1b. Foram feitas coletas na primavera (11/2010), outono (06/2010) e inverno (06/2011).



(a) SALTO DAS ORQUÍDEAS, SAPOPEMA - PR



(b) *Peperomia armondii*

Figura 4.1: LOCAL DE COLETA E MATERIAL BOTÂNICO EM ESTUDO.

Após a coleta do material botânico foi realizada uma exsicata para identificação da espécie e armazenamento no herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O restante do material foi utilizado para obtenção do extrato bruto e óleo essencial para posteriores testes biológicos.

A espécie vegetal foi identificada pela chave de identificação botânica baseando-se na exsicata do material coletado disponibilizado no herbário.

4.1.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise morfológica e anatômica foi realizada com o material coletado no outono (06/2010). A fixação da amostra de folhas, a partir do quarto nó, para a obtenção das lâminas semipermanentes e permanentes foi realizada utilizando-se FAA 70 - formalina, ácido acético e álcool etílico 70% (V/V) (JOHANSEN, 1940), sendo o material, posteriormente, armazenado em álcool etílico a 70% (V/V).

O método de Berlyn e Miksche (1976) foi utilizado para a montagem das lâminas semipermanentes. Foram realizadas secções transversais da porção mediana do limbo foliar, bem como secções paradérminas da face adaxial e abaxial das folhas da espécie em estudo. As secções foram confeccionadas a mão livre, utilizou-se hipoclorito de sódio a 20% para o clareamento dos cortes e posteriormente lavados em água destilada. Na coloração, foi utilizado azul de toluidina a 0,05% (m/V) (HADDAD, 1989), fucsina básica a 0,0125% (m/V) e azul de Astra a 1% (m/V) (BRITO; ALQUINI, 1996). A montagem das lâminas foi desenvolvida com glicerina a 50% (V/V) em água purificada, seguindo a selagem com esmalte de unha incolor.

Para a elaboração das lâminas permanentes, o material foi desidratado em série etanólica crescente e diafanização em xilol. A infiltração foi realizada em estufa a 60°C, com parafina (JOHANSEN, 1940). As secções transversais da porção central e mediana do limbo foliar e do pecíolo foram obtidas a partir dos blocos parafinados, em micrótomo de rotação Leica RM 2025, com 10 a 12 μ m de espessura. As secções foram hidratadas, distendidas nas lâminas e secas em mesa térmica a 40°C. Para a coloração, foi empregada a solução de azul de toluidina a 0,05% (m/V) (SAKAI, 1973) e também, a solução da fucsina básica 0,0125% (m/V) mais azul de Astra a 0,5% (m/V) (LUQUE *et al.*, 1996; ROESER, 1972). O bálsamo do Canadá sintético foi usado como meio de montagem.

Na avaliação histoquímica, foram realizadas secções transversais à mão livre da região mediana de folhas recentemente coletadas de *Peperomia armondii*. Essas secções foram tratadas com os seguintes reagentes: cloreto férrico para a comprovação de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940); lugol, indicado para a pesquisa de amido (BERLYN & MIKSHE, 1976); floroglucinol acidificado, para evidenciar a presença de lignina (FOSTER, 1949); e Sudam III, para a investigação de substâncias graxas, como estruturas de revestimento cutinizadas e suberizadas e gotículas de óleo (SASS, 1951).

Os registros fotográficos foram conduzidos no Fotomicroscópio Olympus CX31, sendo que as escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições ópticas.

Para a análise ultra-estrutural da superfície foliar e caulinar, as amostras foram desidratadas em temperatura ambiente, montadas em suporte, cobertas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura SHIMADZU SSX-550 Superscan (15 kV). O registro das imagens ocorreu pela utilização de software específico.

4.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

4.2.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Foram realizadas extrações de folhas e caule frescos das coletas sazonais (primavera, outono e inverno) da espécie em estudo. A extração foi efetuada pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado por WASICKY(1963) apud FABROWSKI (2002) em aparelho de destilação baseado na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988).

Cem gramas de folhas fragmentas com tesoura, medindo aproximadamente um centímetro de lado, foram pesadas e colocadas em um balão volumétrico, juntamente com pedaços de porcelana para regularizar a ebulição. Foi acrescentado três litros de água destilada, posteri-

ormente o balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger e mantido sobre uma manta térmica a 95°C, aproximadamente. Assim que a primeira gota de óleo for visualizada no tubo com escala graduada, foi marcado o tempo de aproximadamente 8 horas de extração. Ao final, o rendimento do óleo foi determinado em porcentagem v/m, isto é, volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal (FARMACOPEA BRASILEIRA, 1988). Assim, o óleo foi armazenado em um recipiente fechado e levado ao congelador para posteriores testes biológicos.

4.2.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Condições cromatográficas para Cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS)

A caracterização dos constituintes químicos presentes no óleo essencial do caule e das folhas de *Peperomia armondii* foi realizada a partir de cromatografia gasosa, sendo empregado um sistema cromatográfico composto de cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa, marca Varian® CG/EM/EM Saturn 2000, acoplado a um cromatógrafo gasoso Varian® 3800 e coluna capilar CP-Sil 8 low bleeding. A análise foi efetuada com injeção de 1,0µL da amostra. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A rampa da temperatura da coluna foi programada no intervalo de 60 a 280°C, sendo desenvolvida do seguinte modo: temperatura inicial de 60°C por 3 min, acréscimo de 3°C/min até 280°C e mantendo 280°C/min por 10 min. O injetor permaneceu funcionando por 15 min a 280°C.

4.2.3 MARCHA SISTEMÁTICA FITOQUÍMICA

Foram utilizadas folhas e caules de *Peperomia armondii* coletados no outono (06/2010) sendo estes fragmentados e moídos, após secagem sob as mesmas condições, que para a determinação do rendimento da biomassa para extrair o óleo essencial e foram preparados extratos aquoso e hidroalcoólico a 20% (M/V). Os ensaios fitoquímicos a serem realizados seguirão a metodologia utilizada no laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da UFPR (NAKASHIMA, 1993).

Preparo dos extratos hidroalcoólico e aquoso

Os extratos foram preparados com os órgãos vegetais coletados no outono, pertencentes ao tratamento controle, macerando 20g de material fresco com 100 mL de água destilada em banho-maria a 60°C, durante 2 horas para a obtenção do extrato aquoso e, para o extrato hidroalcoólico 100mL de etanol a 70% (v/v em água), deixando-se em maceração durante 10 dias. Após, foram filtrados e armazenados em frascos âmbar para as análises. No extrato hidroalcoólico foram pesquisados: alcalóides, aminogrupos, glicosídeos flavônicos, leucoantocianidinas, glicosídeos antraquinônicos, cumarinas, saponinas, taninos e esteróides e/ou triterpenóides.

No extrato aquoso foi determinada a presença de glicosídeos antociânicos, glicosídeos saponínicos, glicosídeos cianogênicos, ácidos voláteis, ácidos fixos, taninos em geral e taninos hidrolisáveis e condensados.

Determinações de caracteres organolépticas e pH

Para os dois extratos foram determinadas as características organolépticas e a determinação do pH do extrato, através de papel indicador pH (MERCK), com escala de precisão de 0,5.

Foi realizada a observação da cor (visual), olfação para detectar o odor e o sabor foi através de uma gota do extrato aquoso na língua.

Determinação de teor de sólidos

Foram transferidos para uma placa de petri tarada (previamente levada a estufa a 100°C durante 30 minutos e decorrido este tempo colocada no dessecador e quando fria pesada e o peso da placa de petri vazia foi anotado para posterior cálculo), 10 mL do extrato hidroalcoólico e aquoso e estas foram levadas ao banho-maria até secura. Após, as placas de petri com os resíduos foram colocadas na estufa a 100°C, durante 15 minutos e em seguida foram colocadas no dessecador, depois disso, foram pesadas e anotados o pesos de secagem e esta operação foi repetida cinco vezes, até peso constante.

Obtenção das frações orgânicas

O restante do extrato hidroalcoólico ($\pm 190\text{mL}$) foi transferido para um balão e concentrado no rotavapor, até a redução do volume a 1/5 ($\pm 40\text{mL}$), a uma temperatura inferior a 50°C.

O extrato concentrado foi transferido para um funil de separação e foi efetuada a extração líquido/líquido com solvente de polaridade crescente: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol.

1. Foi extraído com 20 mL do solvente de cada vez (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), 5 vezes, separou-se a fase orgânica em recipientes rotulados (*F1*, *F2*, *F3* e *F4*).
2. Terminado a extração com o primeiro solvente, foi levado o extrato ao banho-maria até evaporação total do líquido extrator, logo após esperou-se o material esfriar e a extração continuou com o segundo solvente.
3. Repetiu-se esta etapa a cada extração.
4. Terminada a extração com todos os solventes, as frações *F1*, *F2*, *F3* e *F4* foram utilizadas para as pesquisa de metabólitos bioativos.

O restante do extrato deverá ser levado ao banho-maria até a evaporação total do solvente extrator e ser recomposto com o etanol 70% até 100 mL, refazendo a fração *F5*. O processo de obtenção das frações orgânicas está simplificado na figura 4.2.

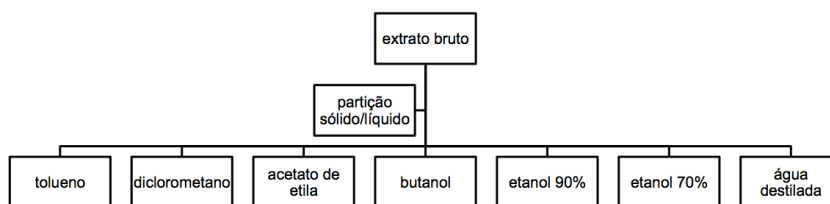


Figura 4.2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ORGÂNICAS PARA A REALIZAÇÃO DA PESQUISA DE METABÓLITOS BIOATIVOS.

Pesquisas de metabólitos bioativos nas frações

Alcalóides

Foram transferidos 10mL das frações *F1*, *F2*, *F3* e *F4* para um funil de separação e fez-se a extração com 10mL de HCl solução a 1%. O extrato clorídrico foi reunido e dividido em cinco tubos de ensaio. A pesquisa dos alcalóides foi efetuada com os reativos gerais (Reativos de Mayer, Bertrand, Bouchardat e Dragendorff), e observou-se a formação de precipitado, coloração ou turvação. O quinto tubo foi utilizado como branco-referência.

Foi transferido 10mL da fração *F5* para uma cápsula de porcelana e levada ao banho maria a 50° C, até evaporação completa. Adicionou-se ao resíduo 1mL de etanol e 5mL de solução aquosa de ácido clorídrico a 1%, filtrou-se e distribuiu-se o extrato em cinco tubos de ensaios para testar a presença de alcalóides com três gotas dos reativos Mayer, Bertrand, Bouchardt e Dragendorff, o quinto tubo usado como branco-referência.

Aminogrupos

Concentrou-se 5mL das frações (*F1*, *F2*, *F3*, *F4* e *F5* separadamente em cápsula de porcelana) até um volume final de 2mL, depositou-se três gotas em cromatoplas de sílica gel e colocou-se uma gota do reativo de Ninhidrina (seg. WAGNER, 1983) sobre a mancha das frações, levou-se à estufa a 120° C, durante 10 minutos. Observou-se o desenvolvimento de coloração.

Glicosídeos Flavônicos

i Reação de Shinoda

Foi transferido para quatro cápsulas de porcelana 5mL das frações (*F1*, *F2*, *F3* e *F4*) e evaporou-se até secura em banho-maria (60° C). Ao resíduo foi adicionado 5mL de etanol e posteriormente transferido para quatro tubos de ensaio. Adicionou-se 200mg de limalha de magnésio e lentamente 1mL de HCl concentrado. Para *F5*, transferiu-se para um tubo de ensaio 5mL, adicionou-se 200mg de limalha de magnésio e 1mL de ácido clorídrico concentrado. Observou-se o desenvolvimento da reação.

ii Reação de oxalo-bórico

Transferiu-se 5mL das frações *F1*, *F2*, *F3*, *F4* e *F5* para cápsula de porcelana e foi levada ao banho-maria até evaporação total. Ao resíduo adicionou-se 0,5mL de acetona e 30mg de uma mistura oxalo-bórica e levou-se ao banho-maria até secar. Logo após levou-se à câmara de luz UV 365nm e observou-se o desenvolvimento de fluorescência.

iii Reação de Pacheco

Transferiu-se para um copo de béquer ou cápsulas de porcelana 10mL das frações *F1*, *F2*, *F3*, *F4* e *F5*, levou-se à secura em banho-maria. Adicionou-se ao resíduo 100mg de cristais de acetato de sódio e 0,5mL de anidrido acético e aqueceu-se em uma chapa quente. Em seguida adicionou-se 0,5mL de ácido clorídrico concentrado e observou-se o desenvolvimento de coloração.

iv Reação com lentilha de zinco

Transferiu-se para um copo de béquer ou cápsulas de porcelana 10mL das frações *F1*, *F2*, *F3* e *F4* e levou-se a secura em banho-maria. Dissolveu-se o resíduo em 5mL de etanol e transferiu-se para tubos de ensaio. Adicionou-se uma lentilha de zinco e 0,5mL de HCl fumegante. Foi transferido 5mL de *F5* para um tubo de ensaio, adicionou-se uma lentilha de zinco e 0,5mL de ácido clorídrico fumegante. Observou-se o desenvolvimento de coloração.

v Reação da Leucoantocianidinas

Transferiu-se para um copo de béquer ou cápsulas de porcelana 10mL das frações *F1*, *F2*, *F3* e *F4* levou-se à secura em banho-maria Dissolveu-se o resíduo com 5mL de etanol e foi adicionado 0,5mL de ácido clorídrico concentrado e aqueceu-se até ebulição em uma chapa quente. Transferiu-se 5mL da *F5* para uma cápsula, adicionou-se 0,5mL de ácido clorídrico concentrado e aqueceu-se até ebulição. Observou-se o desenvolvimento de coloração.

Glicosídeos Antraquinônicos

Foi transferido 15mL da *F5* para um balão de refluxo, adicionado 5mL de ácido sulfúrico 1N. Acoplou-se um balão ao condensador de Liebig, mantido sob refluxo por 30 minutos, filtrou-se e adicionou-se 30mL de água destilada e transferiu-se para um funil de separação. Extraíu-se por duas vezes com 5mL de diclorometano. O extrato orgânico foi concentrado em banho-maria até que o volume fosse reduzido a 5mL, transvasou-se para um tubo de ensaio e efetuou-se a reação de Bornträeger (adicionou-se 2mL da solução aquosa de NH₄OH).

Pesquisa de Antraquinonas Livres

Foram utilizadas as frações *F1*, *F2*, *F3* e *F4* → Transferiu-se 2mL para tubos de ensaio e adicionou-se 2mL de NH₄OH e observou-se o desenvolvimento de coloração.

Cumarinas

Foi transferida para um bequer, 10mL da fração 5 e adicionado solução de ácido clorídrico 2N até a obtenção de pH ácido e reduziu-se o seu volume a 1/5 do volume inicial em banho-maria. Extraíu-se a fração duas vezes com 5mL de éter etílico como líquido extrator. Com a fração etérea efetuou-se três manchas em papel filtro, em pontos previamente determinados (1, 2 e 3), adicionou-se uma gota da solução aquosa de hidróxido de sódio 1N, recém preparada, em duas manchas, cobriu-se uma das manchas e levou-se para a câmara UV a 365nm. Deixou-se sob ação da luz UV durante 5 minutos e observou-se o desenvolvimento de fluorescência na mancha exposta (no caso a 2) e comparou-se com a mancha 1 (coberta com uma lâmina de alumínio).

O restante do extrato etéreo foi transferido para um tubo de ensaio e em seguida adicionados 5mL de hidróxido de amônio, agitou-se e observou-se na câmara de radiação ultravioleta a 365nm.

Foram concentrados 10mL das frações *F1*, *F2*, *F3* e *F4* → em cápsula de porcelana até volume final de 5mL. Foram efetuadas três manchas com as frações concentradas, em duas delas adicionou-se uma gota de NaOH 1N, recém preparada, cobriu-se a mancha 1 e levou-se à câmara de radiação UV 365nm, foram deixadas expostas durante 5min. Decorrido o tempo, foi observado se a mancha 2 exposta apresentava fluorescência, quando comparada com a mancha 1.

O restante das frações concentradas foram transferidas para tubos de ensaio, adicionou-se 5mL de hidróxido de amônio, agitou-se e observou-se na câmara de radiação ultravioleta a 365nm.

Esteroides e/ou triterpenoides

Foram transferidos 10mL de todas as frações para cápsulas de porcelana, evaporou-se a secura em banho-maria. Acrescentou-se ao resíduo 5mL de clorofórmio/diclorometano em cada cápsula das frações. Transferiu-se alíquotas de 0,1; 0,25 e 0,5mL dos extratos clorofórmico/diclorometano (das frações) para tubos de ensaios, completando o volume para 2mL com clorofórmio/diclorometano e realizou-se a reação de Liebermann-Buchard. Observou-se o desenvolvimento de coloração nos tubos.

Saponinas

Foram transferidos para cápsulas de porcelana 5mL da fração *F4* e *F5*, levou-se ao banho-maria até o volume final de 2mL. Transferiu-se para tubo de ensaio e agitou-se por três minutos e observou-se a presença de espuma. Mediu-se a altura da espuma formada. Deixou-se em repouso durante 15min e foi medida novamente a altura da espuma persistente.

Taninos

Concentrou-se em banho maria 10mL da fração *F5* até um volume de 5mL, adicionou-se ao concentrado 5mL de água destilada e efetuou-se as reações com:

i FeCl₃ a 1%

Transferiu-se 1mL de fase concentrada para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 a 3 gotas da solução aquosa de FeCl₃ a 1%, observou-se o desenvolvimento de coloração ou formação de precipitado.

ii Sulfato de ferro amoniacal

Transferiu-se 1mL da fase aquosa concentrada para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 a 3 gotas da solução aquosa 1% de sulfato de ferro amoniacal, observou-se o desenvolvimento de coloração ou formação de precipitado.

iii Cloridrato de emetina a 1%

Transferiu-se para tubo de ensaio 1mL da fase aquosa e adicionou-se 1 a 3 gotas da solução aquosa de cloridrato de emetina 1%. Observou-se e anotar a formação de precipitado ou turvação.

iv Solução de gelatina a 2,5% em NaCl a 0,9%

Transferiu-se para 3 tubos de ensaio; 0,1mL; 0,5mL e 1,0mL da fração concentrada e adicionou-se 2mL da solução de gelatina 2,5%.

Observou-se a formação de precipitados ou turvação.

Concentrou-se as frações *F1*, *F2*, *F3*, *F4* e *F5* restantes e foi guardada em frascos apropriados.

Glicosídeos antociânicos

Transferiu-se para três tubos de ensaios com *5mL* do extrato aquoso em cada tubo. O primeiro tubo foi acidificado com solução aquosa de ácido clorídrico diluído até pH próximo de 2,0 e o segundo tubo alcalinizado até pH em torno de 9,0 com hidróxido de sódio 2N e o terceiro deixou-se a pH em torno de 7,0 (neutro).

Transferiu-se para um funil de separação *10mL* do extrato aquoso e extraiu-se com *5mL* de álcool n-butílico 2 vezes. Reuniu-se as fases butílica em cápsula de porcelana e foi reduzido o volume a *5mL*, adicionou-se *0,5mL* de HCl concentrado e aqueceu-se a ebulição em uma chapa quente. Observou-se o desenvolvimento de coloração.

Glicosídeos saponínicos

Utilizou-se os três tubos da pesquisa anterior de glicosídeos antociânicos, que foram agitados energeticamente durante 3 minutos. Observou-se a formação de espuma. Anotou-se a altura da espuma formada e foi deixado em repouso durante *15min*. Após, anotou-se novamente a altura da espuma persistente.

Glicosídeos Cianogênicos

Transferiu-se para um tubo de ensaio, *5mL* do extrato aquoso e *1mL* de ácido sulfúrico 1N, sem umedecer a parede do tubo de ensaio.

Suspendeu-se uma tira de papel picrossódico com auxílio de uma rolha de cortiça e levou-se ao banho-maria a 60°C durante 30 minutos. Observou-se a mudança na tira do papel picrossódico.

Ácidos Voláteis

Transferiu-se ao tubo de ensaio *5mL* do extrato aquoso e adicionou-se *1mL* de ácido sulfúrico 1N, sem umedecer as paredes do tubo de ensaio, suspendeu-se uma fita de papel de pH e levou-se ao banho-maria a 60°C durante 15 minutos. Após, observou-se a mudança de coloração da fita de pH.

Ácidos fixos

Transferiu-se para um balão de refluxo, *20mL* do extrato aquoso e *2mL* de hidróxido de sódio 2N, foi acoplado um balão ao condensador de bolhas e deixou-se em refluxo durante 30 minutos. Após, foi acidificado com ácido sulfúrico, extraiu-se com *5mL* de éter etílico por duas vezes. Tratou-se o extrato etílico com carvão ativo, filtrou-se com papel filtro e evaporou-se até *secura* em banho-maria. O resíduo foi aquecido durante 10 minutos em estufa a 120° C. Ao resíduo adicionou-se *5mL* de solução aquosa de hidróxido de amônio 1N e transferiu-se três gotas do extrato amoniacal para o papel de filtro, de modo a se obter 3 manchas homogêneas. A seguir secou-se na estufa e foi tratado com uma gota do reativo de Nessler. Observou-se o desenvolvimento de coloração.

Taninos

A pesquisa de taninos foi efetuada através da solução aquosa a 1% de cloreto férrico, sulfato de ferro amoniacal, solução de gelatina a 2,5% em solução a 0,9% de cloreto de sódio e solução de cloridrato de emetina, conforme a reação dos aminogrupos.

Taninos hidrolisáveis e condensados

Transferiu-se *25mL* do extrato aquoso para um balão de refluxo e adicionou-se *4mL* de ácido clorídrico fumegante e *6mL* de formaldeído. Acoplou-se ao condensador e deixou-se em refluxo durante uma hora, após, filtrou-se com papel filtro.

No filtrado foi realizada a pesquisa de taninos hidrolisáveis, empregando *100mg* de acetato de sódio e gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico. Observou-se o desenvolvimento de coloração sobre o acetato de sódio.

O precipitado no papel de filtro foi lavado com etanol a 70% e sobre o precipitado gotejou-se solução aquosa de hidróxido de potássio a 5%. Observou-se o desenvolvimento de coloração no precipitado.

Aminogrupos

Concentrou-se *5mL* do extrato aquoso em cápsula de porcelana até um volume final de *2mL*, depositou-se três gotas em cromatoplasmas de sílica gel, levou-se a estufa para secar e colocou-se uma gota do reativo de Ninhidrina (seg. WAGNER, 1983) sobre uma das manchas, levou-se à estufa a 120° C, durante 10 minutos. Observou-se o desenvolvimento de coloração.

Concentrou-se o restante do extrato aquoso e reservou-se em frasco apropriado para posterior realização do perfil cromatográfico.

4.2.4 DOSAGEM DE FENÓIS TOTAIS

Para a determinação de fenólicos totais, o método utilizado foi o descrito por WANG, LEE e PENG (1997), com modificações.

A técnica baseia-se na intensidade da cor azul, formada pela redução do reagente fosfotúngstico-fosfomolibdico (reativo de Folin-Ciocalteu) em presença de álcali (carbonato de sódio). A reação determina fenóis pela ocorrência de hidroxilas fenólicas.

A partir do extrato bruto de caule e folhas frescos, no qual *20g* de cada material vegetal foram imersos em *150mL* de etanol a 70% (v/v) durante 15 dias, posteriormente os extratos foram filtrados em papel de filtro, e levados ao banho-maria até a secura. A extração para obtenção da fração acetônica foi empregada a partição sólido/líquido, com o solvente acetona 80% (aquoso), para originar um extrato fenólico na concentração de 1 g% (solução mãe). A partir da solução mãe foi realizada uma diluição para que a amostra se encontrasse na concentração de *300µg/ml* de material vegetal, a qual foi utilizada na análise.

Para a reação foi empregado *1ml* do extrato, *1ml* do reagente de Folin-Ciocalteu, *5ml* do reagente de carbonato de sódio a 20% (aquoso) e quantidade suficiente para *10ml* de água destilada. Após 20 minutos da adição do último reagente foi feita a leitura no espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1800 em *735 nm*. Como branco foi utilizado água destilada, sendo o procedimento realizado em quintuplicata.

Nesse método, a ação do reativo forma um complexo instável com os fenóis, por isso a leitura das amostras foi realizada no tempo pré-determinado (20 minutos). O padrão utilizado foi a rutina, o qual foi submetido ao mesmo tratamento, nas concentrações de 10 a *100µg/ml*, fornecendo a curva analítica.

Considerando a curva analítica do padrão, substituiu-se o valor de y da equação da reta pelo valor da absorbância da amostra. O resultado da quantificação de fenólicos totais foi expresso em mg equivalentes de rutina/ g de amostra fresca.

4.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 PREPARO DAS FRAÇÕES

Para a obtenção das frações dos extratos do material vegetal, primeiramente, foram preparados os extratos brutos de caule e folhas frescas, através da maceração a frio (preservação dos compostos termo lábeis). Para isso, 20g de cada material vegetal foram imersos em 150mL de etanol a 70% (v/v) durante 15 dias. Posteriormente os extratos foram filtrados em filtro de vidro, com papel de filtro, e levados ao rotaevaporador até a secura total sob temperatura controlada de $\pm 35^{\circ}C$. Assim, foi procedida a extração sólido/líquido com os seguintes solventes, nessa ordem, tolueno, diclorometano, acetato de etila, butanol, etanol 90% (V/V), etanol 70% (V/V) e água destilada, obtendo-se sete frações para cada material vegetal. As frações orgânicas foram levadas à secura, evaporando-se os solventes ao ar livre, enquanto que a fração aquosa foi liofilizada (ROBARDS, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003; GLOWNIAK *et al.*, 2005).

4.3.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante do caule e das folhas frescos, foi determinada por dois métodos: o método do fosfomolibdênio e o método do 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH).

Método do fosfomolibdênio

O método de redução do complexo fosfomolibdênio para a determinação da capacidade antioxidante total (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), é baseado na redução do molibdênio VI a V pela amostra em análise. Essa redução possibilita a formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente, em quintuplicata, a 695nm.

Uma alíquota de 300 μ L extrato bruto de caule e folhas, em solução etanólica a 200 μ g.mL⁻¹, foi acrescentada em um tubo de ensaio, juntamente com 3mL do reativo (molibdato de amônio a 4mmol.L⁻¹, fosfato de sódio 28mmol.L⁻¹, ácido sulfúrico 0,6mol.L⁻¹). O tubo foi fechado hermeticamente e levado ao banho-maria a 95°C por 90min.

O tubo foi resfriado e a leitura de absorbância efetuada em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1800 a 695nm contra um branco (300 μ L de etanol, acrescidos de 3mL do reativo). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico e a rutina a 200 μ g.mL⁻¹. Desta forma, uma equação da reta, do tipo $y = a.x + b$, foi estabelecida e a atividade redutora equivalente ao ácido ascórbico e rutina, substâncias reconhecidas pelo seu poder antioxidante (VAN DUJIN, 2002), foi calculada a partir dessas equações. A y foi atribuído o valor da absorbância encontrada nas amostras de caule e folhas, resultando numa mensuração da capacidade antioxidante expressa

em ácido ascórbico ou rutina. Foram realizados testes estatísticos ANOVA e Bartlett para os resultados encontrados.

Método do DPPH

O método baseia-se na utilização do radical DPPH·, um cromóforo muito estável, de cor violeta e absorção máxima em 517nm. Na presença de substâncias redutoras, como os compostos antioxidantes, ocorrem a redução do radical, alterando sua coloração de violeta para amarela, devido ao emparelhamento de seus elétrons, e a absorvibilidade em 517nm começa a diminuir. Logo, a intensidade de cor violeta lida no espectrofotômetro será inversamente proporcional à concentração de substâncias redutoras na amostra (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS, 1995; ARNAO, 2000). A atividade do radical DPPH· foi medida de acordo com o procedimento descrito por Chan e Ismail (2009), com modificações.

Para o experimento foram preparadas soluções metanólicas dos padrões, ácido ascórbico e rutina, nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/ml. As mesmas concentrações foram utilizadas também para os extratos metanólicos das folhas e caule. Já o reagente cromogênico DPPH foi preparado na concentração de 40 µg/ml em metanol.

Em uma microplaca de poliestireno com 96 orifícios foi adicionado em cada cavidade 50 µl da solução padrão em suas várias concentrações (25 a 250 µg/ml), 50 µl de metanol (controle) e 150 µl da solução de DPPH (40 µl), o experimento foi realizado em quintuplicata. A placa foi incubada em Fotômetro de Microplacas Multiskan FC - Thermo Scientific a 25°C, sendo as leituras das absorvâncias realizadas imediatamente e com intervalos de 10 minutos, durante 60 minutos em 540nm, a fim de se obter a cinética da reação. Para os extratos metanólicos das folhas e caule foi realizado o mesmo procedimento descrito acima.

A curva analítica de DPPH· foi procedida primeiramente pela diluição da solução metanólica nas concentrações de 1 a 40 µl em metanol. Em uma microplaca de 96 orifícios foi adicionado em cada cavidade 150 µl da solução de DPPH nessas concentrações, as análises foram realizadas em quintuplicata. As leituras das absorvâncias foram realizadas imediatamente e com intervalos de 10 minutos, durante 60 min, Fotômetro de Microplacas Multiskan FC - Thermo Scientific em 540nm a 25°C. A partir dos resultados confeccionou-se um gráfico da absorvância X concentração (µg/ml) e obteve-se a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (R²). A partir da equação da curva analítica e dos valores de absorvância no tempo de 30 minutos para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH remanescente), conforme a equação abaixo:

$$DPPH_{remanescente} = 100 \times \frac{[DPPH]_{t_{30}}}{[DPPH]_{t_0}}$$

Onde:

$[DPPH]_{t_{30}}$ = concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato.

$[DPPH]_{t_0}$ = concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 µg/ml.

O IC₅₀ foi calculado a partir da equação da reta de cada amostra (caule e folhas), para determinar a concentração da amostra necessária para reduzir 50% do radical DPPH presente no meio. Como substâncias-referência foram empregados os padrões ácido ascórbico e a rutina nas concentrações de 25 a 250 µg/ml em metanol.

4.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A pesquisa da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia (LABMOR) vinculado ao Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), no Setor de Ciências Agrárias, Campus Curitiba, Paraná.

Preparo das amostras

Nesse experimento foram estabelecidas a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) apresentadas pelas amostras representadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1: LISTA DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NO TESTE ANTIMICROBIANO.

CAULE	FOLHAS
extrato bruto	extrato bruto
Frações	
tolueno	tolueno
diclorometano	diclorometano
acetato de etila	acetato de etila
-	butanol
etanol 90%	etanol 90%
etanol 70%	etanol 70%
aquoso	aquoso

Com os materiais do ensaio devidamente esterilizados, foram preparadas soluções-mãe na concentração de 4mg/mL a partir de todas as amostras descritas acima, empregando como solvente a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% (v/v) em água destilada.

Preparo do meio de cultura

Para a realização dos testes de microdiluição em caldo foi utilizado Mueller-Hinton caldo como de meio de cultura para as bactérias. Pesou-se 2,1g de Mueller-Hinton que foi diluído em 100mL de água destilada, aqueceu-se até o ponto em que a mistura se encontrasse homogênea.

Distribuiu-se 25mL de meio em recipientes de vidro com tampa, fechou-se os recipientes e logo após foram levados para a autoclavagem durante 20min a 121°C .

O caldo Sabouraud foi utilizado como meio de cultura para o crescimento dos fungos leveduriformes. Pesou-se 1g de peptona e 2g de dextrose anidra, adicionando-se 100mL de água destilada. O método de esterilização e armazenamento foi realizado como descrito anteriormente.

Micro-organismos testados e preparo dos inóculos

Os microrganismos empregados foram: *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

As bactérias e as leveduras foram inoculadas em placas de Petri pequenas (90mmX15mm) contendo meio de cultura de acordo com a espécie de bactéria e levedura, para as gram-positivas utilizou-se ágar sangue e para as gram-negativas o ágar MacConkey, levou-se para a estufa a 37°C por 24 horas. Já para as leveduras utilizou-se ágar Sabouraud, e o crescimento ocorreu em temperatura ambiente num período de 48 horas.

Depois do crescimento nas placas as bactérias e leveduras foram inoculadas em 4mL de PBS (solução salina) ajustando a turbidez com a solução padrão de MacFarland de 0,5 (1.10^8 UFC/mL) e diluídos em PBS para a concentração final de 10^4 UFC/poço.

Teste de microdiluição em caldo

Para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras de caule e folhas descritas acima, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. A concentração inicialmente testada de todas as amostras foi de $500\mu\text{g/mL}$ em DMSO (dimetilsulfóxido) a 10%. Para a realização do teste utilizou-se microplacas de 96 orifícios, transparentes e de fundo chato, a figura 4.3 ilustra como as microplacas foram organizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras selecionadas.

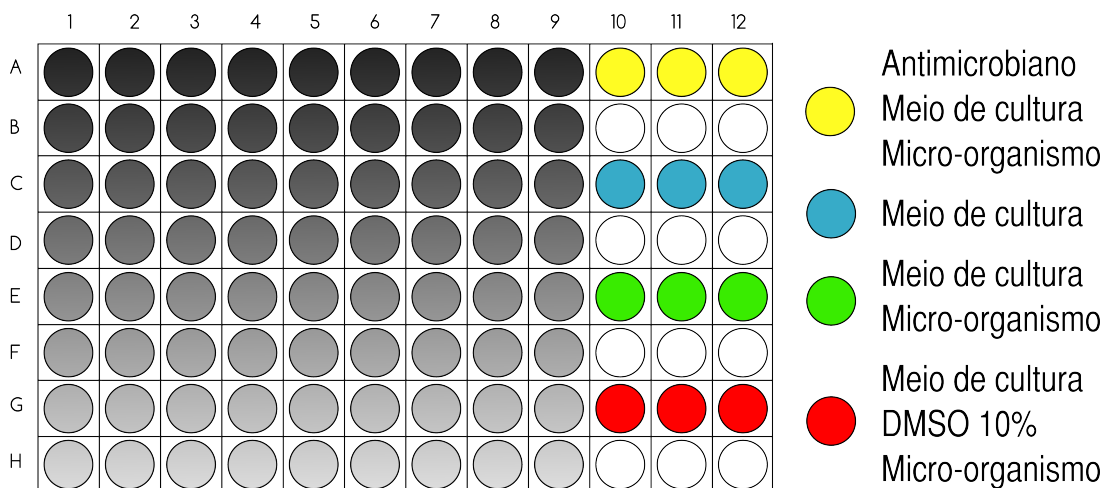


Figura 4.3: ORGANIZAÇÃO DAS MICROPLACAS PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para o teste com bactérias, utilizando o caldo de Mueller-Hinton, foram processadas diluições seriadas, para resultar em concentrações entre $1,5$ e $500\mu\text{g/mL}$ das amostras em estu-do, distribuídos em $100\mu\text{L}$ em cada orifício da microplaca, estéril, de 96 poços. Em seguida, foram adicionados $5\mu\text{L}$ dos inóculos bacterianos, contendo 5×10^5 UFC/mL de cada bactéria, e as placas foram incubadas em aerobiose a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Decorrido o tempo, adicionaram-se $10\mu\text{L}$ de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) (5% v/v) em metanol, à cada cavidade das microplacas utilizadas, que foram levadas para incubação em aerobiose durante

30min a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, para verificar o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando cloranfenicol, a $30\mu\text{g}/\text{mL}$, como antimicrobiano padrão.

No teste com leveduras foi empregado o meio Sabouraud Dextrose, do qual foram processadas diluições seriadas, resultando nas concentrações entre 500 a $1,5\mu\text{g}/\text{mL}$ das amostras em estudo, distribuídas em $100\mu\text{L}$ em cada orifício da microplaca. Posteriormente, foram somados $100\mu\text{L}$ de inóculo, com $2,5 \times 10^3 \text{ UFC}/\text{mL}$ da levedura testada, e as placas incubadas a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. O crescimento dos microrganismos, também, foi analisado adicionando-se $10\mu\text{L}$ de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) e levando as placas para incubação em aerobiose durante 30min a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os testes foram realizados em triplicata, empregando nistatina, a $22,7\text{mg}/\text{mL}$ como padrão.

Para determinar a CIM, foi considerada a menor concentração de agente antimicrobiano que impediu o crescimento dos micro-organismos, tanto para as bactérias quanto para a levedura. As amostras que apresentaram valores de CIM menores que $10\mu\text{g}/\text{mL}$ foram considerados excelentes; valores entre 10 e $100\mu\text{g}/\text{mL}$ bons e valores entre 100 e $500\mu\text{g}/\text{mL}$ atividade moderada. Valores acima de $500\mu\text{g}/\text{mL}$ são considerados de fraca atividade (MACHADO *et al.*, 2005).

A CBM e a CFM foram avaliadas repicando $10\mu\text{L}$ dos poços que possuíam a CIM e dos poços com as duas concentrações maiores, em placas contendo o meio MuellerHinton para as bactérias (incubação de 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e meio Sabouraud dextrose para a levedura (incubação de 24 horas a 26°C). A CBM e CFM são aquelas que não apresentam crescimento microbiano visível após a repicagem, indicando a morte de 99,5% dos microrganismos presentes no inóculo. As amostras que demonstrarem crescimento dos microrganismos após a repicagem para o teste de CBM ou CFM foram consideradas com efeito bacteriostático e fungistático, respectivamente (VELJIC *et al.*, 2010).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material vegetal coletado foi identificado por GUIMARÃES, E. F., pertencendo ao reino Plantae, superdivisão Spermatophyta, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliide, ordem Piperales, família Piperaceae, subfamília Peperomioideae, gênero *Peperomia* e espécie *Peperomia armondii*. A exsicata foi armazenada no herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), coleção B. Moriel *et al.* número 2, (FUEL 44.424).

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

5.2.1 DIAGNOSE MACROSCÓPICA

O material em estudo é uma erva com ramos longos e rastejantes, figura 5.1a. O caule é piloso, figura 5.9, com entrenós distando de 1,5 a 4cm, diâmetro de 2 a 3mm e presença de raízes adventícias longas saindo dos nós.

As folhas, figura 5.1c apresentam disposição alternada, com pecíolos de 0,7 a 1mm de comprimento, a lâmina foliar é do tipo ovada com 3 a 5cm de comprimento e 2 a 2,6cm de largura, pilosa em ambas as faces, ápice abruptamente acuminado e ciliada na margem. Presença de alguns pontos glandulares na face abaxial, nervura central com dois ou três ramos delgados em cada lado e com um par adicional próximo da porção central, nervura central com discretos ramos menores para cima e com um nervo submarginal delgado.

A inflorescência é um espiga terminal, figura 5.1b, longa, solitária com 6 a 12cm de comprimento, sustentada por um pedúnculo de 2mm, viloso e com brácteas arredondadas pel-tadas. Os frutos são em forma de drupas cilíndricas, glabras, providas de escudo no ápice com estigma central de 1 a 2mm de comprimento (GUIMARÃES, 1984; ZANOTTI, 2010).

5.2.2 DIAGNOSE MICROSCÓPICA

A epiderme foliar é unisseriada em ambas as faces, figuras 5.2a, 5.2b, em vista frontal, com células de formato poligonal, figuras 5.2c, 5.2d.

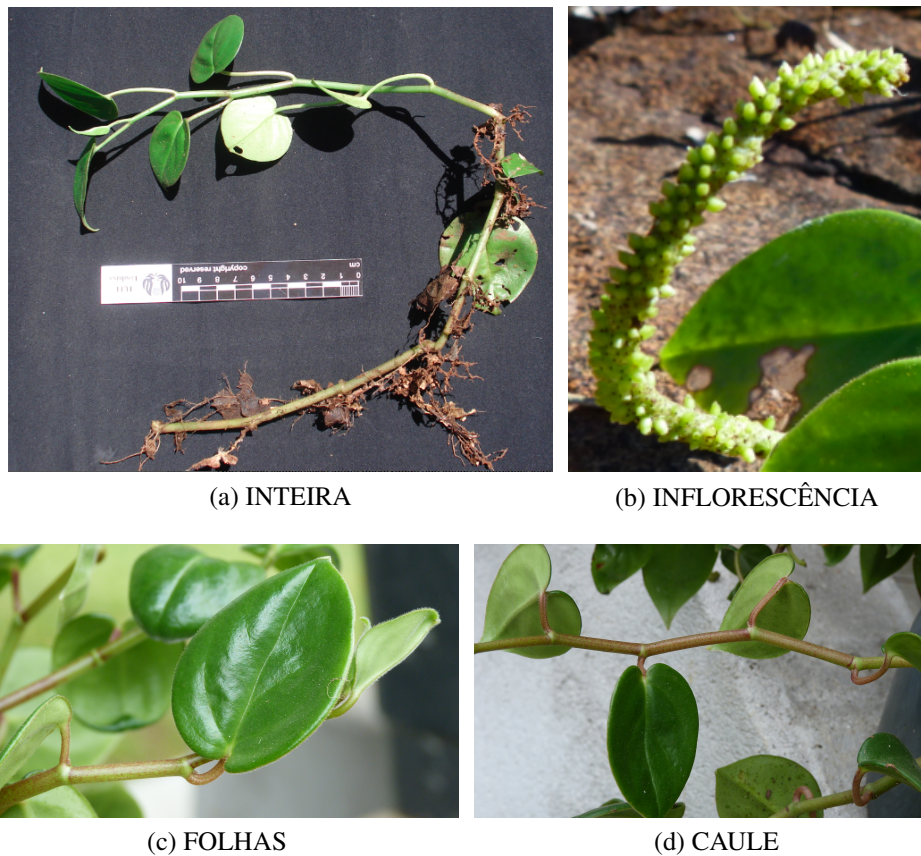


Figura 5.1: ÓRGÃOS VEGETATIVOS DE *Peperomia armondii*.

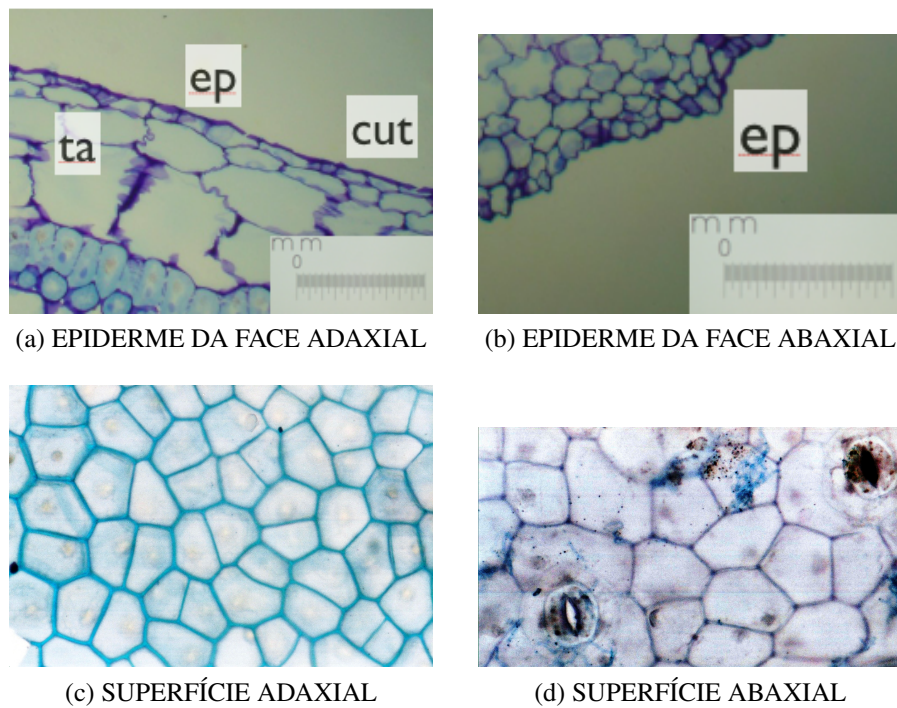


Figura 5.2: (a) E (b) EPIDERME EM CORTE TRANSVERSAL. (c) E (d) EPIDERME EM VISTA FRONTAL. SUPERFÍCIE ABAXIAL COM ESTÔMATOS ANISOCÍTICOS. ABREVIACÕES – cut: CUTÍCULA, ep: EPIDERME, ta: TECIDO AQUÍFERO.

Em ambas as faces a epiderme foliar é revestida por uma fina cutícula lisa, figuras 5.3a, 5.3b, e provida de tricomas tectores multicelulares, unisseriados, figuras 5.5. A folha é hipoestomática, com estômatos do tipo anisocíticos localizados no mesmo nível que as células epidérmicas, figura 5.7.

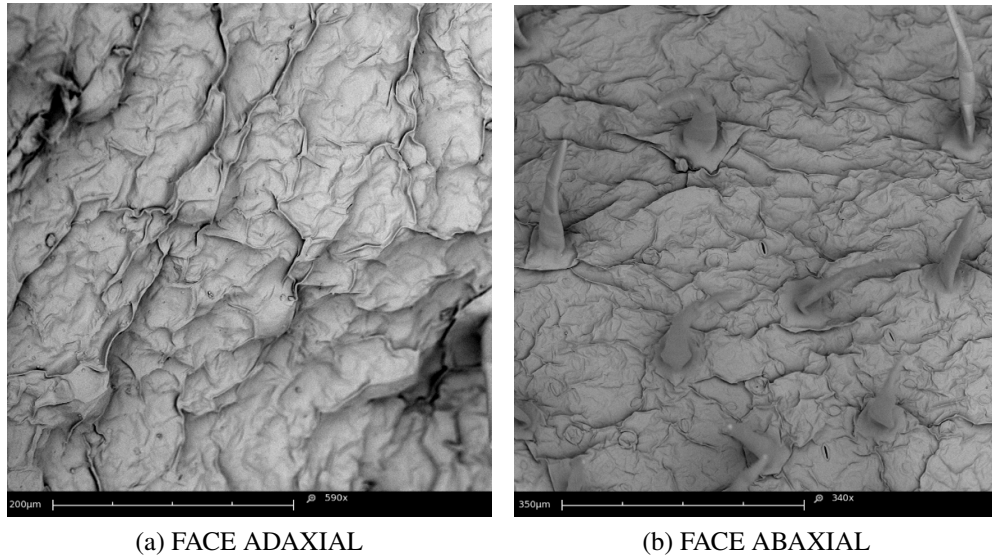


Figura 5.3: CUTÍCULA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.

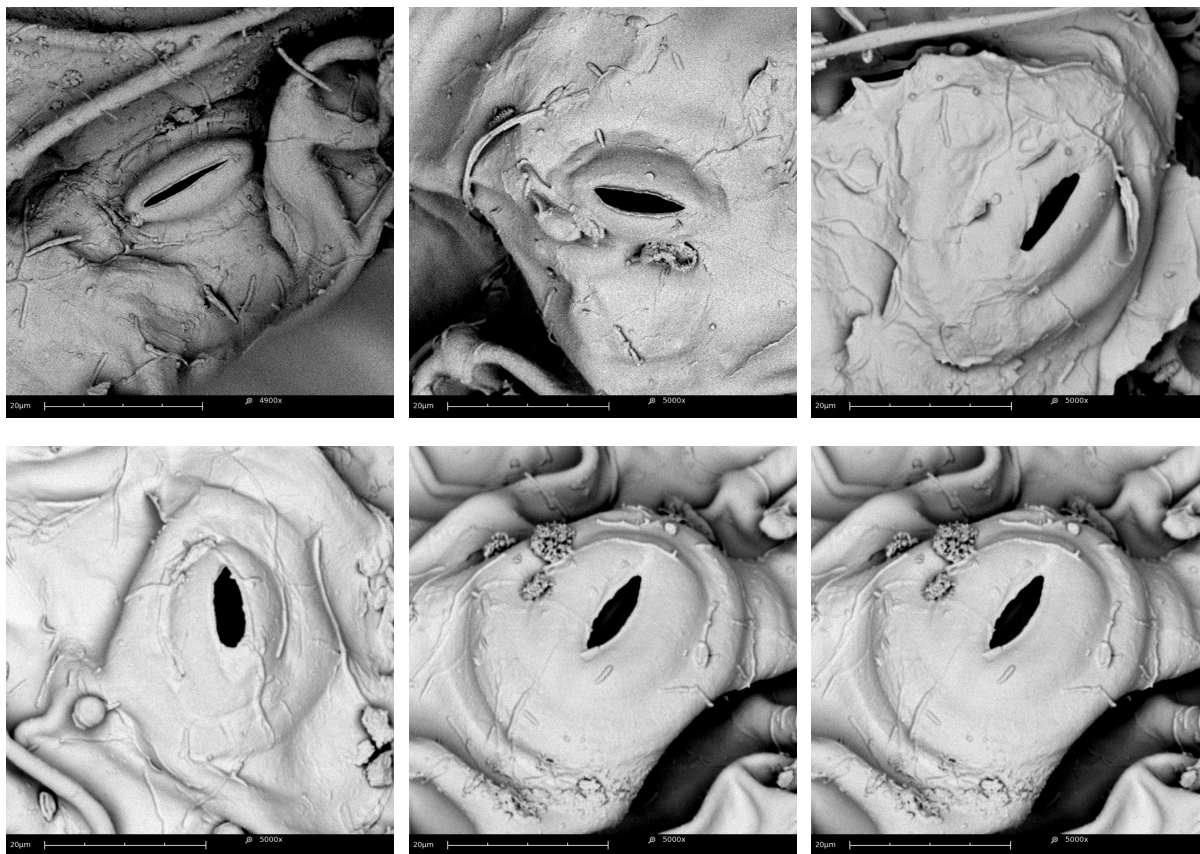


Figura 5.4: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS ESTÔMATOS ANISOCÍTICOS NA FACE ABAXIAL.

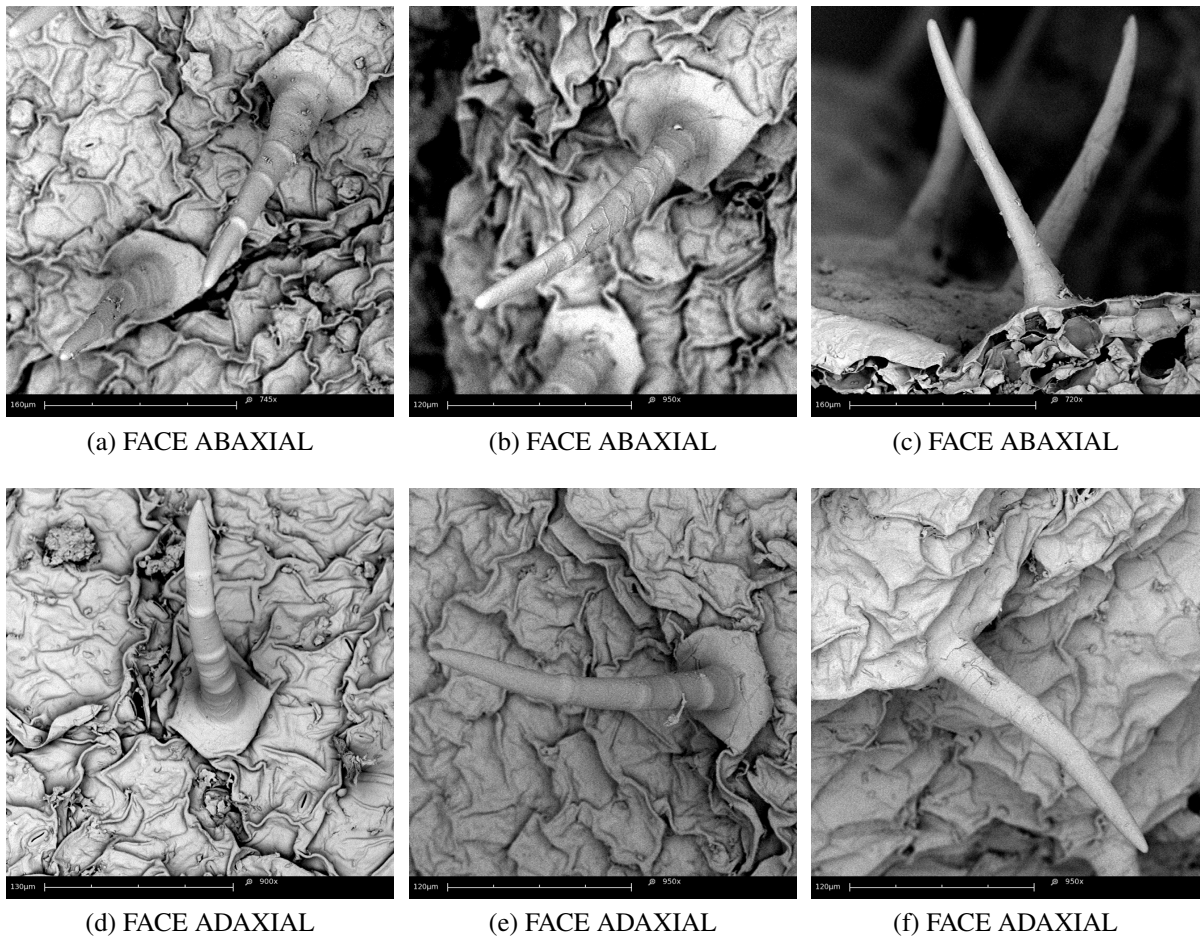


Figura 5.5: TRICOMAS TECTORES MULTICELULARES EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. A, B e C - FACE ABAXIAL; D, E e F - FACE ADAXIAL

O mesofilo é do tipo dorsiventral onde, abaixo da epiderme encontram-se três camadas desorganizadas de tecido aquífero, figura 5.2a, oriundo de divisões das células protodérmicas na face adaxial consequentemente, uma epiderme múltipla. As células dessa camada apresentam um citoplasma escasso e vacúolo preponderante, salientando sua função de reserva de água (TAKEMORI, 2003).

O parênquima paliçádico é uniestratificado, rico em idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio, figura 5.6. O parênquima lacunoso é pluriestratificado, contendo idioblastos providos de ráfides, figura 5.7b.

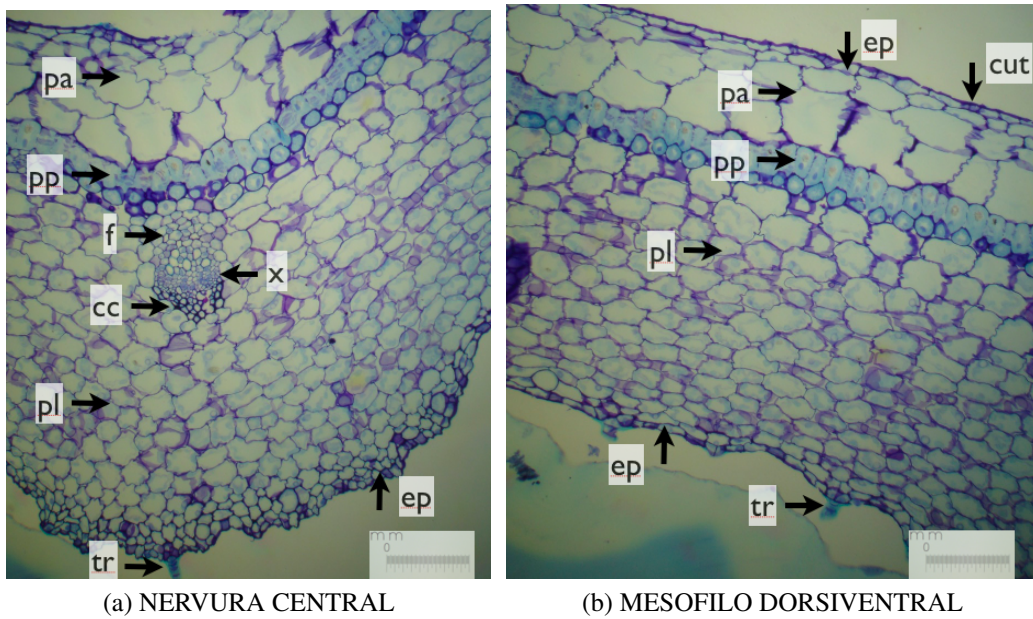


Figura 5.6: LÂMINA FOLIAR EM CORTE TRANSVERSAL. ABREVIACÕES – pa: PARÊNQUIMA AQUÍFERO, pp: PARÊNQUIMA PALIADICO, x: XILEMA, f: FLOEMA, cc: CÉLULAS COLENQUIMÁTICAS pl: PARÊNQUIMA LACUNOSO, ep: epiderme, tr: tricoma, cut: cutícula.

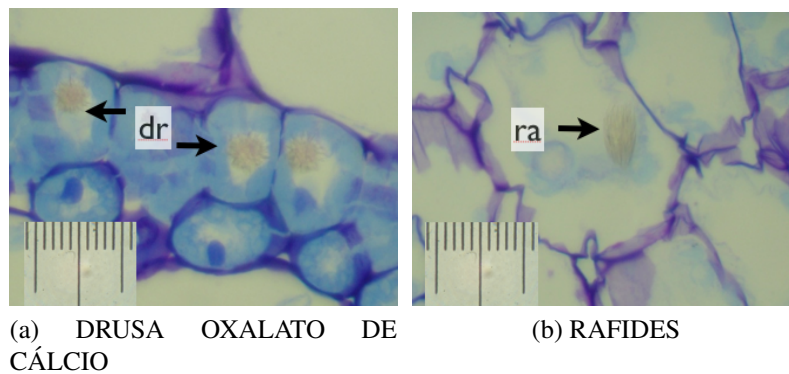


Figura 5.7: MESOFILO *Peperomia armondii* Yunck. A - DRUSAS DE OXALATO DE CÁLCIO. B - RFIDES.

ABREVIACÕES – dr: DRUSAS e r: RFIDES.

O feixe vascular da nervura central  do tipo colateral, opostamente ao floema verifica-se a presença de células colenquimáticas, figura 5.8.

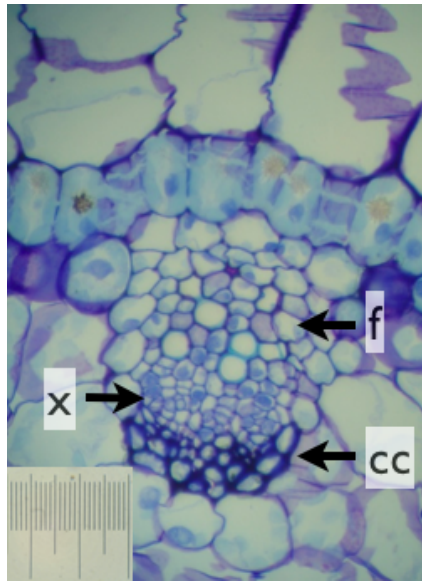


Figura 5.8: NERVURA CENTRAL FOLIAR. ABREVIACOES – x: XILEMA, f: FLOEMA e cc: CÉLULAS COLENQUIMÁTICAS.

No caule, a epiderme  uniestratificada envolta por uma fina camada de cutícula, internamente, seguem várias camadas de colênquima angular. Os feixes vasculares são colaterais e estão dispersos no parênquima, caracterizando uma estrutura atactostlica, figura 5.9.

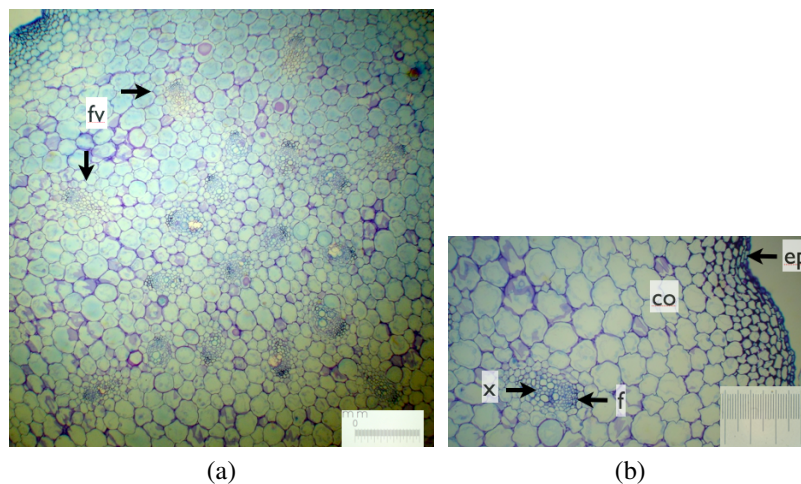


Figura 5.9: CAULE EM CORTE TRANSVERSAL. ABREVIACOES – fv: feixe vascular, f: FLOEMA, x: XILEMA, co: CÓRTEX, ep: EPIDERME.

Histoquímica

Substâncias graxas estão presentes na superfície foliar, a figura 5.10 evidencia a cutícula recobrando a epiderme e os tricomas tanto na face adaxial como na face abaxial.

Compostos fenólicos estão presentes tanto no parênquima paliádico quanto no lacunoso da lâmina foliar, ilustrados pela figura 5.11. Amiloplastos são frequentes no parênquima lacunoso, figura 5.12.

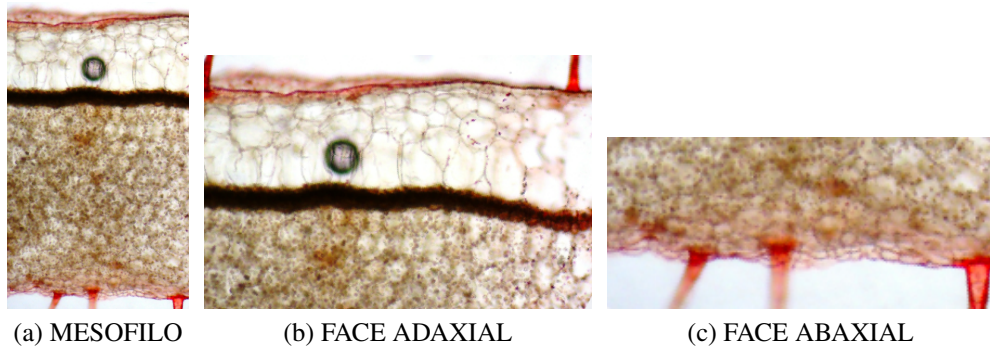


Figura 5.10: FOLHA EM CORTE TRANSVERSAL CORADO COM SUDAM III.

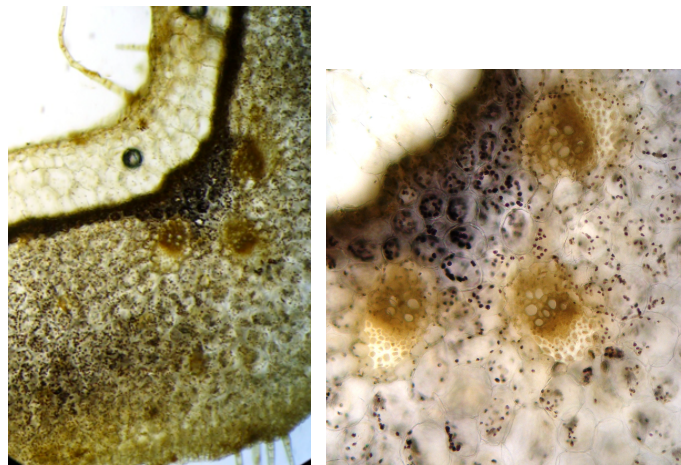


Figura 5.11: FOLHA EM CORTE TRANSVERSAL CORADO COM LUGOL.

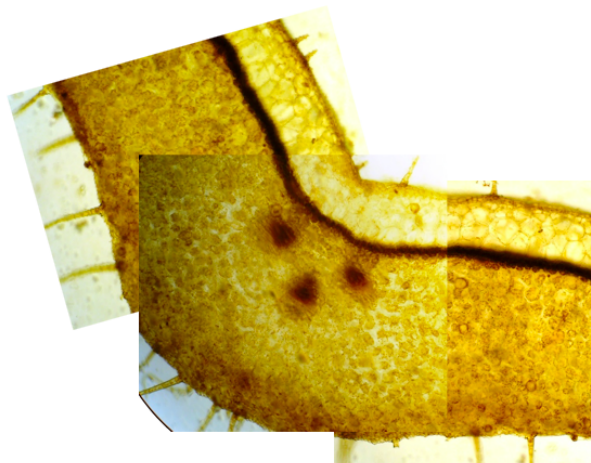


Figura 5.12: FOLHA EM CORTE TRANSVERSAL CORADO COM CLORETO FÉRRICO.

5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.3.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

Características Organolépticas

As características organolépticas demonstradas pelos extratos hidroalcoólicos e aquosos preparados a partir do caule e folhas frescas estão apresentados na tabela 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1: CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Peperomia armondii*.

Extrato	pH	Cor	Odor
Caule	5,0	marrom	aromático
Folhas	5,0	verde	aromático

Tabela 5.2: CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DO EXTRATO AQUOSO DE *Peperomia armondii*.

Extrato	pH	Cor	Odor
Caule	7,0	marrom	aromático
Folhas	7,0	marrom	aromático

Teor de sólidos das folhas e caule

As folhas e caule de *Peperomia armondii* apresentaram um teor de sólidos extraídos dos extratos hidroalcoólicos (%) que pode ser observado na tabela 5.3.

Tabela 5.3: TEOR DE SÓLIDOS EXTRAÍDOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (%) DO CAULE E FOLHAS DE *P. armondii*.

Extrato	Teor de sólidos (%)
Caule	0,499
Folhas	0,429

Detecção dos compostos presentes

Nos testes fitoquímicos foram observadas nas folhas esteroides, triterpenos e alcaloides, no caule, glicosídeos antociânicos, bem como a presença de flavonoides e aminogrupos em ambos.

Tabela 5.4: BIOATIVOS DETECTADOS NOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E/OU FRAÇÕES DE FOLHAS E CAULE DE *Peperomia armondii*.

Metabólito Secundário	Folhas	Caule
Alcaloides		
Reativo de Mayer	Positivo	Negativo
Reativo de Dragendorff	Negativo	Negativo
Reativo de Bouchardat	Positivo	Negativo
Reativo de Bertrand	Positivo	Negativo
Flavonoides		
Reação de Shinoda	Positivo	Negativo
Reação de Pacheco	Negativo	Positivo
Reação Oxalo-bórica	Positivo	Positivo
Reação com Zinco	Negativo	Negativo
Leucoantocianidinas	Negativo	Positivo
Cumarinas	Negativo	Negativo
Antraquinonas		
Reação de Bornträger	Negativo	Negativo
Esteroides e/ou Triterpenos		
Reação de Lieberman-Burchard	Positivo	Positivo

Tabela 5.5: METABÓLITOS VEGETAIS DETECTADOS NOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS E CAULE DE *Peperomia armondii*.

Metabólito Secundário	Folhas	Caule
Glicosídeos antociânicos	Negativo	Negativo
Glicosídeos saponínicos	Negativo	Negativo
Taninos		
Reação com cloreto férrico	Negativo	Negativo
Reação com gelatina 2,5%	Negativo	Negativo
Reação com sulfato de ferro	Negativo	Negativo
Reação com cloridrato de emetina	Negativo	Negativo
Reação com cianeto de potássio	Negativo	Negativo
Reação com dicromato de potássio	Positivo	Negativo
Reação de Staniasny		
Taninos condensados	Negativo	Negativo
Taninos hidrolisáveis	Negativo	Negativo
Aminogrupos	Positivo	Positivo

Nenhum estudo fitoquímico foi realizado com esta espécie, porém alguns estudos fitoquímicos foram feitos com o gênero *Peperomia*, dentre os metabólitos secundário mais comumente encontrados neste gênero estão: flavonóides (AQIL, 1993), derivados benzopiranos (SEERAM, 1998; MBAH, 2002; SALAZAR, 2005), secolignanas (CHEN, 1989; MANACHE 1996; GOVINDACHARI, 1998), terpenos, arilpropanoídes, compostos fenólicos (TANAKA, 1998; MOREIRA, 1999; BAYMA, 2000; LI, 2003) e óleos essenciais (BESSIERE, 1994; SILVA, 1999, ZOGHBI, 2005). Os metabólitos secundários encontrados no trabalho confirmam os dados encontrados na literatura, porém a presença de alcaloides encontrada nesta espécie sendo ocorre mais comumente em espécies do gênero *Piper* (DODSON, 200).

5.3.2 ÓLEO ESSENCIAL

Rendimento

Foram realizadas coletas nas estações do outono, primavera e inverno, o rendimento de cada extração está disposto na tabela 5.6.

Tabela 5.6: RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS E CAULE FRESCOS EM DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.

Estação	Caule	Folhas
Outono	0,002	0,002
	0,01 ^s	0,008 ^s
Primavera	0,002	0,002
Inverno	0,003	0,0023

^s: folhas e caule secos

Pode-se observar que o rendimento das folhas permaneceu praticamente constante durante as estações do ano, sendo mais elevado quando a extração é realizada com as folhas secas, embora maiores conclusões não podem ser tomadas já que a extração com esse tipo de material foi realizada somente no outono. O rendimento do caule apresenta-se ligeiramente maior no inverno, época em que o vegetal prepara-se física e quimicamente para um período de condições ambientais adversas.

Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

A identificação dos componentes do óleo essencial de *Peperomia armondii* foi realizada no laboratório de química da Universidade Federal do Paraná. Os gráficos dos espectros, obtidos pela cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas da amostra de óleo essencial do caule e das folhas de *Peperomia armondii* estão representados nas figuras 5.13 e 5.14, respectivamente. A composição química, o índice de Kovats (IK) e quantidade (%) de cada componente das amostras de caule e folhas está representada nas tabelas 5.7 e 5.8.

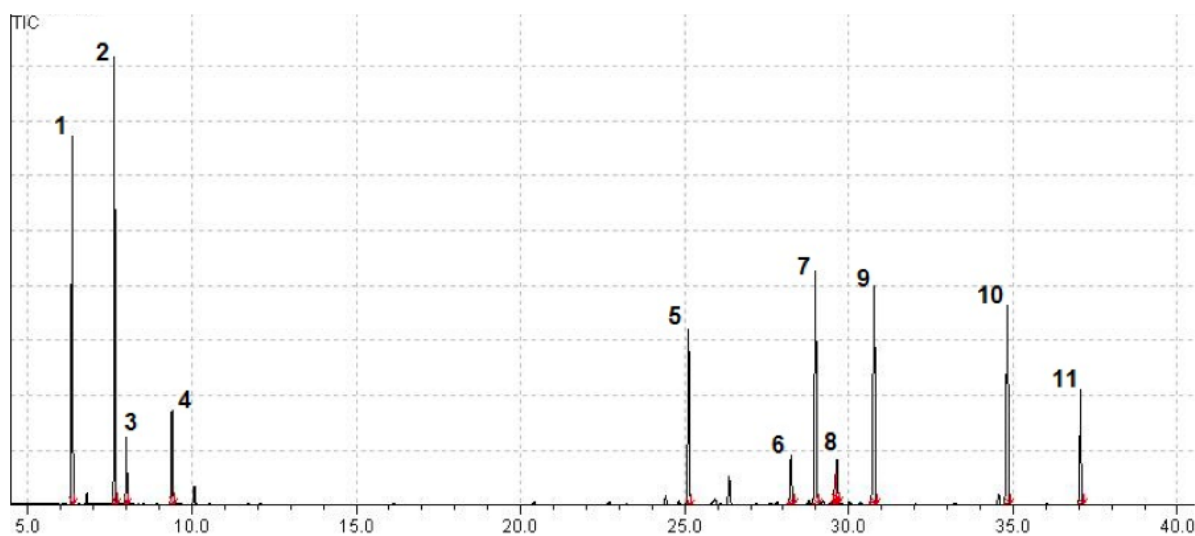


Figura 5.13: CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE CAULE IDENTIFICADO POR ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.

Tabela 5.7: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CAULE DE *Peperomia armondii*

PICO	IK	COMPOSTO	QUANTIDADE
1	935	α -pineno	13,48
2	980	β -pineno	18,59
3	992	β -mirceno	2,65
4	1030	limoneno	4,24
5	1396	β -elemeno	9,63
6	1469	9-epi-(E)-cariofileno	2,91
7	1486	germacreno D	13,5
8	1502	(E, E)- α -farneseno	2,35
9	1530	ácido carbamico	13,06
10	1631	dilapiol	11,6
11	1689	apiol	6,48

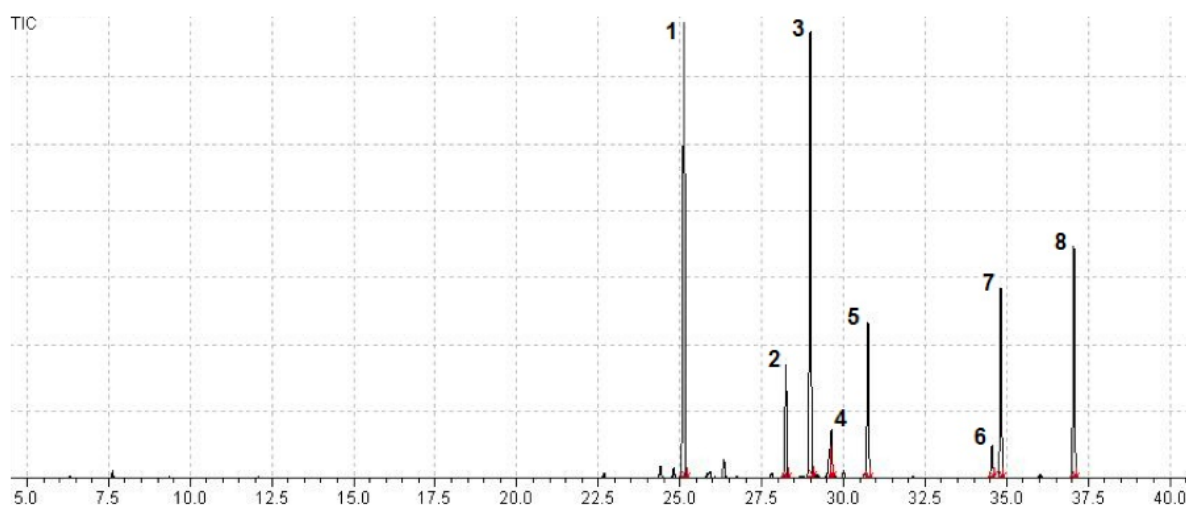


Figura 5.14: CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE FOLHAS IDENTIFICADO POR ESPECTÔMETRO DE MASSAS.

Tabela 5.8: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Peperomia armondii*

PICO	IK	COMPOSTO	QUANTIDADE
1	1397	β -elemeno	27,31
2	1469	9-epi-(E)-cariofileno	6,35
3	1487	germacreno D	28,66
4	1502	(E, E)- α -farneseno	2,4
5	1529	ácido carbamico	8,72
6	1624	não identificado	1,65
7	1631	dilapiol	11,12
8	1689	apiol	13,79

Os óleos essenciais do caule e das folhas mostraram-se bastante semelhantes entre si, diferindo em alguns compostos e suas quantidades. No caule os compostos majoritários são: β -pineno (18,59%), germacreno D (13,5%), α -pineno (13,48%), ácido carbâmico (13,06%) e dilapiol (11,6%). Já nas folhas os principais constituintes são: germacreno D (28,66%), β -elemeno (27,31%), apiol (13,79%) e dilapiol (11,12%).

Os elementos presentes no óleo essencial do caule e das folhas foram também encontrados no óleo essencial de outras espécies do gênero *Peperomia*, fato este que pode ser comprovado no estudo realizado por da Silva *et al.* (1999), neste foi observada presença de limoneno (0,4%), (E)-cariofileno (10,7%), germacreno D (2,7%), (E,E)- α -farnaseno (2,2%), dilapiol (19,7%), apiol (2,3%), entre outros compostos em ***Peperomia pellucida*** Kunth., na espécie ***Peperomia circinnata*** Link var. *circinnata* foram encontrados α -pineno (0,4%), β -pineno (1,6%), limoneno (13,5%), β -elemeno (3,0%), (E)-cariofileno (1,5%), germacreno D (0,5%) entre outros.

Estes mesmos compostos podem ser encontrados também em *Peperomia blanda* Kunth e *Peperomia rupestris* var. *rupestris* Humb. Bonpl. & Kunth, destacando-se o germacreno D (3,5%) e (14,95%), (E)-cariofileno (3,32%) e (9,69%), respectivamente (dos SANTOS, 2001).

Um dos compostos das folhas não foi possível ser identificado pelos métodos utilizados no trabalho, não foi encontrado na literatura nenhum espectro de massa semelhante, nem na biblioteca do aparelho empregado para a realização da cromatografia. Para a sua identificação seria necessário o fracionamento do óleo essencial ou enriquecimento desse composto, pela obtenção de frações puras, através do fracionamento em coluna cromatográfica. Por ser um trabalho inédito fica difícil a identificação desse composto, já que não há dados na literatura para comprovação sendo esta análise realizada através da comparação dos dados de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero (BAYMA, 2000; LAGO, 2007), além de algumas informações que são características da família (FAZOLIN, 2005; SOUSA, 2007).

5.3.3 FENÓIS TOTAIS

Os compostos fenólicos são todas as estruturas que possuem pelo menos um único núcleo benzenico com uma ou mais hidroxilas, livres ou fazendo parte de ésteres, éteres ou heterosídeos. São derivados do metabolismo do ácido chiquímico e/ou de um poliacetato. Destacam-se pela suas ações farmacológicas os ácidos fenólicos, os compostos cumarínicos, os flavonoides, os taninos e os compostos quinônicos (CUNHA, 2010).

A origem biossintética dos compostos fenólicos deriva de duas vias metabólicas: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. A via do ácido chiquímico se origina a partir deste ácido, cuja biossíntese tem início na condensação do fosfenolpiruvato com 4-fosfo-eritrose. O ácido chiquímico origina ácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), que pela reação de desaminação formam ácidos cinâmicos e seus derivados mais complexos. A via do acetato origina ácido β -policetometilénicos com comprimento diverso, por ciclização (reação de Claisen ou condensação aldônica) originando compostos fenólicos (CUNHA, 2010).

Alguns compostos fenólicos apresentam coloração, outros por exposição a luz ultravioleta tornam-se fluorescentes. São várias as reações de coloração empregadas na identificação dos compostos fenólicos, diretamente ou após o isolamento por processos cromatográficos. Podemos destacar os reagentes contendo cloreto férrico, vanilina e outros aldeídos em meio ácido. A cromatografia líquida é bastante utilizada para a identificação e dosagem de fenólicos, sendo mais precisa quando faz-se o uso de cromatógrafo acoplado a espectrofotômetro de ultravioleta/visível, incluindo os detectores de matriz de diodos ou espectro de massas (CUNHA, 2010).

O teor de fenólicos totais presente nas amostras foi expresso em *mg* em equivalentes de rutina (ER) por *g* de material vegetal (MV). A equação da reta foi obtida através dos dados da curva analítica da rutina (padrão referência), apresentada no gráfico abaixo. Substituindo o *y*, da equação da reta, pelo valor de absorvância apresentado pela amostra obteve-se a concentração de compostos fenólicos totais.

Figura 5.15: GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO RUTINA PARA DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS.

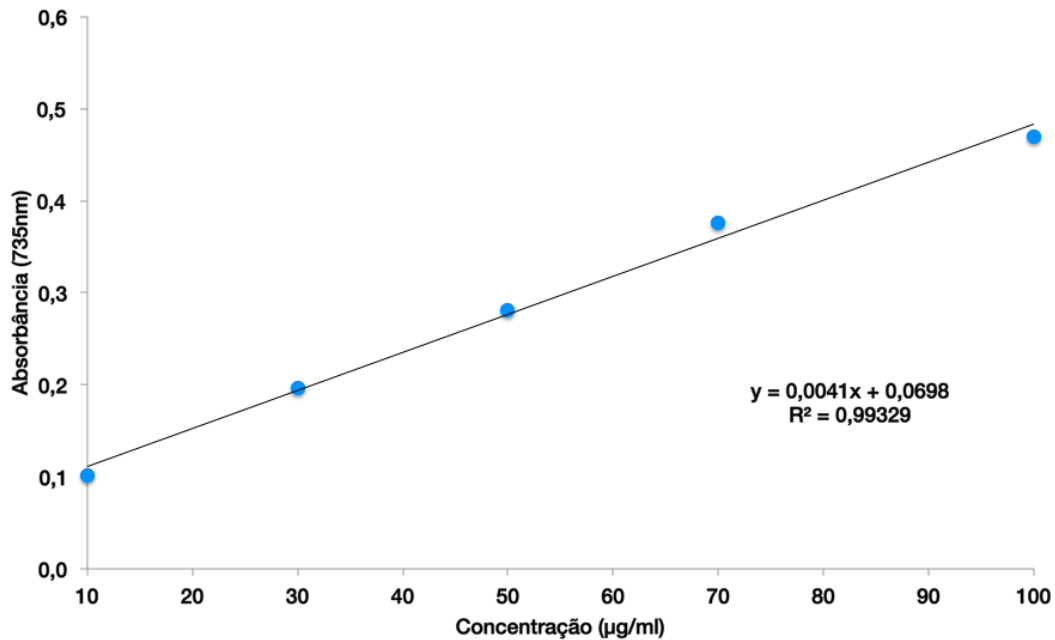


Tabela 5.9: FENÓLICOS TOTAIS DE CAULE E FOLHAS DE *Peperomia armondii*.

AMOSTRA	FENÓIS TOTAIS (mgER/gMV)
Caule	139,8374 ± 10,4021
Folhas	105,6911 ± 8,7072

As diferentes concentrações de compostos fenólicos encontradas nos materiais vegetais podem ser explicadas segundo Santos (2007). A origem dos metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação, onde cada processo é regulado por genes e influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia e ambiente. Porém, a maioria dos mecanismos reguladores dos processos de biossíntese, estocagem e degradação ainda permanecem desconhecidos.

Em muitas espécies, o sítio da biossíntese dos metabólitos secundários é restrito a um órgão, enquanto que aqueles são acumulados em todo o vegetal ou em determinados órgãos, providos de um sistema de transporte intracelular. Os metabólitos mais hidrofílicos tendem a ser armazenados em vacúolos, enquanto que os hidrofóbicos se aglomeram em ductos de células mortas, ou aderem-se aos componentes lipofílicos da célula, como membranas, ceras cuticulares e lignina.

5.4 BIOATIVIDADES

5.4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

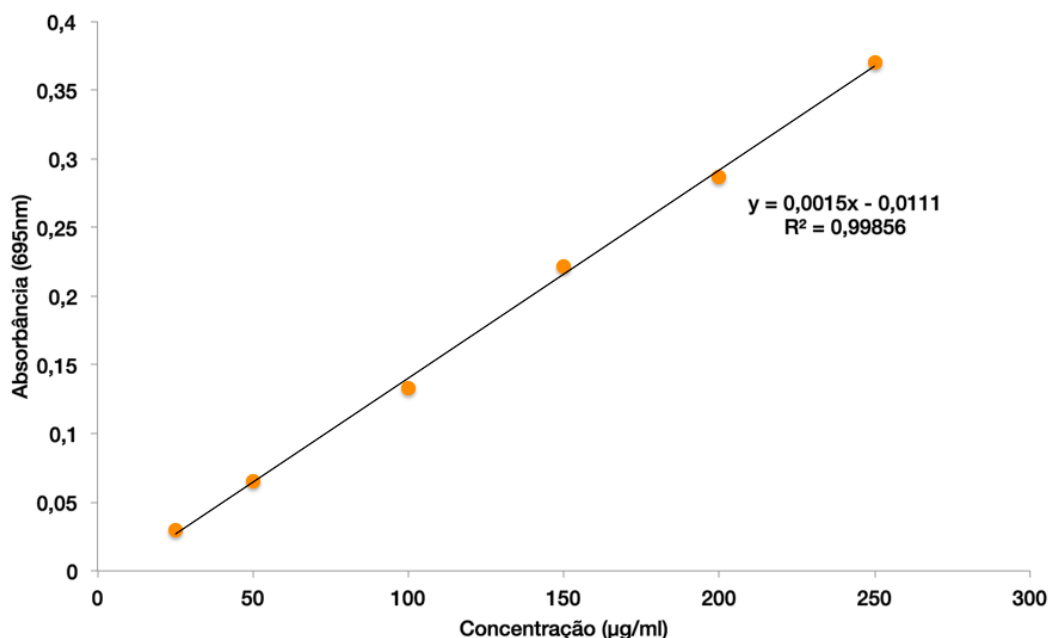
Método do fosfomolibdênio

Esta metodologia baseia-se na redução em meio ácido do molibdênio VI (Mo^{6+}) de cor amarelada quando em solução, levando a formação de um complexo de coloração azul, cuja intensidade é diretamente proporcional a extensão de redução do molibdato (TRIPATHI, 2002; THAIPONG, 2006).

O mecanismo de reação proposto por Shukor (TRIPATHI, 2002; THAIPONG, 2006) está associado a formação de fosfomolibdato com intermediário entre molibdato e o complexo azul de molibdênio. A formação desse intermediário é favorecida pela acidez da solução e a presença de íons fosfato. Nessas condições, os íons molibdato podem combinar-se entre si formando poliíons, como $[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$, $[\text{Mo}_8\text{O}_{26}]^{4-}$ e $[\text{Mo}_{12}\text{O}_{37}]^{2-}$. Estes íons na presença de agentes redutores podem ser reduzidos e formar o complexo azul isopolimolibdênio, sendo os valores de absorvância lidos em comprimento de onda de 695nm.

O gráfico analítico do padrão ácido ascórbico utilizado para comparação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos do caule e folhas está representado na figura 5.16.

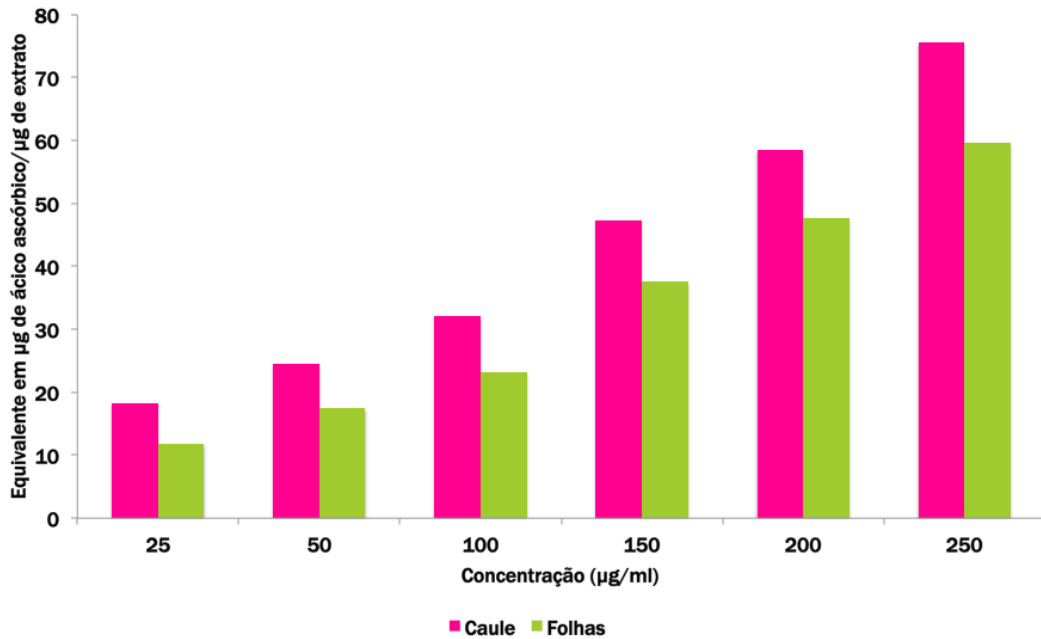
Figura 5.16: GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO NO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.



A capacidade antioxidante dos extratos metanólicos de caule e folhas está representada na figura 5.17, neste a capacidade antioxidante está expressa em equivalentes de μg de ácido ascórbico/ μg de extrato metanólico de caule e folhas em suas diferentes concentrações testadas

(25, 50, 100, 150 200 e 250 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 5.17: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE CAULE E FOLHAS FRENTE PADRÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.



A partir dos resultados obtidos foi realizado o teste ANOVA o qual tem como objetivo verificar se existe alguma diferença significativa entre as médias dos parâmetros mensurados, padrão ácido ascórbico e extratos metanólicos de caule e de folhas. O teste de Bartlett foi utilizado para verificar a homogeneidade das populações e usado para confirmar ou não a hipótese observada no teste ANOVA.

Nas tabelas 5.10, 5.11 e 5.12 estão representados os valores obtidos pelos extratos metanólicos do caule e folhas em relação padrão ácido ascórbico, pelo teste ANOVA.

Tabela 5.10: TESTE DA HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DO CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO. Abreviações – F: variância entre os grupos, df_1 : grau de liberdade tratamento, df_2 : grau de liberdade residual.

Amostra	F	df_1	df_2	valor de p
Caule	877,4	11	48	<0,0001
Folhas	972,1	11	48	<0,0001

Tabela 5.11: ANOVA DAS AMOSTRAS DE CAULE FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO. Abreviações – SS: soma de quadrados, df: grau de liberdade, MS: média dos quadrados.

CAULE	SS	df	MS
Tratamento	0,7238	11	0,0658
Residual	0,0036	48	0,00007499
Total	0,7274	59	

Tabela 5.12: ANOVA DAS AMOSTRAS DE FOLHAS FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO. Abreviações – SS: soma de quadrados, df: grau de liberdade, MS: média dos quadrados.

FOLHAS	SS	df	MS
Tratamento	0,7775	11	0,07069
Residual	0,00349	48	0,00007272
Total	0,781	59	

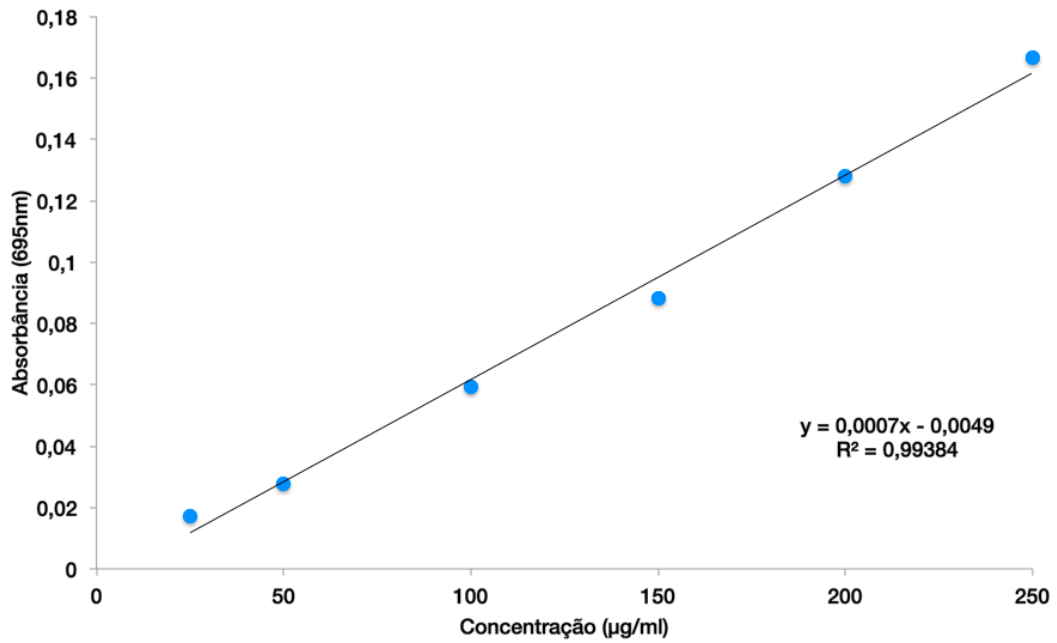
A tabela 5.13 representa os valores obtidos pelos extratos metanólicos do caule e folhas em relação padrão ácido ascórbico, pelo teste de BARTLETT.

Tabela 5.13: TESTE DE BARTLETT PARA AS AMOSTRAS DE CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO.

Amostra	Valor
Caule	43,57
Folhas	47,16

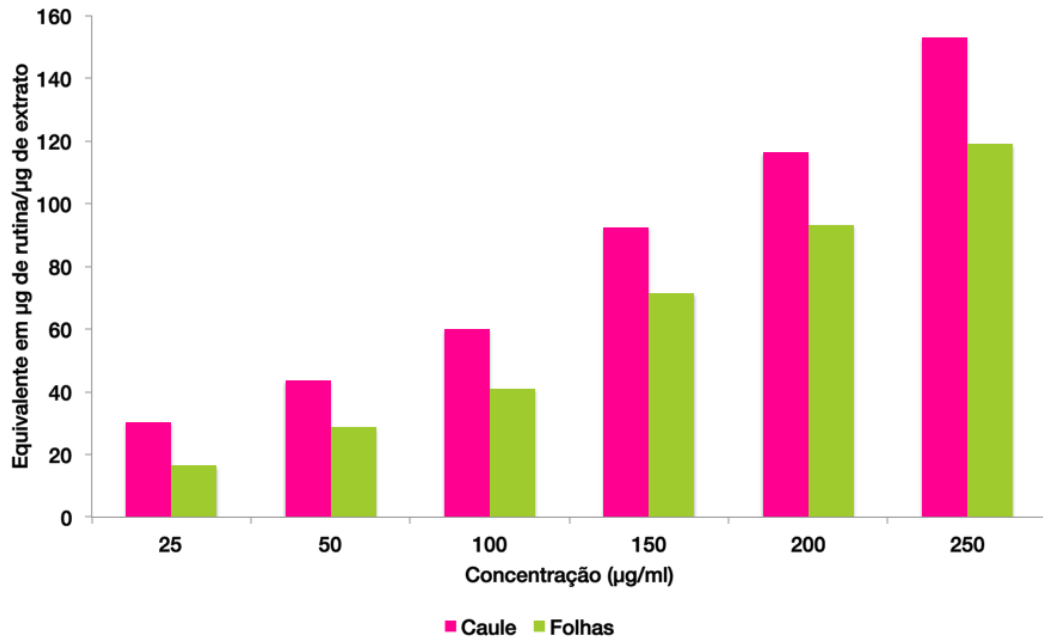
O gráfico analítico do padrão rotina utilizado para comparação da capacidade antioxidante dos extratos metanólicos do caule e folhas está representado na figura 5.18.

Figura 5.18: GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO RUTINA NO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.



A capacidade antioxidante dos extratos metanólicos de caule e folhas está representada na figura 5.19, neste a capacidade antioxidante está expressa em equivalentes de μg de rutina/ μg de extrato metanólico de caule e folhas em suas diferentes concentrações testadas (25, 50, 100, 150 200 e 250 $\mu g/ml$).

Figura 5.19: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.



Nas tabelas 5.14, 5.15 e 5.16 estão representados os valores obtidos pelos extratos metanólicos do caule e folhas em relação padrão ácido ascórbico, pelo teste ANOVA.

Tabela 5.14: TESTE DA HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DO CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO. Abreviações – F: variância entre os grupos, df_1 : grau de liberdade tratamento, df_2 : grau de liberdade residual.

Amostra	F	df_1	df_2	valor de p
Caule	456,2	11	48	<0,0001
Folhas	536,2	11	48	<0,0001

Tabela 5.15: ANOVA DAS AMOSTRAS DE CAULE FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO. Abreviações – SS: soma de quadrados, df: grau de liberdade, MS: média dos quadrados.

CAULE	SS	df	MS
Tratamento	0,1237	11	0,01125
Residual	0,001183	48	0,00002465
Total	0,1249	59	

Tabela 5.16: ANOVA DAS AMOSTRAS DE FOLHAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO. Abreviações – SS: soma de quadrados, df: grau de liberdade, MS: média dos quadrados.

FOLHAS	SS	df	MS
Tratamento	0,132	11	0,012
Residual	0,001074	48	0,00002238
Total	0,133	59	

A tabela 5.17 representa os valores obtidos pelos extratos metanólicos do caule e folhas em relação padrão ácido ascórbico, pelo teste de BARTLETT.

Tabela 5.17: TESTE DE BARTLETT PARA AS AMOSTRAS DE CAULE E FOLHAS FRENTE AO PADRÃO RUTINA.

Amostra	Valor
Caule	28,09
Folhas	28,76

Os resultados obtidos revelam que o extrato etanólico das folhas e caule em todas as concentrações testadas apresentou capacidade antioxidante maior que a do ácido ascórbico e da rutina em reduzir o complexo fosfomolibdênico. A amostra de caule apresentou maior capacidade antioxidante que a amostra de folhas, ambas as amostras foram mais eficientes frente a rutina do que em relação ao ácido ascórbico. Fato comprovado pelo teste do ANOVA, (tabelas 5.11, 5.12, 5.15 e 5.16) e Bartlett (tabelas 5.13 e 5.17). Podendo ser um potencial antioxidante com capacidade de impedir a formação de radicais livres.

Método do DPPH

Ultimamente esta metodologia tem-se tornado bastante popular nos estudos da atividade antioxidante de compostos naturais, por ser um método simples e de alta sensibilidade (MOON, 2009).

Esse ensaio baseia-se na teoria de que um hidrogênio doador é considerado um antioxidante. A figura 5.20 demonstra o mecanismo de reação em que o DPPH· aceita o hidrogênio de um antioxidante (MOON, 2009).

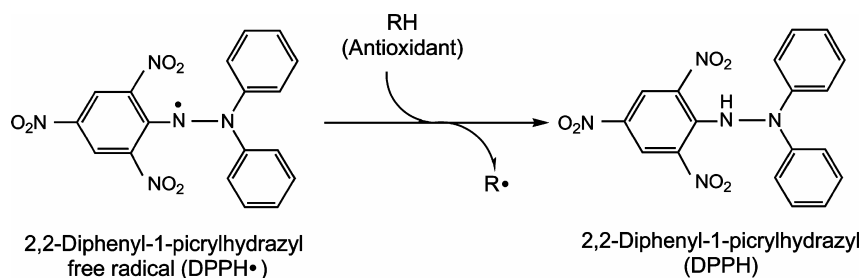


Figura 5.20: REAÇÃO ENTRE DPPH· E O ANTIOXIDANTE PARA A FORMAÇÃO DE DPPH

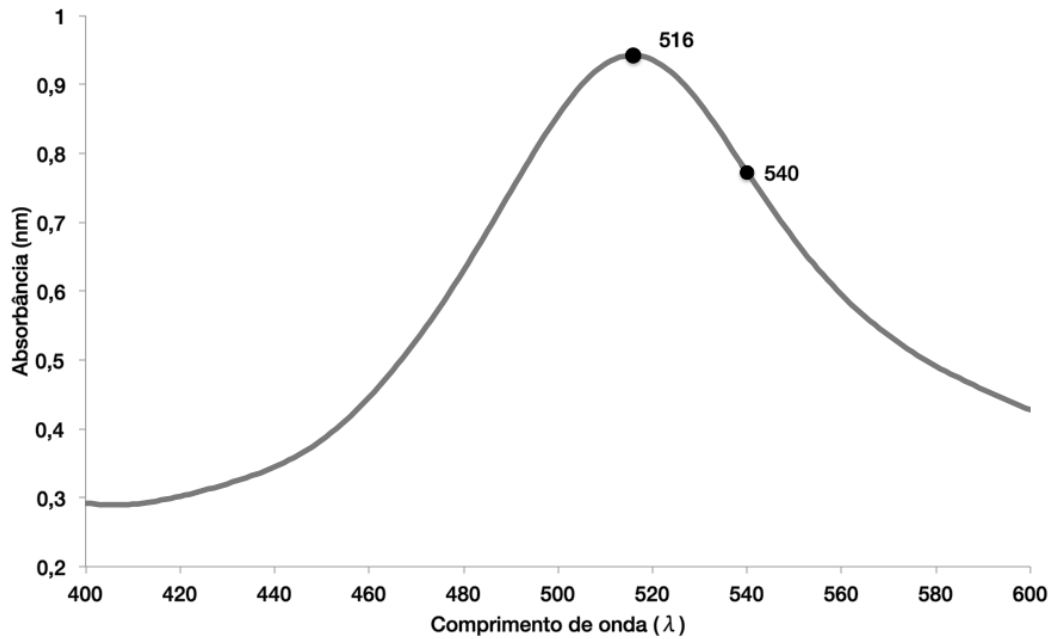
O DPPH· é um dos poucos radicais orgânicos nitrogenados estáveis e comercialmente disponível, seu efeito oxidante é proporcional ao desaparecimento do radical DPPH· nas amostras testadas. Vários mecanismos de monitoramento da quantidade de DPPH· foram relatados, porém o monitoramento com espectrometria UV tornou-se o mais amplamente e comumente utilizado recentemente, devido a sua simplicidade e precisão. O DPPH· apresenta o máximo de absorção em 517nm, sua cor muda do roxo para amarelo devido a formação de DPPH pela absorção do hidrogênio oriundo do antioxidante. Essa reação é estequiométrica e relaciona-se ao número de átomos de hidrogênio absorvidos (MOON, 2009).

O efeito antioxidante pode ser facilmente avaliado seguindo-se o declínio a absorção UV em 517nm. Os resultados são relatados como EC₅₀, o qual é a quantidade de antioxidante necessária para o decréscimo da concentração de DPPH· em 50% (MOON, 2009).

Inúmeros estudos da atividade antioxidante presente em plantas têm sido conduzidos pela análise do DPPH, incluindo frutas e vegetais, plantas medicinais, cereais e grãos, especiarias e ervas, chás e folhas, bem como, poucos estudos com algas e cogumelos também tem sido realizados utilizando esta metodologia (MOON, 2009).

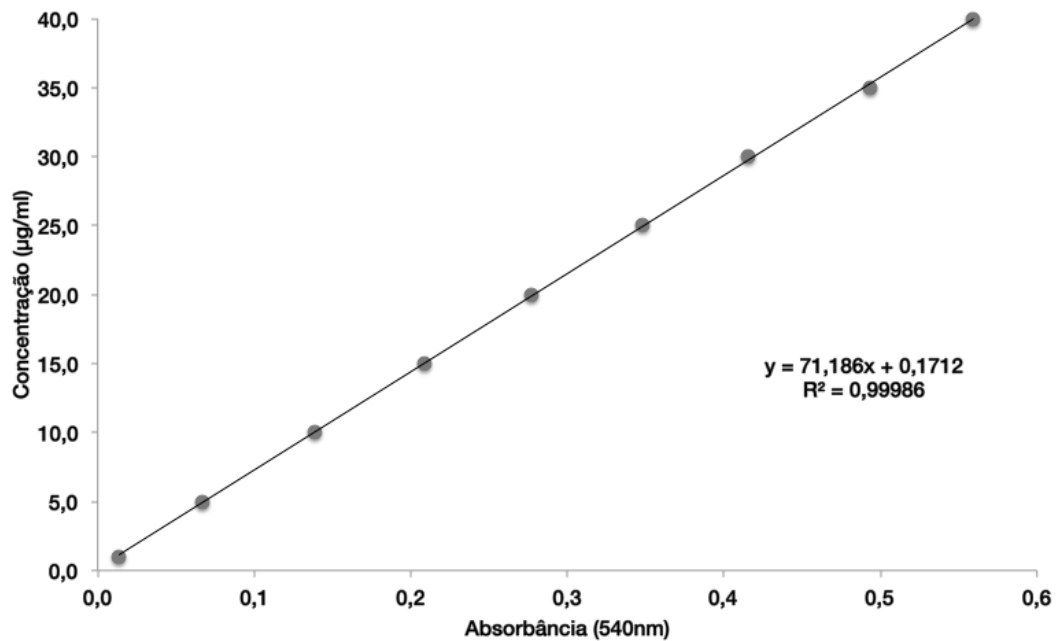
A atividade do radical DPPH foi medida de acordo com o procedimento descrito por Chan e Ismail (2009), com algumas modificações, entre elas a leitura em espectrofotômetro das amostras foi realizada em 540nm, na figura 5.21 pode-se notar o varredura espectral da solução metanólica de DPPH a 40µg/ml, demonstrando que neste comprimento de onda a solução ainda é passível de leitura.

Figura 5.21: VARREDURA EM ESPECTROFOTÔMETRO DA SOLUÇÃO METANÓLICA DE DPPH A $40\mu\text{g/ml}$.



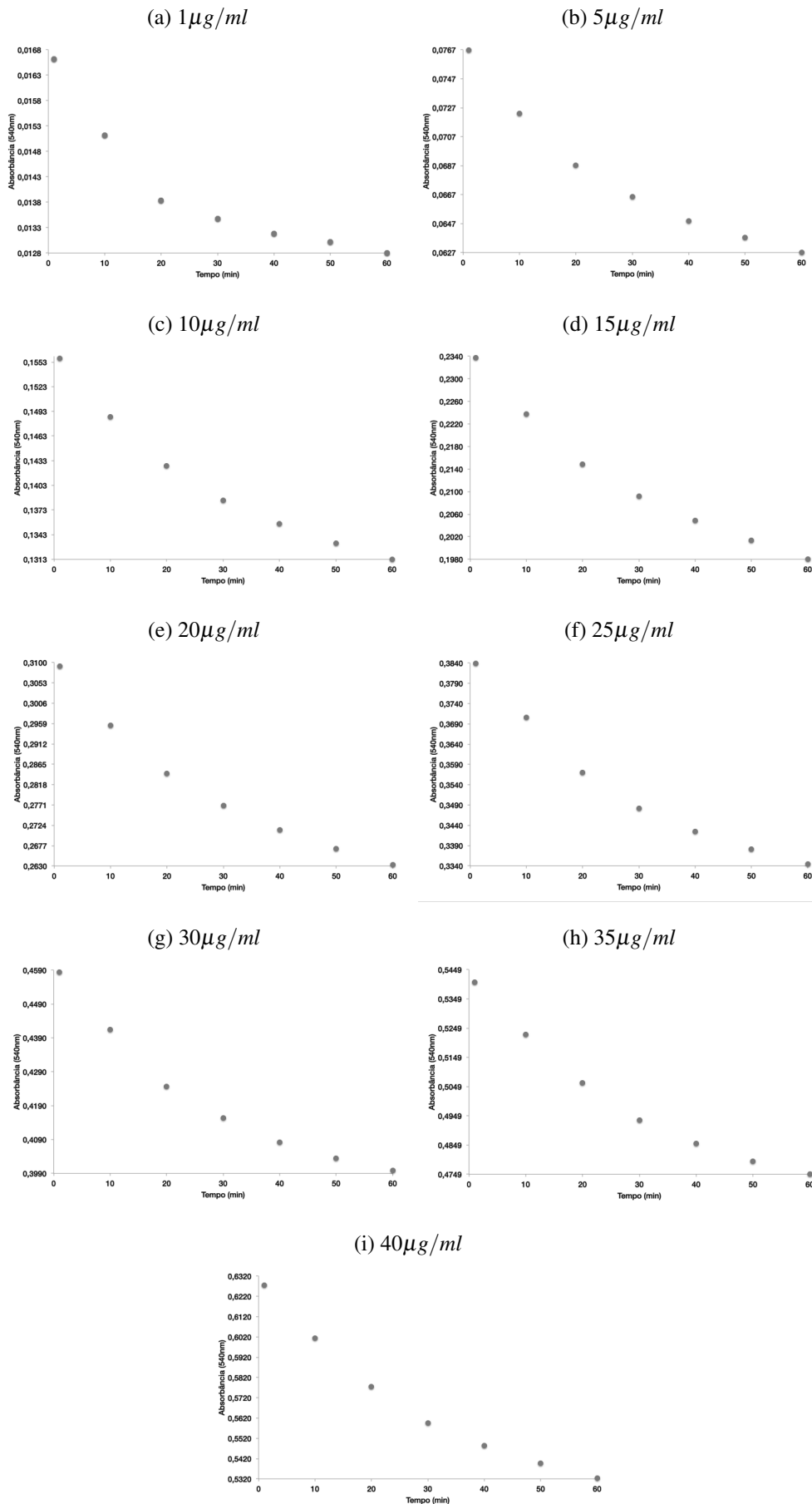
A ilustração 5.22, representa o gráfico analítico referente às concentrações das soluções metanólicas de DPPH (1 - $40\mu\text{g/ml}$) e a média ($n=5$) de suas absorvâncias, bem como sua equação da reta.

Figura 5.22: GRÁFICO ANALÍTICO DO DPPH.



A figura 5.23 mostra os gráficos da cinética de reação da solução de DPPH em suas diferentes concentrações (1 - 40 $\mu\text{g/ml}$), ou seja, o decaimento da concentração de DPPH, expresso em absorbância, em relação ao tempo.

Figura 5.23: CINÉTICA DO REAGENTE DPPH.



Os gráficos das figuras 5.24 e 5.26 mostram a atividade antioxidante pela concentração dos padrões ácido ascórbico e rutina e suas equações da reta.

A cinética de reação dos padrões ácido ascórbico e rutina frente ao radical DPPH, estão representadas nos gráficos das figuras 5.25 e 5.27, respectivamente, onde o decaimento da concentração de DPPH pode ser evidenciado pelos valores de absorbância em relação ao tempo.

Figura 5.24: GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO DO DPPH.

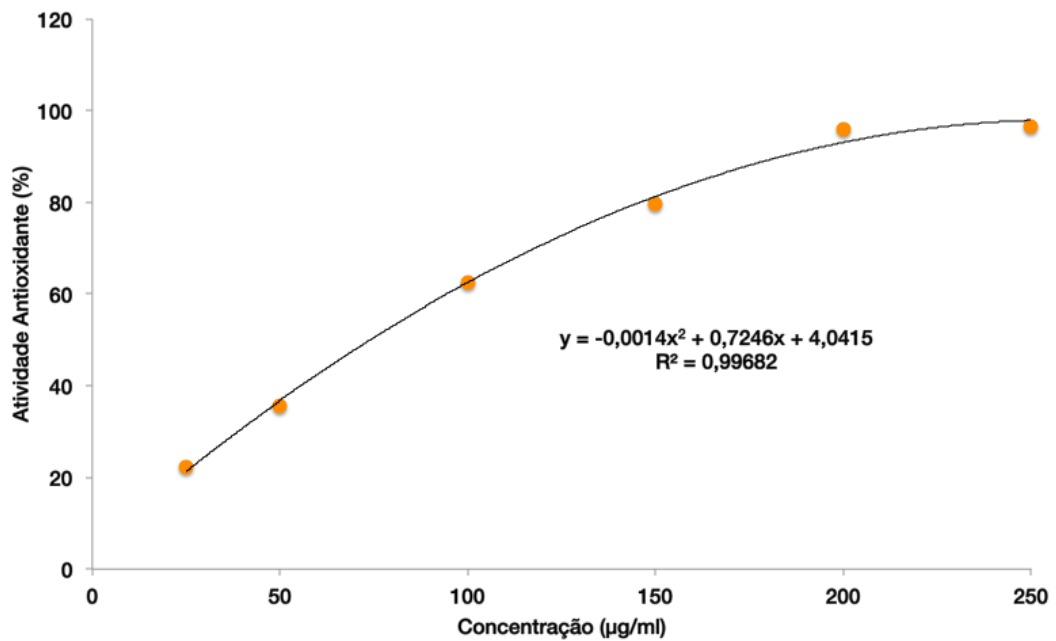


Figura 5.25: CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO ÁCIDO ASCÓRBICO.

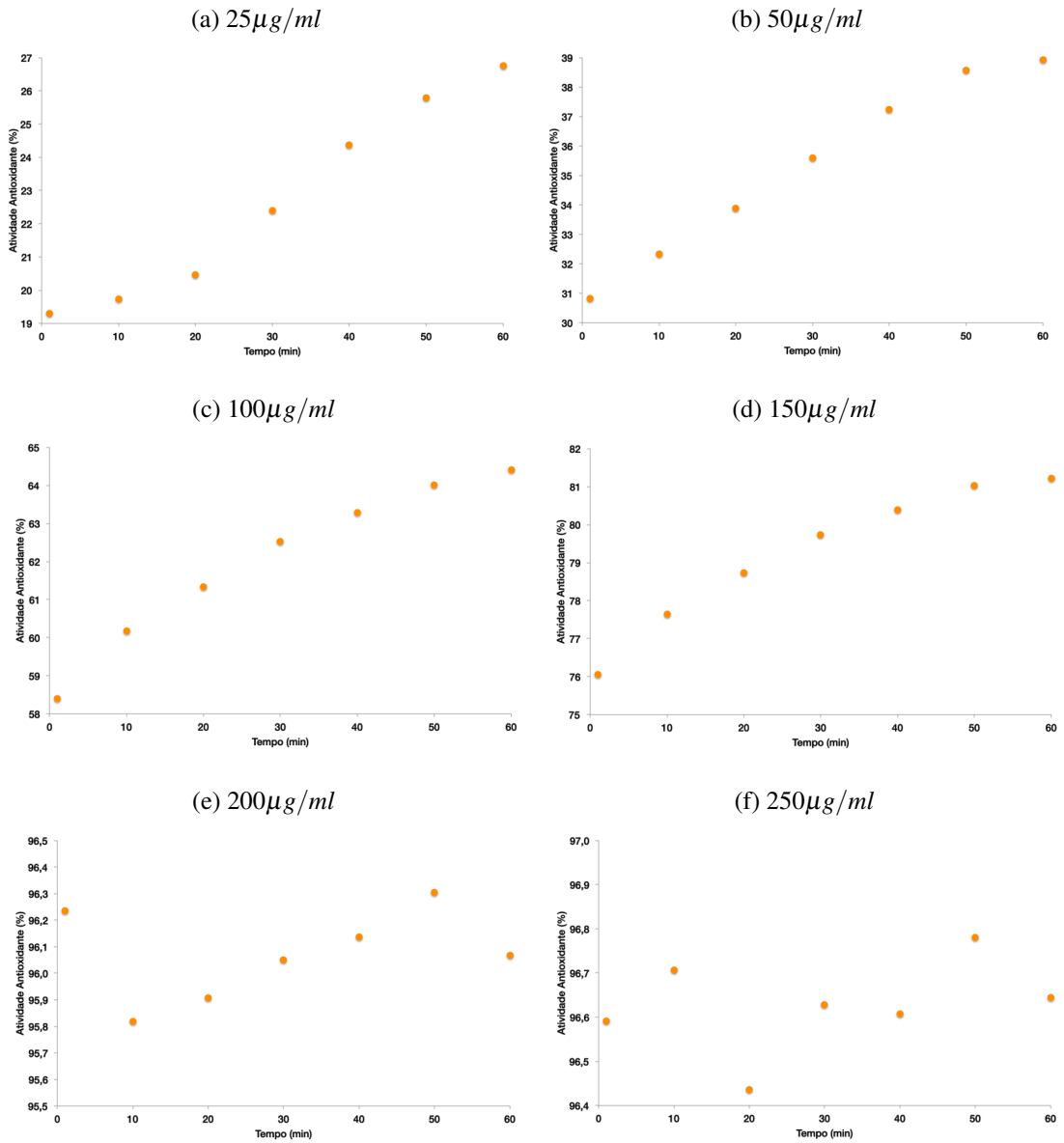


Figura 5.26: GRÁFICO ANALÍTICO DO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DPPH.

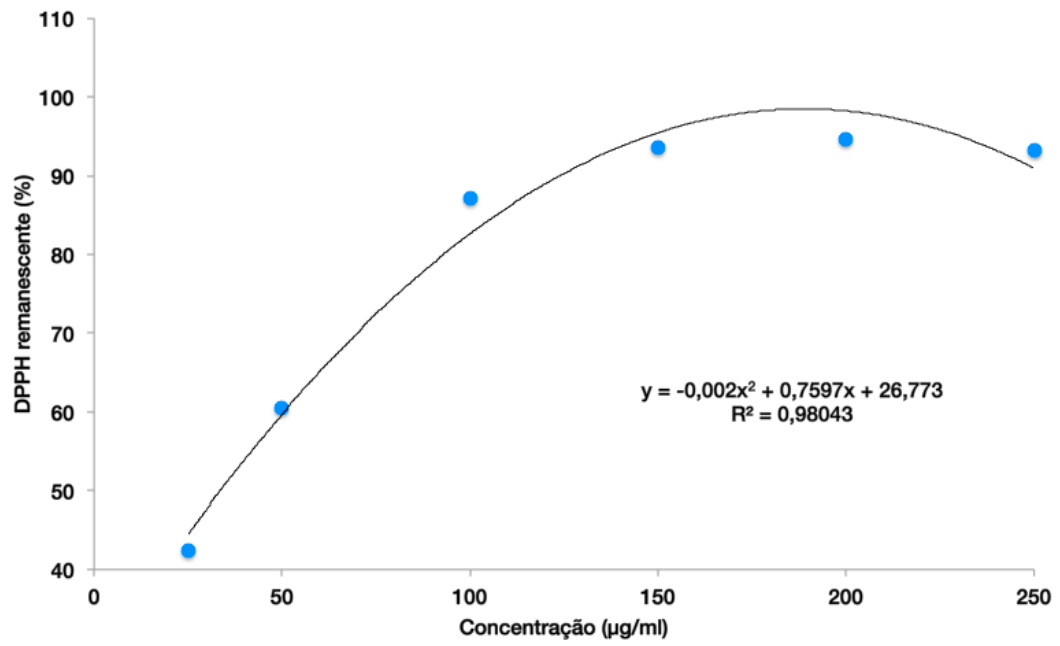
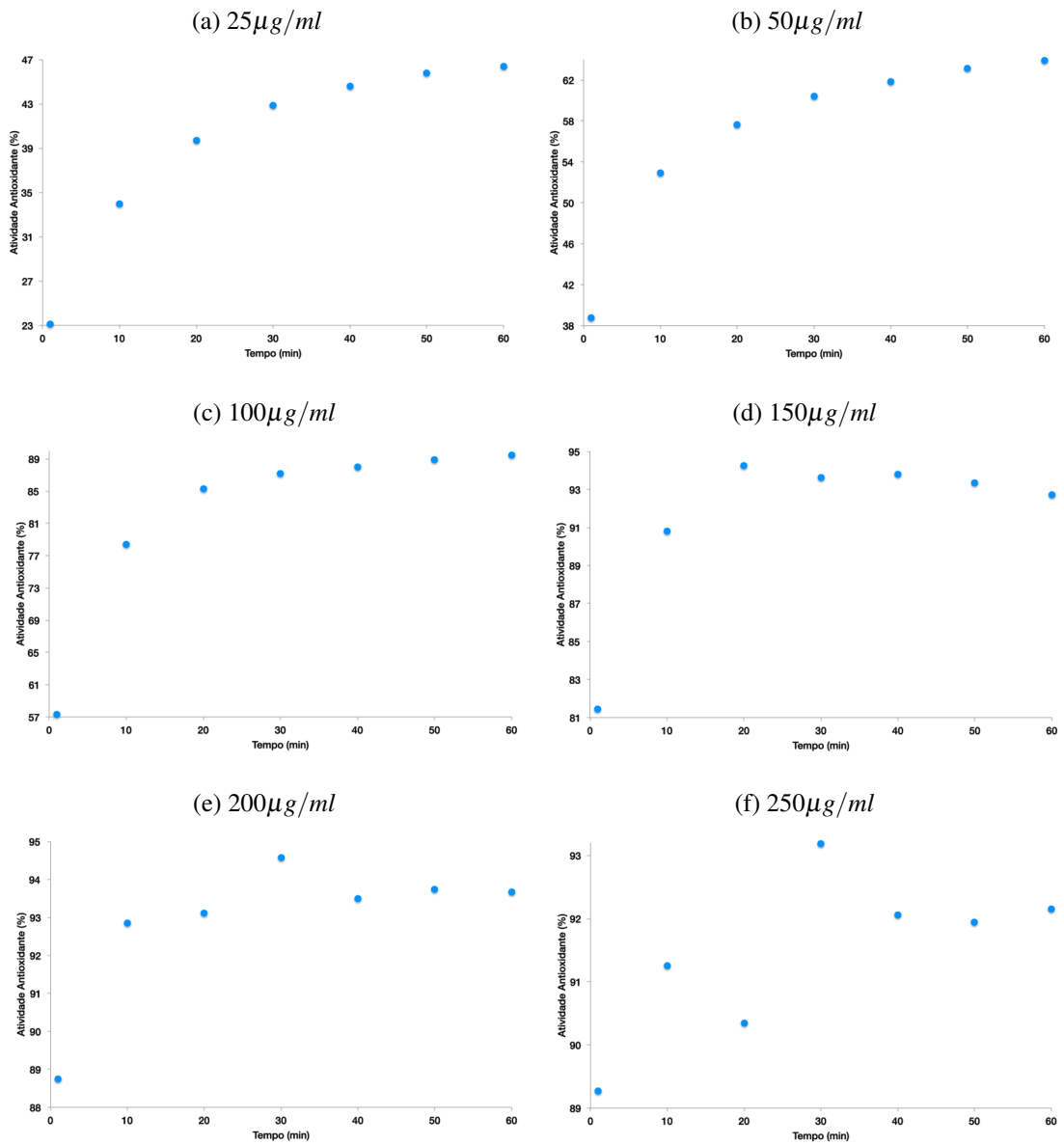


Figura 5.27: CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO PADRÃO RUTINA.



Para as amostras de caule e folhas foram realizados os mesmos procedimentos anteriores, ou seja, foram elaborados os mesmos gráficos tanto da atividade antioxidante como o de cinética da reação, representados respectivamente, nas figuras 5.28 e 5.29 para a amostra de caule e nas figuras 5.30 e 5.31 para as folhas

Figura 5.28: GRÁFICO ANALÍTICO DO CAULE PELO MÉTODO DO DPPH.

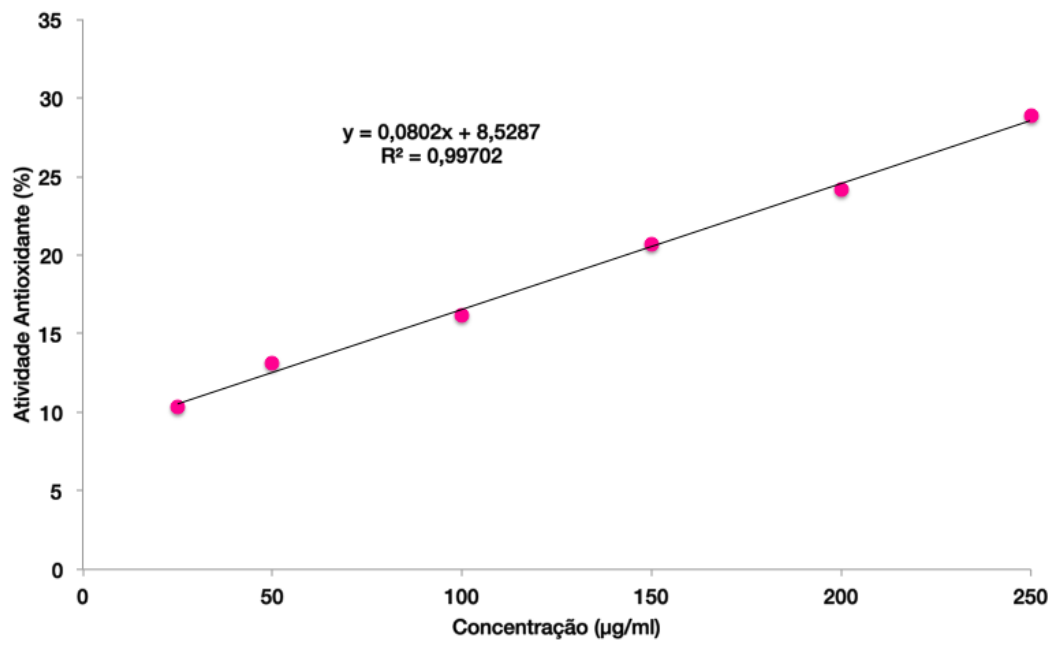


Figura 5.29: CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAULE.

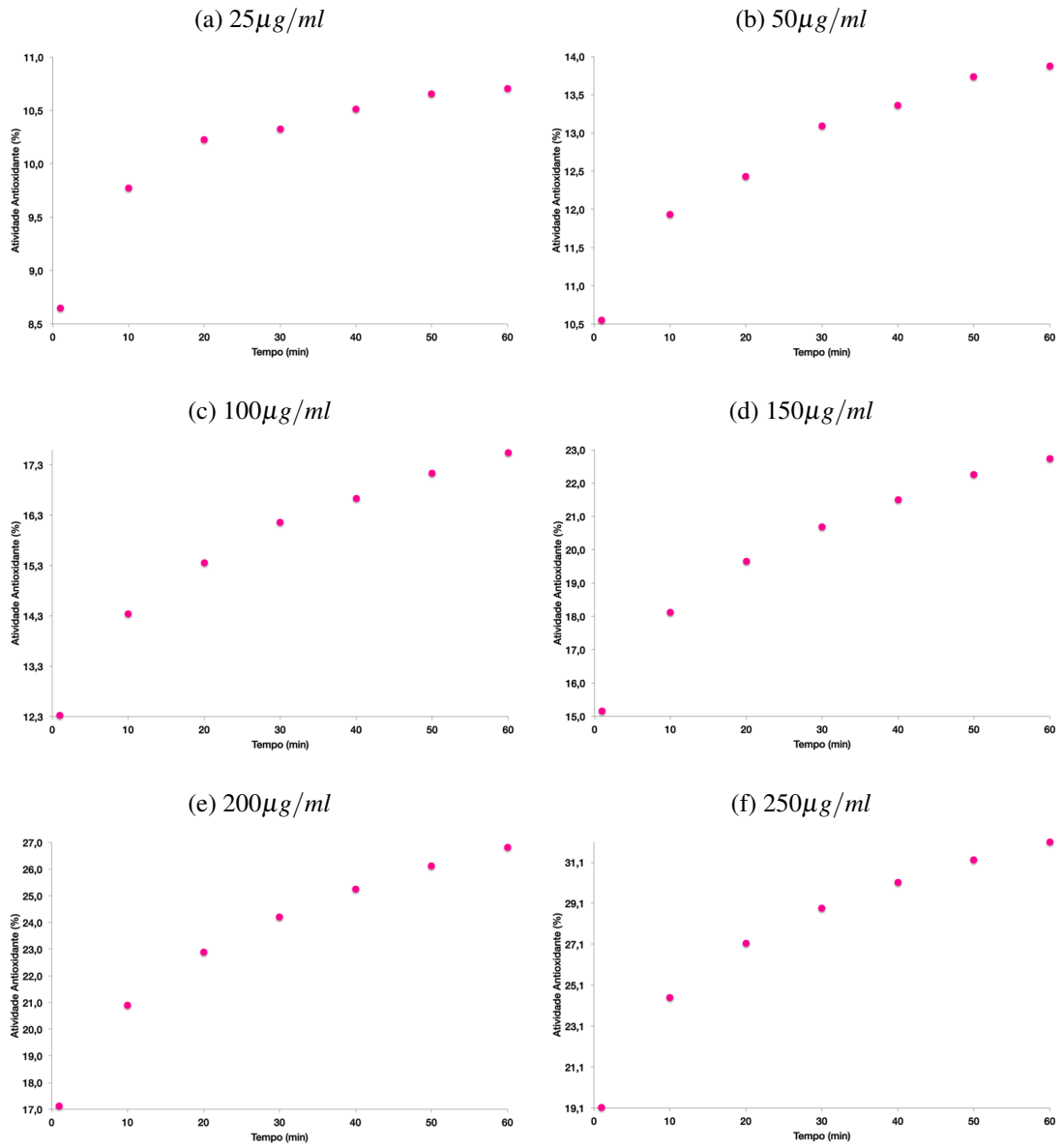


Figura 5.30: GRÁFICO ANALÍTICO DAS FOLHAS PELO MÉTODO DO DPPH.

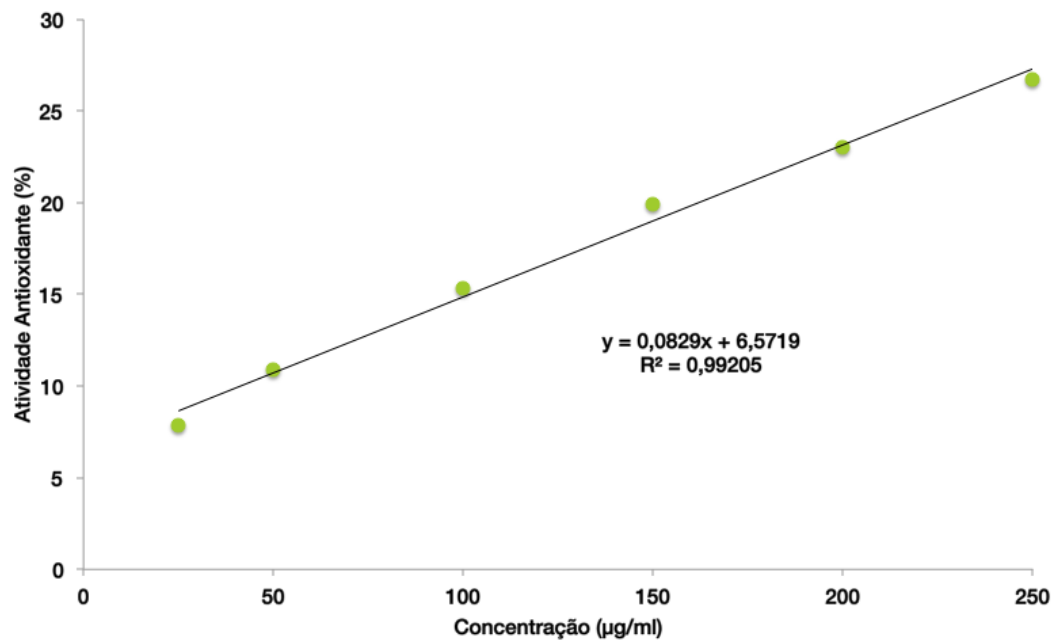
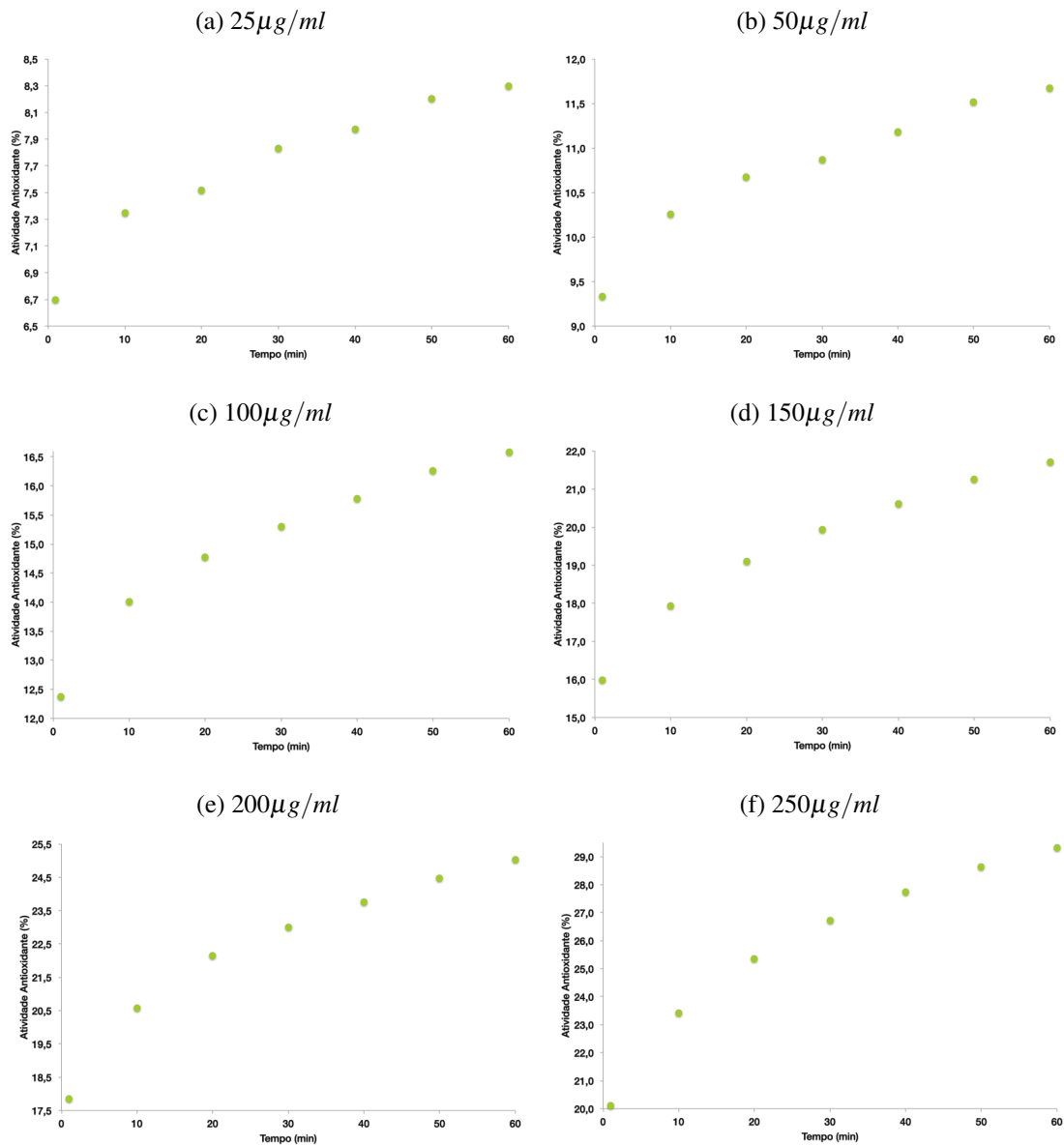


Figura 5.31: CINÉTICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS.



A tabela 5.18 mostra os resultados do IC_{50} teórico para os padrões ácido ascórbico e rutina e para as amostras de caule e folhas.

Tabela 5.18: IC_{50} TEÓRICO DOS PADRÕES E AMOSTRAS PELO MÉTODO DO DPPH

Amostras	IC_{50} ($\mu g/ml$)
Ácido ascórbico	74
Rutina	33,5
Caule	524
Folhas	439

O gráfico 5.32 resume a médias das absorbâncias das amostras de caule, folhas e do padrão rutina e seus respectivos intervalos de confiança (IC).

Figura 5.32: GRÁFICO DA MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS DO CAULE, DAS FOLHAS E DO PADRÃO RUTINA PELO MÉTODO DO DPPH.

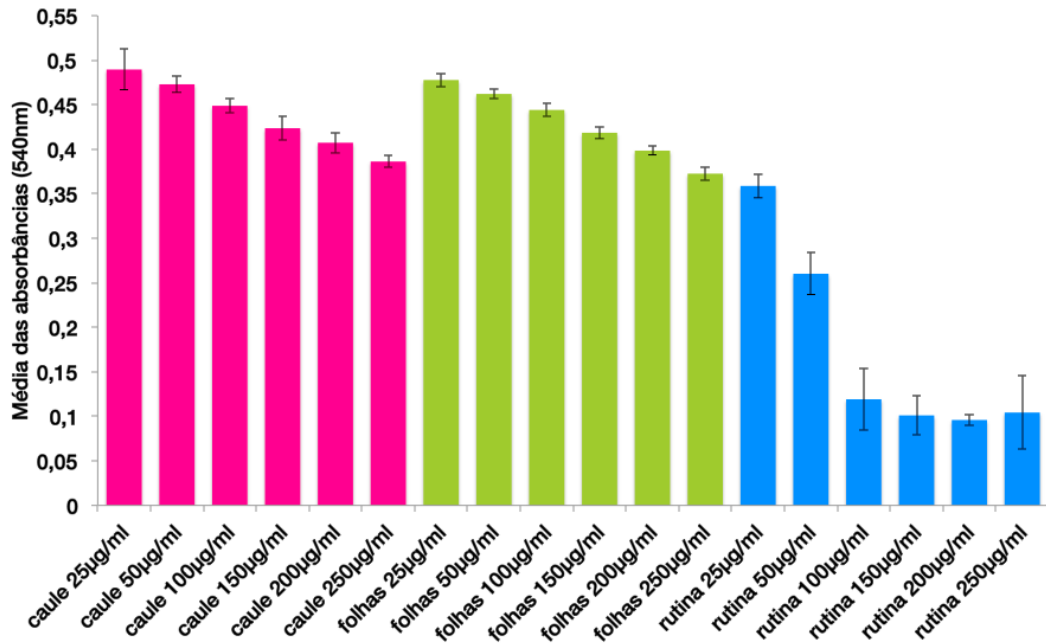


Tabela 5.19: TESTE DA HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS.

Amostra	F	df ₁	df ₂	valor de p
Caule	449,9	11	48	0,0001
Folhas	499,7	11	48	0,0001

Abreviações – F: variância entre os grupos, df₁: grau de liberdade tratamento, df₂: grau de liberdade residual.

Tabela 5.20: TABELA DO ANOVA PARA AS AMOSTRAS DE CAULE.

CAULE	SS	df	MS
Tratamento	1,394	11	0,1267
Residual	0,01352	48	0,0002817
Total	1,408	59	

Abreviações – SS: soma de quadrados, df: grau de liberdade, MS: média dos quadrados.

Tabela 5.21: TABELA DO ANOVA PARA AS AMOSTRAS DE FOLHAS.

FOLHAS	SS	df	MS
Tratamento	1,323	11	0,1203
Residual	0,01156	48	0,0002408
Total	1,335	59	

Abreviações – SS: soma de quadrados, df: grau de liberdade, MS: média dos quadrados.

A partir dos dados estatísticos de ANOVA e Bartlett representados nas tabelas 5.19, 5.20 e 5.21, pode-se observar que tanto a amostra de caule como a de folhas apresentam capacidade antioxidante significativamente menor que ao padrão rutina, com $p < 0,05$. Os valores do IC_{50} para ambas as amostras se encontram elevados em relação aos padrões.

Os gráficos da cinética de reação dos padrões ácido ascórbico (figura 5.25) e rutina (figura 5.27), nas concentrações de $200\mu g/ml$ e $250\mu g/ml$ para o ácido ascórbico e nas concentrações de $150\mu g/ml$, $200\mu g/ml$ e $250\mu g/ml$ para a rutina, não apresentaram um comportamento muito uniforme, isto pode ser justificado por erros experimentais, ou contaminação dos materiais utilizados para a realização do teste.

5.4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As frações do caule e das folhas de *Peperomia armondii* foram avaliadas frente os micro-organismos *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans*, através do método da microdiluição em caldo. Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) para cada amostra e micro-organismo esté representado pela tabela 5.22.

Tabela 5.22: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DAS AMOSTRAS FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS TESTADOS.

	Micro-organismos					
	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato bruto ^f	x	x	x	x	x	x
Tolueno ^f	x	x	x	x	x	x
Diclorometano ^f	x	x	500	x	x	500
Acetato de etila ^f	x	x	x	x	x	x
Butanol ^f	x	x	x	x	x	x
Etanol 90% ^f	x	x	500	x	x	500
Etanol 70% ^f	x	x	x	x	x	500
Aquoso ^f	x	x	x	x	x	500
Extrato bruto ^c	500	x	x	x	x	250
Tolueno ^c	x	x	x	x	x	500
Diclorometano ^c	x	x	x	x	x	500
Acetato de etila ^c	62,5	x	250	x	x	x
Etanol 90% ^c	250	x	x	x	x	x
Etanol 70% ^c	x	x	x	x	x	250
Aquoso ^c	x	x	x	x	x	250

^f: folhas, ^c: caule, x: sem atividade.

Todas as amostras que apresentaram atividade revelaram, após o plaqueamento dos orifícios em que não foram observados crescimento, ação microbicida contra os micro-organismos.

Comparando-se as concentrações inibitórias mínimas e a ação antimicrobiana das amostras testadas, podemos dizer que todas as frações da amostra de caule apresentaram atividade de alta a moderada contra pelo menos um dos micro-organismos testados, a tabela 5.23 resume

esses resultados.

Tabela 5.23: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DO CAULE.

Amostra	Atividade	Micro-organismo
Extrato bruto	moderada	<i>S. epidermidis</i>
	moderada	<i>C. albicans</i>
Tolueno	moderada	<i>C. albicans</i>
Diclorometano	moderada	<i>C. albicans</i>
Acetato de etila	boa	<i>S. epidermidis</i>
	moderada	<i>P. aeruginosa</i>
Etanol 90%	moderada	<i>S. epidermidis</i>
Etanol 70%	moderada	<i>C. albicans</i>
Aquoso	moderada	<i>C. albicans</i>

Assim, para as amostras testadas, extrato bruto apresenta atividade antimicrobiana moderada frente a bactérias gram-positivas e a leveduras; as frações tolueno, diclorometano, etanólica (70%) e aquosa também possuem atividade moderada contra fungos leveduriformes; já a fração etanólica (90%) apresenta atividade moderada somente contra bactérias gram-positivas; a fração acetato de etila apresenta alta atividade bactericida contra *Staphylococcus epidermidis* com o menor valor da CIM ($62,5\mu\text{g/ml}$), porém inferior ao padrão cloranfenicol ($30\mu\text{g/ml}$), e atividade moderada frente a bactérias gram-negativas, podendo ser considerado antibiótico de amplo espectro em potencial. Esse fato pode ser explicado pela maior resistência das bactérias gram-negativas a agentes antimicrobianos, devido a estrutura da parede celular mais complexa e principalmente pela presença de uma membrana externa, ausente em bactérias gram-positivas.

Nem todas as frações da amostra de folhas apresentaram atividade antimicrobiana, porém as que tiveram, revelaram uma ação moderada contra os micro-organismos nas concentrações testadas, a tabela 5.24 mostra esses resultados.

Tabela 5.24: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DE FOLHAS.

Amostra	Atividade	Micro-organismo
Extrato bruto	nenhuma	
Tolueno	nenhuma	
Diclorometano	moderada	<i>P. aeruginosa</i>
	moderada	<i>C. albicans</i>
Acetato de etila	nenhuma	
Butanol	nenhuma	
Etanol 90%	moderada	<i>P. aeruginosa</i>
	moderada	<i>C. albicans</i>
Etanol 70%	moderada	<i>C. albicans</i>
Aquoso	moderada	<i>C. albicans</i>

As frações diclorometano e etanólica (90%) demonstraram atividade bactericida moderada contra bactérias gram-negativas e leveduras; já o restante das frações apresentou atividade

moderada, porém somente contra fungos leveduriformes. As amostras que não revelaram atividade (extrato bruto, tolueno, acetato de etila e butanol) podem apresentar sinergismo com outros compostos, tornando-se ativos na presença de algum outro metabólito secundário, separado no fracionamento do extrato bruto das folhas.

Os compostos oriundos do metabolismo secundário da espécie vegetal *Peperomia armondii* podem ser de grande importância principalmente nos casos de infecções hospitalares relacionadas com *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*, já que estes micro-organismos têm-se tornado resistentes aos antibióticos e antifúngicos utilizados na terapêutica como é o caso do imipenem, meticilina e fluconazol, respectivamente (CASALINUOVO, 2004; DUAH, 2010; NEVES, 2011). Em regiões onde a assistência médica é de difícil acesso, em que a população ribeirinha faz uso da medicina popular para o tratamento de enfermidades, o uso desta espécie vegetal poderia ser empregado como alternativa de amenizar, ou mesmo de sanar uma infecção por bactérias gram-positivas e negativas, além de fungos leveduriformes.

6 CONCLUSÕES

Alguns parâmetros morfoanatômicos apresentados neste trabalho podem ser utilizados para a diagnose da espécie. Certas características são relevantes, como os feixes vasculares encontrados dispersos no caule. Outra característica bastante peculiar da espécie é a presença de caule piloso (GUIMARÃES, 1984).

O presente trabalho confirmou e fundamentou a família Piperaceae com uma fonte de óleos essenciais, contribuindo para a linha de pesquisa em produtos naturais, que tem adquirido bastante destaque num contexto atual, no qual os micro-organismo demonstram mecanismo de resistência frente a antibióticos.

Nenhum estudo fitoquímico anterior foi realizado nesta espécie, embora o gênero *Peperomia* apresente alguns estudos fitoquímicos. Os metabólitos secundários mais comuns são: flavonóides (AQIL, 1993), derivados benzopiranos (SEERAM, 1998; MBAH, 2002; SALAZAR, 2005), secolignanas (CHEN, 1989; MANACHE 1996; GOVINDACHARI, 1998), terpenos, arilpropanoides, compostos fenólicos (TANAKA, 1998; MOREIRA, 1999; BAYMA, 2000; LI, 2003) e óleos essenciais (BESSIERE, 1994; SILVA, 1999, ZOGHBI, 2005). O estudo fitoquímico do extrato bruto das folhas e caules de *Peperomia armondii* revelou a presença de esteroides, triterpenos, alcaloides, glicosídeos antociânicos, flavonoides e aminogrupos, demonstrando semelhança com as outras espécies do mesmo gênero.

O perfil qualitativo e quantitativo do óleo essencial do caule e das folhas indicaram ser os componentes principais no caule β -pineno (18,59%), germacreno D (13,5%), α -pineno (13,48%), ácido carbâmico (13,06%) e dilapiol (11,6%). Já nas folhas os principais constituintes foram: germacreno D (28,66%), β -elemeno (27,31%), apiol (13,79%) e dilapiol (11,12%). Estes compostos mostraram concordância com outros estudos realizados com espécies pertencentes ao mesmo gênero, em **Peperomia pellucida** Kunth. foi observada presença de germacreno D, dilapiol e apiol, entre outros compostos. Na espécie **Peperomia circinnata** Link var. *circinnata* foram encontrados α -pineno, β -pineno, β -elemeno (3,0%) e germacreno D (da SILVA, 1999). Estes mesmos compostos podem ser encontrados também em *Peperomia blanda* Kunth e *Peperomia rupestris* var. *rupestris* Humb. Bonpl. & Kunth, destacando-se o germacreno D (dos SANTOS, 2001).

O extrato bruto das partes aéreas apresentou boa capacidade antioxidante frente aos padrões ácido ascórbico e rutina pelo método do fosfomolibdênio, podendo ser um potencial antioxidante com capacidade de impedir a formação de radicais livres, desempenhando um papel citoprotetor em situações de risco de dano celular. Como o stress oxidativo mostra ser um componente fundamental de muitas doenças humanas, o uso de antioxidantes na farmacologia é intensamente estudado, sobretudo em tratamentos para enfartes ou doenças neurodegenerativas. Além do uso farmacológico, estes compostos têm imensas aplicações industriais, como conservantes alimentares, cosmética, e na prevenção da degradação da borracha, também são

importantes aditivos na gasolina, prevenindo a formação de gomas que interferem com a atividade dos motores de combustão interna (DABELSTEIN, 2007).

Apesar da ineficiência antibacteriana do óleo essencial, as frações do caule e folhas apresentaram bons resultados perante as bactérias e fungo testados, em especial a fração acetato de etila contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*, na qual foram encontrados o menor valor de CIM, esta espécie de bactéria é comensal da pele e mucosas, responsável principalmente por infecções hospitalares, através de catéteres, sondas (material de plástico), bem como próteses devida sua capacidade de formar biofilmes, que dificultam a chegada de drogas antimicrobianas (TRABULSI, 2008). Assim, esta espécie vegetal pode ser uma alternativa para o tratamento de afecções causados por esses micro-organismos, especialmente para populações residentes em locais onde a assistência médica é de difícil acesso ou bastante precária.

A espécie vegetal estudada *Peperomia armondii* não apresenta nenhuma pesquisa referente a sua atividade biológica contra micro-organismo, bem como a sua constituição química. Assim, os dados apresentados por este trabalho possuem caráter inédito, contribuindo com as linhas de pesquisa relacionadas a produtos naturais.

7 PERSPECTIVAS

Analisar os metabólitos secundários do extrato bruto do caule e folhas de *Peperomia armondii*.

Investigar atividades biológicas do extrato bruto e frações do caule e folhas

- atividade citotóxica
- atividade antifúngica
- atividade antivirótica
- atividade antiprotozoária
- atividade anti-helmíntica
- atividade antimutagênica
- atividade antiinflamatória
- atividade analgésica
- atividade inseticida
- atividade larvicida
- atividade moluscicida

Realizar o sequenciamento genético a fins de completa identificação da espécie.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy**, 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- ALVARENGA, A. L.; SCHWAN, R. F.; DIAS, D. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BRAVO-MARTINS, C. E. C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.
- ALVES, T. M. A.; RIBEIRO, A.; MENDES, N. M.; NAGEM, T. J.; HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K.; ZANI, C. L. Molluscicidal saponins from *Guaiacum officinale* L. (Zygophyllaceae). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 81-86, 1996.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. de F. A.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ANVISA 2010. Medicamentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definição.htm>, Consulta em: 09 jan. 2010.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436.
- AQIL, M.; KAN, I. Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from *Peperomia pellucida*. **Sci. Phys. Sci.** v. 5, p. 213-215, 1993.
- Arrigoni-Blank, M. F.; Dmitrieva, E. G.; Franzotti, E. M.; Antonioli, A. R.; Andrade, M. R.; Marchioro, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, V. 91, p. 215-218, 2004.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.
- Aziba, P. I.; Adedeji, A.; Ekor, M.; Adeyemi, O. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. **Fitoterapia**, v. 72, p. 57-58, 2001.
- BAQUERO, F.; BLAQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Tree**, v. 12, p. 482-487, 1997.
- BAYMA, J. C.; ARRUDA, M. S. P.; MÄLLER, A. H.; ARRUDA, A. C.; CANTO, W. C. A dimeric ArC₂ compound from *Peperomia pellucida*. **Phytochemistry**. v. 55, p. 779-782, 2000.

- BERLYNG, P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**, Iowa: Iowa University, 1976.
- BERNACCHI, A. S.; FRANKE DE CAZZULO, B.; CASTRO, J. A.; CAZZULO, J. J. Trypanocidal action of 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyl diethylamine hydrobromide (Lilly 18947) on *Trypanosoma cruzi*. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 23, n. 5, p. 399-404, 2002.
- BESSIERE, J. M.; MENUT, C.; LAMATY, G.; JOSEPH, H. Variations in the volatile constituents of *Peperomia rotundifolia* Schlecht. & Cham. grown on different host-trees in Guadeloupe. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 9, p. 131-133, 1994.
- BLECHER, B. Soja reduz os sintomas da menopausa. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 9 de Dezembro de 1999.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1959, 1958.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, principalmente do Ceará**, 3a ed., Ceará: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lwt - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRITO, J. F. A.; ALQUINI, Y. A. New method for staining botanical material embedded in glycol metacrilate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 949-951, 1996.
- CALIXTO, J. B. Biopirataria: a diversidade biológica na vida da indústria farmacêutica. **Ciência Hoje**, v. 28, n. 167, p. 36-43, 2000.
- CASALINUOVO, I.A.; DI FRANCESCO, P.; GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 8, p. 69-77, 2004.
- Chan, K. W.; Ismail, M. Supercritical carbon dioxide fluid extraction of *Hibiscus cannabinus* L. seed oil: A potential solvent-free and high antioxidative edible oil. **Food Chemistry**, v. 114, p.970-975, 2009.
- CHEN, C. M.; JAN, F. Y.; CHEN, M. T.; LEE, T. J. Peperomins A, B and C, novel secolignans from *Peperomia japonica*. **Heterocycles**. v. 29, p. 411-414, 1989.
- CHENG, M. J.; LEE, S. J.; CHANG, Y. Y.; WU, S. H.; TSAI, L.; JAYAPRAKASAM, B.; CHEN, I. S. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. **Phytochemistry**. v. 63, p. 603-608, 2003.
- CHERNYSHOV, V. P.; HEUSSER, P.; OMELCHENKO, L. I.; CHERNYSHOVA, L. I.; VODYANIK, M. A.; VYKHOVANETS, E. V.; GALAZYUK, L. V.; POCHINOK, T. V.; GAIDAY, N. V.; GUMENYUK, M. E.; ZELINSKY, G. M.; SCHAEFERMEYER, G. Immunomodulatory and clinical effects of *Viscum album* (Iscador M and Iscador P) in children with recurrent respiratory infections as a result of the Chernobyl nuclear accident. **American Journal of Therapy**, v. 7, n. 3, p. 195-203, 2000.
- COELHO, A. M. S. P.; SILVA, G. A. da; VIEIRA, O. M. C.; CHAVASCO, J. K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 47-54, 2001.

- COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.
- CORDELL, G. A. Changing Strategies in Natural Products Chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1585-1612, 1995.
- DABELSTEIN, W.; REGLITZKY, A.; SCHÜTZE, A.; REDERS, K. Automotive Fuels. in: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- DIMARTINO, M. J.; CAMPBELL, JR. G. K.; WOLF, C. E.; HANNA, N. The pharmacology of arachidonic acid-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**. v. 21, p. 303-305, 1987.
- DODSON, C. D.; DYER, L. A.; SEARCY, J.; WRIGHT, Z.; LETOURNEAU, D. K. Cenocladamine, a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. **Phytochemistry**. v. 53, p. 51-554, 2000.
- DUAH, M. Daptomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* native-valve endocarditis: a case report. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 9, n. 9, 2010.
- DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. esp, p. 139-143, 2006.
- EVANS, W. C. **Farmacognosia Trease y Evans**. Mexico: Interamericana McGrae-Hill, 1989.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. Parte II.
- FARNSWORTH, E. A. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 3, p. 225-276, 1966.
- FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. da S.; GUIMARÃES, F. E.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**. v. 69, p. 445-450, 2008.
- FERREIRA, A. A.; OLIVEIRA, P. M.; EVANGELISTA, E. A.; ALVES, R. B.; PIZZIOLLO, V. R.; BRASILEIRO, B. G.; RODRIGUES, F. M. O.; SILVEIRA, D.; RASLAN, D. S. Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 14-18, 2006.
- FLEISCHER, T. C.; AMEADE, E. P. K.; MENSAH, M. L. K.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 136-138, 2003.
- FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. New York: Van Nostrand, 1949.
- GLOWNIAK, K.; SKALICKA, K.; LUDWICZUK, A.; JOP, K. Phenolic compounds in the flowers of *Lavatera trimestris* L. (Malvaceae). **Journal of Planar Chromatography**. v.18, p.264-268, 2005.
- GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G. Flora ilustrada catarinense: **Piperáceas 4. Peperomia**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1984

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodriguésia**, v. 55, p. 21-46, 2004.

GOVINDACHARI, T. R.; KUMARI, G. N. K.; PARTHO, P. D. Two secolignans from *Peperomia dindigulensis*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 2129-2131, 1998.

HADDAD, A. Obtenção e coloração de cortes semifinos. In: SOUZA, W.; HADDAD, A.; SESSO, A.; SILVEIRA, M.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; PADRÓN, T. S. (eds). **Manual sobre técnicas em microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro: Sociedade brasileira de microscopia eletrônica, 1989.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry. Plant phenolics**. London: Academic, v.1, 1989.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. 3 ed., London: Chapman & Hall Pub, 1998.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p. 481-504, 2000.

Hostettmann, K.; Queiroz, E. F.; Vieira, P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. **Série de textos da Escola de Verão em Química- IV**. São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 529-538, 2007.

KAEGI(a), E. Unconventional therapies for cancer: 2. Green tea. **Canadian Medicinal Association**, v. 158, n. 8, p. 1033-1035, 1998.

KAEGI(b), E. Unconventional therapies for cancer: 3. Iscador. **Canadian Medicinal Association**, v. 158, n. 9, p. 1157-1159, 1998.

KHAN, M. R.; OMOLOSO, A. D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 251-254, 2002.

KINGHORN, A. D. Biological Active Compounds from Plants with Reputed Medicinal and Sweetening Properties. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 6, p. 1009-1024, 1987.

KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; TOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw.) Loudon (Piperaceae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2398-2402, 2006.

KOSTER, R. ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.

LEI, L. G.; LIANG, H. X. Variations in floral development in *Peperomia* (Piperaceae) and their taxonomic implications. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 131, p. 423-431, 1999.

- LI, N.; WU, J.-L.; SAKAI, J.; ANDO, M. Dibenzylbutyrolactone and dibenzylbutanediol lignans from *Peperomia duclouxii*. **Journal of Natural Products**. v. 66, p. 1421-1426, 2003.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais No Brasil: Nativas e Exóticas**. 2 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2008.
- LUQUE, R.; SOUZA, H. C.; KRANS, J. E. Métodos de coloração de Roeser (1972) - modificado e Kropp (1972) visando a substituição do azul de Astra por azul de alcião 8GX. **Acta Botanica Brasílica**, v. 10, p. 199-211, 1996.
- MABBERLEY, D. J. **The plant book: A portable dictionary of the vascular plants**. 5 ed., Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- MACHADO, M.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, R.; MALLMANN, R.; SILVA, C. M.; CRUZ, A. B. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**. v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.
- MCLAUGHLIN, J. M. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In K. Hostettmann, **Assays for Bioactivity**. Academic Press, San Diego, p. 2-32, 1991.
- MADIGAN, M. T. ; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo:Prentice-Hall, 10 ed., 2004.
- MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, A.; CAVÉ, A. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galiodes*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 324-327, 1995.
- MATHIEU, G.; SAMAIN, M. S.; REYNDERS, M; GOETGHEBEUR, P. Taxonomy of the *Peperomia* species (Piperaceae) with pseudo-epiphyllous inflorescences, including four new species. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 157, p. 177-196, 2008.
- MBAH, J. A.; TCHUENDEM, M. H. K.; TANE, P.; STERNER, O. Two chromones from *Peperomia vulcanica*. **Phytochemistry**. n. 60, p. 799-801, 2002.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.
- MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**, São Paulo: Robe, 1999.
- MONACHE, F. D.; COMPAGNONE, R. S. A secolignan from *Peperomia glabella*. **Phytochemistry**. v. 43, p. 1097-1098, 1996.
- MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional do Itatiaia - Brasil: *Peperomia* (Piperaceae). **Rodriguésia**. v. 59, n. 1, p. 161-195, 2008.
- MOON, J.-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.
- MOREIRA, E. A. **Marcha sistemática de análise em fitoquímica**. Tribuna Farmacêutica, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.
- MOREIRA, E. A.; De SOUZA, P. O.; KAPLAN, M. A. C.; GUIMARÃES, E. F. Essential oil analysis of four *Peperomia* species (Piperaceae). **Acta Horticulturae**. v. 500, p. 65-69, 1999.

NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. P. D. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, f. 5, p. 675-678, 1999.

NAKASHIMA, T. **Fitoquímica experimental. Apostila prática**. Departamento de Farmácia, UFPR, 1993, 25 p.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NEUSS, M. *et al.* The Structure of the Oncolytic Alkaloids Vinblastine (VLB) and Vincristine (VCR). **Journal of American Chemical Society**, v. 86, p. 1440-1442, 1964.

Neves, P. R.; Mamizuka, E. M.; Levy, C. E.; Lincopan, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 1, p. 49-58, 2003.

PACHECO, T. A. R. C.; BARATA, L. E. S.; DUARTE, M. C. T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera spp*) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 123-124, 2006.

PANTHI, M. P.; CHAUDHARY, R. P. Antibacterial activity of some selected folklore medicinal plants from west Nepal. **Scientific World**, v. 4, n. 4, July 2006.

PAULA, L. S. de; BUNYAPRAPHATSARA, N. LEMMENS, R. H. M. J., editors. **Plant resources of south-east Asia n. 12(1). Medicinal and poisonous plants 1**. Leiden, the Netherlands: Backhuya Publishers, 1999.

PERRY, L. M. **Medicinal plants of east and southeast Asia: attributed properties and uses**. Cambridge, Massachusetts, and London: the MIT Press, 1980.

PHARMACOPEA Helvetica. 7. ed. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1993.

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

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRIMACK, R. B. **Essentials of conservation biology**. Massachusetts: Sunderland, 546 p., 1993.

REHDER, V. L. G.; MACHADO, A. L. M., DELARMELINA, C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 2, p. 67-71, 2004.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S; Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**. v.100, p.657-691, 2003.

ROESER, K. R. Nadel der Schwarzkiefer. Massernprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, f. 2, 2006.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Satin Technology**, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

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

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E. dos; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da Atividade antibacteriana das folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 241-244, 2008.

SAMAIN, M. S.; ANDERSHAEVE, L.; CHAERLE, P.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C.; WANKE, S. Is morphology telling the truth about the evolution of the species rich genus *Peperomia* (Piperaceae)? **Plant Systematics and Evolution**. v. 278, p. 1- 21, 2009.

dos SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. **Phytochemistry**. v. 58, p. 547-552, 2001.

SANTOS, S. C.; MELLO, v. c. p. Taninos . In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed., Florianópolis/Porto Alegre: Editora, UFSC/UFRGS, 2007, p. 615-656.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS, 2007. p. 403-434.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REDHER, V. L. Composition and antimicrobial activity os essencial oils from aromatics plantas used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 85, p. 275-289, 2004.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2 ed., Iowa: State College Press, 1951.

- SCHENKEL, M E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed., Florianópolis/Porto Alegre: Editora, UFSC/UFRGS, 2007, p. 711-740.
- SEERAM, N. P.; JACOBS, H.; MCLEAN, S.; REYMOLDS, W.F. A prenylated benzopyran derivate from *Peperomia clusiifolia*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 5, p. 1389-1391, 1998.
- SEERAM, N. P.; LEWIS, A. W.; JACOBS, H.; NAIR, M. G.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, F. Proctoriones A-C:, 2-Acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 399-402, 2000.
- de SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. The essential oils of *Peperomia pellucida* Kunth and *P. circinnata* Link var. *circinnata*. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 14, p. 312-314, 1999.
- SILVA, R. L.; MELO, G. B.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S. O.; DE MELO, V. A.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S.; DE CASTRO E SILVA JÚNIOR, O. Effect the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 101-105, 2002.
- SILVA, S. R. S.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; ANDRADE, N. J.; NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 6, n. 1, p. 63-70, 2003.
- da SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. do S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.
- SIMIONATTO, E.; PORTO, C.; SILVA, U. F. da; SQUIZANI, A. M. C.; DALCOL, I. I.; MOREL, A. Composition and antimicrobial activity of the essencial oil from *Aloysia sellowii*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1458-1462, 2005.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC. 2010.
- SINGH, A. K.; DIKSHIT, A.; DIXIT, S. N. **Beitrage zur Biologie de Planfzen**. v. 58, p. 357, 1983.
- SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.
- SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. *In*: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.
- SOUZA, A. A.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratíssima* (Gill et Hook) Tronc. (guarapá, erva-santa), usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul - Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 9, n. 3, p. 23-29, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. 2 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STASI, L. C. di; LIMA, C. A. H. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed., São Paulo: Fundação Editora da UNESP, 2002.

STROHL, W. A.; ROUSE, H.; FISHER, B. D. **Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology**. 1 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

TAKEMORI, N. K.; BONA, C.; ALQUINI, Y. Anatomia comparada das folhas de espécies de *Peperomia* Piperaceae - I. Ontogênese do tecido aquífero e dos estômatos. **Acta Botânica Brasileira**. v. 17, n. 3, p. 387-394, 2003.

TANAKA, T.; ASAI, F.; IINUMA, M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. **Phytochemistry**. v. 49, n 1, p. 229-232, 1998.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, p. 669-675, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRIPATHI, Y. B.; UPADHYAY, A. K. Effect of the alcohol extract of the seeds of *Mucuna pruriens* on free radicals and oxidative stress in albino rats. **Phytoterapy Research**. v. 16, p. 534-538, 2002.

TRUEBA, G. P.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. **Pharmacognosy**. 9 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988.

TRUEBA, G. P.; SANCHEZ, G. M. Los flavonóides como antixodantes naturales. **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v. 20, p. 297-306, 2001.

USP XXVIII (UNITED STATES PHARMACOPEIA). Rockville. United States Pharmacopeial Convention, 2005.

VAN DUJIN, M. M.; VAN DER ZEE, J.; VAN DEN BROEK, P. J. Analysis of transmembrane redox reactions: interaction of intra- and extracellular ascorbate species. **Methods in Enzimology**. v. 352, p. 268-279, 2002.

VELJI?, M.; CIRI?, A.; SOKOVI?, M.; JANA?KOVI?, P.; MARIN, P. D. Antibacterial and antifungal activity of the liverwort (*Ptilidium pulcherrimum*) methanol extract. **Archives of Biological Sciences Belgrade**. v. 62, n. 2, p. 381-395, 2010.

VELOSO, L. S. M.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. Unusual chromenes from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**. v. 67, p. 492-496, 2006.

VELOSO, L. S. M.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*. **Fitoterapia**. v. 80, p. 119-122, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas.** 2 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996, 362 p.

WANG, C.K.; LEE, W. H.; PENG, C.H. Contents of phenolics and alkaloids in *Areca catechu* Linn. during maturation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** v.45, n.4, p.1185-1188, 1997.

WHO 2003. Traditional medicine. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>>, Consulta em: 20 jan. 2010.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** v. 111, p. 544-547, 1962.

WU, J.; LI, N.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; MITSUI, T.; OGURA, H.; KATOAKA, T.; OKA, S.; KIUCHI, M.; TOMIDA, A.; TURUO, T.; LI, M. TANG, W.; ANDO, M. Bioactive secolignans from *Peperomia dindygulensis*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 790-794, 2006.

XU, S., LI, N.; NING, M-M.; ZHOU, C-H.; YANG, Q-R.; WANG, M-W. Bioactive Compounds from *Peperomia pellucida*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 247-250, 2006.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. **Ver. Racine**, v. 43, p. 50-51, 1998.

YUNCKER., Boletim do Instituto de Botanica (São Paulo) 3: 187. Figura 165. 1966. TIPO: Brasil, Rio de Janeiro, Carmo, **A. F. das Neves Armond s.n.** (holotipo R!; isotipo NY!). Figura 1 C, D, E.

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

ZANOTTI C. A.; BIGANZOLI, F. *Peperomia nitida* y *Peperomia armondii* (Piperaceae), nuevos registros para la Argentina. **Darwiniana**. v. 48, p. 210-213, 2010.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; LOBATO, R. C. L.; TAVARES, A. C. C.; SOUZA, A. P. S.; CONCEIÇÃO, C. C. C.; GUIMARÃES, E. F. *Peperomia circinnata* Link and *Peperomia rotundifolia* (L.) Kunth growing on different host-trees in Amazon: volatiles and relationship with bryophytes. **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 33, p. 269-274, 2005.

ANEXO A – Primeiro anexo



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 29681-1	Data da Emissão: 16/06/2011 13:56
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Bárbara Moriel	CPF: 325.610.688-97
----------------------	---------------------

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
GENERO	Peperomia

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 89927635

