

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Eliane Maurici de Aguiar

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE PIPERÁCEAS NO
VALE DO ITAJAÍ, SANTA CATARINA**

FLORIANÓPOLIS - SC

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE PIPERÁCEAS NO VALE DO ITAJAÍ,
SANTA CATARINA**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Química.**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Inês M^a Costa Brighente

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo

Eliane Maurici de Aguiar

FLORIANÓPOLIS - SC

2003

Eliane Maurici de Aguiar

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS DE PIPERÁCEAS NO VALE DO ITAJAÍ,
SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica e aprovada em sua forma pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina em 19.07.2002.

Banca Examinadora:

Moacir Geraldo Pizzolatti

Maria da Graça Nascimento

Eduardo Carasek da Rocha

“Dedico este trabalho ao meu
esposo, Ronaldo e, a minha filha,
Caroline.”

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^a. Dra. Inês M. Costa Brighente e ao orientador Prof. Dr. Ricardo Andrade Rebelo pela oportunidade, incentivo, dedicação e auxílio em todas as etapas deste trabalho;

Ao Prof^o. M. SC. Aloísio Marcondes do Laboratório de Óleos Essencias da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade e orientação, seja pela disponibilidade dos equipamentos para realização das análises cromatográficas ou na sua pessoa, que sempre com muito carinho e paciência, nos auxiliou e nos repassou seu conhecimento;

A “tia” Hilda que, sempre com muita atenção e carinho, recebeu e hospedou-me em sua casa quando de minhas idas à Curitiba para realização de análises na Univesidade Federal;

À empresa de alimentos Duas Rodas Indl, em especial ao sr. Mozart da Silva Soccas e colaboradores do Laboratório de Pesquisas, pela disponibilização de sua infra-estrutura e realização dos ensaios de caracterização sensorial de uma das espécies estudadas;

À prof^a. Dra. Gladys Roseane Thomé Vieira, do Departamento de Ciências da Saúde da FURB, pela dedicação e empenho na realização dos ensaios de atividade antibacteriana;

À irmã Eva Michalack, da Congregação das Irmãs Catequistas Franciscanas, por disponibilizar os espécimes estudados nos dedicando sempre muita atenção e carinho;

À Fundação Municipal do Meio Ambiente, também pela disponibilização de espécimes estudados os quais foram coletados no Parque São Francisco de Assis, em Blumenau;

À prof^a. Lúcia Sevegnani e bolsistas do Departamento de Ciências Naturais da FURB pela orientação na identificação, coleta do material vegetal e preparação das exsiccatas;

Aos taxonomistas Marcos Sobral da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Marília Borgo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela identificação das exsiccatas;

Aos colegas e amigos de curso, de atividade laboratorial, em especial Mirele, Luis Verdi, Flávia e Luis Everson pelas alegrias compartilhadas, dificuldades divididas e pelo companherismo durante a execução de nossas pesquisas;

Ao Centro de Ciências Exatas e Naturais da FURB e ao Centro de Ciências Exatas da UFSC pela infra-estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho;

Ao CAPES e FUNCITEC pela disponibilização de recursos financeiros que viabilizaram a realização do Mestrado Interinstitucional, e

À todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. DOS CONCEITOS TEÓRICOS	3
2.1- Produtos Naturais e a Biodiversidade.....	3
2.2 - Óleos Essenciais	5
2.3 - Função dos Óleos Essenciais.....	9
2.4 – Biossíntese de Metabólitos Secundários	9
2.5 – Composição dos Óleos Essenciais	14
2.6- Atividade Biológica e Farmacêutica.....	17
2.7- Propriedades Organolépticas.....	20
2.8 - Análise Instrumental Aplicada à Análise de Óleos Essenciais	22
2.8.1- Técnicas Cromatográficas.....	22
2.8.2 - Índice de Retenção.....	24
2.8.3 - Análises Complementares	27
2.9 - Aparelho de Clevenger Modificado.....	28

2.10 - A Família Piperaceae	29
2.10.1- O gênero <i>Piper</i>	30
2.10.2- Gênero <i>Peperomia</i>	31
3- OBJETIVOS	33
3.1- Objetivo Geral	33
3.2- Objetivos Específicos	33
4- PARTE EXPERIMENTAL	34
4.1- Material Vegetal	34
4.1.1- Coletas.....	34
4.2- Método de Extração.....	35
4.3- Grau de Desidratação.....	36
4.4- Análise dos óleos essenciais.....	36
4.4.1- Análises Preliminares por CCD	36
4.4.2- Propriedades Físico-Químicas.....	36
4.4.3- Fracionamento do Óleo em Coluna Cromatográfica	37
4.4.4- Análises Cromatográficas por CG e CG-EM.....	37
4.4.5- Confirmação de Aldeídos.....	38
4.4.6- Análise Sensorial	39
4.4.7- Índice de Retenção.....	39
4.4.8- Investigação de Atividade Antibacteriana	40
5- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.1- <i>Piper cernuum</i> Vell	41
5.1.1- Determinação da Composição do Óleo Essencial	44
5.2- <i>Peperomia emarginella</i>	59
5.2.1 - Determinação das composição do óleo essencial	62
5.2.2- Caracterização Sensorial	72

5.3- Atividade Biológica.....	75
6 – CONCLUSÃO.....	77
7 - PERSPECTIVAS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICE	86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estruturas de alguns terpenos e fenilpropanóides comumente encontrados em óleos essenciais.....	08
FIGURA 2 – Biossíntese do fenilpropanóides.....	12
FIGURA 3 – Biossíntese dos terpenóides.....	13
FIGURA 4 – Derivados de oxidação do limoneno.....	15
FIGURA 5 – Derivados de oxidação do valenceno.....	15
FIGURA 6 – Gráfico de interpretação do sistema de Índice de Retenção.....	25
FIGURA 7 – Aparelho de Clevenger modificado.....	29
FIGURA 8 – Fotografia da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel.....	42
FIGURA 9 – Fotografia da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel (detalhe para o fruto).....	42
FIGURA 10 – Cromatograma do óleo essencial puro da espécie <i>Piper cernuum</i> Vell...	49
FIGURA 11 – Espectro de massas do constituinte di-hidro- β -agarofuran.....	50
FIGURA 12 – Espectro de massas do constituinte elemol.....	51
FIGURA 13 – Espectro de massas do constituinte 10-epi- γ -eudesmol.....	52
FIGURA 14 – Espectro de massas do constituinte trans- \hat{O} -cariofileno.....	53
FIGURA 15 – Estrutura do composto di-hidro-beta-agarofuran.....	55
FIGURA 16 – Cromatograma da fração A do óleo essencial da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel onde predomina o constituinte di-hidro- β -Agarofuran.....	56
FIGURA 17 – Fotografia da espécie <i>Peperomia emarginella</i>	59
FIGURA 18 – Produto de oxidação do decanal.....	65
FIGURA 19 – Produtos de oxidação do limoneno.....	66
FIGURA 20 – Cromatograma do óleo bruto da espécie <i>Peperomia emarginella</i>	67
FIGURA 21 – Espectro de massas do constituinte limoneno.....	68
FIGURA 22 – Fragmentação do limoneno pela reação de Diels-Alder inversa.....	68
FIGURA 23 – Espectro de massas do constituinte decanal.....	69
FIGURA 24 – Fragmentação do decanal pela quebra tipo Mc-Laferty.....	69

FIGURA 25 –	Reação entre o aldeído e a 2,4-di-nitro-fenilhidrazona.....	71
FIGURA 26 –	Cromatograma do óleo essencial puro da espécie <i>Peperomia emarginella</i> realizado pela empresa Duas Rodas Industrial.....	73
FIGURA 27 –	E. M. do α -pineno, constituinte do óleo essencial da <i>Piper cernuum</i> Veel.....	86
FIGURA 28 –	E. M. do α -elemeno, constituinte do óleo essencial da <i>Piper cernuum</i> Veel.....	86
FIGURA 29 –	E. M. do germacreno-D, constituinte do óleo essencial da <i>Piper cernuum</i> Veel.....	87
FIGURA 30 –	E. M. do α -eudesmol, constituinte do óleo essencial da <i>Piper cernuum</i> Veel.....	87
FIGURA 31 –	E. M. do beta-cariofileno, constituinte do óleo essencial da <i>Peperomia emarginella</i>	88
FIGURA 32 –	E. M. do germacreno-D, constituinte do óleo essencial da <i>Peperomia emarginella</i>	88
FIGURA 33 –	E. M. do α -copaeno, constituinte do óleo essencial da <i>Peperomia emarginella</i>	89
FIGURA 34 –	E. M. do α -mirceno, constituinte do óleo essencial da <i>Peperomia emarginella</i>	89
FIGURA 35 –	E. M. do α -pineno, constituinte do óleo essencial da <i>Peperomia emarginella</i>	90

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Identificação das espécies estudadas.....	35
TABELA 2 – Teor em água da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel.....	41
TABELA 3 – Rendimento em óleo essencial da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel coletada em diferentes períodos.....	43
TABELA 4 – Densidade do óleo essencial da espécie <i>Piper Cernuum</i> Veel proveniente de diferentes coletas.....	44
TABELA 5 – Índice de refração do óleo essencial da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel proveniente de diferentes coletas.....	44
TABELA 6 – Identificação dos constituintes presentes no óleo essencial da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel – comparativo entre diversas análises.....	46
TABELA 7 – Identificação dos constituintes presentes no óleo essencial da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel.....	54
TABELA 8– Constituintes identificados no fracionamento do óleo essencial da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel.....	57
TABELA 9 – Composição do óleo essencial da espécie <i>Piper cernuum</i> Veel por grupo químico.....	58
TABELA 10 – Teor em água na espécie <i>Peperomia emarginella</i>	60
TABELA 11 – Rendimento em óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> proveniente de diferentes coletas.....	60
TABELA 12 – Densidade do óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> proveniente de diferentes coletas.....	61
TABELA 13 – Índice de refração do óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> proveniente de diferentes coletas.....	61
TABELA 14 – Identificação dos constituintes presentes no óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> – comparativo entre diversas análises...	63
TABELA 15 – Identificação dos constituintes presentes no óleo essencial da Espécie <i>Peperomia emarginella</i>	70

TABELA 16 – Composição do Óleo Essencial da espécie <i>Peperomia Emarginella</i> por grupo químico.....	71
TABELA 17 – Comparação entre os principais constituintes identificados no óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> , segundo análises realizadas neste trabalho (A) e pela Duas Rodas Industrial (B).....	74
TABELA 18 – Comparação das áreas dos principais constituintes do óleo essencial da espécie <i>Peperomia emarginella</i> (incluindo produtos de oxidação).....	74
TABELA 19 – Ensaio de atividade microbiológica com as cepas <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CoA	- Coenzima A
DMAPP	- Dimetilalilpirofosfo
FPP	- Farnesilpirofosfato
GGPP	- Geranilpirofosfato
IPP	- Isopentenilpirofosfato
IR	- Índice de Retenção
Kunth	- Karl (Carl) Sigismund Kunth (1788-1850)
Miq	- Miquel, Friedrich Anton Wilhelm (1811-1871)
μ L	- Microlitro
nm	- Nanômetro
OPP	- Orto-fenilfenol
U. V.	- Ultravioleta
Yunck	- Truman George Yuncker (1891-1964)
CG-EM	- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectro de Massas
TR	- Tempo de Retenção
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
DM	- Marco Alemão
SNC	- Sistema Nervoso Central
EM	- Espectro de Massas

RESUMO

Óleos essenciais são uma rica fonte de metabólitos secundários voláteis, comumente associados às importantes atividades biológicas. Entre as plantas produtoras de óleo essencial, destaca-se a representatividade da Família Piperaceae, distribuída em cinco gêneros.

O presente trabalho descreve o isolamento, caracterização física e química do óleo essencial de duas espécies de Piperaceae, *Peperomia emarginella* e *Piper cernuum* Veel, bem como a determinação de suas atividades antimicrobianas e propriedades organolépticas. Para a extração do óleo foi usado a técnica de hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado, seguida por caracterização química através de índice de retenção e CG-MS.

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados *in vitro* usando a técnica de difusão em agar e as propriedades organolépticas, através de análise sensorial para estabelecimento do “flavor” do óleo essencial, conduzidas em colaboração com a Duas Rodas Indl. Ltda. *Peperomia emarginella* forneceu o óleo mais interessante do ponto de vista tecnológico, embora em baixo rendimento (0,13%). Decanal e limoneno representam mais de 60% da composição do óleo, 32 e 29%, respectivamente. A maioria dos constituintes pertence a classe dos hidrocarbonetos monoterpênicos. Importantes observações foram relatadas para a estabilidade do óleo à temperatura ambiente e na presença de oxigênio. Nestas condições, observa-se a formação ou um incremento na concentração de ácido decanóico e óxido de limoneno às custas do decanal e limoneno, respectivamente. Determinou-se que poderia ser usado, em concentrações inferiores a 5 ppm, para produzir notas de cítricos, rosas, jasmim e violeta em conjunto com aldeídos florais. O óleo foi moderadamente ativo contra *Staphylococcus aureus* e inerte contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial da *Peperomia emarginella* pode ser usado em perfumaria e aromatização de alimentos. O óleo essencial da *Piper cernuum* Veel foi isolado com 0,51% de rendimento, a partir das folhas frescas, revelando tratar-se de mistura complexa onde o di-hidro- α -agarofuran é o principal constituinte (31%). A maioria dos constituintes pertence a classe dos sesquiterpenos. O óleo foi inativo contra as três espécies investigadas e devido a ausência de algum aroma marcante não foi submetido a análise sensorial.

ABSTRACT

Essential oils are a rich source of volatile secondary metabolites usually associated to important biological activity. Among the plants producers of essential oil are the representatives of the Piperaceae family, distributed in 5 main genus.

The present work describes the isolation, physical and chemical characterization of essential oils from 2 species of Piperaceae *Peperomia emarginella* and *Piper cernuum* Veel, aiming at determining their antimicrobial activity and organoleptic properties. For the oil extraction it was used a standard hydrodistillation procedure employing a modified Clevenger apparatus, followed by the chemical characterization by means of retention index and GC-MS. The antimicrobial activity was performed *in vitro* using the agar diffusion technique and the organoleptic properties conducted in collaboration with Duas Rodas Industrial Ltda, where sensorial procedures were carried out to establish the essential oil flavor.

Peperomia emarginella provided the most interesting oil the technological point the view, although in low yield (0,13%). Decanal and limonene accounted for 61% of the oil composition, 32 e 29%, respectively. The main compound classes were monoterpene hydrocarbons. Important observation was made related to the oil stability at room temperature in the presence of oxygen. In such conditions oxidation takes place giving increasingly amount of decanoic acid and limonene oxide at the expenses of decanal and limonene, respectively.

It was found that in concentrations below 5 ppm it gives notes of citrus, rose, jasmine and purple in association with floral aldehydes. The oil was moderately active against *Staphylococcus aureus* and inert towards *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The essential oil of *Peperomia emarginella* might be used in perfumery and for food flavoring.

The oil of *Piper cernuum* Veel was isolated in 0,51% yield from fresh leaves and showed to be a complex mixture with di-hydro- δ -agarofuran as the main compound (31%). The most important representatives were sesquiterpenes. The oil was inactive against all the 3 bacteria species investigated and due to the absence of any flavor it was not submitted to sensorial analysis.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica ou Floresta Ombrófila Densa é conhecida por sua grandiosa biodiversidade, constituindo-se uma rica fonte de produtos naturais possuindo grande potencial científico e tecnológico.

A Família Piperaceae compreende um grande número de espécies distribuídas em regiões tropicais e sub-tropicais do mundo e muitas destas espécies do gênero *Piper*, *Ottonia* e *Peperomia* têm sido descritas como existentes na Floresta Ombrófila Densa, a qual ainda ocupa áreas expressivas no Vale do Itajaí em Santa Catarina. Para Santa Catarina, segundo Yunker, são citados principalmente os gêneros *Piper* e *Peperomia* (YUNCKER, 1972, 1973 e 1974).

Muitos destes gêneros são produtores de óleo essencial, portanto, importante fonte de metabólitos secundários, notadamente fenilpropanóides e terpenóides.

Os óleos essenciais constituem-se importante fonte de matérias-primas e numerosos grupos de plantas estão em estudo em todo o mundo com vistas no aproveitamento de seu óleo essencial. Devido às propriedades biológicas normalmente interessantes e aroma marcante, normalmente agradável, que a maioria dos óleos essenciais apresentam, são freqüentemente alvo de interesse pela indústria farmacêutica, alimentícia e de perfumaria (ZAMBONI, 1983; CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

Pode-se ainda destacar a importância deste estudo como contribuição na investigação química de espécies vegetais. Sabe-se que hoje grande parte da população, seja como único recurso ou seguindo moda naturalista, recorre ao consumo de produtos naturais para a cura de seus males e que vários distúrbios têm sido atribuídos ao consumo inadequado destes produtos, seja como medicamento ou na alimentação. Por este motivo a investigação científica da composição e atividade de produtos naturais constitui-se tarefa extremamente importante para validação de seu consumo humano (ABBOUT, 1988).

Outro argumento bastante forte, especialmente para nós brasileiros, é a nossa condição geográfica. O país possui extensão territorial que permitiria grandes empreendimentos agrícolas em óleos essenciais o que poderia ser sugerido, e de certa forma

já vem acontecendo, pelo menos para as regiões mais carentes como norte e nordeste. A descoberta de espécies produtoras de óleo essencial que despertem interesse científico e tecnológico muito provavelmente representarão interesse econômico. Porque não tirar proveito disso em benefício da população? Como produtor de óleos essenciais, o Brasil poderia ainda utilizar tecnologia química e lhes agregar valor através de purificação, destilação, isolamento de constituintes e modificações químicas, passando rapidamente de importador à exportador dos produtos sintéticos, derivados destes. Portanto trata-se de um nicho econômico bastante promissor (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

A razão do estudo do tema proposto emerge no interesse na identificação de outras espécies produtoras de óleo essencial com vistas na sua possível aplicação “in natura” ou como fonte de precursores de outras substâncias de maior valor agregado. A escolha pela família Piperaceae se deu em função desta parecer bastante promissora quanto à produção de óleo essencial, além de ser bastante abundante na região.

Este trabalho objetiva identificar e caracterizar, em especial, óleos essenciais de Piperáceas de ocorrência no Vale do Itajaí-SC. Para tanto far-se-á um estudo sistemático com espécies desta família, independente do gênero, com o propósito de identificar aquelas produtoras de óleo essencial e estabelecer seu perfil químico bem como sua aplicação.

2. DOS CONCEITOS TEÓRICOS

2.1- Produtos Naturais e a Biodiversidade

Uma das principais características da biodiversidade é a distribuição relativa desigual dos seus componentes no espaço geográfico, significando que a abundância de espécies é variável em um determinado ambiente e que existem gradientes geográficos da biodiversidade. O Brasil, neste sentido, encontra-se em posição privilegiada pois possui a maior diversidade genética vegetal do mundo com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1996). A maioria destas espécies vegetais encontram-se em florestas tropicais, representada no Brasil pela Floresta Atlântica, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra. Portanto, essas regiões devem ser consideradas como prioritárias no estabelecimento de programas de conservação “in situ” de germoplasma vegetal (SOEJARTO, 1996).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pode-se destacar o óleo da *Piper hispidinervium* do qual obtêm-se o safrol como componente majoritário. A principal utilização industrial do safrol se constitui na obtenção do piperonal e butóxido de piperonila, que são muito usados como matéria-prima na industrialização de fragrâncias e de inseticidas leves e biodegradáveis. Também é utilizado na obtenção da paroxetina, fármaco empregado como anti-depressivo (BARREIRO & FRAGA, 1999). Ainda como exemplo pode-se citar a utilização do citronelol, principal constituinte de *Eucaliptus citriodora*, como precursor na síntese de feromônios sexuais (ZARBIN et al., 2000).

É importante destacar que, apesar de toda a importância atribuída as plantas, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal. No Brasil, apenas 8% das espécies vegetais foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais. O ritmo atual de extinção de plantas já é entre 50 e 100 vezes maior que as taxas

médias observadas no passado mais próximo. As principais causas da perda da diversidade genética têm sido associadas à destruição e à fragmentação dos ecossistemas e aos estresses ambientais como a poluição e as mudanças climáticas globais (SOULÉ, 1991; SIMÕES, 1999). A crescente extinção de espécies vegetais leva à necessidade de se considerar urgente o estabelecimento de políticas e ações de conservação e, ao mesmo tempo, de se obter grandes quantidades de matéria prima vegetal para a obtenção de substâncias dela derivada, pois caso contrário, determinada espécie pode se tornar extinta sem que tenhamos a chance de caracterizá-la, conhecer seu potencial e usufruir de seus benefícios (BORRIS, 1996).

Outro fato importante que advém do estudo de plantas é a descoberta não somente de novas substâncias ativas, inéditas, mas também de metabólitos já conhecidos, consagrados, só que de uma nova fonte, talvez mais abundante ou, ecologicamente, mais saudável, ou seja, cuja extração não comprometa a vida da planta. Até 1991 o país era o maior produtor mundial de safrol, o qual era obtido do lenho da canela sassafrás, *Ocotea pretiosa*. Contudo, a exploração rotineiramente extrativista e crimosamente predatória, quase determinou a extinção desta espécie vegetal, fazendo com que o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis- IBAMA, através do Decreto 1.557, publicado no Diário Oficial da União em 25 de setembro de 1991 proibisse a exploração das áreas remanescentes. Estudos com representantes da Família Piperaceae revelaram a existência de duas novas fontes potenciais deste metabólito, a espécie *Piper hispidinervium*, já citada anteriormente, e, mais recentemente, a espécie *Piper mikanianum*. Nestas duas espécies o óleo essencial concentra-se nas folhas, o que permite que o óleo seja extraído sem a derrubada da planta. Também se regeneram mais rápido permitindo até duas podas por ano, diferentemente de uma espécie lenhosa (REBELO et al., 2002; SAFROL DA AMAZÔNIA, 1994; CHAVES, 1994).

Várias espécies vegetais têm sido largamente utilizada pela população, algumas com estudos químicos e/ou farmacológicos que dão suporte à sua utilização, outras empregadas apenas a partir do conhecimento empírico ou tradicional da população. Porém, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. A validação científica desses produtos é essencial ao seu uso como medicamentos alternativos (SIMÕES, 1999; ABBOUT, 1988).

As potencialidades de uso de plantas medicinais encontram-se longe de estarem esgotadas. Novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão no reino vegetal soluções, através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas, com atividade terapêutica, com aplicações na tecnologia farmacêutica ou no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (CORRÊA JÚNIOR et al., 1994).

Pode-se considerar ainda que, com a demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, o cultivo e o extrativismo dessas plantas torna-se uma alternativa cada vez mais atrativa e importante na agricultura nacional, contribuindo para o desenvolvimento econômico do país (CORRÊA JÚNIOR et al., 1994).

Por fim, a biodiversidade pode ser entendida como uma preciosa biblioteca genética mantida em seus ecossistemas naturais, na qual apenas uma pequena parte de seus componentes foi adequadamente estudada e cujos benefícios futuros não são ainda conhecidos (BRITO & NUNES, 1997).

2.2 - Óleos Essenciais

A denominação “óleos essenciais” define um grupo de substâncias naturais de variável poder aromatizante, de composição mais ou menos complexa que faz parte do organismo de diversas espécies vegetais e de algumas espécies animais, das quais é extraído segundo processamento específico para cada caso (ZAMBONI, 1983). De forma geral, são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Devido ao aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, também são designados por óleos essenciais (SIMÕES, 1999; BAUER & GARBE, 1985).

A exploração de óleos essenciais começou, historicamente, no Oriente vários anos antes de Cristo, tendo bases de produção na Pérsia, Índia, Egito e em outros países da região. No decorrer do tempo surgiram destilarias de óleos essenciais pelo mundo afora, mas somente com o advento da química fina a atividade tomou impulso, permitindo a manipulação de produtos com várias aplicações científicas (CHAVES, 1994).

Os óleos essenciais podem ser usados brutos ou como fontes de importantes precursores na síntese orgânica. Neste caso, os óleos que contêm uma porcentagem alta de um único composto, são usados para a obtenção do referido composto isolado. A presença dos componentes na essência, em maiores ou menores quantidades, afeta diretamente sua qualidade, ditando as possibilidades do aproveitamento industrial e, por conseqüência, o valor comercial do óleo bruto (ZAMBONI, 1983 e CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993).

Plantas ricas em óleos voláteis são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras (SIMÕES, 1999).

Eles constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas para várias indústrias, notadamente as de perfumaria, alimentos e farmacêutica. Por este motivo o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos voláteis constituem importantes atividades econômicas. Avalia-se que, para a obtenção de óleos de espécies da família Lamiaceae, sejam cultivados mais de 500 mil hectares destacando-se como espécies de maior utilização: *Mentha arvensis* L. var *piperascens* Holmes, *Mentha piperita* L. , *Mentha spicata* L. , *Lavandula intermedia* Emeric. Ex Loisel., *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., *Mentha gracilis* Sole, *Lavandula angustifolia* Mill. e *Rosmarinus officinalis* L.

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por fenilpropanóides e terpenóides, sendo que estes últimos preponderam. Estas classes de substâncias são freqüentemente alvo de interesse de pesquisadores que vêem neles uma fonte promissora de princípios ativos diretos ou precursores na síntese de outros compostos de maior importância e valor agregado, como por exemplo o safrol, eugenol, citral, citronelal, dentre outros. Embora a maior utilização ocorra nas áreas de alimentos como condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas, cosméticos na composição de perfumes e produtos de higiene e farmacêutica como fonte de matéria prima, também são empregados “in natura” em preparações galênicas simples, em medicina alternativa, como a aromaterapia por exemplo e até mesmo para aromatização de ambientes (ROSE, 1995; SIMÕES, 1999; CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993; BERMUDEZ, 1995).

Existem no comércio aproximadamente 90 variedades de óleos essenciais. O Brasil concorre no mercado com um número considerável, produzido a partir de (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993; SIMÕES, 1999):

- Gramíneas: citronela (*Cymbopogon nardus*), capim limão (*Cymbopogon citratus*) e palmarosa (*Cymbopogon martini*);
- Plantas de folhas largas: patchouly (*Pogostemon patchouli*) e hortelã (*Mentha piperita* e *Mentha viridas*), pimenta longa (*Piper hispidinervium*);
- Cascas de frutas cítricas: laranja (*Citrus sinensis* ou *Citrus aurantium*), limão (*Citrus limon*), tangerina (*Citrus reticulata* ou *Citrus nobilis*), mandarina (*Citrus reticulata*) e bergamota (*Citrus bergamia*);
- Árvores (madeira): Cabriúva, Copaíba (grupo das Cesalpinoídeas), Pau Rosa (*Aniba rosaedora*);
- Árvores (folhas): Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus glóbulos*) e cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*).

Dentre esses óleos, destacam-se os extraídos de Lemongrass (capim-limão), *Eucalyptus citriodora* (eucalipto), *Eugenia caryophyllata* (cravo da Índia) e até alguns anos atrás o da canela de sassafrás (*Ocotea pretiosa*). Os referidos óleos apresentam como constituinte principal o citral, D-citronelal, eugenol e safrol, respectivamente.

A Figura 1 apresenta algumas estruturas terpênicas e fenil propanóides comumente encontrados em óleos essenciais (CRAVEIRO & QUEIROZ, 1993; ZAMBONI, 1983).

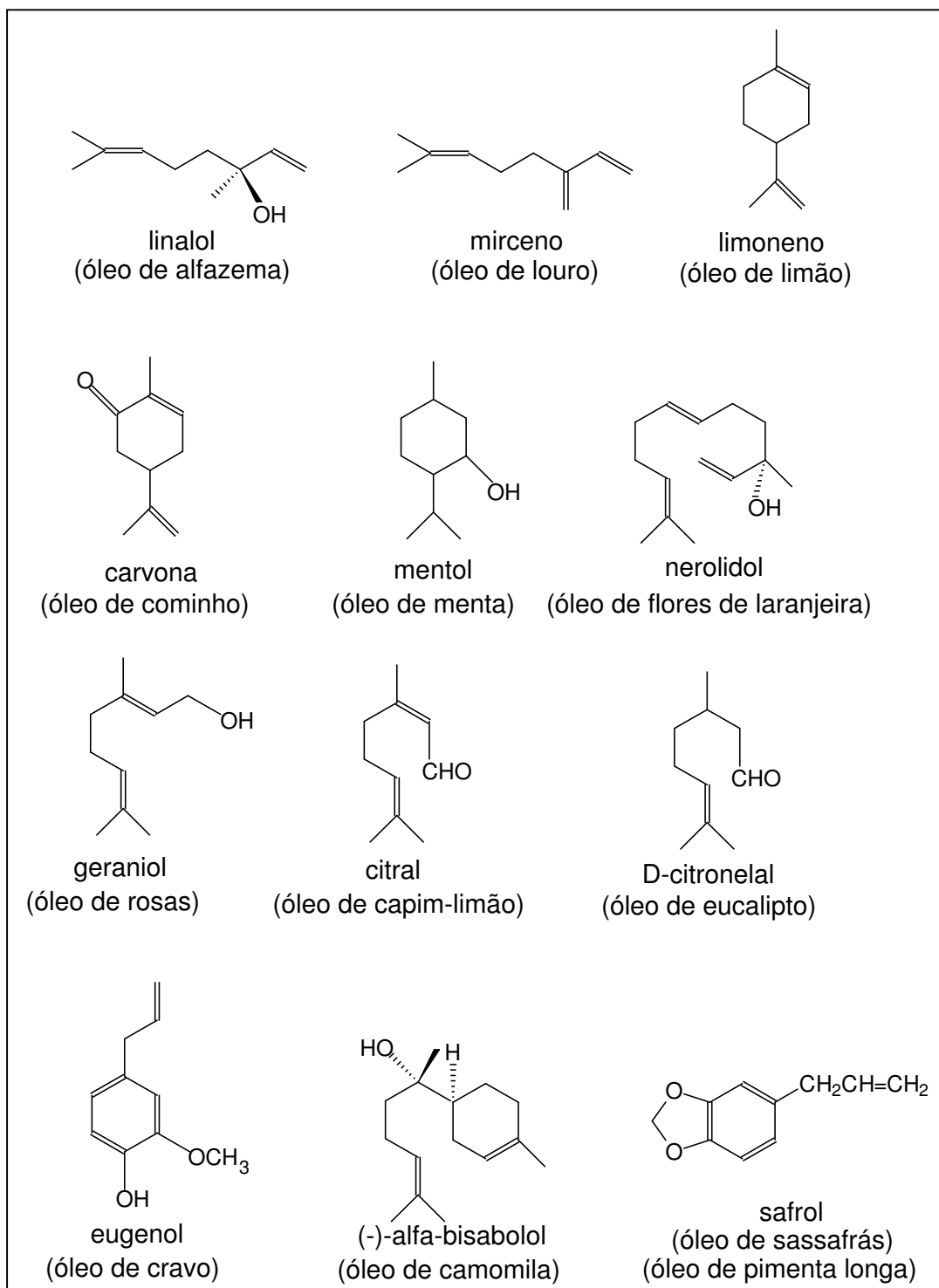


FIGURA 1- Estruturas de alguns terpenos e fenilpropanóides comumente encontrados em óleos essenciais.

2.3 - Função dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais localizam-se nos espaços intercelulares ou nas bolsas oleíferas, presentes praticamente em todas as partes da planta, embora cada tipo os possua em regiões definidas: embriões, flores, folhas, cascas, talos, frutas, sementes, madeira, raízes, rizomas e, em algumas árvores, nos exudatos óleo-resinosos (ZAMBONI, 1983).

A principal evidência para a suposição que os componentes dos óleos essenciais não são fontes importantes de energia para a planta é o fato de que os óleos não são transportados para o caule. Sabe-se que muitos de seus constituintes estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio.

As abelhas e borboletas são insetos freqüentemente atraídos por aromas de diversas flores. Plantas com polinização noturna ou crepuscular possuem aromas particularmente intensos, pois, nesses horários, o estímulo atrativo visual torna-se impraticável (HARBONE, 1988).

Existem trabalhos demonstrando que a toxicidade de alguns componentes dos óleos voláteis constitui uma proteção contra predadores e infestantes. Mentol e mentona, por exemplo, são inibidores do crescimento de vários tipos de larvas (RODRIGUES & HEALEY, 1984). Também existem evidências de que alguns insetos utilizam óleos voláteis seqüestrados de plantas para defenderem-se de seus predadores. Assim, os vapores de certas substâncias como citronelol, utilizado por formigas, e α -pineno, utilizado por cupins, podem causar irritação suficiente em um predador para fazê-lo desistir de um ataque (HARBONE, 1988).

2.4 – Biossíntese de Metabólitos Secundários

Os produtos químicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grandes grupos. Os primeiros, essenciais a todos os seres vivos, são os metabólitos primários ou macromoléculas. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas diversas e freqüentemente desconhecidas, originam, as custas de energia, o segundo grupo de compostos químicos, os metabólitos secundários ou micromoléculas, que geralmente

apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas e são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas. Os processos que envolvem a biossíntese são governados por genes e portanto, serão influenciados por três fatores principais: hereditariedade, estágio de desenvolvimento e o ambiente. Em várias espécies o local da biossíntese está restrito a um órgão, enquanto que os produtos são acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes e específicos devido a um sistema de transporte intercelular (SIMÕES, 1999).

O aparecimento de metabólitos biologicamente ativos na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, sendo que a co-evolução de plantas, insetos, microorganismos e mamíferos conduz à síntese de metabólitos secundários com funções de defesa ou atração, principalmente. Assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, freqüentemente, apresentam atividades biológicas interessantes. Embora muitos metabólitos primários também sejam de interesse em algumas áreas, o elevado número e a grande diversidade dos metabólitos secundários vegetais têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que vêem neles uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SILVA, M. et al., 1992; SIMÕES, 1999; WERMUTH, 1996).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato.

Os ácidos cinâmicos são os precursores da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (ArC3), compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático. A redução da cadeia lateral dos ácidos cinâmicos conduz à formação de compostos importantes presentes em óleos voláteis, como por exemplo o eugenol, presente em *Eugenia caryophyllata* (L.), conhecido como cravo-da-índia, empregado em produtos de higiene oral. A cadeia lateral também pode perder átomos de carbono, originando derivados ArC2 e ArC1. A biossíntese desta classe de compostos pode melhor ser entendida com o auxílio da Figura 2. Os fenilpropanóides também servem como unidades formadoras dos compostos fenólicos mais complexos como os lignóides e as cumarinas (SIMÕES, 1999; GEISSMANN & CROUT, 1969).

A rota empregada na biossíntese dos terpenóides é apresentada na Figura 3. O mevalonato é formado da condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma molécula da acetil-CoA. Após a condensação aldólica ocorre uma hidrólise originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzida a mevalonato, numa reação irreversível. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato, ou isopreno ativo, a unidade básica na formação dos terpenos e esteróides. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula de isopentenil-pirofosfato e seu isômero dimetilalil-pirofosfato formam trans-geranil-pirofosfato, a partir do qual forma-se os demais terpenos (SIMÕES, 1999; GEISSMANN & CROUT, 1969).

Novas ligações cabeça-cauda entre trans-geranil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato resultarão em sesqui (C15) e diterpenos (C20). Já a ligação cabeça-cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato (C15) dará origem ao esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteróides. Os triterpenos (C30) originam-se da ciclização do esqualeno, enquanto que os esteróides (C27) podem ser considerados metabólitos dos triterpenos. Dentre os triterpenos e esteróides de origem vegetal de importância estão as saponinas (SIMÕES, 1999).

Os metabólitos secundários compreendem várias classes de substâncias dentre as quais pode-se citar as cumarinas, ligninas, flavonóides, taninos, quinonas, saponinas, os alcalóides e a fração volátil denominada de óleos essenciais que é objeto de estudo deste trabalho. Cada classe de metabólitos secundários é extraída/isolada da planta que a contém segundo métodos específicos para cada caso. (SIMÕES, 1999).

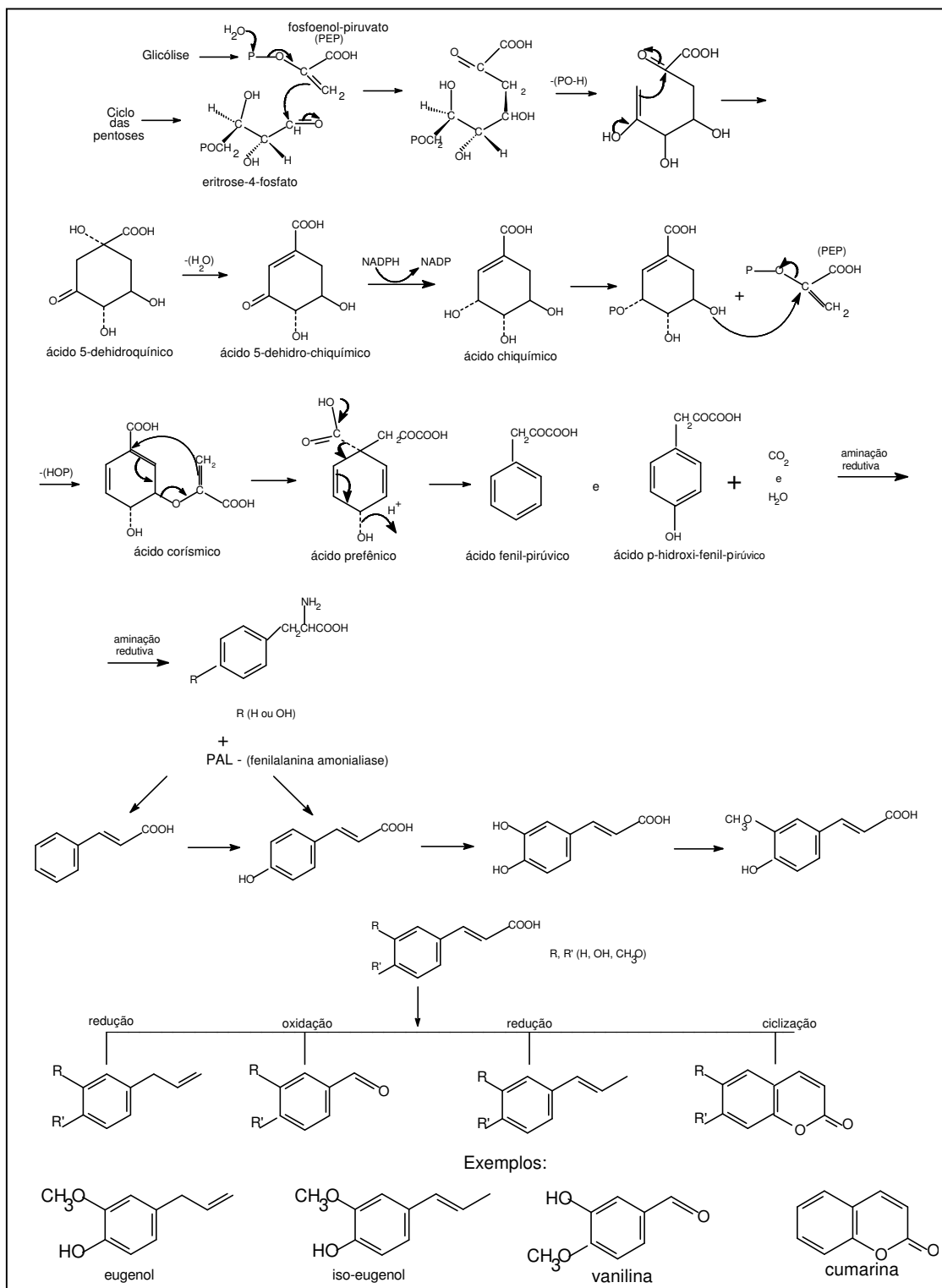


FIGURA 2 – Biossíntese de fenilpropanóides

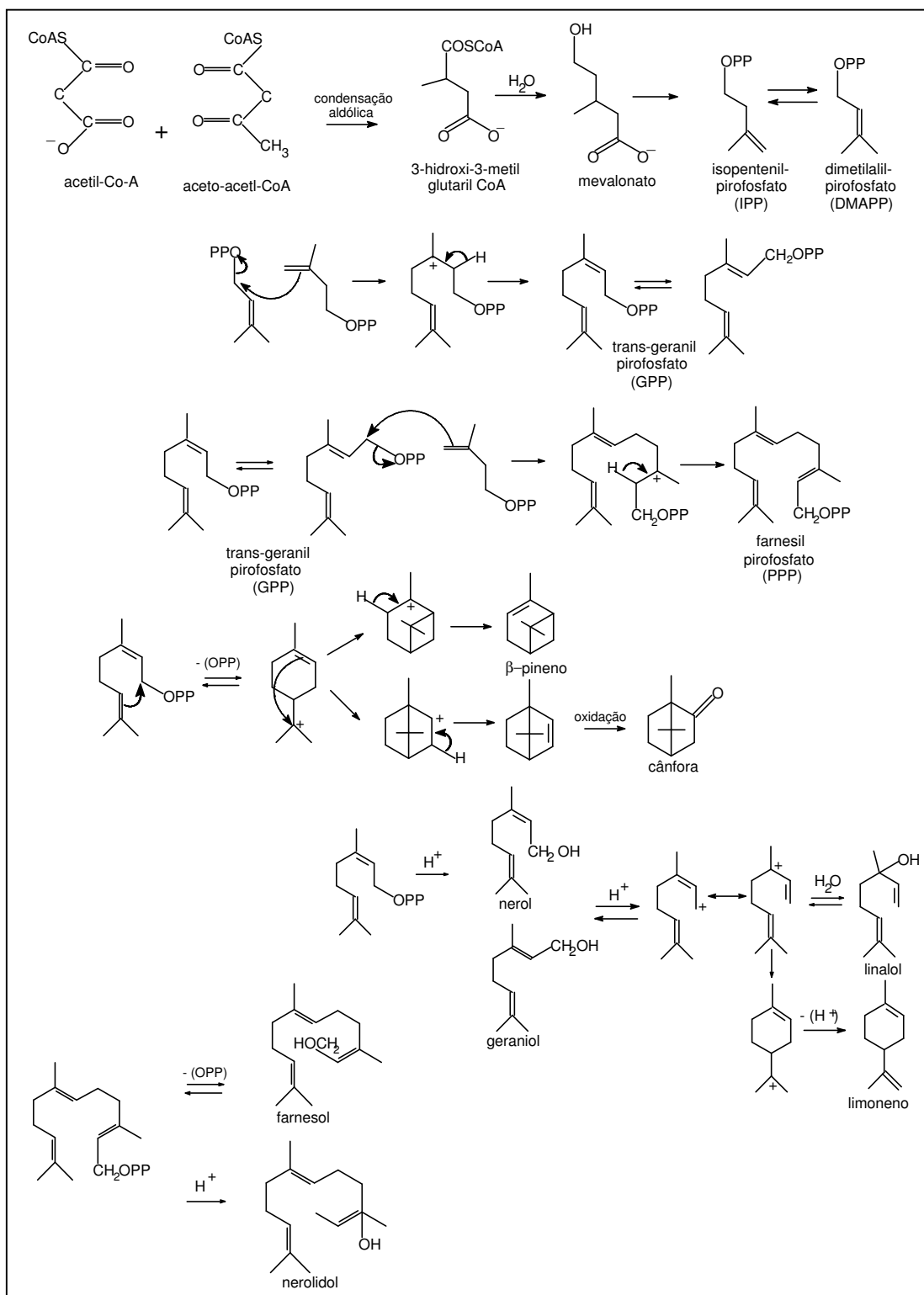


FIGURA 3 – Biossíntese dos terpenóides.

2.5 – Composição dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são complexos orgânicos constituídos por numerosos componentes, notadamente monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular, característica esta que lhes confere alta volatilidade e que permite sua extração pelo arraste com vapor de água (SIMÕES, 1999).

As novas técnicas analíticas têm favorecido grandemente o estudo de óleos essenciais, e o número de constituintes químicos identificados está crescendo constantemente em muitos óleos, principalmente nos mais importantes (ZAMBONI, 1983). Estes constituintes são formados de apenas cinco espécies de átomos: carbono, hidrogênio, oxigênio e em quantidade muito menor de nitrogênio e enxofre (ZAMBONI, 1983).

Os óleos essenciais, não raramente, são misturas e é muito comum encontrar variedades com 100, 200 ou mais compostos que se caracterizam por terem funções idênticas, por exemplo: hidrocarbonetos, álcoois, cetonas, aldeídos, olefinas, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos, compostos polifuncionais e compostos terpênicos com todas estas funções.

Alguns terpenos, como o hidrocarboneto limoneno, são encontrados em diferentes espécies vegetais, enquanto outros, principalmente aldeídos aromáticos e fenóis, ocorrem como principais constituintes em algumas plantas. O aroma característico do óleo de cravo, por exemplo, é devido ao eugenol, seu principal componente (ARAÚJO, 1999).

Os hidrocarbonetos são os constituintes mais comuns dos óleos essenciais, mas eles não são necessariamente os mais valiosos. Eles são frequentemente sujeitos à auto-oxidação e diminuem a solubilidade dos óleos em álcool. Esta tendência a oxidação é devida principalmente, a insaturações facilmente oxidadas em presença de calor, luz e oxigênio. Nestes casos há formação de aromas indesejáveis, originados de novos compostos formados. Os produtos de oxidação de maior contribuição para formação de aromas indesejáveis no óleo de limão, por exemplo, são carveol e carvona (Figura 4). De forma similar, o valenceno é oxidado para nootcatono (Figura 5) responsável pelo sabor amargo e rançoso em suco de laranja “velho” (ARAÚJO, 1999; ZAMBONI, 1983).

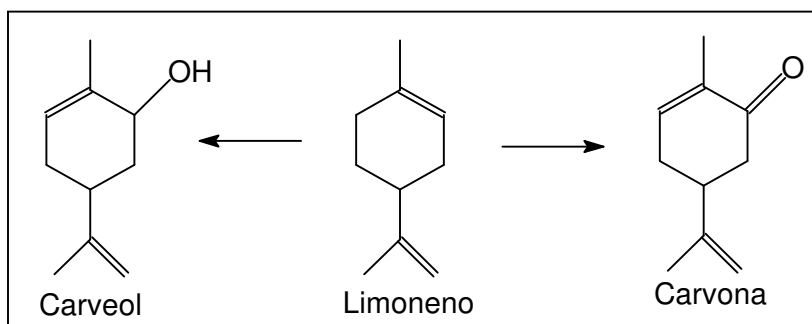


FIGURA 4 – Derivados de oxidação do limoneno.

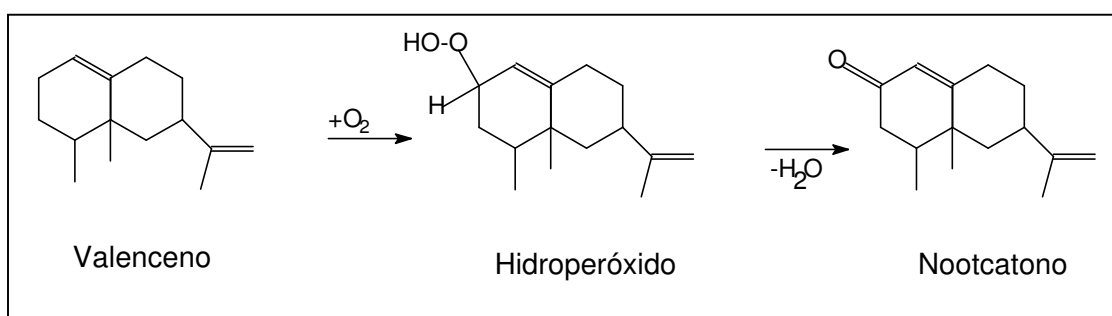


FIGURA 5 – Derivados de oxidação do valenceno.

Os compostos oxigenados como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos, acetais, óxidos, lactonas e fenóis são responsáveis pelo odor específico dos óleos e representam suas maiores porções de solúveis em álcool (ARAÚJO, 1999; ZAMBONI, 1983).

Normalmente, na indústria, óleos com alta concentração de hidrocarbonetos terpênicos, sofrem uma redução parcial destes, denominada desterpenação. O objetivo deste processo é concentrar os componentes responsáveis pelo aroma e assegurar que o produto tenha maior estabilidade, tornando-o menos sensível à oxidação, e melhor solubilidade em álcool.

Compostos nitrogenados, embora menos frequentes, geralmente têm odor intenso e os que contêm enxofre estão presentes em quantidades menores e seus odores são ainda mais pronunciados (ARAÚJO, 1999 ; ZAMBONI, 1983).

Os componentes isolados servem de matéria-prima para a fabricação sintética de importantes compostos. Neste sentido representam especial importância óleos que contêm

uma porcentagem alta de um único composto mas, os componentes presentes em quantidade minoritária também são importantes porque conferem ao óleo seu odor característico, de importância fundamental para a indústria de perfumes e aromas (ARAÚJO, 1999 ; ZAMBONI, 1983).

A composição do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento mas, as condições ambientais são capazes de causar variações significativas. A composição dos óleos voláteis ainda pode variar em função de quimiotipos, ou seja, vegetais botanicamente idênticos, mas que diferem quimicamente. Por exemplo, para *Chrysanthemum vulgare* (L.) Bernhardt (= *Tanacetum vulgare* L.) (catinga-de-mulata), apenas na Hungria, foram caracterizados 26 quimiotipos, com diferenças significativas na composição dos óleos (TEUSCHER, 1990).

Também exemplificando esta questão pode-se citar os resultados obtidos para a *Piper mikanianum* de origem catarinense, os quais não estão de acordo com outras descrições previstas na literatura para o óleo essencial desta mesma espécie proveniente de espécimes coletados em localidades do estado do Rio Grande do Sul. O óleo essencial dos exemplares de origem catarinense apresentaram o constituinte safrol como componente majoritário (84%), enquanto no óleo essencial dos espécimes originários do Rio Grande do Sul nem sequer traços de safrol foi evidenciada (REBELO et al., 2002; POSER et al., 1994).

O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influem sobre a composição química dos óleos voláteis. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem na superfície. Nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos voláteis é mais constante. Exemplo disto é a hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L., Lamiaceae) que, quando cultivada em períodos de dias longos e noites curtas, apresenta um maior rendimento de óleo, com teor aumentado de mentofurano; ao contrário, noites longas favorecem a formação de mentol (SIMÕES, 1999).

Durante a destilação, a água, a acidez e a temperatura podem provocar a hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerizações, racemizações e oxidações. Também para o armazenamento dos óleos voláteis deve-se tomar alguns cuidados. A relativa instabilidade das moléculas que constituem os óleos voláteis torna difícil sua conservação. As possibilidades de degradação são inúmeras e podem ser estimadas através da medição de alguns índices como de peróxido e de refração, da determinação de características físico-químicas como viscosidade, miscibilidade com álcool, poder rotatório, além da análise por cromatografia gasosa. As alterações ocorrem, principalmente, por reações de oxidação e de polimerização. Os óleos voláteis devem ser guardados dessecados, secos com Na_2SO_4 anidro, e livres de impurezas insolúveis. Para reduzir as degradações, deve-se empregar frascos de pequeno volume, em embalagens neutras, feitas de alumínio, aço inoxidável ou vidro âmbar, completamente cheios e hermeticamente fechados, que devem ser estocados a baixa temperatura ou, de preferência, em atmosfera de nitrogênio (SIMÕES, 1999).

2.6- Atividade Biológica e Farmacêutica

Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos. Esta propriedade, presente na grande maioria destes compostos, de certa maneira, representa uma extensão da própria função que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos (JANSSEN et al., 1987; SILVA, M. et al., 1992).

A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, de frações obtidas ou do óleo puro, “in natura”, a fim de identificar qual ou quais substâncias são responsáveis por algum efeito observado. No trabalho de KELNER & KOBER citado em LOBATO et al. (1989) são relatados os resultados de ensaios de ação bactericida com cerca de 175 óleos essenciais visando a desinfecção de ambientes domésticos e hospitalares. Entre os grupos de substâncias responsáveis pelas atividades antibacterianas observadas, estavam álcoois monoterpênicos tais como linalol, geraniol e α -terpineol, além de óxidos como ascaridol e 1,8 cineol. Os fenóis

timol e carvacrol e os alilfenóis eugenol e safrol apresentaram também elevada atividade antimicrobiana.

Normalmente a atividade biológica observada é atribuída a uma única substância mas, há casos em que algum tipo de atividade biológica existente para o óleo bruto não foi observado nas substâncias isoladas. LOBATO et al. (1989) realizaram ensaios para avaliação de atividade antimicrobiana com 14 óleos essenciais contra 9 diferentes tipos de bactérias. Três destes óleos apresentaram atividade, entre eles um proveniente de uma espécie de Piperaceae, *Piper hispidinervium*, cujo principal componente é o safrol. Comprovou-se após fracionamento do referido óleo que o responsável pela atividade bacteriana é o safrol. No entanto, é levantada a hipótese de que o efeito antibacteriano observado esteja sendo potencializado pela presença de pequena quantidade de um derivado do mentol não identificado e, também pelo δ -elemeno pois, frações que o continham, apesar do safrol, também nestas frações ser o componente principal, apresentaram maior atividade.

Também é citada atividade antimicrobiana para α e β -pineno e limoneno (CHALCAT et al., 2000 ; NEIROTTI et al., 1996).

A ação anti-inflamatória apresentada pelo metabólito α -bisabolol, o qual é obtido a partir do óleo essencial da camomila (*Matricaria chamomilla*), também merece destaque. O rendimento em óleo essencial da camomila é baixo e a concentração de α -bisabolol neste é muito variável, normalmente muito baixa (0 a 45%), o que justifica seu alto valor comercial (DM 10,000/kg). No entanto, estudos revelaram que este constituinte é o principal responsável pela atividade anti-inflamatória observada no óleo essencial. O α -bisabolol preparado sinteticamente, neste caso como uma mistura racêmica (\pm), também apresenta atividade biológica, no entanto menor que o obtido naturalmente, que é a forma (-). O α -bisabolol obtido sinteticamente é predominantemente utilizado pela indústria de cosméticos. Para uso específico, o isômero obtido naturalmente, promove melhores resultados. Neste caso os fins justificam os meios e muito bem exemplificam a importância deste metabólito (JELLINEK, 1984).

É preciso levar em consideração que, se é possível estabelecer a atividade farmacológica de uma substância isolada, o mesmo não é tão fácil para um óleo volátil que,

além de ser uma mistura complexa, pode ter sua composição alterada por vários fatores. Contudo algumas propriedades farmacológicas estão relativamente bem estabelecidas como por exemplo ação secretolítica promovida por alguns óleos essenciais como de eucalipto e anis-estrelado e ação sobre o SNC. Esta última pode ser estimulante quando promovida por óleos voláteis contendo cânfora, depressora como no caso da melissa e do capim-limão ou mesmo provocar convulsões quando usado em doses elevadas como a losna, erva-de-santa-maria, sávia e canela (SILVA, M. et al., 1992 ; SIMÕES, 1999).

Uma possível explanação para efeitos antiinflamatórios apresentado pela maioria mas, em especial, por alguns óleos essenciais, pode ser explicado por suas propriedades antioxidantes. A patogênese e sintomas de processos inflamatórios são acompanhados e/ou iniciados pela produção de espécies oxigenadas reativas (ROS) ou radicais livres. O efeito dos óleos essenciais nestes processos tem sido estudado com o auxílio de reações modelo de bioquímica, simulando estes eventos patológicos. Ensaio de efeito anti-inflamatório foram realizados com óleo essencial de Eucalipto obtendo-se resultados positivos e satisfatórios comparados ao efeito do Myrton, uma droga natural usada contra infecções do trato respiratório, usada como padrão neste estudo. O Myrton e o óleo de eucalipto amenizam processos inflamatórios pela interação com radicais oxigenados agressivos do tipo $\text{OH}\cdot$ e interferem na ativação leucócita. Estas atividades permitem a atenuação parcial do ataque oxidativo e prejudicial introduzidos por infecções ou impactos ambientais (GRABMANN et al., 2000).

Como pode ser visto, a tendência a oxidação apresentada por alguns óleos essenciais pode ser indesejada para algumas aplicações, como na área de alimentos por exemplo, mas, por outro lado de apreciadíssimo interesse como antioxidante em outras preparações a exemplo dos cosméticos.

Do ponto de vista químico, os óleos voláteis com alto teor de compostos insaturados são, geralmente, os mais tóxicos. A toxidade crônica dos óleos voláteis é pouco conhecida e ainda é necessário avaliar suas eventuais propriedades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas (SVENDSEN & SCHEFFER, 1985; TISSERARD & BALACS, 1995).

2.7- Propriedades Organolépticas

Uma das características mais evidentes de um óleo volátil é o seu odor. O olfato do ser humano é um instrumento muito potente para analisar amostras odoríferas e, em muitos casos, quando treinado, pode ser até mais sensível do que alguns métodos instrumentais. O odor é a percepção, por meio do nariz, de substâncias voláteis liberadas dos objetos. Nos casos dos alimentos e, na maioria das substâncias odoríferas, esta propriedade é diferente para cada uma e não é possível estabelecer classificações nem taxonomias completamente adequadas para os odores. Assim a descrição verbal de um odor é extremamente difícil devido a falta de objetividade (MORALES, 1994).

O aroma consiste na percepção de substâncias odoríferas ou aromáticas de um alimento depois de tê-lo colocado na boca. Estas substâncias se dissolvem na mucosa do paladar (boca) e da faringe e chegam, através das trompas de eustáquio, aos centros sensores do olfato (MORALES, 1994).

O gosto ou sabor básico de um alimento pode ser ácido, doce, salgado ou amargo ou, ainda, uma combinação de dois ou mais desses quatro. Esta propriedade é detectada por meio da língua. Há pessoas que podem perceber com muita clareza determinado gosto e, no entanto, não conseguir definir com clareza outros gostos. É necessário determinar que sabores básicos pode detectar uma certa pessoa para que então possa participar de provas de sabor.

O sabor é o atributo dos alimentos mais completo, ele combina três propriedades: o odor, o aroma e o gosto. O sabor é a soma das três características e, portanto, sua medição e apreciação são mais completas que cada propriedade em separado. É o sabor que diferencia um alimento do outro e não o gosto, pois se se provar um alimento com os olhos fechados e o nariz tampado, somente poderá se julgar se é doce, salgado, amargo ou ácido. Em contrapartida se se percebe o odor, facilmente se identifica de que alimento se trata (MORALES, 1994).

Quanto as propriedades sensoriais estas podem ser divididas em provas afetivas, discriminativas e descritivas.

Nas provas afetivas o provador simplesmente indica se gosta ou não do produto, se aceita ou recusa ou se prefere outro. As provas afetivas podem ser classificadas em provas de preferência, de satisfação e de aceitação.

As provas discriminativas são aquelas que não se requer conhecer a sensação subjetiva que produz um alimento a uma pessoa, sendo que deve-se estabelecer se há diferenciação ou não entre duas ou mais amostras e, em alguns casos, a magnitude ou importância desta diferença. Estas provas são muito usadas em controle de qualidade para avaliar se as amostras de um lote estão sendo produzidas com uma qualidade uniforme, se estão em conformidade com os padrões. Há necessidade de degustadores treinados, somente para alguns produtos mais complexos, principalmente quando tem-se que considerar diferenças quanto a algum atributo em particular ou avaliar a magnitude de certas diferenças. As provas discriminativas mais comumente empregadas são as seguintes; prova de comparação apareada simples, triangular, duo-trio, de comparações apareadas de Scheffé, de comparações múltiplas e de ordenamento (MORALES, 1994).

As provas descritivas tratam de definir as propriedades dos alimentos e medi-las de maneira mais objetiva possível. Aqui não são importantes as preferências ou aversões dos provadores, e também não é importante saber se as diferenças entre as amostras são detectadas, sendo importante a magnitude ou intensidade dos atributos de determinado alimento. As provas descritivas proporcionam, portanto, muito mais informações a respeito do produto que as outras. Em contrapartida, são mais difíceis de realizar, o treinamento dos provadores deve ser mais intenso e monitorado e a interpretação dos resultados é ligeiramente mais laboriosa que nos outros tipos de provas. Consiste basicamente na comparação do produto com padrões, onde os atributos podem ser descritos através de escalas de intensidade (escalas não estruturadas, escalas de intervalo, escalas de padrões), por classificação proporcional, medição de atributos sensoriais com relação ao tempo, determinação de perfis sensoriais e relações psicofísicas (MORALES, 1994).

Algumas propriedades sensoriais não podem ser descritas por somente um atributo, e sim como uma combinação ou agrupamento de várias características ou notas que confirmam o atributo em questão, é o caso da descrição pela determinação dos perfis

sensoriais. Isto é particularmente importante para os atributos textura e sabor pois, não se fala em textura do alimento e sim características da textura do alimento. Da mesma forma uma só palavra nem sempre descreve correta ou suficientemente um sabor pois, este é uma combinação de doçura, acidez, adstringência, etc. As análises de perfis sensoriais consistem em uma descrição minuciosa de todas as características ou notas que compõem o sabor, cor, odor e textura, seguida de uma medição de cada uma delas (MORALES, 1994).

De forma generalizada para a avaliação organoléptica de um óleo volátil isolado, recomenda-se aplicar o óleo em um papel de filtro e cheirá-lo várias vezes durante sua evaporação. Como cada componente de um óleo tem uma volatilidade diferente, é possível, com treino, distinguir diferentes frações deste óleo (SIMÕES, 1999).

Geralmente um odor fraco demonstra que o vegetal ou óleo volátil isolado já perdeu a maioria dos seus compostos voláteis. Um odor desagradável, por sua vez, que pode ser causado por produtos de degradação química ou microbiana, indica má conservação do produto e deve ser rejeitado (SIMÕES, 1999).

2.8 - Análise Instrumental Aplicada à Análise de Óleos Essenciais

A análise de produtos naturais e especialmente dos óleos essenciais constitui-se tarefa árdua e de difícil execução devido ao grande número de constituintes, semelhança de propriedades físicas e a existência de substâncias em alta concentração associadas a um grande número de outras, que estão em menor proporção, talvez na ordem de parte por milhão e que são, quase sempre, as responsáveis pela qualidade do seu odor e sabor (SIMÕES, 1999).

2.8.1- Técnicas Cromatográficas

A cromatografia em coluna não é indicada para separação de misturas muito complexas, como os óleos essenciais, principalmente quando se tratam de substâncias com gradientes de polaridade muito próximos. A quantidade de adsorvente a ser usada varia de

acordo com a adsorbilidade do material; geralmente, a proporção mínima de adsorvente/substância é de 25:1. Quanto maior a distância percorrida pelo material eluído, maior é a sua distribuição dentro da coluna, formando uma banda que mostra uma parte caudal e parte frontal, num determinado estágio de sua passagem descendente. O segredo de uma boa separação está na escolha certa do adsorvente e dos eluentes (COLLINS et al., 1993).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método bastante usado na análise de óleos voláteis, já que permite obter várias informações sobre um óleo volátil em curto espaço de tempo, com pouca amostra e com poucos custos. A análise através de CCD pode revelar alguns dados sobre a composição do óleo, como a presença de duplas ligações, complexidade de sua constituição ou, no caso de comparação com padrões, confirmação de identidade ou detecção de falsificações. Outra aplicação da CCD seria no monitoramento do fracionamento dos óleos voláteis em coluna cromatográfica. Geralmente, são usadas placas de gel de sílica como fase fixa e, como fase móvel, existe uma grande variedade de sistemas de solvente. A revelação pode ser feita sob luz ultravioleta ou com reagente adequado para cada caso, como por exemplo o H_2SO_4 (SIMÕES, 1999).

Tanto na cromatografia em camada delgada como na em coluna pode-se fazer uso de sílica impregnada com $AgNO_3$. Estudos com álcoois subdivididos em grupos contendo o mesmo número de carbonos demonstraram que eles podem ser melhor separados com base no número de duplas ou triplas ligações. A sílica impregnada com $AgNO_3$ promove uma maior interação com os elétrons π e portanto, estes álcoois foram diferentemente retidos em função do número de duplas ou triplas ligações que possuem. Usando diferentes gradientes de concentração do $AgNO_3$ na sílica, conclui-se que partindo-se de 0% e aumentando-se gradativamente a concentração, a melhor separação frente a relação custo x benefício, foi 2,5% de $AgNO_3$ em relação a massa de sílica (STAHL e VOLLMANN in STAL, 1969).

A cromatografia em fase gasosa é uma técnica conhecida há longa data e que mostrou ser a ferramenta ideal para análise de misturas complexas e principalmente de óleos essenciais. É um método moderno de separação de compostos de propriedades físicas semelhantes, e que facilita o isolamento de substâncias. A identificação dos compostos

individuais pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões (SIMÕES, 1999).

Para se ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, são recomendáveis analisar um óleo volátil também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Este método permite, como a CG, a separação dos componentes e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico. O espectro de massas geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação o qual pode ser comparado com aqueles constantes da biblioteca de espectros, que, normalmente, é instalada no computador (SIMÕES, 1999).

2.8.2 - Índice de Retenção

Neste sistema o comportamento de retenção da(s) substância(s) em estudo é (são) comparado(s) com substâncias-padrão e expresso(s) em uma escala uniforme. Na proposta de Kovatz os padrões tomados como referência são uma série de alcanos homólogos mas, substâncias de outra natureza, preferencialmente o mais familiar possível com os compostos de interesse, podem também ser adicionados e ainda, constituintes da própria amostra, que tenham sua estrutura confirmada previamente, poderão ser utilizados como padrões. Na determinação do índice de retenção, ambos componentes da amostra e as substâncias-referência (padrões) são analisados sob as mesmas condições (ETTRE, 1973, 1974a, 1974b).

Os pontos fixados na escala do índice de retenção são as n-parafinas; o mecanismo do sistema pode melhor ser entendido com ajuda da Figura 6. Para uma série homóloga os logaritmos dos tempos de retenção obtidos para uma determinada coluna a uma determinada temperatura são linearmente proporcionais ao número de carbonos.

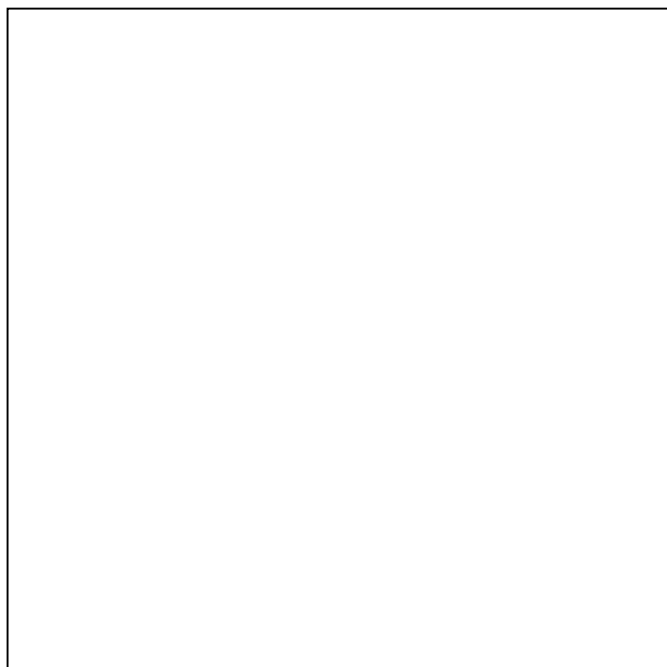


FIGURA 6- Gráfico de interpretação do Sistema de Índice de Retenção (ETTRE, 1973)

Se desejar expressar o índice de retenção de uma substância x, basta localizar seu tempo de retenção no eixo y (tempo de retenção) e buscar sua coordenada em x (número de carbonos). Este será o número de carbonos de uma n-parafina teórico que tem o mesmo tempo de retenção da substância x. O índice de Retenção será o número de carbonos x 100. Eventualmente o eixo x já pode ser graficado com a conversão para índices de retenção, conforme pode ser verificado na Figura 6.

Naturalmente, não é necessário traçar o gráfico para cada caso. O índice de retenção para uma determinada substância pode ser determinado pela equação 1:

$$I = 100z + 100 \frac{\log t'_{R(x)} - \log t'_{R(z)}}{\log t'_{R(z+1)} - \log t'_{R(z)}} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

- x = substância de interesse
- z = parafina normal com z átomos de carbono dado pelo gráfico (coordenada y em função de x) da substância de interesse.
- $z + 1$ = parafina normal com $(z + 1)$ átomos de carbono dado pelo gráfico (coordenada y em função de x) da substância posterior a substância de interesse.

A substância de interesse será sempre interpolada entre duas substâncias-padrão e um detalhe importante é que se o tempo de retenção do composto de interesse em relação aos tempos de retenção dos padrões considerados forem extremamente diferentes, a precisão é prejudicada. O ideal é que o índice de retenção da substância de interesse esteja intercalada entre dois padrões com tempos de retenção mais próximos possível do tempo de retenção da substância de interesse.

Por definição, o índice de retenção de uma parafina normal será sempre $100 \times$ o número de carbonos, por exemplo, ele é 600 para o n-hexano, 700 para o n-heptano, 1200 para o n-dodecano, etc. O índice de retenção para as n-parafinas, por convenção, será o mesmo para qualquer coluna. Contudo, isto não é verdadeiro para outras substâncias, pois a presença de agrupamentos, cadeias ou, presença de duplas ou triplas ligações nas moléculas lhes atribuem tempos de retenção específicos.

Com base nestas definições vários dados de índices de retenção de compostos voláteis foram tabelados permitindo uma comparação com componentes de amostras (ETTRE, 1973, 1974a, 1974b).

A determinação do índice de retenção é empregado como auxiliar na identificação de compostos pois este nos dá uma idéia da posição relativa dos picos, permitindo portanto, uma comparação com os índices de retenção da literatura e uma conclusão quanto a coerência ou não da estrutura de um determinado pico para um determinado tempo de retenção, realizada com base no espectro de massas, muitas vezes dificultada pela presença de estruturas isoméricas.

Convém salientar que Kovatz empregou seu modelo para uma única isoterma e a reprodutibilidade pode ser alcançada, com precisão de dados, em situação semelhante.

Quando se emprega condições diferentes e, principalmente, quando se utiliza mais do que uma isoterma é necessário traçar uma curva ajustada (regressão linear) e, portanto algumas divergências encontradas entre os índices de retenção calculados e os da literatura são justificados por este motivo. Neste caso, utiliza-se o termo Índice de Retenção e não mais Índice de Kovatz (ETTRE, 1973, 1974a, 1974b).

A confirmação de constituintes da própria amostra para emprego como “padrões internos” pode ser realizada de várias maneiras. Primeiramente pelo próprio modelo de Índice de Retenção empregando-se uma série de padrões e determinando-se o índice de retenção (calculado) para as substâncias de interesse. Como já foi dito anteriormente a determinação do índice de retenção fornece uma idéia da posição relativa dos constituintes vindo então, a auxiliar na confirmação ou não de sua identidade. Outra possibilidade de confirmação destas estruturas é pela adição de padrões externos mas, fazendo-se uso proposital de substâncias as quais o espectro de massas já oferece uma boa margem de segurança quanto a identidade. Por comparação entre as áreas relativas determinadas pela análise em CG-MS da amostra pura e em paralelo da amostra pura mais padrões pode-se ter a confirmação. E ainda, com base apenas na análise do cromatograma e espectros de massas, muitas vezes, pode-se determinar a identidade dos constituintes com boa margem de confiabilidade (ETTRE, 1973, 1974a, 1974b).

2.8.3 - Análises Complementares

Atualmente pode-se empregar ainda na determinação estrutural, a espectrometria de massas, a espectroscopia no ultravioleta (UV), no visível e no infravermelho, bem como a ressonância magnética nuclear (RMN) de próton e carbono 13. Estas constituem as técnicas mais amplamente empregadas (SIMÕES, 1999).

O espectro de massas (EM) de uma substância pode fornecer importantes informações relacionadas com a sua estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação. A massa molecular permite estabelecer a fórmula molecular da substância, enquanto o padrão de fragmentação pode ajudar a caracterizar a presença, bem como a

localização de certos grupos funcionais e cadeias laterais. O espectrômetro de massas pode ser acoplado a um aparelho de CG (CGMS), que permite tanto a identificação como a quantificação de componentes de baixa massa molecular, mesmo em misturas complexas. Esta técnica é muito utilizada para a análise de óleos voláteis (SILVERSTEIN et al, 1979; SIMÕES, 1999).

2.9 - Aparelho de Clevenger Modificado

Há dois tipos de aparelhos de Clevenger para hidrodestilação. Um para óleos menos densos que a água e outro para óleos mais densos que a água. São equipamentos padrões para o isolamento ou determinação de óleos essenciais de material vegetal e resinas oleosas.

Para utilização desses aparelhos, a amostra desconhecida necessita ser submetida à análise preliminar, já que é necessário conhecer a densidade do óleo a ser destilado para a escolha apropriada do equipamento.

Deve ser observado também que um óleo menos denso que a água que lentamente é enriquecido com material mais denso, poderá retornar ao frasco de destilação. Também a eficiência dos aparelhos de Clevenger é reduzida porque pequenas quantidades do destilado retornam ao frasco de destilação sem terem alcançado o referido aparelho, ou então quando ocorre o gotejamento do destilado o mesmo é respingado retornando ao frasco condensador.

O aparelho ilustrado na Figura 7, foi projetado para superar as dificuldades anteriores. O braço (A) encontra-se posicionado entre as duas escalas, proporcionando o uso do aparelho tanto para óleos mais densos que a água quanto para óleos menos densos. A curvatura (B), devidamente revestida com material isolante, tipo amianto, permite que o óleo ao condensar, não retorne ao frasco de destilação. O estrangulamento (C) é projetado para impedir o gotejamento direto do óleo sobre o destilado (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960).

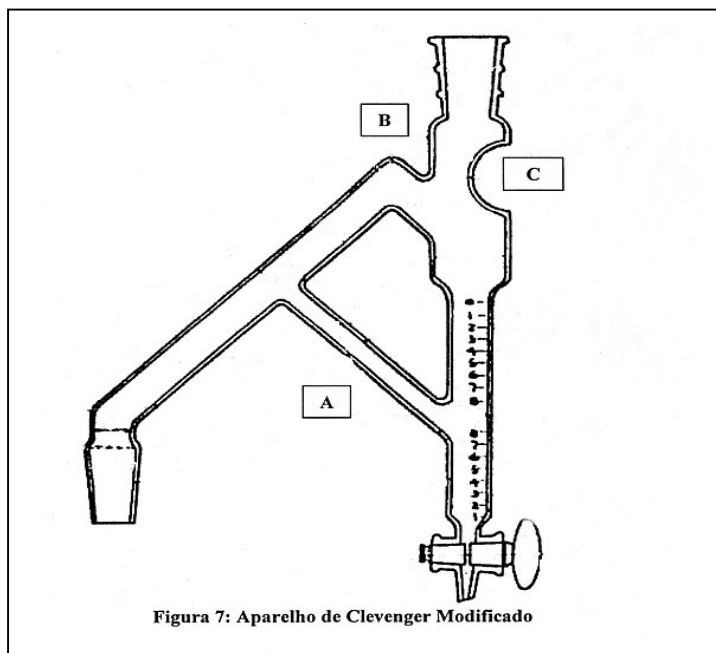


FIGURA 7 – Aparelho de Clevenger modificado

2.10 - A Família Piperaceae

A família Piperaceae é conhecida como a família da Pimenteira. Seu representante mais popular é a Pimenta Longa (*Piper hispidinervium*) e foi descoberta na década de 80 por técnicos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Normalmente é encontrada no Acre e pesquisadores do Museu Paraense Emílio Goeldi em Belém, descobriram que seu óleo essencial é rico em Safrol (SAFROL DA AMAZÔNIA, 1994).

Os termos *Piperaceae* e *Piper* são nomes latinos provenientes do grego *peperi*, que por sua vez, origina-se do árabe *babary* (pimenta do reino) (REITZ, 1978). O nome genérico *Piper* deriva-se provavelmente também do sânscrito, referindo-se ao sabor picante e ao aroma das sementes da *Piper nigrum* L. (ATTAL et al., 1975).

Trata-se de uma das mais numerosas famílias das Dicotiledôneas, representada nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Existem 5 gêneros, representados por cerca de 1400 espécies. São eles; *Ottonia*, *Piper*, *Peperomia*, *Pothomorphe* e *Sarcorrhachis* (REITZ, 1984).

Em geral, são plantas herbáceas ou arbustivas, com folhas inteiras, inflorescências espiciformes de flores hermafroditas e muito reduzidas (BARROSO, 1978; SCHULTZ, 1985). Segundo estudos realizados por YUNKER (1972, 1973 e 1974) e publicado na coleção Hoehnea, *Piper* e *Peperomia* são os dois gêneros melhor representados na flora brasileira com cerca de 170 e 150 espécies. Para Santa Catarina são citadas, 32 espécies do gênero *Piper* e 50 espécies, distribuídas em 05 sub-gêneros, para o gênero *Peperomia*. Para os gêneros *Ottonia* e *Sarcorhachis* apenas uma espécie de cada são citadas e para gênero *Pothomorphe* não há nenhuma referência (YUNCKER, 1972, 1973, 1974).

A maior parte dos estudos realizados com representantes desta família referem-se ao gênero *Piper*, provavelmente por ser este mais promissor na produção de óleos essenciais. Para os gêneros *Ottonia*, *Sarcorhachis* e *Pothomorphe*, o número de trabalhos fitoquímicos é relativamente reduzido, (RORIG & POSER, 1991). No levantamento bibliográfico realizado para este trabalho encontrou-se apenas uma referência para o gênero *Ottonia* e nenhuma para *Sarcorhachis* e *Pothomorphe* (MOREIRA et al., 1997; MARTINS et al., 1998; ALENCAR et al., 1972; LUZ et al., 2000; GARG & JAIN, 1996; TORQUILHO et al., 1999; MAIA et al., 1987 ; CHAVES, 1994; RAMOS et al., 1986; GIESBRECHT et al., 1981; ANDRADE et al., 1998).

2.10.1- O gênero *Piper*

Espécies do gênero *Piper* são largamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo e são usadas medicinalmente de várias maneiras, além de serem frequentemente fonte de importantes precursores na síntese de outras substâncias de relevante poder econômico ou tecnológico. A investigação fitoquímica de espécies deste gênero tem revelado uma ampla variedade de constituintes químicos produzidos por estas, importantes classes, como alcalóides/amidas, lignanas, neolignanas e terpenos, entre outras são citadas. Num total de 592 diferentes compostos isolados a partir de espécies de *Piper*, 145 são alcalóides/amidas, 47 são lignanas, 70 são neolignanas e 89 são terpenos. Cabe destacar ainda

o fato de que são 700 espécies deste gênero distribuídas por todo o mundo e somente 12% tem sido fitoquimicamente investigadas (PARMAR et al., 1997).

Atividades biológicas importantes são atribuídas a representantes deste gênero, e dentre elas pode-se citar: atividade inseticida a partir da *Piper nigrum*, atividade vasorelaxante a partir da *Piper longum* e atividade antibacteriana a partir da *Piper aduncum*, nestes casos as substâncias responsáveis pela atividade são os alcalóides. Alguns fenilpropanóides, freqüentemente presentes nos óleos essenciais, com atividades fungicida e antimicrobiana significantes são citados para as espécies *Piper betle*, *Piper sarmentosum* e *Piper aduncum*. Também pode-se citar o forte efeito relaxante muscular promovido por lactonas (kawapironas) isolados a partir da *Piper methysticum*, popular Kawa-kawa (PARMAR et al., 1997).

A espécie *Piper cernuum* Veel é um imponente arbusto que pode alcançar 6 metros ou mais de altura. Apresenta folhas enormes, elípticas-ovadas e assimétricas, chegando a medir até 40 cm de comprimento; não chega a gerar frutos, apenas infrutescências as quais chegam a medir 60 cm de comprimento e até 8 mm de diâmetro. É normalmente encontrada nas proximidades do Rio de Janeiro e distribuído em todo o Brasil (YUNCKER, 1972).

Não encontrou-se referência quanto a nomes e/ou usos populares para esta espécie.

2.10.2- Gênero *Peperomia*

O gênero *Peperomia* é bem menos estudado quimicamente. A maior parte das referências trata de estudos em bioquímica fisiológica, relacionados especialmente com particularidades nos mecanismos fotossintéticos e morfológicos de diversas espécies. Há contudo alguns trabalhos mais recentes já voltados para a investigação fitoquímica. Algumas espécies revelam-se produtoras de óleo essencial e há, inclusive, referência do uso medicinal popular da *Peperomia pellucida* no tratamento de problemas inflamatórios dermatológicos e contra várias enfermidades renais, efeitos estes atribuídos a ação do ácido linoleico e ácido

linolênico isolados a partir do extrato etanólico das partes aéreas desta espécie (BESSIERE et al., 1994; AQIL et al., 1993, MOREIRA, et al., 1997; HEINRICH, et al., 1998; SILVA, M. L. et al., 1973).

A espécie *Peperomia emarginella* não é citada por REITZ (1984) na Flora Ilustrada Catarinense nem por YUNCKER na coleção Hoehnea como existente em Santa Catarina, embora tenha sido encontrada em vários locais do Vale do Itajaí. Trata-se de planta epífita, muito delicada, de folhas alternas e muito pequenas, cerca de 2 a 5 mm. Não foram encontradas referências quanto ao uso medicinal, bem como nomes populares (YUNCKER, 1974).

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Contribuindo para a consolidação da linha de pesquisa em produtos naturais na Mata Atlântica, esta dissertação visa o estudo da composição química de duas espécies da família Piperaceae de ocorrência no Vale do Itajaí em Santa Catarina.

3.2- Objetivos Específicos

1. Extrair óleo essencial das folhas, talos e infrutescências das espécies, *Piper cernuum* Veel e *Peperomia emarginella*, empregando para tanto a técnica de hidrodestilação;
2. Caracterizar as propriedades físico-químicas, densidade e índice de refração, dos referidos óleos essenciais isolados;
3. Determinar a composição química do óleo essencial isolado pela utilização, principalmente, da técnica de CG-MS associada ao Índice de Retenção;
4. Determinar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais destas espécies vegetais frente às bactérias patogênicas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
5. Realizar a análise sensorial do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* para determinação de propriedades organolépticas.

4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Material Vegetal

4.1.1- Coletas

No Parque São Francisco de Assis, composto por mata de Floresta Ombrófila Densa Primária e alguns pontos por mata secundária, localizado no centro no município de Blumenau, Santa Catarina, foi coletada a espécie *Piper cernuum* Vell. As datas de coleta foram as seguintes: 29.07.99, 20.11.99, 19.02.00, 15.11.00, 18.01.01, 13.02.01 e ainda em 15.09.00 e 10.09.01 para os quais não foi calculado rendimento e 10.04.99 e 29.01.00 para os quais foi determinado apenas o teor em água.

Na cidade de Benedito Novo, Santa Catarina, em um pomar de propriedade do Sr. Wigond Wiotshet, localizado à SC 477, Km 9, foi coletada a espécie *Peperomia emarginella*, na data de 28.02.00. Estes espécimes foram encontrados no tronco e galhos finos de uma laranjeira.

Na Congregação das Irmãs Catequistas Franciscanas, localizado na rua Barão do Rio Branco, 1486, cidade de Rodeio, Santa Catarina, em um pomar circundado por área de pastagem, também coletou-se exemplares da espécie *Peperomia emarginella*, provenientes de árvores diversas e distintas, nas datas de 12.12.00, 14.02.01, 13.03.01 e 03.08.01.

Segundo descrição citada em literatura, preparou-se exsiccatas com exemplares de cada uma das espécies estudadas, as quais foram encaminhadas para classificação taxonômica aos herbários da Universidade Federal do Paraná e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os responsáveis pela classificação foram a Prof^ª Marília Borgo e o Prof^º Marcos Sobral, respectivamente. As exsiccatas foram depositadas no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein, na FURB, sob os códigos descritos na Tabela 1.

TABELA 1 – Identificação das espécies estudadas.

Nome Científico/taxonomia	Nº de registro no herbário
<i>Piper cernuum</i> Vell	3795
<i>Peperomia emarginella</i>	3832

4.2- Método de Extração

O material vegetal foi superficialmente limpo com algodão seco e picado com tesoura de forma a aumentar a superfície de contato. A técnica empregada para a extração do óleo é a hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado, realizada segundo métodos convencionais. Quando necessário, optou-se pelo uso de água refrigerada para condensação dos vapores. O tempo de destilação variou de 2 a 3 horas. Os exemplares de aparelho de Clevenger empregados neste trabalho foram adquiridos por encomenda tendo sido confeccionados com base no modelo descrito da literatura.

Adotou-se dois procedimentos distintos para a separação dos óleos essenciais obtidos pela hidrodestilação, diferenciados pelo uso ou não de n-hexano. O procedimento 1 consistiu no tratamento direto do óleo essencial com agente dessecante ($MgSO_4$) e posterior filtração. No procedimento 2, realizou-se a extração com n-hexano com separação da fase orgânica e posterior concentração em evaporador rotatório.

Quanto a conservação do material vegetal, estes quando não realizado hidrodestilação na sequência das coletas, manteve-se sob refrigeração por períodos de até 10 dias. O óleo essencial obtido foi armazenado em recipientes de vidro sob refrigeração até a realização da análises e ensaios.

4.3- Grau de Desidratação

Pesou-se inicialmente uma certa quantidade de material fresco e manteve-se o mesmo exposto sob jornal em bancada de laboratório para desidratação. Este mesmo material foi pesado diversas vezes (a cada 48 horas) até peso constante, quando então, por diferença de peso entre o material fresco e seco, determinou-se o grau ou percentual de desidratação.

4.4- Análise dos óleos essenciais

4.4.1- Análises Preliminares por CCD

Os óleos essenciais obtidos foram analisados previamente por CCD. Fez-se uso de placas de 20 x 5 cm, 20 x 10 cm e 20 x 20 cm revestidas com sílica e sílica impregnada com AgNO_3 (2,5%) e a revelação foi realizada com H_2SO_4 (concentração 10%). A sílica impregnada com AgNO_3 foi preparada segundo técnica descrita em WILLIAMS & MANDER (2001) que emprega vários solventes. A impregnação do AgNO_3 é realizada por adição da sílica gel numa solução aquosa de AgNO_3 . Mantêm-se a suspensão ao abrigo da luz durante todo o procedimento. Após a evaporação completa do solvente a sílica está pronta para ser usada. Utilizaram-se os seguintes eluentes: n-hexano, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, álcool n-propílico (propanol) e misturas destes.

4.4.2- Propriedades Físico-Químicas

O índice de refração dos óleos foi obtido através de Refratômetro modelo Abbe, fabricante Biosystems e a densidade calculada segundo método indireto em tubo capilar. A técnica consiste na determinação do volume de um tubo capilar pelo emprego de água destilada à temperatura ambiente. Posteriormente o mesmo capilar, previamente seco, é preenchido com óleo essencial. Pela diferença das massas do tubo vazio e contendo óleo, encontra-se a massa do óleo. De posse deste dado e do volume, determinado pelo

procedimento anterior, determina-se sua densidade. Não se seguiu algum critério quanto ao tempo de estoque dos óleos para realização dos ensaios.

4.4.3- Fracionamento do Óleo em Coluna Cromatográfica

O óleo essencial da espécie *Piper cernuum* Veel foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica, tendo sido esta empacotada com sílica gel impregnada com AgNO_3 (2,5%). Da mesma forma que a sílica utilizada para as placas, a sílica utilizada para a coluna foi impregnada com AgNO_3 (2,5%). A coluna foi preparada com as seguintes dimensões: ± 30 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro, tendo sido utilizado para seu preenchimento 58 g de sílica. O fracionamento foi conduzido sob pressão de nitrogênio, tendo sido recolhidos 72 frações de 1 à 7 mL (frações 1 a 12 de 1 a 1,5 mL, 13 a 14 de 2 a 2,5 mL, 15 a 24 de 2,5 a 4 mL e de 25 a 72 em diante de 6 a 7 mL). Utilizou-se como eluente o clorofórmio e 1 mL de volume de amostra (óleo bruto). Posteriormente, as frações que apresentaram mesmo perfil, conforme revelação por UV, H_2SO_4 e câmera de iodo, foram reagrupadas e concentradas (Grupo A, frações de 01 a 17, Grupo B, frações de 18 a 20, Grupo C, frações de 21 a 24, Grupo D, frações de 25 a 27 e Grupo E, frações de 28 a 72).

4.4.4- Análises Cromatográficas por CG e CG-EM

Amostras dos óleos essenciais brutos obtidos foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas, em cromatógrafo modelo HP5890A/5970, coluna capilar de sílica fundida, revestida com metil silicone (HP-PONA, 50 m x 0,21 mm e filme de 0,50 μm) e detector de ionização de chamas. Como gás de arraste foi utilizado hélio com vazão de 4 mL min^{-1} . A aquisição de sinais foi realizada por software em interface com o cromatógrafo. A temperatura do injetor foi de 250° C. Para a análise do óleo da espécie *Piper cernuum* empregou-se a seguinte programação: 120° C (10 min), 150° C (10 min) e 180° C (20 min) com um gradiente de temperatura de 4° C por minuto; de 180° C a 250° C com gradiente de 6° C por minuto permanecendo nesta temperatura por 50 minutos e para a espécie

Peperomia emarginella: 80° C (1 min) a 140° C (10 min) com gradiente de de temperatura de 5° C por minuto; de 140° C a 160° C (20 min) com gradiente de 2° C por minuto e de 160° C (20 min) a 250° C (10 min) com gradiente de 3° C por minuto.

As frações obtidas pelo fracionamento em coluna do óleo essencial da espécie *Piper cernuum* Veel, após reagrupamento (Grupos A, B, C, D e E), também foram submetidas a cromatografia gasosa sob as mesmas condições utilizadas para o óleo bruto.

A identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos espectros de massa obtidos com os armazenados em biblioteca computadorizada, segundo banco de dados Wiley-Windows, em função de seus índices de retenção. Todas estas análises e varreduras foram realizadas no Laboratório de Óleos Essenciais da Universidade Federal do Paraná - UFPR sob coordenação do Profº M. SC Aloísio Marcondes.

A quantificação foi realizada segundo as áreas dos picos, embora reconheça-se que este método não é muito confiável sem a aplicação de um índice de correção.

As análises cromatográficas realizadas pela empresa Duas Rodas foram conduzidas em aparelho modelo HP6890 serie, coluna polar HP INNOWAX de polietileno glicol (30 m X 250 µm e filme de 0,25 µm), com a seguinte programação de aquecimento: 50° C (4 min) a 220 (4 min) gradiente de temperatura de 4° C por minuto. Detector de massa modelo Quadripolo (Mass Selective Detector), modelo equipamento HP 6890 serie.

4.4.5- Confirmação de Aldeídos

O óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* foi submetido ao ensaio de identificação ou confirmação de aldeídos segundo técnica descrita em PASTO et al., (1992) que consiste na reação com fenil hidrazina, separação do precipitado, cristalização em etanol e determinação do ponto de fusão. O ponto de fusão foi determinado em aparelho tipo Kofler (Microquímica APS-301) não corrigido.

4.4.6- Análise Sensorial

A análise do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* foi realizado pela empresa Duas Rodas Industrial, localizada em Jaraguá do Sul/SC, de acordo com a seguinte técnica: Utilizou-se um grupo de analistas sensoriais formado por pessoas treinadas na detecção e diferenciação de compostos aromáticos puros e óleos essenciais, grupo este pertencente a uma casa de aromas especializada no desenvolvimento de “flavors” para a indústria alimentícia. Após diluição do óleo essencial em álcool etílico, aplicou-se em bases apropriadas procurando-se sentir diferentes nuances de sabor, sendo elas: água e sal, água e açúcar, água, açúcar e ácido cítrico. Após descrição dos analistas, agrupou-se dados e obteve-se uma caracterização final.

4.4.7- Índice de Retenção

A identificação dos constituintes promovida automaticamente pelo CG-MS foi criteriosamente avaliada com base, principalmente, nos respectivos índices de retenção. Estes são encontrados tabelados na literatura e são característicos para determinado tipo de coluna, apolar ou polar por exemplo. Neste trabalho adotou-se os valores apresentados por ADAMS (1995). Para a determinação do índice de retenção calculado adotou-se como padrões constituintes do próprio óleo os quais foram previamente confirmados pelo espectro de massa e pela adição ao óleo de uma mistura de padrões constituída por compostos hidrocarbonetos, terpênicos e fenilpropanóides, a saber:

Padrões hidrocarbonetos: C6, C7, C8, C11, C14, C15, C16, C17, C18 e C19.

Padrões terpênicos e fenilpropanóides: α -pineno, β -pineno, canfeno, alo-ocimeno, terpineol, linalool, mirceno, geraniol, citral, eugenol, citronelal, mentol, cânfora, cariofileno, α -citronelol, nerolidol, limoneno, safrol, iso-safrol, azuleno.

4.4.8- Investigação de Atividade Antibacteriana

A atividade antibacteriana foi determinada para os óleos essenciais puros através do método de difusão em agar. Estas foram medidas pelo halos de inibição de crescimento formados. Foram utilizadas 3 espécies de bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

As placas com o meio de cultura para os testes de difusão foram preparadas da seguinte maneira: 18 mL de agar Mueller-Hinton foram vertidos em placas de Petri (13 x 100 mm). Após a solidificação do meio foram perfurados poços de 7 mm de diâmetro para conter o material a ser testado (SMANIA et al., 1995).

As culturas de bactérias, que cresceram durante a noite em caldo Mueller-Hilton, foram diluídas a uma concentração final de aproximadamente 10^6 UFC mL⁻¹. A suspensão bacteriana foi inoculada na superfície do meio agar Mueller-Hilton, anteriormente preparado, com auxílio de swab de algodão. Os poços foram preenchidos com 50 µL de cada um dos óleos. As placas foram incubadas a 36° C por 20 h (ALVES et al., 2000).

O resultado positivo foi definido como uma zona de inibição do crescimento bacteriano de 9 mm ou mais de diâmetro. Para simplificar a interpretação dos resultados, os seguintes símbolos foram usados (ALVES et al., 2000):

- 0 (inativo), que corresponde a nenhuma zona de inibição ou um halo de inibição do crescimento bacteriano menor que 9 mm;
- 1 (parcialmente ativo), com uma zona de inibição ou um halo de inibição entre 9 a 12 mm;
- 2 (ativo), com uma zona média de inibição entre 13 e 18 mm;
- 3 (muito ativo), com uma zona de inibição acima de 18 mm.

5- RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o emprego da técnica de hidrodestilação evidenciou-se a presença de componentes voláteis nas duas espécies estudadas: *Piper cernuum* Vell e *Peperomia emarginella*.

Os resultados das propriedades físico-químicas, análise química e sensorial serão apresentados e discutidos separadamente para cada espécie, concluindo-se o capítulo com apresentação, em conjunto, dos resultados de atividade antimicrobiana.

5.1- *Piper cernuum* Vell

É um imponente arbusto que chama atenção pelo tamanho de suas folhas e, principalmente, infrutescências, espigas que chegam a medir 60 cm de comprimento, confirmando a literatura. Foi encontrada infrutescendo nos meses de fevereiro e março, sendo que esta característica foi observada em dois anos subsequentes. Caracteriza-se pelo elevado teor em água, conforme pode ser visualizado na Tabela 2, o que torna mais atrativo seu rendimento se considerado sua massa seca.

TABELA 2 – Teor em água na espécie *Piper cernuum* Veel.

Coleta	% água
10.04.99	80,21
29.07.99	81,70
29.01.00	84,28
Média	82,06

As Figuras 8 e 9 mostram as fotografias de espécimes da espécie *Piper cernuum* Veel coletados no Parque São Francisco de Assis – Blumenau.

FIGURA 8 –Espécie *Piper cernuum* Veel

FIGURA 9 –Espécie *Piper cernuum* Veel (detalhe para o fruto).

A espécie apresenta bom rendimento em óleo essencial. Na Tabela 3, apresenta-se os resultados de rendimento para diferentes estações do ano.

TABELA 3 – Rendimento em óleo essencial da espécie *Piper cernuum* Veel coletada em diferentes períodos.

Estação/Ano	Material Vegetal	Rendimento em óleo
Inverno/99	Folhas frescas	0,34%
	Folhas secas	1,67%
Primavera/99	Folhas frescas	0,32%
Verão/00	Folhas frescas	0,35%
	Frutos	0,06%
Primavera/00	Folhas frescas	0,51%
Verão/01	Folhas frescas	0,51%
Verão/01	Folhas frescas	0,52%

O rendimento de óleo essencial para os talos foi inexpressivo, < 0,02%, e por isso não foi apresentado na Tabela 3. Pode-se observar que o rendimento de óleo para as folhas frescas foi aproximadamente constante para as coletas de inverno/99, primavera/99 e verão/00, porém, para as demais coletas aumentou em 55% o que pode ser justificado por alguns motivos: procedimento adotado, ou seja, tratamento direto do óleo com agente dessecante, sem a utilização de separação com solvente; pela seleção das folhas submetidas a hidrodestilação e ainda pelo aprimoramento da técnica.

As propriedades físico-químicas, densidade e índice de refração, determinadas para o referido óleo são apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Pode se observar um pequeno aumento positivo no valor de densidade com o tempo de estocagem do óleo. Os valores de índice de refração mantiveram-se bastante aproximados o que pode ser um indicativo de estabilidade do óleo analisado.

TABELA 4 – Densidade do óleo essencial da espécie *Piper cernuum* Veel**proveniente de diferentes coletas.**

Coleta	Ensaio	Valor
29.07.99	07.12.99	0,9615
19.02.00	06.04.00	0,9407
15.09.00	22.01.01	0,9626
15.11.00	22.01.01	0,9574
18.01.01	22.01.01	0,9472
Densidade Média:		0,9539

TABELA 5 – Índice de Refração do óleo essencial da espécie *Piper cernuum* Veel**proveniente de diferentes coletas.**

Coleta	Ensaio	Valor
29.07.99	07.12.99	1,4956
15.09.00	22.01.01	1,4965
15.11.00	22.01.01	1,4966
18.01.01	22.01.01	1,4950
Índ. de Refração Médio:		1,4959

5.1.1- Determinação da Composição do Óleo Essencial

A identificação dos constituintes foi bastante trabalhosa em função do grande número destes, principalmente na região dos álcoois sesquiterpênicos onde os picos se sobrepunham dificultando a identificação. Tentou-se melhorar a qualidade dos cromatogramas executando-se diferentes programações no equipamento mas, mesmo assim, não foi possível a identificação completa. A Tabela 6 apresenta os constituintes identificados

em diferentes análises (diferença de datas de coleta ou de programação), onde se pode observar que a maioria dos constituintes se repete em quase todas as análises, respondendo por 86% da composição do óleo. Algumas diferenças observadas na identificação ou quantificação podem ser justificadas por diferenças na quantidade de óleo injetado ou tempo de estocagem (coleta de 19/02/00 e análises de 31/08/00 e 02/06/00), condições cromatográficas empregadas (coleta de 15/09/00 e análises em 27/11/00) ou, ainda, em função da sazonalidade.

A análise tomada como referência para os demais procedimentos (varredura manual, cálculo de índice de retenção) foi a realizada em 31.08.00 referente coleta de 19.02.00, face reunir as melhores características. O referido cromatograma é apresentado na Figura 10 e os espectros de massas que confirmam as estruturas dos principais constituintes identificados são apresentados nas Figuras 11, 12, 13 e 14. Além destes constituintes os demais, cuja concentração foi maior que 2% têm seus espectros de massas apresentados no apêndice. Nestas figuras é sempre feito uma comparação entre os espectros de massas obtidos da amostra, o superior, com outro proveniente da biblioteca do sistema CG-EM, o inferior.

A existência de isômeros com padrões de fragmentação semelhantes conduzem a espectros de massas muito parecidos o que, muitas vezes, pode dificultar a interpretação dos dados. No entanto, estas mesmas substâncias, normalmente, apresentam índices de retenção diferentes. Por este motivo fez-se uso da técnica de Índice de Retenção complementarmente às análises por CG-MS. Merece destaque a proximidade, em alguns casos igualdade, dos valores de índices de retenção calculados em relação aos encontrados na literatura, o que aumenta a confiabilidade nos resultados encontrados.

Com a associação destas técnicas conseguiu-se a caracterização inequívoca de 88,33% da composição do óleo essencial desta espécie, tendo sido identificado como constituintes majoritários: di-hidro- β -agarofuran (31,2%), elemol (12,2%) e 10-epi- γ -eudesmol (12,9%). Em recente artigo publicado por TORQUILHO et al. (2000), o qual desenvolveu estudo com a espécie *Piper cernuum* Veel procedente do Rio de Janeiro/RJ, os constituintes majoritários identificados foram: cis-dihidroagarofuran (32,3%), 10-epi-gama-eudesmol (7,1%), α -pineno (10,2%), β -pineno (7,4%), e elemol (6,7%) mostrando grande similariedade com este trabalho. Por outro lado, os resultados não estão de acordo com aqueles apresentados no trabalho de CONSTANTIN et al. (2001), onde os principais constituintes identificados são α -cariofileno (20,7%), bido germacrene (21,9%) e α -pineno (7,2%). Convém salientar que as técnicas empregadas, mesmo em conjunto, não permitem diferenciar, e conseqüentemente identificar, enantiômeros ou a existência de racemato.

A identificação completa do óleo essencial desta espécie, com concentração, índices de retenção e “matching”, é apresentada na Tabela 7.

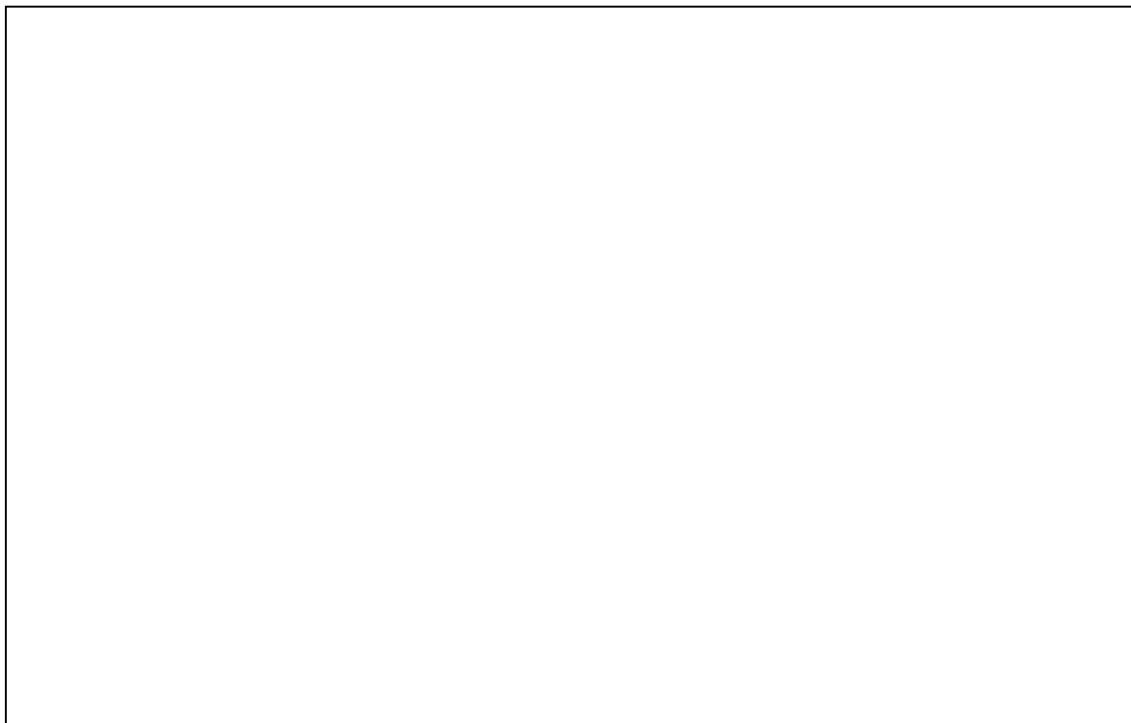


FIGURA 11 – Espectro de massas do di-hidro- β -agarofuran

Na Figura 11, pode-se observar o fragmento de massa 222 que refere-se ao íon molecular, pouco intenso, característico dos éteres. Em m/e 207 tem-se o pico base que refere-se a perda de metila (M-15). Sua intensidade considerável pode ser justificada pela presença de 4 grupos metila, sendo que a cisão em qualquer um destes radicais geraria o referido fragmento. E ainda, em m/e 189 tem-se um fragmento de intensidade média que refere-se a perda de H₂O na sequência da perda de fragmentos de metila.

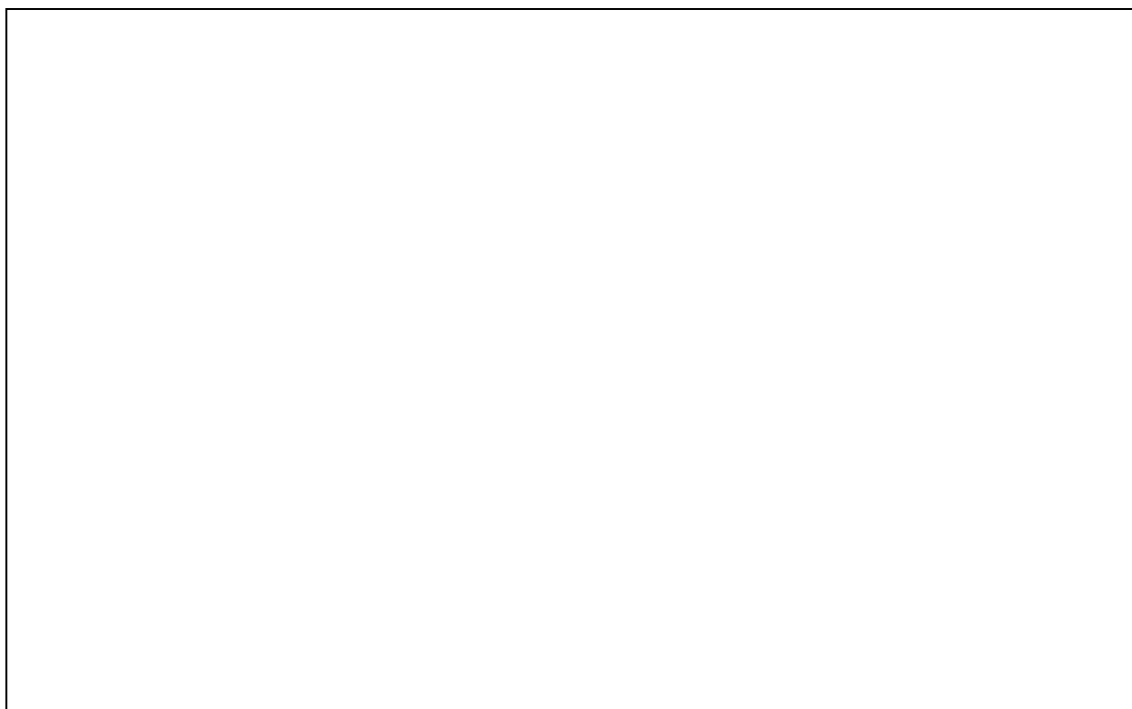


FIGURA 12 – Espectro de massas do elemol

No espectro de massas deste constituinte, conforme pode ser observado na Figura 12, o íon molecular não aparece ($M^+ = 222$), característica esta peculiar aos álcoois terciários. Observa-se no espectro um fragmento discreto de massa 204 que refere-se a perda de H_2O ($M-18$), também característico de álcoois ou, de modo geral, para compostos que apresentam oxigênio em sua estrutura. Em m/e 59 tem-se o pico base referente a quebra da ligação C-C próxima ao átomo de oxigênio com formação do íon $CH_3-C=O^+H$

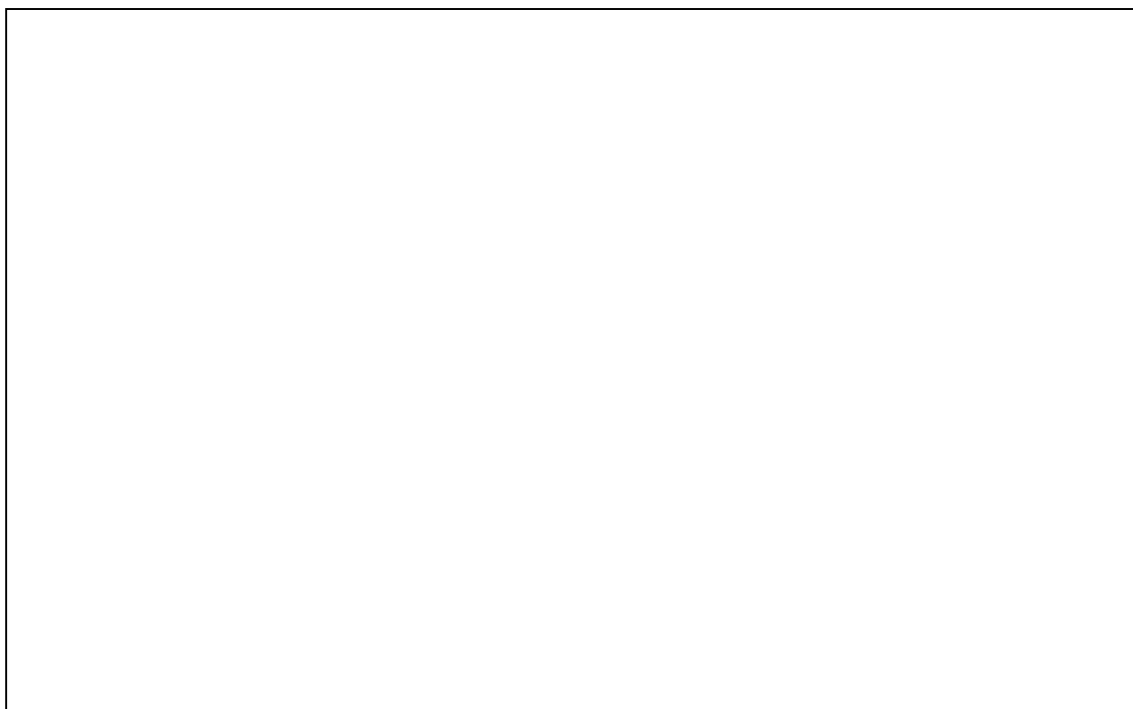


FIGURA 13 – Espectro de massas do 10-epi- γ -eudesmol

Conforme pode ser observado na Figura 13, o íon molecular aparece em 222. A baixa intensidade apresentada é peculiar aos álcoois. O pico em m/e 204, relativamente intenso, refere-se a perda de H₂O (M-18). Observa-se em m/e 189 o pico base que refere-se a perda de metila após a perda de H₂O (M-18-15 ou M-33). Sua intensidade pode ser justificada pela presença de 4 grupos metila, sendo que a cisão em qualquer um destes geraria o fragmento em questão.

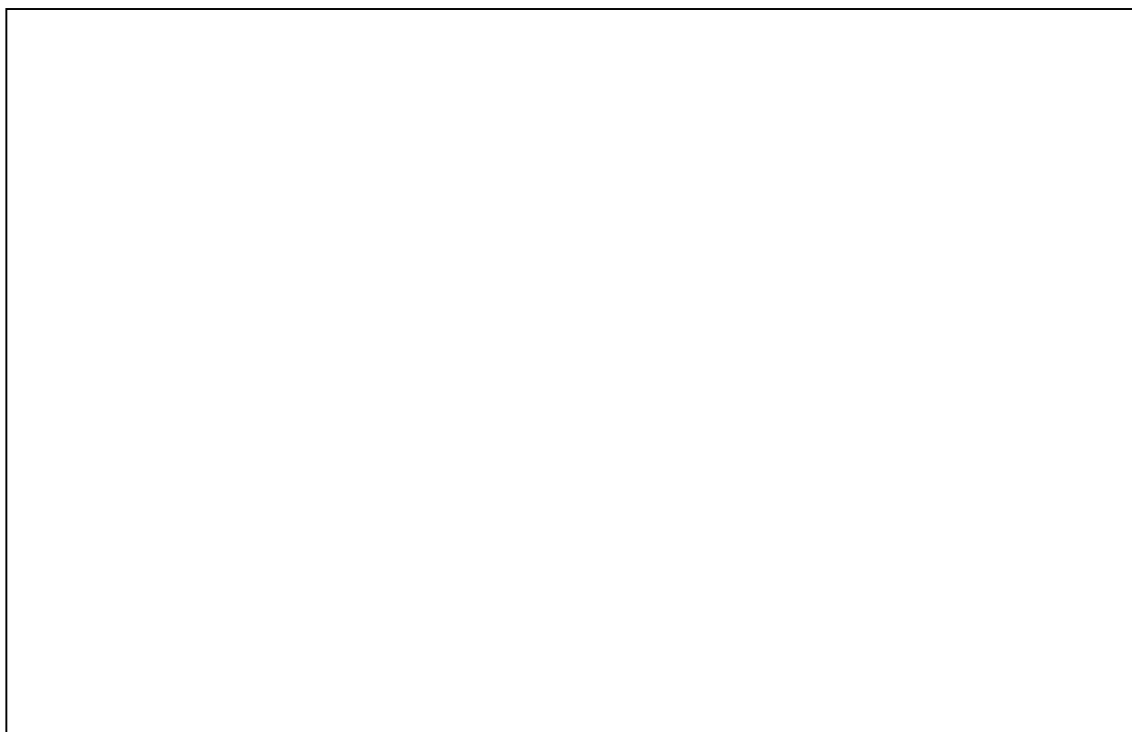


FIGURA 14 – Espectro de massas do trans-β-cariofileno

Na Figura 14 pode-se observar o pico de massa 204 que refere-se ao íon molecular (M+) e o pico m/e 189 refere-se a perda de fragmento de metila (M-15).

O considerável teor em di-hidro- β -agarofuran, aliado a abundância da espécie e elevada produtividade de óleo essencial nos motivou a realização dos ensaios para isolamento ou enriquecimento do referido composto, pela obtenção de frações mais puras, através de fracionamento em coluna cromatográfica.

Convém salientar que este ensaio foi realizado relativamente no início deste trabalho quando apenas tínhamos suspeitas com relação a composição do constituinte majoritário. Nas primeiras análises a resolução obtida nos cromatogramas não era muito boa e o sistema apresentava muitas sugestões de identificação distintas, o que dificultava a interpretação.

Os ensaios preliminares realizados por CCD permitiram a escolha do melhor eluente para o fracionamento.

A caracterização dos principais constituintes já havia sido possível pelas análises via CG-EM, inclusive considerando a suspeita quanto ao constituinte majoritário. Por tratar-se de constituinte com estrutura saturada (vide Figura 15), em mistura com constituintes insaturados optou-se pela impregnação da sílica com AgNO_3 , revelando-se o composto de interesse com ácido sulfúrico.

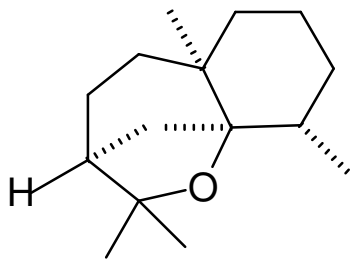


FIGURA 15 – Estrutura do composto di-hidro- β -agarofuran

O fracionamento cromatográfico do referido óleo e análise por CG-MS das principais frações obtidas (A-E) permitiu a elucidação inequívoca quanto a estrutura do constituinte majoritário, bem como a confirmação de outras, merecendo destaque a fração A, onde obteve-se o di-hidro- β -agarofuran em concentração de 81,5%, vide cromatograma (Figura 16). A Tabela 8, apresenta os constituintes identificados em cada uma das frações analisadas.

Na caracterização do óleo essencial por classes de compostos químicos, observou-se a predominância de sesquiterpenos oxigenados, conforme pode ser visualizado na Tabela 9.

TABELA 9 – Composição do óleo essencial da espécie *Piper cernuum* Veel por grupo químico.

Grupo químico	%
Hidrocarbonetos Monoterpênicos	6,31
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos	15,58
Sesquiterpenos Oxigenados	66,44
Não classificados	11,67

Todas as coletas foram realizadas no mesmo local mas, ainda assim, em diversas épocas diferentes do ano. A análise do óleo essencial proveniente de cada uma destas coletas revelou que este não sofre alterações representativas em sua composição ou concentração em função do período de coleta.

Esta espécie, devido a ausência de algum aroma marcante, não foi submetida a análise sensorial.

5.2- *Peperomia emarginella*

A escolha por uma planta epífita de proporções tão diminutas que em princípio desestimularia o estudo foi motivada pelo intenso e agradável odor cítrico que apresentava quando da maceração de sua folhas. Foi encontrada em várias localidades do Vale do Itajaí em Santa Catarina. Observou-se infrutescência nos meses de fevereiro e março e que esta desenvolve-se, principalmente, em lugares muito úmidos, inclusive junto a troncos e galhos em decomposição. Chama atenção pelo elevado teor em água, conforme pode ser observado na Tabela 10, o que da mesma forma que a espécie anterior, torna mais atrativo seu rendimento se considerado sua massa seca. Abaixo, na Figura 17, encontra-se fotografia da referida espécie.

FIGURA 17 – Espécie *Peperomia emarginella*

TABELA 10 – Teor em água na espécie *Peperomia emarginella*.

Coleta	% água
12.12.00	93,86
14.02.01	88,70
Média	92,19

Na Tabela 11 tem-se os resultados relativos ao rendimento em óleo essencial para a planta fresca. Em todas as extrações submeteu-se a planta inteira a hidrodestilação dado a inviabilidade da separação de suas folhas, dos talos e infrutescências devido ao diminuto tamanho desta planta. Os resultados são apresentados em função do período de coleta (estação do ano).

TABELA 11 – Rendimento em óleo essencial da *Peperomia emarginella* proveniente de diferentes coletas.

Estação/Ano	Rendimento
Verão/00 – Benedito Novo	0,12
Verão/01 - Rodeio	0,13%
	0,12%
	0,14%
Inverno/01 - Rodeio	0,13%

Pode-se observar que a concentração de óleo essencial manteve-se praticamente constante. Mesmo nas coletas realizadas em locais diferentes (verão/00 em Benedito Novo, e verão/01 e inverno/01 em Rodeio) não se observou diferença significativa. A técnica de extração empregada para a coleta de Benedito Novo foi a descrita na parte experimental como procedimento 2, ou seja, separação com solvente orgânico e posterior concentração em evaporador rotatório, para as demais coletas empregou-se o procedimento 1. A espécie

apresentou rendimento relativamente baixo em relação à espécie *Piper cernuum* Veel, o que pode ser justificado, além de característica intrínseca, pela alta volatilidade de seus componentes e pela dificuldade de limpeza, significando que um pouco de “sujeira” acabou sendo computado junto com a massa da planta. Convém salientar que esta espécie apresenta elevado teor em água (média 91,28%) e que, se for considerado sua massa seca, o rendimento médio em óleo essencial sobe para 1,49%.

Os resultados das propriedades físico-químicas são apresentados nas Tabelas 12 e 13:

TABELA 12 – Densidade do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* proveniente de diferentes coletas.

Coleta	Ensaio	Valor
28.02.00*	06.04.00	0,8780
12.12.00**	22.01.01	0,8468
Densidade Média:		0,8624

* Benedito Novo ** Rodeio

TABELA 13 – Índice de Refração do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* proveniente de diferentes coletas.

Coleta	Ensaio	Valor
28.02.00*	22.01.01	1,4615
12.12.00**	22.01.01	1,4571
Índ. de Refração Médio:		1,4593

* Benedito Novo ** Rodeio

Não se realizaram ensaios com as demais amostras. As diferenças observadas nos valores de densidade, embora pequenas, podem ser atribuídas aos diferentes locais de coleta.

5.2.1 - Determinação das composição do óleo essencial

Para a determinação do perfil químico do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* procedeu-se inicialmente a análise por cromatografia gasosa (CG-MS). O resultado preliminar da caracterização por CG-MS é submetido aos valores tabelados de índice de retenção pois, como já dito anteriormente, a existência de espectros de massas muito parecidos para alguns isômeros pode equivocar a interpretação. Na Tabela 14 tem-se os resultados de identificação dos constituintes de análises distintas. Cabe ressaltar que as amostras de óleo empregadas nas análises procederam de diferentes localidades, quando não ainda assim, de diferentes épocas do ano ou ainda de mesma localidade, mesma data de coleta mas, conduzidas sob condições cromatográficas diferentes.

Com referência aos resultados da análise do óleo de diferentes localidades, pouco pode ser concluído. Observou-se pequena variação na composição, como por exemplo a presença de safrol, em torno de 6%, no óleo essencial dos espécimes provenientes de Benedito Novo, sendo que nas amostras procedentes de Rodeio nem sequer traços deste foi evidenciado. Não foi possível confirmar esta informação pois não encontrou-se mais material para uma 2^a coleta em Benedito Novo.

Também observou-se na composição do óleo essencial dos espécimes provenientes de Benedito Novo, possíveis produtos de oxidação. Três análises foram realizadas com esta amostra de óleo, sendo que a primeira foi realizada após 3 meses de estocagem. Portanto, não se pode afirmar que no óleo recém extraído os mesmos já não estivessem presentes. Contudo, as evidências de oxidação são bastante razoáveis, principalmente na última destas três análises. Pode-se notar que a concentração dos principais constituintes, o limoneno e o decanal, é bastante inferior à média observada nas demais análises, enquanto os produtos de oxidação, como o ácido decanóico por exemplo (vide Figura 18), tem sua concentração bastante aumentada. Esta tendência a oxidação também foi evidenciada no óleo essencial dos espécimes provenientes de Rodeio, coleta de 12.12.00, análises de 14.12.00 e 01.02.01 (vide composição). Na 2^a análise já existe presença de óxidos de limoneno (vide Figura 19).

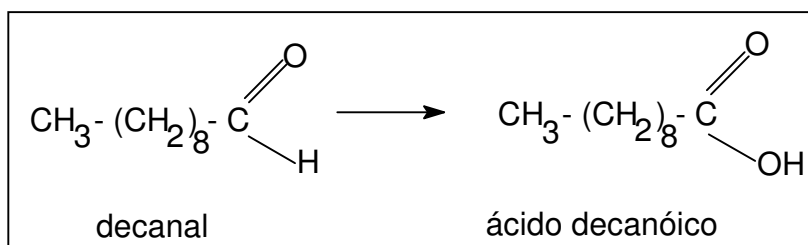


FIGURA 18 – Produto de oxidação do decanal

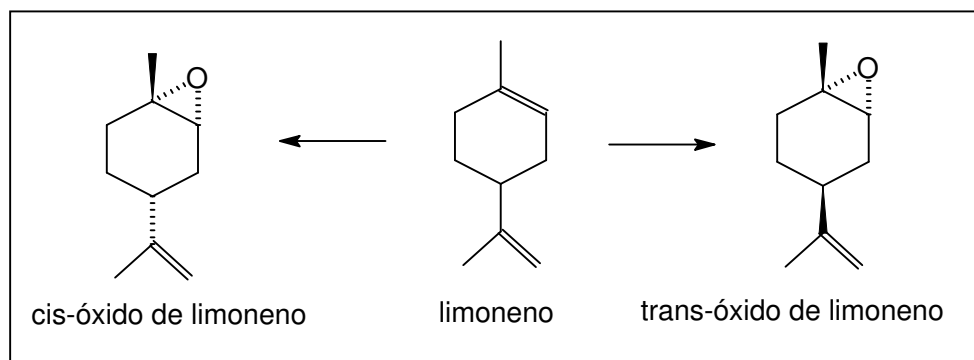


FIGURA 19 – Produtos de oxidação do limoneno

A análise tomada como referência para realização dos demais procedimentos, como varredura manual para obtenção do melhor matching e cálculos de índice de retenção e determinação final da composição, foi a realizada em 19.09.01 referente coleta de 03.08.01, porque reúne as melhores características de um modo geral. Os valores de índice de retenção calculados ficaram bem próximos, alguns igualando-se aos encontrados na literatura.

O emprego destas técnicas permitiu a caracterização de 95,01% da composição do óleo, tendo apresentado-se como principais constituintes o limoneno (29,3%) e o decanal (32,6%). O cromatograma do óleo essencial obtido nesta análise é apresentada na Figura 20 e os espectros de massas das referidas estruturas são apresentados das Figuras 21 e 23. Os espectros de massas dos demais constituintes com concentração > 2,5% estão no apêndice. Da mesma forma que para a espécie anterior, é feito uma comparação entre os espectros de massas obtidos da amostra, o superior, com outro proveniente da biblioteca do sistema CG-EM, o inferior. Também para esta espécie, as técnicas empregadas para identificação da composição do óleo essencial, não permitem diferenciar enantiômeros e conseqüentemente estabelecer a existência de racematos.

A identificação completa do óleo essencial desta espécie, com concentração, índices de retenção e “matching”, é apresentada na Tabela 15.

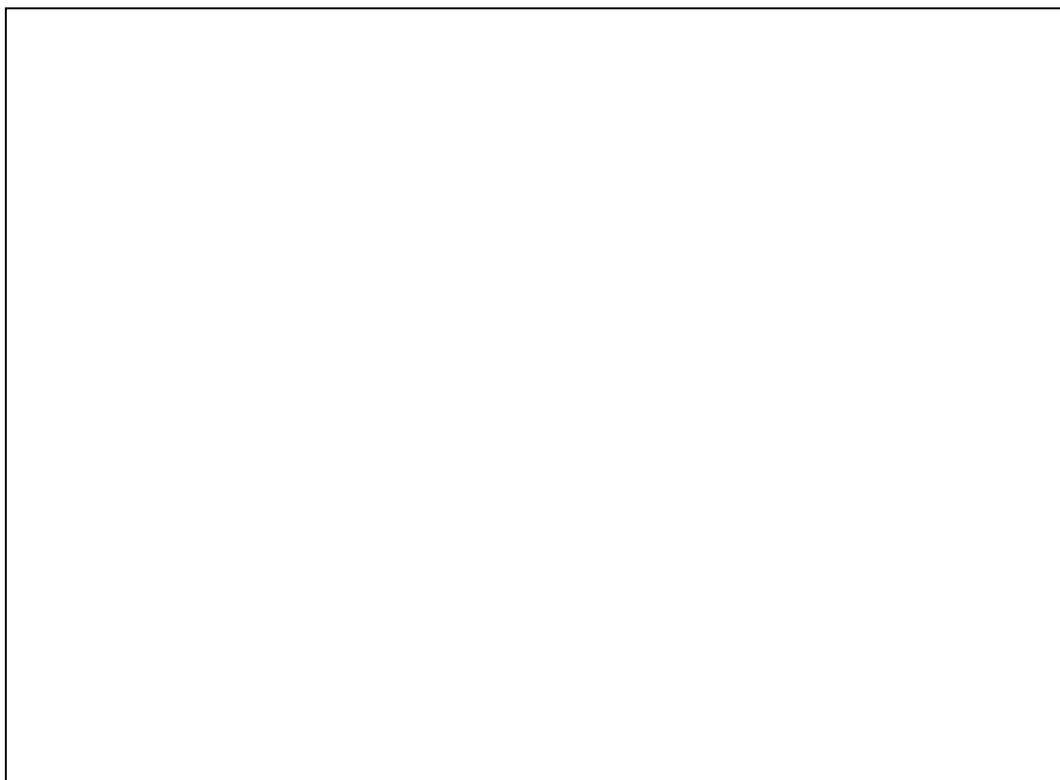


FIGURA 21 – Espectro de massas do limoneno.

Na Figura 21 pode-se observar o fragmento de massa 136 que refere-se ao íon molecular, usualmente observável em se tratando de olefinas. O pico base é observado no fragmento de massa 68 que refere-se aos fragmentos produto da reação de Diels-Alder inversa (Figura 22).

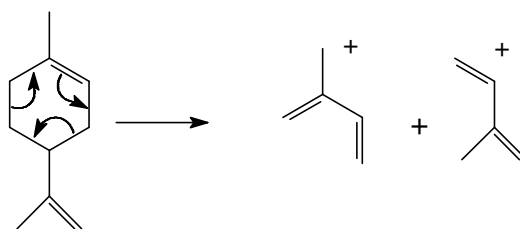


FIGURA 22 – Fragmentação do limoneno pela reação de Diels-Alder inversa.

Outro pico bastante intenso observado neste espectro é o fragmento de massa 93 que refere-se a cisão, seguida de rearranjo de H^+ , no fragmento iso-propenil, ficando a carga positiva no fragmento cíclico. Observa-se ainda vários aglomerados de fragmentos relativos a perda de CH_2 , o que ocorre frequentemente em hidrocarbonetos lineares saturados e também em olefinas.

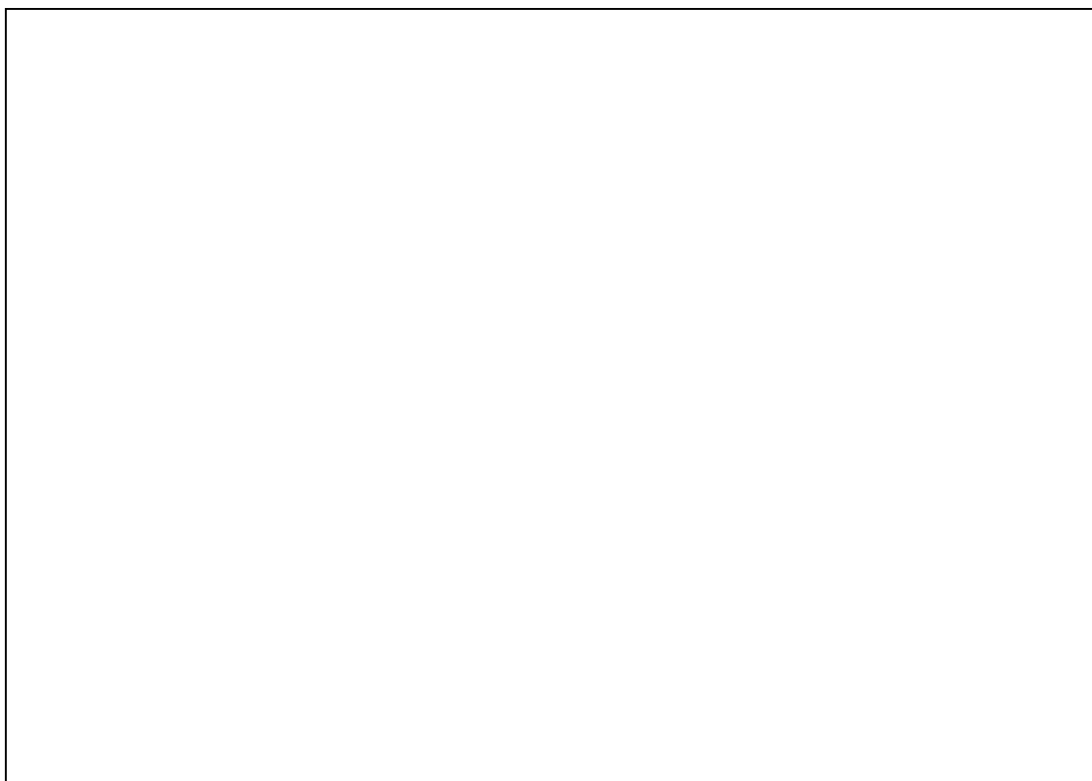


FIGURA 23 – Espectro de massas do decanal.

Na Figura 23 tem-se o espectro de massas do decanal, onde podem ser observados picos bem característicos de fragmentação de aldeídos alifáticos lineares, tais como:

Em m/e 156 tem-se o pico relativo ao íon molecular (M^+) de baixa intensidade, característico de aldeídos. Em m/e 138 tem-se o fragmento que refere-se a perda de H_2O ($M-18$).

O pico intenso em m/e 29 refere-se a $M-107$ que se origina pela cisão da ligação C-C próximo ao átomo de oxigênio com formação de (CHO^+) .

Observa-se também em m/e 112 pico relativo a perda de $CH_2=CH-OH$ ($M-44$) fragmento este formado pela quebra tipo Mc Lafferty da ligação C-C $\alpha\beta$ em relação ao oxigênio.

Também observa-se pico relativo a mesma quebra do tipo Mc Lafferty quando a carga positiva fica om o fragmento que contém o heteroátomo $CH_2=CH-O^+H$ (vide Figura 24).

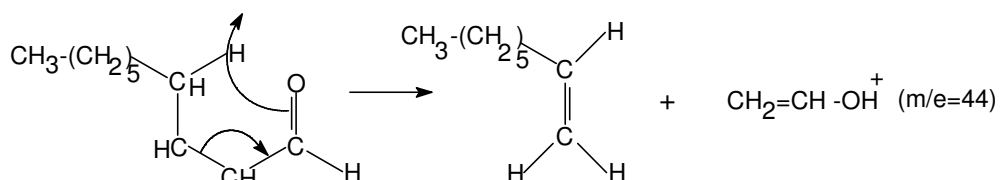


Figura 24 – Fragmentação do decanal segundo a quebra tipo Mc Lafferty.

Na caracterização do óleo por classes de compostos químicos observou-se a predominância de hidrocarbonetos monoterpênicos, vide Tabela 16.

TABELA 16 - Composição do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* por grupo químico.

Grupo químico	%
Hidrocarbonetos Monoterpênicos	40,24
Monoterpenos Oxigenados	1,38
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos	15,51
Sesquiterpenos Oxigenados	2,44
Hidrocarbonetos Oxigenados	35,44
Não classificados	95,01

Apesar da caracterização inequívoca do decanal, procedeu-se a confirmação deste por via úmida. Segundo literatura o derivado 2,4-dinitro-fenil-hidrazona do decanal apresenta ponto de fusão em 104° C. Complementarmente a análise por CG-MS reagiu-se o óleo bruto com a 2,4-dinitro-fenilhidrazina de acordo com procedimento analítico (PASTO et al, 1992). O precipitado formado após ser purificado apresentou ponto de fusão de 104° C , compatível com a fenil-hidrazona do decanal descrita na literatura.

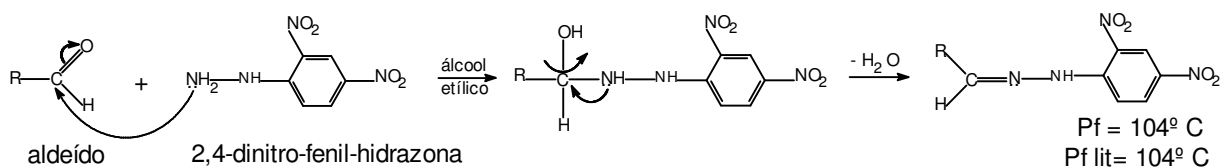


FIGURA 25– Reação entre o decanal e a 2,4-dinitro-fenil-hidrazona.

5.2.2- Caracterização Sensorial

Devido ao aroma marcante do óleo essencial, e o fato de seus constituintes majoritários serem substâncias empregadas comercialmente em aromas cítricos, resolveu-se por analisá-lo sensorialmente, para avaliação de suas propriedades organolépticas. Este trabalho foi realizado em parceria com a empresa Duas Rodas Indl.

Agrupando-se os dados apurados pelos analistas sensoriais chegou-se a seguinte descrição sensorial do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella*: Odor penetrante, leve, doce ceroso, aldeídico com remanescentes de frutas cítricas especialmente laranja. Seu “flavor” torna-se interessante apenas em concentração abaixo de 5 ppm. Poderia ser utilizado em composição de perfumaria, quando em baixas concentrações. Indicado para dar notas características em cítricos (laranja, lima, limão) além de rosas, jasmin e violeta em conjunto com aldeídos florais. Por sua nota refrescante poderia ser utilizado em mentas. Paralelamente à análise sensorial do referido óleo, realizaram-se análises cromatográficas em CG-MS. A Figura 23 apresenta o cromatograma da análise inicial do óleo essencial realizada pela empresa. Os principais constituintes identificados são apresentados na Tabela 17.

TABELA 17 – Comparação entre os principais constituintes identificados no óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella*, segundo análises realizadas neste trabalho (A) e análise realizada pela Duas Rodas Industrial (B).

Constituinte	A (%)	B (%)
α -pineno	1,42	1,47
β -pineno	3,08	2,89
limoneno	29,27	48,77
decanal	32,66	24,35
Trans- β -cariofileno	3,98	1,58

A tendência a oxidação discutida anteriormente também é levantada na análise realizada pela Duas Rodas:“A utilização deste óleo, porém, é prejudicada pela tendência a oxidação, mesmo em baixas temperaturas”..... (vide comparação das áreas na Tabela 18). As análises cromatográficas que confirmam a forte tendência a oxidação foram realizadas sob as mesmas condições, sendo que as amostras intituladas resfriada e temperatura ambiente foram realizadas aproximadamente seis meses depois do isolamento do óleo, e a amostra recente cerca de duas semanas após.

TABELA 18 – Comparação das áreas (%) dos principais constituintes do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* (incluindo produtos de oxidação).

Constituinte	Amostra Recente	Amostra Resfriada	Amostra Temp. Amb.
Limoneno	51,20	44,17	40,63
Decanal	27,39	18,57	15,41
Ácido decanóico	0,58	2,56	6,75
E-limoneno-1,2-epoxide		1,49	1,40
Trans-iso-limoneno			0,32
Limoneno oxide		3,30	0,23

5.3- Atividade Biológica

As cepas escolhidas para estes ensaios foram *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes a três grupos microbiológicos distintos. Assim, a *Escherichia coli* é um bacilo gram negativo não esporulado, o *Staphylococcus aureus* é uma bactéria (cocus) gram positiva e a *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo piociânico gram negativo, não esporulado e batante aeróbio. A Tabela 19 apresenta o resultado, em halos de inibição, obtido dos ensaios realizados para determinação de atividade biológica das duas espécies estudadas produtoras de óleo essencial. A espécie *Peperomia emarginella* apresentou atividade somente contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Torna-se difícil atribuir a atividade antimicrobiana a algum constituinte do óleo essencial desta espécie, pois devido a pequena quantidade de material existente não foi possível o fracionamento cromatográfico para o isolamento e avaliação de atividade de algum constituinte. No entanto, estão presentes na amostra, o álcool monoterpênico linalool, além de δ -elemeno, limoneno, α e β -pineno todos possuindo reputação bactericida, já descrita na literatura (LOBATO et al., 1989; CHALCAT et al., 2000; NEIROTTI et al., 1996). Os ensaios para as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foram negativos.

TABELA 19 – Ensaio de atividade microbiológica com as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Espécie Vegetal	Bactérias testadas/halos de inibição		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Peperomia emarginella</i>	0	13,0 mm	0
<i>Piper cernuum</i> Veel	0	5,0 mm	0

Quanto a espécie *Piper cernuum* Veel observou-se um halo de inibição de 5,0 cm para a bactéria *Staphylococcus aureus*, mas este é considerado inativo. Portanto, a referida espécie não foi ativa para nenhuma das bactérias listadas.

6 – CONCLUSÃO

1. O trabalho confirmou e consolidou a família Piperaceae como importante fonte de óleos essenciais, tendo contribuído no âmbito geral para a linha de pesquisa em produtos naturais na Mata Atlântica;
2. Os estudos conduziram ao estabelecimento do perfil químico, qualitativo e quantitativo, do óleo essencial das espécies *Piper cernuum* Vell e *Peperomia emarginella* de ocorrência natural no Vale do Itajaí, Santa Catarina. Destacam-se como principais constituintes: di-hidro- β -agarofuran (31,2%), elemol (12,2%) e 10-epi- γ -eudesmol (12,9%) para a espécie *Piper cernuum* Vell e limoneno (29,3%) e decanal (32,6%) para a espécie *Peperomia emarginella*;
3. Quanto a espécie *Piper cernuum* Vell, esta apresentou bom rendimento em óleo essencial, 0,35% da massa das folhas frescas. Pode ser considerada como espécie em potencial para o fornecimento natural do metabólito di-hidro- β -agarofuran.
4. Em função de suas características, determinadas por sua composição química, pode-se considerar a utilização do óleo essencial da *Peperomia emarginella* “in natura” na composição de aromas e perfumaria. Seu “flavor” torna-se interessante apenas em concentrações abaixo de 5 ppm o que justificaria seu emprego apesar do rendimento em óleo essencial não ser tão expressivo.
5. Somente a espécie *Peperomia emarginella* apresentou atividade antimicrobiana e contra a bactéria *Staphilococcus aureus*.

7 - PERSPECTIVAS

1. Importantes propriedades biológicas, como atividade inibidora de apetite, narcótica e inseticida contra vários insetos são associadas a estruturas polioxigenadas contendo o esqueleto dihidro- β -agarofuran (WU et al., 1992; HUANG et al., 2000 ; TU et al., 1992). Uma nova proposta de estudo para isolamento, avaliação de reatividade e utilização como precursor do dihidro- β -agarofuran, presente no óleo essencial da espécie *Piper cernuum* Veel, poderia ser sugerida;
2. Avaliação do comportamento do óleo essencial da espécie *Peperomia emarginella* frente a antioxidantes naturais numa tentativa de corrigir sua tendência a oxidação, também seria uma proposta de trabalho interessante;
3. Outra proposta interessante seria a investigação de outros metabólitos secundários, como alcalóides, lactonas e flavonóides. Segundo literatura, importantes propriedades biológicas são atribuídas a estas classes de compostos, sendo que a presença destes foi citada para vários representates da família Piperaceae;
4. Avaliar outras propriedades biológicas como atividades antifúngicas e antiinflamatórias pode ser apresentado como nova proposta de pesquisa;
5. Outro estudo bastante importante que poderia ser sugerido a partir desta linha de pesquisa é o de micropropagação vegetativa e/ou, melhoramento genético, no intuito de melhorar o rendimento quantita e qualitativamente, ou ainda estudos agronômicos a fim de que se possa recomendar um sistema de produção economicamente adequado para exploração dessas Piperáceas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUT, P. I. Comfrey: assessing the low-dose health risk. **The Medical Journal of Austrália**, v. 149, 1988.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy**. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, 1995
- ALENCAR, R.; LIMA, R. A.; CORREA, R. G. C.; GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L.; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S.; MAGALHÃES, M. T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. Óleos Essenciais de Plantas Brasileiras. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 44, p. 312-314, 1972.
- ALVES, M. A., SILVA, A. F.; BRANDÃO, M. Biological screening of brasilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; SANTOS, A. D.; MAIA, J. G. Essential Oils of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. **J. Essential Oil Research**, v. 10, p. 465-467, 1998.
- AQIL, MOHAMMAD; KHAN, I. Z.; AHMAD, M. B. Flavonoids from Peperomia pellucida, **Sci. Phys. Sci**, v. 2, n. 5, p. 213-215, 1993.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos, teoria e prática: Óleos essenciais**, 2^a ed. , UFV, 1999.
- ATTAL, C. K.; DHAR, K. L.; SINCH, J.. The Chemistry of Indian Piper species. **Lloydia**, v. 38, n. 3, p. 257-65, 1975.
- BARREIRO, E. L.; FRAGA, C. A. M., A utilização do Safrol principal componente do Óleo de Sassafrás, na Síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 5, n. 22, p. 744-759, 1999.
- BARROSO, G. M., **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, , LTC., v. 1, p. 255, 1978.
- BAUER, K; GARBE, D. Common fragrance and flavour materials: preparations, properties and uses. **Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft**, p. 149, 1985.

- BERMUDEZ, J. A. Z. **Indústria farmacêutica, estado e sociedade**. São Paulo: Hucitec, p. 204, 1995.
- BESSIERI, J. M.; MENUT, C.; LAMATY, G.; JOSEPH, H. Variations in the volatile constituents of *Peperomia rotundifolia* Schlecht & Cham. Grown on different hosttrees in Guadeloupe. **Journal Flavour Fragrance**, v. 3, n. 9, p. 131-133, 1994.
- BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal Ethnopharmacol.**, n. 51, p. 29-38, 1996.
- BRITO, A. R. M. S.; NUNES, D. S.. Ethnopharmacology and the sustainable development of new plant-derived drugs. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5/6, p. 402-408, 1997
- CHALCAT, J. C.; CHIRON, F.; GARRY, R.; LACOSTE, J.; SAUTOU, V. Photochemical hydroperoxidation of terpenes. Antimicrobial activity of α -pinene, β -pinene and limonene hydroperoxides. **Journal Essential Oil Research**, v. 12, n. 1, p. 125-134, 2000.
- CHAVES, J. L. Pimenta Longa Reativa O Safrol. **Química e Derivados**, p. 40-41, 1994.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, Ed. da Unicamp, 1993.
- CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**, 2 ed., Jaboticabal: FUNEP, p. 162, 1994.
- COSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; FERREIRA, M. J. P.; STEPPE, M.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO, M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnelli* – Antimicrobial activities and analyses by GC/MS and C13 NMR. **Planta Médica**, v. 67, p. 771-773, 2001.
- CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.
- DIAS, B. F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas. André Tosello, 1996, p. 10.
- ETTRE, L. S. The Retention Index System; Its Utilization for Substance Identification and Liquid Phase Characterization. **Chromatographia**, v. 6, n. 11, p. 489-495, 1973.

- ETTRE, L. S. The Retention Index; Its Utilization for Substance Identification and Liquid Phase Characterization, *Chromatographia* System – Part II: Correlation Between Retention Index, Structure and Analytical Characteristics. **Chromatographia**, v. 7, n. 1, p. 39-46, 1974a.
- ETTRE, L. S. The Retention Index System; Its Utilization for Substance Identification and Liquid Phase Characterization – Part III: Characterization of Liquid Phases. **Chromatographia**, v. 7, n. 5, p. 261-268, 1974b.
- GARG, S. C.; JAIN, R. Volatile constituents of the essential oil of *Piper betle* L. (CultiverSagar Bangla). **Indian Journal of Chemistry**, v. 35B, p. 874-875, 1996.
- GEISSMANN, T. A.; CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**, Ed. Freeman, Cooper & Company, USA, p. 136-166/232-266, 1969.
- GIESBRECHT, A. M.; ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. R. (2E, 4E) – N-Isobutyl-9-piperonyl-nona-2,4-dienoic Amide from *Ottonia anisum*. *Planta Médica – Journal of Medicinal Plant Research*, v. 43, p. 375-377, 1981.
- GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. **Modified distillation trap**. *Chemist-Analys*, v. 49, 1960.
- GRABMANN, J.; HIPPELI, S.; DORNISCH, K.; ROHNERT, U.; BEUSCHER, N.; ELSTNER, E. F.. Antioxidant properties of essential oils: Possible explanations for their anti-inflammatory effects. **Arzneim.-Forsch./Drug Res.**, v. 50 (I), p. 135-139, 2000.
- HARBONE, J. B., **Introduction to ecological biochemistry**. 3^a Ed. London: Academic, 1988.
- HEINRICH, MICHAEL; KOEHLER, I.; RIMPLER, H.; BAUER, R. Bioactive compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Peperomia pellucida*, **Rev. Soc. Quim. Mex.**, v. 6, n. 42, p. 245-248, 1998.
- HUANG, H. C.; SHEN, C. C.; CHEN, C. F.; WU, Y. C.; KUO, Y. H. A novel agarofurn sesquiterpene, Celahin D from *Celastrus hindsii* Benth. **Chem. Pharm. Bull**, v. 48, n. 7, p. 1079-1080, 2000.

- JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J.; BOERHEIM-SVENDSEN, A. Antimicrobials activities of essential oils. **Pharm. Week**, v. 9, p. 193-197, 1987.
- JELLINEK, J. S. Ó-Bisabolol: An anti-inflammatory agent for skin care products. **Dragoco report**, v. 31, p. 127-133, 1984.
- LOBATO, A. M.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. F. S.; MAIA, J. G. S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 19, p. 355-363, 1989.
- LUZ, A. I. R.; SILVA, J. D.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents of Brazilian Piperaceae. Part 4. Essential Oil composition of *Piper dactylostigium*, *P. plurinervosum* and *P. vitaceum*. **J. Essent. Oil Res.**, v. 12, p. 94-96, 2000.
- MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, v. 3, n. 10, 1987.
- MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L.; VILA, R.; TOMI, F.; CAÑIGUERAL, S.; CASANOVA, A.; DA CUNHA, A. P.; ADZET, T. et al. Essential Oils From Four Piper Species. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2019-2023, 1998.
- MORALES, A. A. , **La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica**, Ed. Acribia S.A., Zaragoza-Espanha, 1994, p. 67-113.
- MOREIRA, D. L., KAPLAN, M. A.; GUIMARÃES, E. F. C. 1- Butyl-3,4-methylenedioxybenzene as the major constituent of Essential oil from *Ottonia anisum* Sprengel (Piperaceae). **Journal Essential Oil Research**, v. 9, p. 565-568, 1997.
- NEIROTTI, E.; MOSCATELLI, M.; TISCORNIA, S. Antimicrobial activity of limonene. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 39, n. 2, p. 233-237, 1996.
- PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TNEJA, P.; JHA, A.; TYAAAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M.. Phytochemistry of the Genus Piper. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.
- PASTO, D.; JOHNSON, C.; MILLER, M. **Experiments and Techniques ind Organic Chemistry**, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, p. 324, 1992.

- POSER, G. L. V., RORIG, L. R.; HENRIQUES, A. T.. Aromatic plants from Brail. III. The chemical composition of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel essential oils. **Journal Essential oils Research**, v. 6, p. 337-340, 1994.
- RAMOS, L. S.; DA SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S.. Essential oil of *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 712-741, 1986.
- REBELO, R. A.; ABREU, A. M. ; SEVEGNANI, L.; *Piper mikanianum* (Kunth) Steudel from Santa Catarina, Brasil – A new source of Safrole. **Journal Of Essential Oil Research**, 2002, “in press”.
- REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Piperáceas: Ottonia, Sarcorhachis, Potomorphe, 1978.
- REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Piperáceas: Peperomia, Itajaí, 1984.
- RODRIGUES, E.; HEALEY, P. L. **Biology and chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum, 1984.
- RORIG, L. R.; POSER, G. L. V. Investigação fitoquímica em espécies de Piperaceae, **Rev. Bras. Farm.**, v. 1, n. 72, p. 15-17, 1991.
- ROSE, J. **O livro das aromaterapia: Aplicações e Inalações**, Ed. Campus, Rio de Janeiro, 1995
- SAFROL da Amazônia. Ciência em Dia. **Ciência Hoje**, n. 97, v. 17, p. 86, 1994
- SCHULTZ, A. **Introdução à Botânica Sistemática**, 5^a ed., Ed. da Universidade, Porto Alegre, v. 2, p. 414-417, 1985.
- SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, J. C.; PEDREIRA, G.; MARX, M. C.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES. Óleos essenciais da Amazônia. VI. **Acta Amazônica**, n. 3, v. 3, p. 41-42, 1973.
- SILVA, M.; BITTNER, M.; HOENÜSEN, M.; BECERRA, L.; CAMPOS, V.; GONZALEZ, F.; CESPEDES, C.; MARAMBIO, O.. Actividad biologica de los triterpenos. **Secretaria General de la Organización**. Estados Americanos. ESTADOS UNIDOS. Washington, D. C., 1992.

- SILVERSTEIN, R. M. ; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 3^a edição, ed. Guanabara Koogan S.A., 1979.
- SIMÕES, C. M. O., **Farmacognosia** : Da Planta ao Medicamento PortoAlegre/Florianópolis, UFRS/UFSC, p. 14, 328-405, 1999
- SMANIA, A. J.; DELLE MONACHE, F.; SMANIA, E. F. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 45, p. 177-181, 1995
- SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field., **Journal Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 1-15, 1996.
- SOULÉ, M. E. Conservation: tactics for a constant crisis. **Science**, n. 253, p. 744-750, 1991.
- STAL, E. **Thin Layer Chromatography**: A Laboratory hand book. 2^a ed, New York: Springer-Verlag, p. 227-228, 1969.
- SVENDSEN, A. B.; SCHEFFER, J. J. C. **Essential oils and aromatic plants**. Dordrech; W. J. Publischers, 1985.
- TEUSCHER, E. **Pharmazeutische Biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.
- TISSERARD, R.; BALACS, T. **Essential oil safety**. Aguide for health care professionals. New York: Churchill Livingstone, 1995.
- TORQUILHO, H. S.; PINTO, A. C.; GODOY, R. L. O.; GUIMARÃES, E. F. Essential oil of *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae) from Rio de Janeiro. Brazil, **J. Essent. Oil Res.**, v. 11, n. 4, p. 429-430, 1999.
- TORQUILHO, H. S.; PINTO, A. C.; GODOY, R. L. O.; GUIMARÃES, E. F. Essential oil of *Piper cernuum* Vell. **Journal Essential Oil Research**, v.12, n. 4, p. 443-444, 2000.
- TU, Y. Q., HUANG, G. S.; MA, Y. X.; WU, X. L.; SONG, Q. B. Alkaloids from *Celastrus angulatus*, **Journal of Natural Products**, v. 55,n. 9, p. 1320-1322, 1992.
- WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Ed. Academic Press, London, p. 101-105, 1996.
- WILLIAMS, C. M.; MANDER, L. N. Chromatography with silver nitrate. **Tetrahedron**. v. 57, p. 425-447, 2001.

- WU, W. J.; TU, Y. Q.; LIU, H. X.; ZHY, J. B.. Celangulins II, III and IV: New insecticidal sesquiterpenoids from *Celastrus angulatus*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 9, p. 1294-1298, 1992.
- YUNKER, T. G. The Piperaceae of Brazil, **Hoehnea**, v.2, p. 19-366, 1972
- YUNKER, T. G. The Piperaceae of Brazil, **Hoehnea**, v.3, p. 29-284, 1973
- YUNKER, T. G. The Piperaceae of Brazil, **Hoehnea**, v.4, p. 71-413, 1974
- ZAMBONI, S. Óleos Essenciais. **Revista Brasileira de Química**. XCV, v. 11, n. 575, p. 106-110, 1983.
- ZARBIN, P. H. G.; RECKZIEGEL, A.; PLASS, E.; OLIVEIRA, A. R. M.; SIMONELLI F.; MARQUES, F. A.. Synthesis of the Minor Sex Pheromone Component of Two Brazilian Soybean Stink Bugs (Het.: Pentatomidae), and na Analogue Compound. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 6, p.572-577, 2000.

APÊNDICE

FIGURA 27 - E. M. do Ó-pineno, constituinte do óleo essencial *Piper cernuum* Veel

FIGURA 28 - E. M. do Ê-lemeneno, constituinte óleo essencial da *Piper cernuum*

FIGURA 29 - E. M. do germacreno-D, constituinte óleo essencial *Piper cernuum* Veel

FIGURA 30 - E. M. do α -eudesmol, constituinte do óleo essencial da *Piper cernuum* Veel

FIGURA 31 - E. M. do α -cariofileno, constituinte do óleo essencial da
Peperomia emarginella.

FIGURA 32 - E. M. do germacreno-D, constituinte do óleo essencial da espécie
Peperomia emarginella.

FIGURA 33 - E . M. do α -copaeno, constituinte do óleo essencial da espécie
Peperomia emarginella.

FIGURA 34 - E . M. do α -mirceno, constituinte do óleo essencial da espécie
Peperomia emarginella .

FIGURA 35 - E . M. do α -pineno, constituinte do óleo essencial da espécie
Peperomia emarginella.