

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA PARA RECURSOS AMAZÔNICOS**

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIPROTOZOÁRIAS *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Piper marginatum Jacq (Piperaceae)**

REGIANE GONÇALVES

**ITACOATIARA-AM
2018**

REGIANE GONÇALVES

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIPROTOZOÁRIAS *in vitro* DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Piper marginatum Jacq (Piperaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra.

Orientador (a): Profa. Dra. Renata Takeara

**ITACOATIARA-AM
2018**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G635e Goncalves, Regiane
Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoárias in vitro do óleo essencial de *Piper marginatum* Jacq (Piperaceae). / Regiane Goncalves. 2018
89 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Renata Takeara
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Piperaceae. 2. Óleo volátil. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. *Trypanosoma cruzi*. 5. *Leishmania amazonensis*. I. Takeara, Renata II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

REGIANE GONÇALVES

Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antiprotozoárias *in vitro* do Óleo essencial de *Piper marginatum* jacq (Piperaceae).

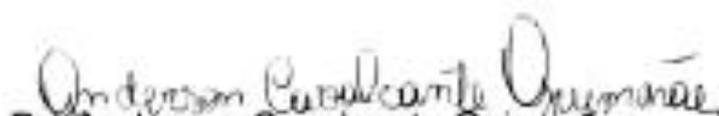
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos, área de concentração Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Recursos Amazônicos.

Aprovada em 30 de julho de 2018.

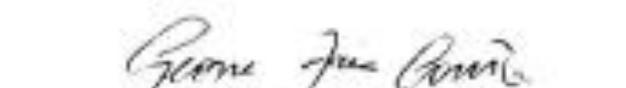
BANCA EXAMINADORA



Dra. Renata Takeara, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Universidade Federal do Amazonas



Dr. Geone Maia Corrêa
Universidade Federal do Amazonas

*Ao meu esposo Junior Lobato e filho Victor Hugo
com amor!*

A minha mãe Ana Vobedo!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À *DEUS* pela proteção e pela conquista!

Ao meu esposo e companheiro Junior Lobato, pela dedicação, por me dá força e incentivo para lutar e conquistar meus objetivos. Amo-te muito!!!

Ao meu querido filho, minha maior riqueza, por me ensinar o que é o verdadeiro amor, e me dar ainda mais forças para seguir em frente!

À minha mãe Ana Vobedo e irmãos Reginaldo e Rogério por me apoiarem sempre. Amo vocês!

Ao meu primo Sidnei Vobedo pela gentileza durante as passadas por Porto Velho.

À minha querida vó Maria Moreira Vobedo por todo carinho!

Ao casal de amigos de Itacoatiara Sâmia e Mayco por tantos encontros para comelança (hahahaaa) e apoio durante as mudanças. Obrigada!

À Prof. Dra. Renata Takeara, pela orientação desde a Iniciação Científica, sempre acreditando em meu potencial e minha competência. Obrigada pela orientação fundamental, ensinamentos, apoio em eventos e companheirismo nas coletas que participamos juntas, muitas vezes nos finais de semana. E por aceitar me orientar neste trabalho. Muito obrigada!

As minhas antigas e melhores amigas: Jô (Joelma), Mary (Maryoilce), Alê (Alessandra), Carla, Maria (Tyla), Márcia, Thays, Jéssika, Thamires, Maurizete, Luana e Sarah. É sempre bom lembrar nossos momentos de alegria e convivência. Hoje cada um no seu lugar, mas com a certeza que a distância nunca abala o que sentimos, porque é amizade verdadeira e eterna.

As minhas colegas de laboratório de Fitoquímica, Clycia e Vanessa por serem grandes companheiras desde a Iniciação Científica e de viagens a congressos, por tornarem as coisas mais fáceis com nossos encontros para conversarmos sobre a vida, estudos e atividades de laboratório. Tenho certeza que nossa ajuda mútua fez muita diferença no que somos e fazemos hoje, Obrigada!

A Plataforma de Bioensaios de Malária e Leishmaniose (PBML)/ FIOCRUZ – RO e a Dra. Carolina Bioni Garcia Teles, atual chefe, pela parceria no ensaio de Leishmaniose.

Ao Laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e ao Professor Dr. Noberto Peporine Lopes e à Técnica Izabel Cristina Casanova Turatti pelas análises do óleo essencial em CG-EM.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ-MG e aos Professores Dr. Policarpo Ademar Sales Júnior e Dr. Álvaro José Romanha, pela realização dos ensaios de atividade tripanocida.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade de Franca/UNIFRAN – SP e a Profa. Dra. Lizandra Guidi Magalhães, pela realização dos ensaios esquistossomicida.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos – UFAM pelos ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca por se disponibilizarem gentilmente para avaliação deste estudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de Bolsa.

Ao grupo Bolsistas CAPES (Facebook), pelas dicas, descontrações e por esperar impacientemente junto comigo o 5º dia útil de cada mês. Haahahhh...

Ao Sci-Hub pela disponibilização dos papers, possibilitando a realização do presente trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que torceram por mim, meus sinceros agradecimentos.

AGRADEÇO

*“Cada planta tem centenas de substâncias,
e uma delas pode ser mais importante que uma galáxia”*

Otto Gottlieb

RESUMO

Doenças negligenciadas são responsáveis por milhões de mortes ao ano. São doenças debilitantes e afetam principalmente as populações das regiões mais carentes. Devido às limitações do tratamento existente, na atualidade, a busca por novos fármacos torna-se urgente. Nesse sentido, o estudo de espécies vegetais conduz uma alternativa para obtenção de um fitofármaco para o tratamento e controle dessas doenças. Muitas das espécies de *Piper* são usadas para fins curativos por diversas culturas, a sua constituição é composta por amidas insaturadas, flavonoides, lignanas, aristolactamas, ésteres de cadeias longas e curtas, terpenos, esteroides, propenilfenóis e alcaloides. *Piper marginatum* é conhecida como capeba, malvarisco, pimenta-do-mato, capeba-cheirosa e nhandi. Ela é utilizada popularmente contra doenças hepáticas, vesiculares, picadas de cobras e insetos. Os compostos voláteis de *Piper marginatum* foram investigados através da determinação da constituição química, variação sazonal e atividade antiprotozoária *in vitro*. Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, por seis horas, e os rendimentos variaram de 0,10 - 0,23% v/m. Os componentes do óleo essencial foram identificados através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM) e os principais constituintes foram: δ -3-careno, (*Z*) β -ocimeno, (*E*) β -ocimeno, α -terpinoleno, *E*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, α -copaeno, linalol, miristicina, 3,4-(metilenodioxo)propiofenona. Este é o primeiro trabalho que descreve atividade *in vitro* do óleo essencial de *P. marginatum* contra formas adultas de *S. mansoni*, formas tripomastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. amazonensis*. O óleo de *P. marginatum* apresentou uma promissora atividade esquistossomicida, reduzindo a motilidade e causando morte dos parasitas de forma diretamente proporcional à concentração e ao tempo de incubação. Quando testado na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, este óleo foi capaz de causar 100% da diminuição da atividade motora dos vermes após 24 horas de incubação e morte de 100% dos vermes na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ após 120 h de incubação. Para *T. cruzi*, o óleo essencial mostrou-se ativo na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ obtendo um percentual de mortalidade de 71% dos parasitos, porém o índice de seletividade foi menor que 2,3, muito abaixo do índice de seletividade (maior que 50) considerado para testes *in vivo*. Para as formas infectivas de *L. amazonensis*, o óleo testado mostrou-se inativo. Os resultados obtidos neste estudo contra os vermes adultos de *S. mansoni*, evidenciam a importância do estudo fitoquímico de espécies encontradas na região Amazônica, como alternativa à restrita terapêutica existente para o tratamento da esquistossomose.

Palavras-Chave: Piperaceae, Óleo volátil, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Neglected diseases are responsible for millions of deaths per year. They are debilitating diseases and affect, mainly, the population of poor regions. Due to the limitations of the existing treatment, the search for new drugs become urgent. In this sense, the study of plant species leads as an alternative to obtaining a phyto-pharmaceutical for their treatment and control. Many *Piper* species are used for curative purposes by various cultures and they are composed by unsaturated amides, flavonoids, lignans, aristolactams, long/short-chain esters, terpenes, steroids, propenyl phenols and alkaloids. *Piper marginatum* is also known as capeba, malvarisco, wild pepper, capeba-fragrant and nhandi. It is popularly used against liver and vesicular disease, snakes and insects bites. Volatile compounds and *Piper marginatum* were investigated by determining the chemical constitution, seasonal variation and anti-protozoan in vitro activity. Essential oils were extracted by hydro-distillation, for 6 hours, and yields ranged from 0.10-0.23% v/m. Essential oil components have been identified through gas chromatography analysis coupled to a mass spectrometry (GC/MS), the main constituents were: δ -3-careno, (*Z*) β -ocimene, β -ocimene, α -terpinolene, *E*-caryophyllene, bicyclogermacrene D, α -copaene, linalool, myristicin, 3.4-(methylenedioxy) propiophenone. This is the first work that describes in vitro activity of the essential oil of *P. marginatum* against adult forms of *S. mansoni*, trypomastigote forms of *T. cruzi* and promastigotes forms of *L. amazonensis*. *P. marginatum* oil presented a promising schistosomiasis activity, reducing the motility and causing death of the parasites directly proportional to the concentration and incubation time. When tested at concentrations of 12.5 μ g/mL, this oil was capable to causes 100% of the motor activity of worms decreased after 24 hours of incubation and 100% death of the worms in a concentration of 50 μ g/mL after 120 h of incubation. For *T. cruzi*, the essential oil shown to be active in the concentration of 20 g/mL, resulting in 71% mortality of parasites, however the selectivity index was below 2.3, far below the selectivity index (less than 50) considered for *in vivo* tests. For the infectious forms of *L. amazonensis*, the oil proved to be inactive. The results obtained in this study against the *S. mansoni* adult worms, demonstrate the importance of phytochemical study of species found in the Amazon region, as an alternative to the existing restricted therapy to treat schistosomiasis.

Keywords: Piperaceae, Volatile oil, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota biossintética dos metabólitos secundários	8
Figura 2 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta	9
Figura 3 - <i>Piper marginatum</i>	13
Figura. 4 – Ciclo biológico do <i>Schistosoma</i>	16
Figura 5 - Ciclo biológico <i>T. cruzi</i>	19
Figura 6 - Ciclo biológico <i>Leishmania</i> ssp	21
Figura 7 - Extração do óleo essencial de <i>Piper marginatum</i> em aparelho de Clevenger modificado.....	24
Figura 8 - Estrutura do substrato resazurina e do produto resorufin fluorescente rosa resultante da redução de células viáveis	29
Figura 9 - Óleo essencial extraído das folhas de <i>P. marginatum</i>	30
Figura 10 – Rendimento do óleo essencial de <i>P. marginatum</i>	32
Figura 11 – Rendimento do óleo essencial de <i>P. marginatum</i> x Volume de Precipitação...33	
Figura 12 – Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de <i>P. marginatum</i>	35
Figura 13 - Componentes majoritários do óleo essencial de <i>P. marginatum</i>	36
Figura 14 - Variação sazonal do teor dos monoterpenos majoritários presentes no OE.....	41
Figura 15 - Variação sazonal do teor dos sesquiterpenos majoritários presentes no OE ...	42
Figura 16 - Variação sazonal do teor dos fenilpropanoides majoritários presentes no OE	43
Figura 17 - Espectro de massas e estrutura do δ -3-careno	46
Figura 18 – Proposta de fragmentação do δ -3-careno	46
Figura 19 - Espectro de massas e estrutura do (Z) β -ocimeno	46
Figura 20 - Espectro de massas e estrutura do (E) β -ocimeno	46
Figura 21 – Proposta de fragmentação do (Z) β -ocimeno e do (E) β -ocimeno	47
Figura 22 - Espectro de massas e estrutura do α -terpinolene	47
Figura 23 – Proposta de fragmentação do α -terpinolene	47
Figura 24 - Espectro de massas e estrutura do linalol	48
Figura 25 – Proposta de fragmentação do linalol	48
Figura 26 - Espectro de massas e estrutura do α -copaeno	49
Figura 27 – Proposta de fragmentação do α -copaeno	50
Figura 28 - Espectro de massas e estrutura do germacreno D	50

Figura 29 – Proposta de fragmentação do germacreno D	50
Figura 30 - Espectro de massas e estrutura do <i>E</i> -cariofileno	51
Figura 31 – Proposta de fragmentação do <i>E</i> -cariofileno	51
Figura 32 - Espectro de massas e estrutura do bicilogermacreno	51
Figura 33 – Proposta de fragmentação do bicilogermacreno	50
Figura 34 - Espectro de massas e estrutura da miristicina	53
Figura 35 – Proposta de fragmentação do miristicina	53
Figura 36 - Espectro de massas e estrutura do 3,4-(metilenodioxo) propiofenona	54
Figura 37 – Proposta de fragmentação do 3,4-(metilenodioxo) propiofenona	54
Figura 38 - Viabilidade celular utilizando o teste de resazurina	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Rendimentos de óleo essencial de <i>Piper marginatum</i>	31
Tabela 2 - Composição química quantitativa do óleo essencial de <i>P. marginatum</i>	37
Tabela 3 - Efeito <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>P. marginatum</i> sobre os vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	55
Tabela 4 - Efeito <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>P. marginatum</i> sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> de cultivo celular	57
Tabela 5 - Atividade Leishmanicida IC ₅₀ do óleo essencial de <i>P. marginatum</i>	59

LISTA DE ABREVIATURA

% - Porcentagem

ANA - Agência Nacional de Águas

CG/EM - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

CPRG - Cloro-fenol- β -D-galactopiranosídeo

DL₅₀ - Dose letal mediana

DMSO – Dimetilsulfóxido

h – Horas

HEPES – N-2-hidroietilpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50 % da população de células

IK - Índice de Kovat's

IS – Índice de Seletividade

OE - Óleo essencial

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAL - Fenilalanina amônio-liase

PZQ - Praziquantel

PM- *Piper marginatum*

Rpm – Rotação por minuto

RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute

SBF – Soro Bovino Fetal

v/m – volume dividido pela massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. Considerações gerais	5
1.2 Metabolismo vegetal	7
1.3 Óleo essencial	10
1.4 Família Piperaceae	12
1.4.1 Gênero <i>Piper</i>	12
1.4.2 <i>Piper marginatum</i>	13
1.5 Esquistossomose	14
1.5.1 Ciclo de vida do parasita	15
1.5.2 Fármacos empregado no tratamento Esquistossomose	16
1.6 Doença de Chagas.....	17
1.6.1 Ciclo de vida do parasita	18
1.6.2 Fármacos empregados no tratamento da Doença de Chagas	19
1.7 Leishmaniose	20
1.7.1 Ciclo de vida do parasita	21
1.7.2 Fármacos empregados no tratamento Leishmaniose	22
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. METODOLOGIA.....	24
3.1 Coleta do vegetal.....	24
3.2 Extração do óleo essencial	24
3.3 Identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais	25
3.4 Avaliação da atividade esquistossomicida	25
3.4.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i>	25
3.4.2 Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	26
3.5 Avaliação da atividade tripanocida	27
3.6 Avaliação da atividade leishmanicida.....	28
3.6.1 Cultivo de <i>Leishmania amazonensis</i>	28
3.6.2 Ensaio de resazurina com promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	28
3.6.3 Valores de CI ₅₀	29

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Teor do óleo essencial de <i>Piper marginatum</i>	30
4.2 Efeito do regime hídrico e no rendimento do óleo	32
4.3 Análise qualitativa e quantitativa dos constituintes dos óleos essenciais	34
4.3.1 Espectros de massas e análises das fragmentações das substâncias majoritárias	44
4.4 Atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	54
4.5 Atividade tripanocida <i>in vitro</i>	56
4.6 Atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	58
5. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
Apêndice	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças por meio da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos. Intuitivamente, o homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas de sobrevivência, como alimentação, moradia, proteção e reprodução (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Suas experiências e observações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de injúrias ou doenças através do uso das plantas e ervas (VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

A medicina tradicional vem sendo usada até hoje em todas as partes do mundo. Ela tem importância econômica especialmente nos países em desenvolvimento, pelo uso de plantas medicinais, pois representa a única forma acessível de tratamento onde os serviços de saúde modernos são limitados (GUTIERREZ *et al.*, 2013). No Brasil, o emprego de plantas medicinais está presente desde antes da colonização, quando índios já as utilizavam e passaram seus conhecimentos para os colonizadores, tornando-as amplamente utilizadas na medicina caseira (LIMA *et al.*, 2012). Na história da descoberta de drogas, é evidente que uma considerável parte delas foi desenvolvida com base na medicina tradicional (YUAN *et al.*, 2016).

A química dos produtos naturais está intimamente relacionada à biodiversidade, principalmente vegetal. Nesse cenário o Brasil se destaca possuindo a maior diversidade genética em espécies de plantas no mundo, porém menos de 10 % foram avaliadas quanto as suas características biológicas e, menos de 5 % foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados. Apesar de um recente aumento de pesquisas nesta área, as plantas ainda constituem uma fonte relativamente subutilizada e, potencialmente, muito valiosa para descoberta de novas substâncias biologicamente ativas (LUNA *et al.* 2005).

A busca de novos compostos bioativos a partir de espécies vegetais é considerada uma das principais estratégias e promissora fonte de moléculas potencialmente ativas (CALIXTO, 2005). Pesquisas com fitoterápicos têm revelado o grande potencial na busca de novas substâncias para combater as doenças negligenciadas (RONDON *et al.* 2012).

No mundo, de acordo com a Organização Mundial Saúde (OMS), há 17 doenças tropicais negligenciadas ou doença de pobre, como também é conhecida, que afetam especialmente pessoas que vivem nos trópicos, porém não são exclusivas a eles, estando presente em 149 países (WHO, 2010; WHO, 2018). São consideradas doenças negligenciadas

por não despertarem interesse da indústria farmacêutica (FIGUEIREDO et al., 2014). A ausência de investimentos da indústria farmacêutica em medicamentos para doenças negligenciadas é justificada pelo reduzido potencial de retorno lucrativo, uma vez que a população atingida é de baixa renda e, em sua maioria, de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (MADUREIRA et al., 2013).

Estas enfermidades possuem um grande impacto sobre indivíduos, familiares e a comunidade, em função da própria doença, mas, também, pelo efeito em sua qualidade de vida, na perda da produtividade, no agravamento da pobreza, além do alto custo do tratamento (WHO, 2010).

Doenças negligenciadas são doenças que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países. Segundo dados da OMS, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial (BRASIL, 2010a). Como exemplos de doenças negligenciadas, podemos citar a esquistossomose, doença de Chagas e a leishmaniose (BRASIL, 2010a). No Brasil, a prevalência é elevada nas regiões Norte e Nordeste, nas quais há os menores índices de desenvolvimento humano (LINDOSO e LINDOSO, 2009).

Neste contexto, as espécies do gênero *Piper* tornam-se relevantes, tendo em vista que muitas já foram extensivamente investigadas como uma fonte de metabólitos secundários, que apresentam atividades ansiolíticas, anti-inflamatórias, anticonvulsivante, tripanocida e leishmanicida (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2008). A espécie *Piper marginatum* Jacq. (PM), pertencente à família Piperaceae, chamada popularmente por capeba, malvarisco, pimenta-do-mato, capeba-cheirosa e nhandi. É utilizada na região principalmente como fitoterápico contra doenças hepáticas, vesiculares, picadas de cobras e insetos. Possui também ação carminativa e antiespasmódica (MAIA et al. 2009; CHAVES et al. 2006).

Neste contexto, a espécie *P. marginatum* motivou o presente estudo, uma vez que têm demonstrado uma ampla utilização na medicina tradicional, e estudos com o óleo essencial das folhas desta espécie, com atividade esquistossomicida, tripanocida e leishmanicida não foram encontrados. O conhecimento da composição química e da atividade biológica do óleo, pode trazer novas fontes para compostos relevantes. Além disso, a possível descoberta de princípios ativos contra parasitas causadores de doenças negligenciadas pode ser o início de pesquisas mais aprofundadas no sentido substituir a terapia existente.

1.2 Metabolismo vegetal

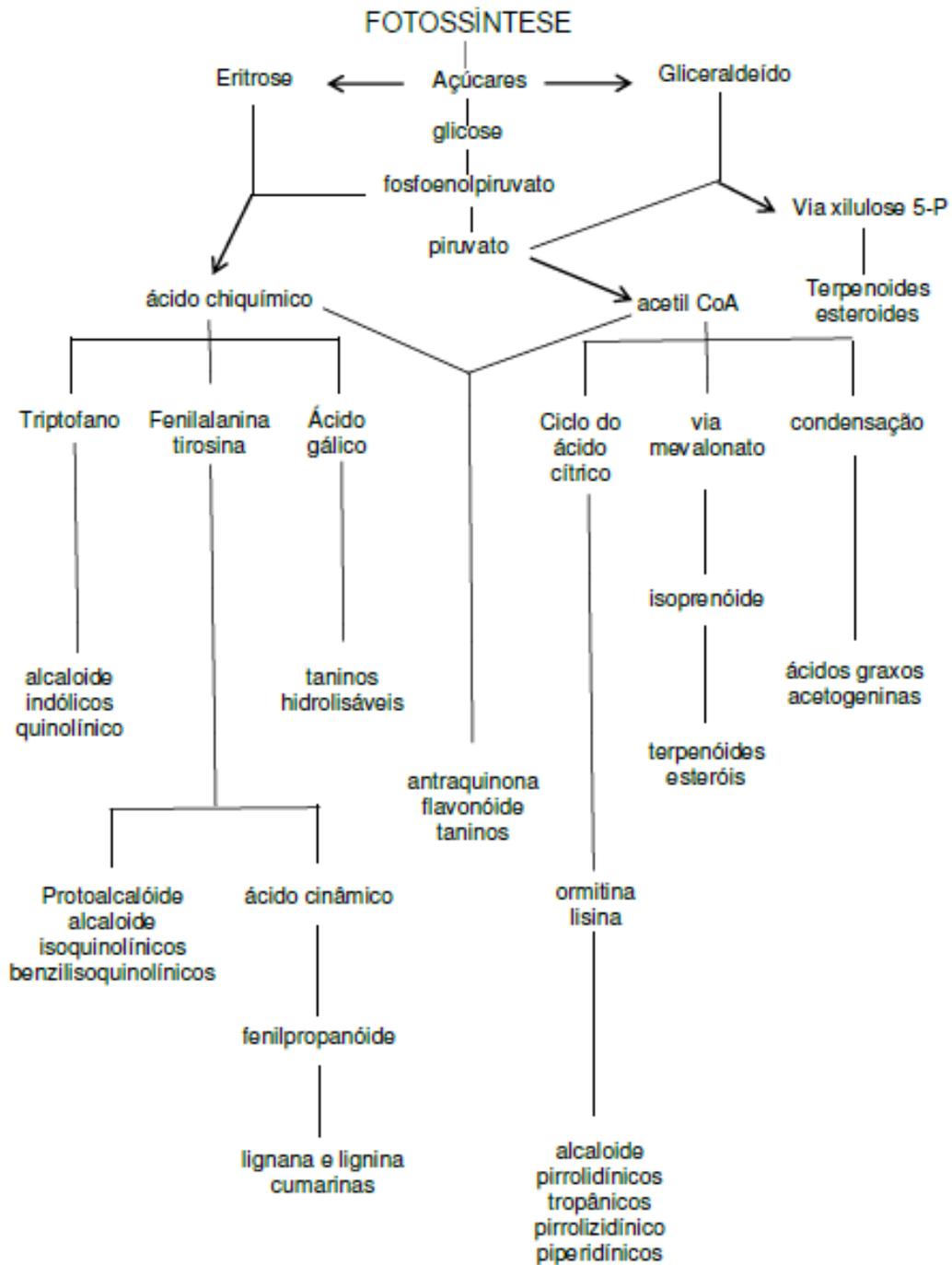
O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado (MARZZOCO e TORRES, 2007).

Quando estudamos plantas temos que levar em consideração os metabolismos primários e secundários, sendo que os primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e a vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, entre outros. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, relacionados aos processos adaptativos, são biossintetizados a partir de metabólitos primários, com distribuição restrita à certas plantas e microrganismos, e caracterizados por uma grande diversidade química, como por exemplo, os alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc. Em geral, o termo “produto natural”, quer dizer metabolismo secundário (BRESOLIN e CECHINEL FILHO, 2003).

Estes princípios ativos distribuem-se pelos diferentes órgãos das plantas (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Entre os terpenos, especialmente os monoterpênicos e seus análogos são componentes abundantes de óleos essenciais de muitas plantas, seguido dos sesquiterpenos (PRATES e SANTOS, 2002). A origem destes metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose formada através da fotossíntese (FIGURA 1). Os terpenos são formados por unidades básicas de isopreno, compostas de 5 carbonos e classificados de acordo com o número de unidades isoprênicas: monoterpênicos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos) e diterpenos (20 carbonos), sendo considerados os principais constituintes dos óleos essenciais (PERES, 2004).

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG e LUBERT, 2008). Muitos deles funcionam como sinais químicos, que permitem à planta responder a estímulos do ambiente. Outros funcionam como defesa das plantas que os produzem contra herbívoros, patógenos (organismos causadores de doenças) ou competidores. Alguns fornecem proteção contra a radiação solar, enquanto outros contribuem para a dispersão de pólen e sementes (RAVEN *et al.*, 2011).

Figura 1 – Rota biossintética dos metabólitos secundários.



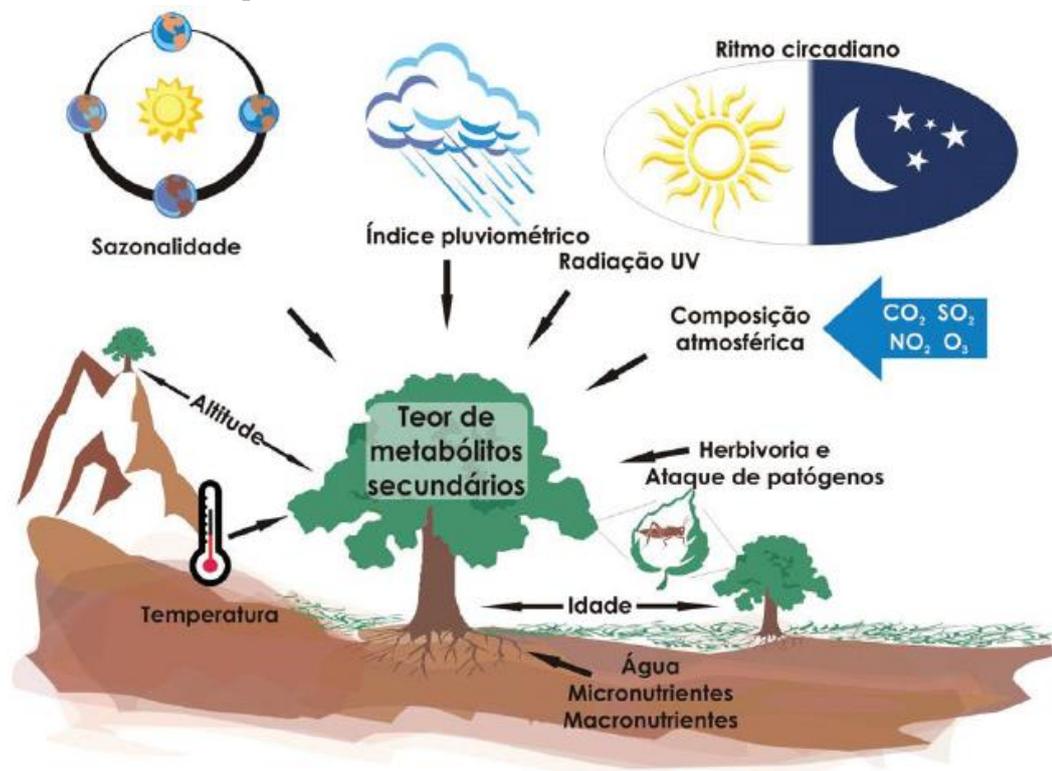
FONTE: Lupe et al. (2007).

O conhecimento envolvendo a química dos produtos naturais, em especial a química do metabolismo secundário, constitui-se uma ciência multidisciplinar que envolve diversas áreas do saber, pois a composição química desses produtos é diretamente influenciada por fatores bióticos (herbivorismo, ação antrópica, alelopatias e outros) e por fatores abióticos (condições

edafoclimáticas, radiação luminosa e outros). Nesse sentido, os metabólitos secundários são os compostos químicos que mais alteram o metabolismo vegetal, seja qualitativa ou quantitativamente, com o intuito de propiciar uma melhor adaptação da planta às condições expostas (GOBBO- NETO e LOPES, 2007).

A época da coleta da droga representa um dos fatores de maior importância no conteúdo de metabólitos secundários, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais, temporais e espaciais no conteúdo total de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, assim como os óleos essenciais. Esses metabólitos ocorrem em diferentes níveis de acordo com as relações (intraplanta, inter e intraespecífica) da planta com o ambiente, como pode ser observado na Figura 2, os mais diversos fatores podem influenciar a soma dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Figura 2 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.



FONTE: Gobbo-Neto e Lopes (2007).

Desde o quarto século a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais. Os carrascos gregos, por exemplo, coletavam suas amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) pela manhã, quando os níveis de coniina são maiores (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). A composição química e teor dos óleos essenciais podem sofrer alteração durante as estações do ano. CASTRO et al. (2001) avaliaram o efeito da sazonalidade associada à época de colheita na produção de fitomassa de *L. alba*, obtendo os maiores rendimentos na primavera e no verão, sendo os menores obtidos no inverno. BEZERRA et al. (2008), observaram variações nos teores dos componentes majoritários do óleo essencial de Macela, quando extraídos de capítulos florais provenientes de diferentes épocas de colheita.

1.3 Óleo essencial

O uso de óleos essenciais é muito antigo, havendo relatos de produção na Pérsia, Índia e Egito em épocas anteriores a Cristo. No final da Idade Média, a destilação de óleos essenciais para produção de óleos de romã e lavanda era bastante frequente (SILVA, 1993). A International Standard Organization (ISO) define óleos voláteis como os produtos obtidos a partir de matéria-prima vegetal por destilação com água ou vapor, ou a partir do epicarpo de frutas cítricas por processo mecânico (SIMÕES et al., 2007). De forma geral, são misturas complexas de produtos voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são produzidos e armazenados pelas plantas em estruturas especializadas, como idioblastos, cavidades, canais e tricomas glandulares. As plantas podem produzir óleos essenciais em várias regiões em quantidades e composições diferentes. Entre as partes das plantas nas quais se podem encontrar óleos essenciais, citam-se as pétalas, cascas, rizomas, raízes, folhas, galhos, pequenos frutos, e lenho (SIMÕES et al., 2003).

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (BAKKALI et al., 2008; SIANI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006; SARTORATTO et al., 2004; SIMIONATTO et al., 2005). Apresentam como características volatilidade, instabilidade na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos, ou meios com traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação, uma vez que dada a sua complexa composição, apresentam alta probabilidade de sofrer modificações físico-químicas devido as reações entre seus próprios constituintes ou entre eles e o meio (BANDONI e CZEPAK, 2008).

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. É comum o óleo apresentar uma grande variedade de constituintes, são comuns óleos nos quais são identificados mais de 60 compostos distintos (BURT, 2004). Alguns aspectos determinantes que podem contribuir para a variabilidade da composição do óleo volátil são: Quimiotipos, Ciclo vegetativo, Fatores extrínsecos (temperatura, umidade relativa, exposição ao sol e regime dos ventos) e Processo de obtenção (SIMÕES, et al., 2003). Ela pode variar conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita, tipo de adubação, mas os principais constituintes responsáveis pelo aroma parecem permanecer constantes (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Vários estudos que avaliam suas propriedades e composição são descritos, como larvicida (AUTRAN et al., 2009), antiparasitários (CRUZ et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012), antifúngico, antioxidante e anticolinesterase (SILVA et al., 2014) e anti-inflamatório (BRANQUINHO et al., 2017).

O Brasil possui tradição no cultivo de plantas aromáticas e na produção de óleos essenciais, proporcionando divisas de exportação, sendo crescente a aplicação desses produtos por diversos ramos industriais como nos de alimentos, fármacos, perfumes e cosméticos, inseticidas, detergentes e desinfetantes. Isto favorece a pesquisa e o desenvolvimento de novos processos ou técnicas de obtenção de tais produtos. Dentre as matérias-primas para a produção de óleos essenciais que despertaram interesse em passado recente, pode-se citar as piperaceas (BRAGA e CREMASCO, 2010).

Os óleos essenciais são cada vez mais estudados para o controle de microrganismos. Além disso, testes *in vitro* tem demonstrado atividade antiparasitária. Devido a sua composição variada, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (ANDRADE et al., 2012). Eles ainda são utilizados em indústrias de alimentos como flavorizantes de massas, pizzas, sorvetes, doces, compotas, sucos, etc. Porém, seu maior valor comercial está na indústria de cosméticos. Algumas plantas aromáticas contêm fragrâncias valiosas e preciosas para as indústrias de perfumes. Vale ressaltar que nem todos os óleos essenciais possuem aroma agradável e nem sempre as espécies que os contem apresentam propriedades terapêuticas (TRANCOSO, 2013).

Em processos de extração do óleo essencial de plantas frescas ou secas, deixa-se o material vegetal em contato com vapor de água (destilação a vapor) ou água em ebulição (hidrodestilação). Durante esses procedimentos ocorre a ruptura dos tricomas glandulares e, conseqüentemente, a liberação das substâncias voláteis nele contidas, ou ainda, terminada a

fase de secreção, as células glandulares sofrem, de um modo geral, degeneração celular, o que leva ao colapso da cabeça glandular do tricoma e à perda de sua funcionalidade (ASCENSÃO, 2007).

1.4 Família Piperaceae

A família Piperaceae é classificada entre as mais primitivas famílias entre as angiospermas (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002), subdividida em cinco gêneros: *Verhuellia*, *Zippelia*, *Manekia*, *Piper* e *Peperomia* (SAMAIN et al., 2010). Nos trópicos são encontradas como plantas pioneiras e têm sido intensivamente analisadas em investigações fitoquímicas (FELIPPE et al. 2008). No Brasil ocorrem aproximadamente 460 espécies de cinco gêneros, muitas delas extremamente comuns na Mata Atlântica, onde ocorrem em abundância e diversidade. Geralmente, as plantas são arbustos, lianas, epífitas, ervas e pequenas árvores sempre aromáticas, normalmente com células de óleos essenciais. A família é muito importante como fonte de substâncias com atividade farmacológica, especialmente do gênero *Piper*, o mais estudado e conhecido do ponto de vista químico, do qual se destacam espécies como *Piper hispidinervum* e *Piper nigrum* (DI STASI et al., 2002).

1.4.1 Gênero *Piper*

O gênero *Piper* agrega mais de 1.000 espécies que se distribuem geograficamente pelas regiões subtropicais, tropicais e temperadas de ambos os hemisférios, cujos representantes são de hábito predominantemente herbáceo (DYER e PALMER, 2004).

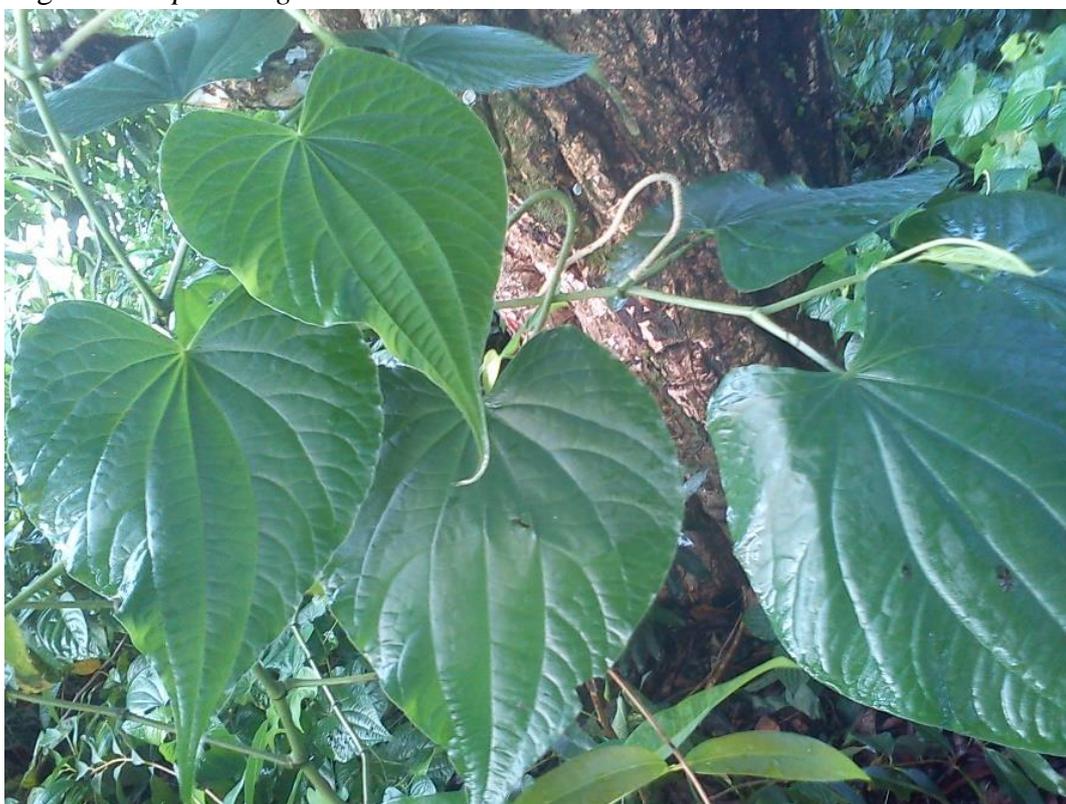
Muitas das espécies de *Piper* são usadas para fins curativos por diversas culturas, tendo a sua constituição sido composta por amidas insaturadas, flavonoides, lignanas, aristolactamas, ésteres de cadeias longas e curtas, terpenos, esteroides, propenilfenóis e alcaloides (PARMAR et al., 1997). A variedade de metabólitos secundários que plantas desse gênero sintetizam, é a principal responsável pelo aumento do interesse medicinal do gênero (JARAMILLO e MARQUIS, 2004).

Extratos de diversas espécies de *Piper* indicam aplicações medicinais e propriedades inseticida (PESSINI et al., 2005), bactericida (POTZERNHEIM et al., 2006), fungicida (PARRA et al., 2013), antioxidante (KAMTO et al., 2014), diurética (NOVAES et al., 2014), esquistossomicida (CASTRO et al., 2015), antitumoral (GIROLA et al., 2015) e ansiolítica (MULLALLY et al., 2016). O óleo essencial tem demonstrado atividades citotóxicas, antifúngicas, antioxidantes e anticolinesterase (BRANQUINHO et al., 2017).

1.4.2 *Piper marginatum*

Piper marginatum Jacq. é um arbusto ou arvoreta que pode atingir até cinco metros de altura (FIGURA 3). As folhas possuem lâmina ovalada com tamanho de dez a vinte centímetros de largura e sete a quinze centímetros de comprimento, com pecíolo de comprimento de dois a seis centímetros, base cordada, ápice acuminado, membranácea, glabra em ambas as faces. Espigas curtas de comprimento máximo de quinze centímetros, pedúnculo com um centímetro de comprimento, com bractéolas triangular-peltadas, franjadas. De quatro a cinco estames, drupa obpiramidal, glabra, três estigmas sésseis (GUIMARÃES e GIORDANO 2004).

Figura 3 - *Piper marginatum*



FONTE: Autora

Piper marginatum é chamada pelos índios tenharins pelo nome de Nhambuí. Outras denominações populares para esta espécie são Caapeba-cheirosa, Bitre, Nnhadi, Pimenta-do-mato e Pimenta-dos-índios. A raiz amassada é usada externamente para o alívio da dor e coceira causada pela picada de insetos, tônica, estomáquica, resolutive e usada em banhos após o parto; as raízes são carminativas, sudoríferas, diuréticas, usadas contra veneno de cobra, dores de dente e blenorragias; os frutos são excitantes e as folhas estimulatórias (DI STASI e HIRUMALIMA, 2002).

Em estudo da atividade fungicida *in vitro*, o extrato das folhas de *P. marginatum* foi ativo para *Colletotrichum scovileii* causador de antracnose em pimentões (ARAÚJO et al. 2014). E o extrato hidroalcoólico demonstrou atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (DUARTE et al., 2004).

O óleo essencial é polimórfico, variando intraespecificamente, e é marcado pela presença de sesquiterpenos e fenilpropanoides (Andrade et al. 2009). Análises do óleo essencial de *Piper marginatum* mostraram a presença α -humuleno, 3,4- (metilenodioxi) propiofenona, γ -elemeno, α -copaeno como compostos majoritários (RAMOS et al., 1986).

Andrade et al., (2008) estabeleceram sete quimiotipos para o óleo essencial das folhas de *P. marginatum* coletadas de 22 amostras de diferentes regiões da Amazônia. Os compostos majoritários encontrados no quimiotipo I foram safrol e 3,4-metilenodioxipropiofenona. No quimiotipo II foram 3,4-metilenodioxipropiofenona, p-menta-1(7), 8-dieno. No quimiotipo III, foram 3,4-metilenodioxipropiofenona, miristicina, β -ocimeno e γ -terpineno. Os compostos majoritários identificados no quimiotipo IV foram β -cariofileno, α -copaeno e 3,4- (metilenodioxi)propiofenona. O quimiotipo V foi predominante as substâncias, (*E*)-isosmorizol, (*E*)-anetol e isosmorizol. Os principais componentes encontrados no quimiotipo VI foram 2-metoxi-4,5-(metilenodioxi) propiofenona, metoxi-4-5-(metilenodioxi) propiofenona e (*E*)-isosmorizol. Os componentes majoritários no quimiotipo VII foram β -cariofileno, biciclogermacreno e (*E*)-asarona.

Atualmente, óleos essenciais de espécies de *Piper* vêm sendo testados frente a diversas atividades biológicas, dentre elas podemos citar a atividade inseticida do óleo essencial de *Piper marginatum* frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti* (NEVES et al., 2009; AUTRAN et al., 2009; SANTANA et al., 2015) e fungicida contra *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici* (SILVA & BASTOS, 2007).

1.5 Esquistossomose

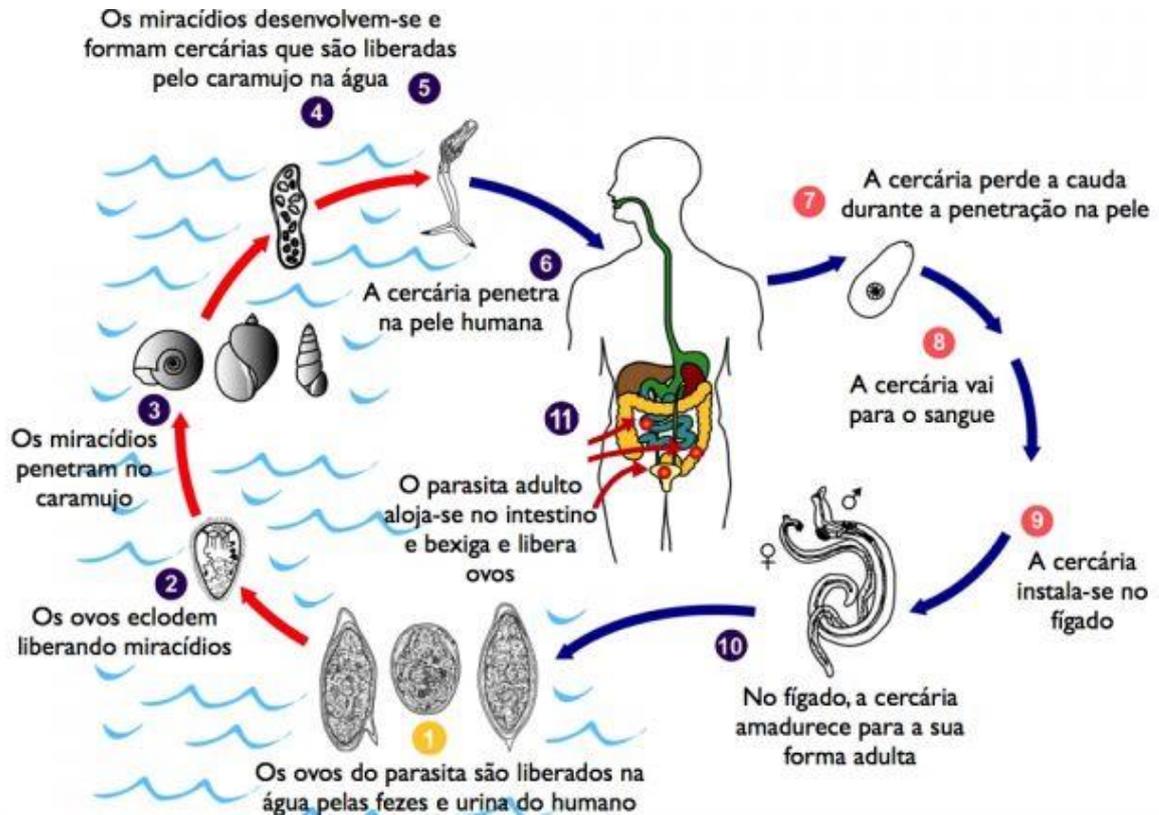
A esquistossomose ou bilharziose é uma doença parasitaria aguda e crônica, causada por vermes do gênero *Schistosoma*. Considerada pela OMS como uma doença tropical negligenciada, com cerca de 732 milhões de pessoas vulneráveis à infecção mundial em áreas endêmicas e com alta taxa de mortalidade (WHO, 2017). Nestas áreas endêmicas a forma prevalente da doença é a esquistossomose crônica, resultante da exposição constante à forma infectante do parasita, as cercárias (COLLEY, et al., 2014). Pelo menos 280.000 pessoas

morrem a cada ano de esquistossomose (VAN DER WERF et al., 2003). A doença foi introduzida no Brasil, no período colonial, com a vinda de escravos africanos (FILES 1951). De acordo com o Ministério da Saúde, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas são acometidas por esquistossomose no Brasil, sendo que a maioria destes localizados nos estados do Nordeste (BRASIL, 2005). Das espécies conhecidas de *Schistosoma*, três são responsáveis por causar a doença em humanos: *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Sabe-se que *S. mansoni* é a espécie com maior distribuição global e a única espécie causadora da esquistossomose no Brasil (BERGQUIST 2002). Sendo endêmica em algumas áreas do território: do Rio Grande do Norte à Bahia, no Interior do Espírito Santo e Minas Gerais (BRASIL, 2009). Os principais sintomas da doença são febre, dor de cabeça, apatia por hepatoesplenomegalia, podendo até causar a morte (VAN DER WERF et al., 2003).

1.5.1 Ciclo de vida do parasita

O ciclo inicia-se quando as fezes de indivíduos infectados contendo ovos de *S. mansoni* entram em contato com água corrente e eclodem, liberando a larva ciliada miracídio, capaz de infectar caramujo do gênero *Biomphalaria*, e através de movimentos rotatórios em torno do próprio eixo, penetra e invade o tegumento do molusco (REY, 2008). No molusco, o parasito inicia o ciclo de reprodução assexuada de esporocistos, gerando milhares de cercarias infecciosas, e devido a estímulos como exposição à luz e água com altas temperaturas, esses parasitos saem do molusco. Ao alcançarem a água, as cercarias na presença do hospedeiro definitivo (homem), penetram através da pele do indivíduo, e algumas delas atingem os vasos sanguíneos cutâneos superficiais, as larvas passam por uma série de transformações morfológicas, gerando os esquistossômulos, uma provável adaptação para a sobrevivência nos capilares sanguíneos entre células imunes. Posteriormente, migram para os pulmões, e em seguida para o sistema porta intra-hepático, onde ocorre a maturação sexual dos vermes, e seu destino é as veias mesentéricas, onde vivem por anos, décadas, inteiramente ilesos dos efeitos do sistema imune. As fêmeas depositam diariamente centenas de ovos, aproximadamente, 50 % dos ovos cruzam a parede dos vasos e do intestino, atingem a luz intestinal e são eliminados nas fezes, o restante é carregados pela corrente sanguínea das veias do mesentério e ficam retidos nos tecidos do hospedeiro (intestino e fígado) induzindo inflamação (FIGURA 4). Desencadeia-se, então, a formação de granulomas que podem culminar com a fibrose hepática (REY, 2008, ADENOVO et al. 2015).

Figura 4 - Ciclo biológico do *Schistosoma*.



FONTE: CDC, 2018. <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

1.5.2 Fármacos empregado no tratamento da Esquistossomose

Atualmente Quimioterapia representa a principal alternativa para minimizar a prevalência e incidência desta doença no mundo. Notoriamente por mais de 30 anos, o Praziquantel (PZQ) é a única droga disponível para o tratamento em massa de esquistossomose (CAFFREY, 2015). Um dos possíveis alvos do Praziquantel é um canal de cálcio existente nas células da superfície do parasito, gerando um descontrole no fluxo de íons para dentro e para fora delas, causando à morte do parasito (CIOLI & PICA-MATTOCIA 2003). Porém, o PZQ apresenta alguns inconvenientes, dentre eles: diminuição ou completa falta de atividade contra estágios mais jovens do parasita em relação as formas adultas, provoca reações alérgicas e hipersensibilidade e não impede reinfeção, que conseqüentemente levam à seleção de parasitas resistentes (CAFFREY, 2015; WHO, 2018). E para tornar o tratamento mais eficiente é necessária a efetiva resposta humoral do hospedeiro contra o parasita (DOENHOFF et al, 2008). Com base no exposto, faz-se necessário a busca por novas drogas para tratamento da esquistossomose que atuem nos estágios jovens e adultos do parasito.

1.6 Doença de Chagas

A doença de Chagas foi originalmente descrita pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909, que na época desenvolvia trabalhos sobre malária no norte de Minas Gerais (DIAS, 2001). A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença potencialmente fatal, classificada como enfermidade negligenciada pela OMS, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida ao homem pelo inseto triatomíneo (*Triatoma infestans*) (BARBOSA, 2009).

São estimados cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas pelo parasita em todo o mundo. Sendo endêmica em 21 países latino-americanos, onde a maior parte da transmissão aos seres humanos ocorre pelo contato com as fezes ou urina dos triatomíneos, conhecido como ‘barbeiro’, entre outros nomes, dependendo da localidade (WHO, 2018b). No Brasil, aproximadamente 2 milhões de indivíduos encontram-se infectados, com o predomínio dos casos crônicos da doença (WHO, 2010). Ocorrendo cerca de 14.000 mortes por ano (REA et al., 2013).

Os barbeiros infestam principalmente casas de regiões rurais e se infectam ao sugar o sangue de animais que tenham o parasito, como por exemplo, marsupiais, roedores e aves. Embora os barbeiros se alimentem desses animais, somente os mamíferos são infectados com *T. cruzi* (ARGOLO et al., 2008). A doença de Chagas, além de ser transmitida pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo com excretas de triatomíneo através da pele lesada ou mucosa, pode ocorrer também através de via transfusional, através da transfusão de hemoderivados ou transplante de órgão por doadores contaminados, via vertical, acidentes em laboratórios e via oral (FERREIRA et al., 2014).

Em 2005, no Estado de Santa Catarina ocorreu um surto da doença através da ingestão de caldo de cana contendo o parasita (LEWINSOHN, 2005). No sudoeste da Bahia foi relatada a doença envolvendo sinais súbitos cardíacos e sistêmicos com letalidade, a transmissão provavelmente foi devido à ingestão de água contaminada por fezes de triatomíneos. A região norte do Brasil liderou o *ranking* de regiões com o maior percentual de registros de contaminação (91%), com destaque para o estado do Pará, responsável por 75% dos casos (DIAS et al., 2008). A principal forma de transmissão nessa região, foi por ingestão de suco de açaí (BRASIL, 2015).

Durante o processo evolutivo da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, manifestações clínicas são evidenciadas e caracteristicamente descritas em duas etapas distintas, denominadas de fase aguda que dura em média 2 meses, sendo sucedida por uma fase crônica que tipicamente se prolonga por toda a vida do hospedeiro (DIAS E DESOY, 2009; MAGALHÃES-SANTOS, 2014).

A forma aguda é caracterizada pela proliferação do parasito na corrente sanguínea e sua disseminação pelo sangue ou vasos linfáticos, afetando fibras musculares principalmente cardíacas, com vários graus de severidade, às vezes só identificada por eletrocardiograma ou eco-cardiograma. As manifestações clínicas mais comuns são: febre prolongada e recorrente, cefaleia, mialgias, astenia, edema de face ou membros inferiores, rash cutâneo, hipertrofia de linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia e ascite. Manifestações digestivas (diarreia, vômito e epigastralgia intensa) são comuns em casos por transmissão oral. Em caso de transmissão vetorial pode ocorrer edema Sinal de Romanã (ocular bípalebral unilateral) ou lesão cutânea semelhante a um chagoma de inoculação (lesão a furúnculo que não sutura). Passada fase aguda, aparente ou inaparente, se não for realizado tratamento específico, ocorre redução espontânea da parasitemia com tendência à evolução para fase crônica. Diferentemente da fase aguda, a fase crônica é caracterizada em três formas distintas denominadas de: forma indeterminada onde não se observam alterações cardíacas, esta fase pode durar toda a vida ou, após cerca de 10 anos, pode evoluir para outras formas (ex.: cardíaca, digestiva); a forma cardíaca, sendo a principal causa de morte em pacientes chagásicos e a forma crônica digestiva, com consequentes alterações morfológicas, causando o megaesôfago e o megacólon (BRASIL, 2010b).

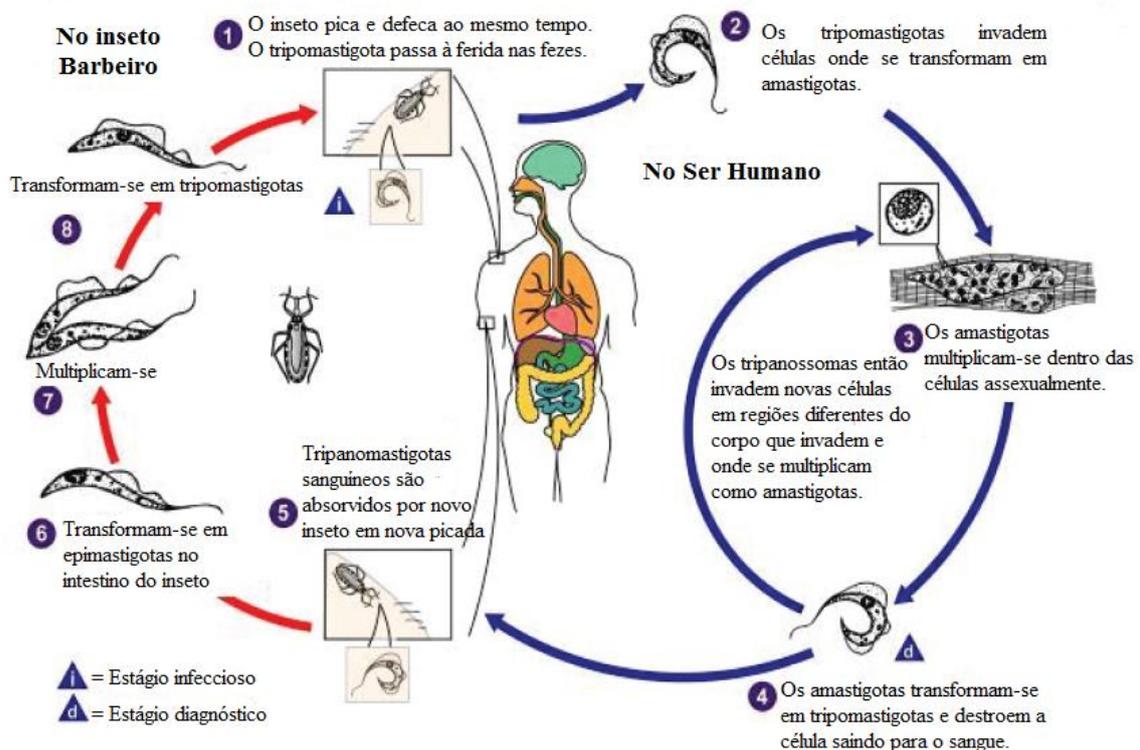
1.6.1 Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, envolve hospedeiros invertebrados e mamíferos, incluindo o homem, e apresenta três estágios morfolologicamente distintos: a forma infectante, tripomastigota metacíclico (eliminado pelo vetor invertebrado) ou sanguíneo (presente no hospedeiro vertebrado); formas replicantes, amastigotas intracelulares; outra forma replicante, presente no intestino do hospedeiro invertebrado, denominada epimastigotas (SOUZA, 2002).

O ciclo tem início quando vetores triatomíneos infectados praticam hematofagia em mamíferos e eliminam fezes contendo formas tripomastigotas metacíclicos. A irritação produzida pela picada do inseto induz o indivíduo a coçar o local, o que permite que o parasita atravesse a epiderme através de discontinuidades na pele e invada as células hospedeiras. Uma vez dentro do hospedeiro, as formas tripomastigotas diferenciam-se para as formas amastigotas no citoplasma e multiplicam-se por divisão binária. Após sucessivas divisões, as formas amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas sanguíneas, que emergem da célula hospedeira rompida, à proporção de 500 parasitas para cada um internalizado (DVORAK, 1975), para infectar células novas ou alcançar a corrente sanguínea. Os tripomastigotas infectam

células de outros órgãos ou, eventualmente, são sugados por um triatomíneo, durante o seu repasto sanguíneo. As formas tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em formas epimastigotas no trato gastrointestinal do inseto e se multiplicam por fissão binária. No intestino posterior, os parasitos diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, que são as formas eliminadas nas fezes e urina dos insetos e são capazes de infectar vertebrados (SOUZA, 2002). O ciclo biológico completo do parasita pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Ciclo biológico *T. cruzi*



FONTE: CDC, 2018. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

1.6.2 Fármacos empregados no tratamento da Doença de Chagas

O tratamento disponível para pacientes infectados com *T. cruzi*, consiste em dois fármacos Nifurtimox e Benzonidazol, ambos introduzidos na clínica há mais de 40 anos (COURA, 2003). O Benzonidazol é o fármaco disponível para o tratamento da doença de chagas no Brasil (BRASIL, 2010b), apresentando um melhor perfil de eficácia e segurança (VIOTTI et al., 2006). A dose recomendada para adultos é de 5 mg/Kg/dia, divididos em 2 a 3 doses diárias, durante 60 dias para a fase aguda da doença (BRASIL, 2010b). O Nifurtimox deixou de ser comercializado no Brasil principalmente devido à alta toxicidade para o homem

(BARBOSA, 2010). Ambos os fármacos apresentam boas taxas de cura na fase aguda da doença. Apesar disso, são responsáveis por uma série de efeitos colaterais (CASTRO et al., 2006). Dentre os efeitos colaterais atribuídos a estes quimioterápicos inclui-se: erupções cutâneas, náuseas, neuropatia periférica, anorexia, vertigens, dores abdominais, hiperexcitabilidade, depressão medular, insuficiência renal e hepática (CLAYTON, 2010; DIAS & DESSOY, 2009).

De acordo com Barbosa (2010), a eficácia desses quimioterápicos chega a 70 % na fase aguda e de menos de 20 % na fase crônica da doença, demonstrando a necessidade de encontrar novas alternativas para o tratamento da doença principalmente na fase crônica da doença.

1.7 Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por mais de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania* sendo endêmica, em cerca de 98 países, é considerada um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento (WHO, 2017). Ela atinge aproximadamente 12 milhões de pessoas no mundo, com cerca de 1,6 milhões de novos casos por ano (WHO, 2010b). Em 2014, mais de 90% dos novos casos relatados ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017).

Estes parasitas são transmitidos aos seres humanos através da picada de insetos denominados flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente, dependendo da região, como mosquito palha, tatuquira, biqui, entre outros existentes nas regiões tropical e temperada do mundo (BRASIL, 2010b). Há 4 formas principais de manifestações clínicas da doença: (i) leishmaniose cutânea, (ii) cutânea difusa, (iii) mucocutânea e (iv) visceral. Embora a leishmaniose cutânea seja a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral é a mais grave, afetando os órgãos internos, podendo ser fatal se não tratada (WHO, 2017). O desenvolvimento dessas diferentes formas clínicas depende da espécie do parasito e da imunidade do hospedeiro durante a infecção (ALEXANDER, et al., 1999).

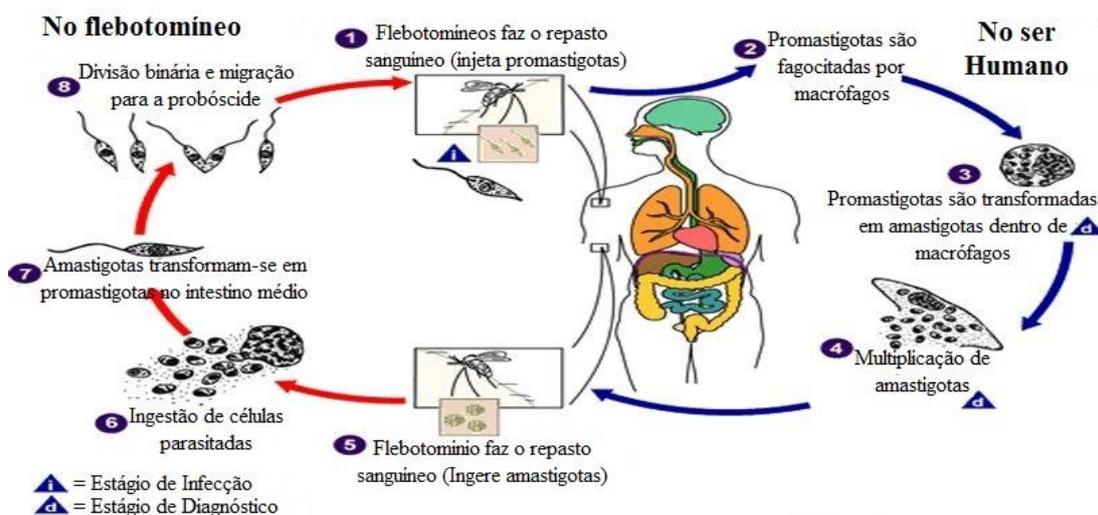
A doença cutânea apresenta-se classicamente por pápulas, que evoluem para úlcera com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura, que podem ser únicas ou múltiplas, mas indolores. Mas também podem desenvolver-se como placas verrucosas, papulosas e nodulares. A forma cutânea difusa apresenta lesões difusas não ulceradas por toda a pele. A forma mucocutânea, apresenta infiltração, ulceração e destruição dos tecidos da cavidade nasal, faringe ou laringe, podendo ocorrer perfurações do septo nasal e/ou palato. A forma visceral é

uma doença crônica, sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, perda de peso, astenia, anemia, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, entre outras manifestações. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90 % dos casos (BRASIL, 2010b).

1.7.1 Ciclo de vida do parasita

O ciclo de infecção do parasita inicia quando fêmeas de flebotomíneos, ao realizarem o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro vertebrado infectado, aspiram macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou mesmo em tecidos. As formas amastigotas, ao atingirem o intestino médio do inseto, se diferenciam em formas promastigotas flageladas e se multiplicam por divisão binária intensa. Estas formas se convertem nos promastigotas metacíclicas (infectantes para hospedeiro vertebrado) e migram para a faringe e esôfago do inseto. Ao realizarem o próximo repasto sanguíneo, essas formas são transmitidas para o hospedeiro vertebrado. Nesse hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos. No interior do vacúolo digestório do macrófago, as formas promastigotas perdem o flagelo e se transformam em amastigotas. Em seguida, as formas amastigotas se multiplicam por divisão binária até o rompimento da parede celular do macrófago, que as libera, infectando outras células fagocitárias (FIGURA 6). O ciclo se completa quando o vetor realiza novo repasto sanguíneo, continuando, assim o ciclo de transmissão (NEUBER, 2008; NEVES et al., 2009).

Figura 6 - Ciclo biológico *Leishmania* ssp



FONTE: CDC, 2018. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>

1.7.2 Fármacos empregados no tratamento da Leishmaniose

Apesar dos avanços ocorridos nas pesquisas em leishmaniose nos últimos anos, a terapêutica utilizada permanece a mesma das últimas cinco décadas. No Brasil, o medicamento de escolha para o tratamento da leishmania cutânea, mucocutânea e visceral é o antimonial pentavalente (Antimoniato de N-metil glucamina) (BRASIL, 2010b). Outros fármacos, como anfotericina B e miltefosina foram introduzidos, visando contornar o problema de resistência dos parasitos aos antimoniais. Entretanto, esses fármacos são de alto custo, o que inviabiliza seu uso em saúde pública (MASMOUDI et al., 2013).

A dose recomendada de Antimoniato de N-metil glucamina para tratamento da leishmaniose cutânea varia de 10-20 mg/Kg/dia, durante 20 dias seguidos. Não havendo cicatrização completa em até 3 meses após o término do tratamento, o paciente deverá ser reavaliado, caso haja necessidade, o esquema terapêutico deverá ser repetido, prolongando-se, dessa vez, a duração da série até 30 dias. A dose recomendada para o tratamento de leishmaniose visceral é de 20mg/Kg/dia, durante 20 dias, podendo chegar a 30 dias, e no máximo, 40 dias. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a Anfotericina B e o Isotionato de Pentamidina. No entanto, a escolha de cada um deles deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez e co-morbidades (BRASIL, 2010b).

O problema existente dessa terapia, além da resistência adquirida a esses fármacos, é a sua alta toxicidade, ocasionando diversos efeitos colaterais, dentre eles: artralgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, azia, nefrites, dores abdominais, cefaleia, tontura, edema, alterações hepáticas, insuficiência renal aguda, pancreatite aguda e problemas cardíacos como arritmias (MURRAY et al, 2005; NUNES et al., 2011).

Devido à limitada eficácia, ao longo período de tratamento, alto custo e efeitos secundários indesejáveis dos fármacos utilizados, a busca por novas moléculas bioativas se justifica, podendo vir ser utilizada como alternativa ao tratamento da leishmaniose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a constituição química do óleo essencial de *Piper marginatum* e sua potencial atividade antiprotozoária *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

1) Caracterizar quimicamente a(s) substância(s) do óleo essencial por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

2) Avaliar a variação da composição química por acompanhamento sazonal.

3) Avaliar a atividade antiprotozoária do óleo volátil frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

4) Avaliar a atividade antiprotozoária contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

5) Avaliar a atividade antiprotozoária contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta do vegetal

As folhas de *Piper marginatum* (Piperaceae) foram coletadas na Fazenda Litiara - Estrada AM 010 Km 18 (S 03°01'50,5'' - W 58°32'37,3''), Estado do Amazonas. A espécie foi identificada pelo Professor Ari de Freitas Hidalgo (Faculdade de Ciências Agrárias - UFAM). A exsicata do vegetal está depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM/UFAM), sob número de tombo 8266 (*P. marginatum*). As coletas foram realizadas de agosto de 2012 a junho de 2014, a cada dois meses para análise da variação sazonal do rendimento e constituintes químicos do óleo essencial.

3.2 Extração dos óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Extração de Óleos Essenciais do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET). As folhas frescas recém coletadas e pesadas de *P. marginatum* foram submetidas a hidrodestilação por um período de 6 horas em aparelho de Clevenger modificado (FIGURA 7). Em seguida, os óleos obtidos foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm para separação e retirada da água com micropipetas. Os óleos essenciais obtidos foram mantidos em frascos âmbar selados e sob refrigeração até o momento de serem analisados. Os rendimentos obtidos dos mesmos foram calculados com base no volume de óleo e no peso das folhas (v/m).

Figura 7 - Extração do óleo essencial de *Piper marginatum* em aparelho de Clevenger modificado.



FONTE: Autora

3.3 Identificação dos componentes químicos dos óleos essenciais

O óleo extraído foi submetido à análise em CG-EM em equipamento SHIMADZU acoplado a um espectrômetro de massas SHIMADZU QP2010 (FIGURA 8). Para cromatografia dos componentes foi empregada coluna DB-5MS, com 30 m x 0,25 mm, espessura do filme interno de 0,25 µm, utilizando hélio (99,999%) como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. A temperatura do injetor foi de 240 °C e o volume de injeção foi de 0,1 µL. A temperatura do forno foi programada de 60 °C a 240 °C a uma velocidade de 3 °C/min. Para a padronização dos tempos de retenção foi adicionada às amostras de óleos essenciais uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos (C₈ a C₂₀).

A identificação dos constituintes foi feita por interpretação de seus respectivos espectros de massas, cálculo do Índice de retenção (Dool & Kratz) e por comparação com dados da literatura (ADAMS, 2007).

Os índices de retenção (IR) foram calculados de acordo com a equação abaixo, proposta por Dool & Kratz (1963):

$$\text{IR} = 100n + 100 (t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)$$

Onde **n** é o número de átomos de carbono do primeiro hidrocarboneto da mistura de padrões cujo tempo de retenção **t_n** é imediatamente menor que o tempo de retenção **t_x** do constituinte do óleo essencial, e **t_{n+1}** é o tempo de retenção do hidrocarboneto da mistura de padrões imediatamente maior.

Para realização dessas análises, foi utilizado equipamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.4 Avaliação da atividade esquistossomicida

3.4.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo do *S. mansoni*

Neste ensaio foi utilizada a linhagem Luiz Evangelista (LE) de *S. mansoni*, que é mantida por passagens seriadas em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* e em camundongos BALB/c no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Camundongos BALB/c foram infectados de forma percutânea, com aproximadamente 200 cercárias e, após nove semanas, foram sacrificados e a cavidade abdominal e torácica abertas de forma asséptica.

Os parasitas foram recuperados do sistema porta-hepático com o auxílio de pipeta Pasteur estéril (SMITHERS & TERRY, 1965). Após a recuperação dos parasitas, estes foram submetidos aos ensaios esquistossomicidas *in vitro* no laboratório de avaliação antiparasitária da UNIFRAN, sob a supervisão da profa. Dra. Lizandra Magalhães. As experiências foram autorizadas pela Comissão de Cuidados com Animais da Universidade de Franca e estavam em conformidade Nacional e internacional para o manuseio e cuidado de animais de laboratório (Protocolo: 028/12).

3.4.2 Atividade esquistossomicida *in vitro*

O ensaio *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Os casais foram colocados em placas de petri (2 X 15cm) contendo meio RPMI a 37 °C, suplementados com 20 µM of HEPS, pH 7.5, penicilina cristalina G (1000 UI/mL estreptomicina (100 µg/mL) e 10% de soro bovino fetal (Gibco), para lavagem.

Posteriormente, os parasitos acasalados foram transferidos para placas de cultura de 24 poços, contendo um casal de verme por poço, no mesmo meio descrito anteriormente e incubados em atmosfera umidificante a 37°C na presença de 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, os casais que se separaram foram descartados e substituídos, sendo que os demais foram transferidos para poços de cultura com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. As amostras de óleos essenciais foram dissolvidas em DMSO a 10% em água e diluídas em meio de cultura RPMI 1640. Os óleos foram avaliados nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/mL.

Os parasitas foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente por 120 horas e monitorados a cada 24 horas usando um microscópio invertido (Leitz Diavert) para avaliar as condições gerais dos parasitas como: taxa de mortalidade, atividade motora e alteração no tegumento. A motilidade, pareamento e morte foram diariamente observadas, durante 5 dias, com o auxílio de microscópio de luz invertida. Para cada grupo experimental foi feito um grupo controle negativo (onde os pares de parasitas foram cultivados em meio RPMI 1640 na presença de dimetilsulfóxido a 10% em água). Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se também um grupo controle positivo (praziquantel), conforme metodologia anteriormente descrita (MAGALHÃES *et. al.*, 2009). Os vermes foram considerados mortos quando nenhum movimento foi identificado após 2 minutos de observação com um microscópio invertido.

3.5 Avaliação da atividade tripanocida

No presente trabalho, a atividade do óleo essencial de *P. marginatum* foi ensaiada usando um sistema de cultura de células de tecido, que é considerado o método *in vitro* de escolha para a triagem de drogas com atividade contra *T. cruzi* (ROMANHA et al. 2010).

O óleo essencial foi testado através de ensaio colorimétrico (BUCKNER *et al.*, 1996), com algumas modificações (OLIVEIRA et al., 2006). Para este ensaio foi utilizado cepa de *T. cruzi* (*Tulahuen*) transformada para expressar β -galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o vermelho de cloro-fenol- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) for utilizado como substrato.

No ensaio com formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* provenientes de cultura de tecido, cerca de 4.000 células L929 por poço foram semeadas em placas de 96 poços, seguindo por incubação durante a noite em estufa, a 37 °C, para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 tripomastigotas provenientes de cultura de tecidos/célula, durante 2 h. Após esse período, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por meio novo e a placa novamente incubada durante 48 h. O óleo essencial foi diluído nas concentrações de 20 e 10 μ g/mL, após 96 h de incubação foi adicionado o substrato CPRG e Nonidet aos poços.

A placa foi novamente incubada na mesma temperatura descrita anteriormente, a leitura foi realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. Simultaneamente, os seguintes controles foram utilizados: células não infectadas, células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1 μ g/mL (controle positivo) e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1% (controle negativo).

O CPRG é um substrato que se encaixa na enzima presente dentro do parasito. O Nonidet é um sabão utilizado para promover a quebra de tudo o que está no meio (parasito, célula) causando a liberação da enzima no meio. Essa enzima, por sua vez, reage com o CPRG fato que é perceptível devido a mudança na coloração do meio - de amarelo para violeta. Assim quanto mais violeta ficar os poços mais parasitas estão presentes, pois houve maior número de reação enzima-substrato, e dessa forma menos efetivo foi o composto testado.

Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento de *T. cruzi* em células infectadas testadas com o óleo essencial, em comparação com as células infectadas não tratadas com óleo essencial. Este ensaio foi realizado em parceria com o Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz-MG.

3.6 Avaliação da atividade leishmanicida

3.6.1 Cultivo de *Leishmania amazonensis*

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* estirpe (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas a temperatura média de 23 °C em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) previamente inativado a 10 %, após foi adicionado 20 mmol de (N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-22, ácido etanosulfônico) e 50 mμ/mL de gentamicina. No 5° dia de cultura (fase estacionária de crescimento), as promastigotas foram colhidas para os ensaios *in vitro*. Antes de cada experimento foi analisado à viabilidade e motilidade flagelar dos parasitos em microscópio ótico (TELES et al., 2011).

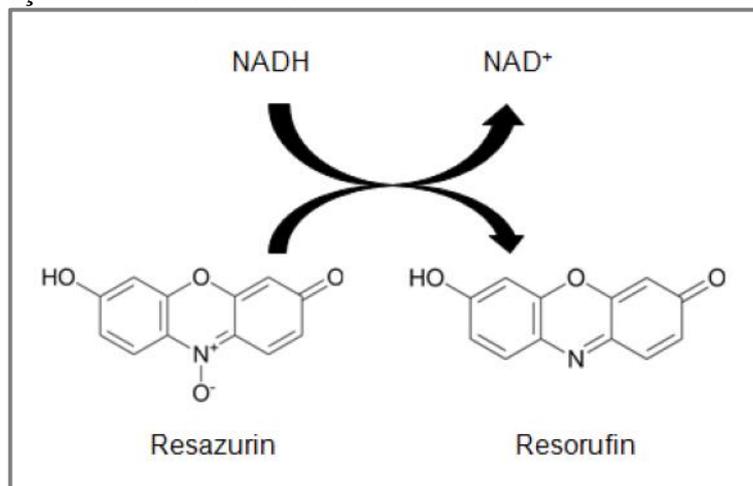
3.6.2 Ensaio de resazurina com promastigotas de *L. amazonensis*.

Culturas de formas promastigotas de *L. amazonensis*, foram cultivadas em uma concentração de 1×10^6 parasitos/mL no meio RPMI suplementado e então transferidas para o teste. Foram distribuídas em microplacas de 96 poços, a solução contendo 180 μL de uma suspensão dos parasitos, acrescidos de 20 μL do óleo essencial de PM. A placa foi incubada 23 °C durante 72 h, com diferentes concentrações do óleo essencial (200 – 1,56 μg/mL), em triplicata. Posteriormente, foi adicionada uma solução de Resazurina (2 mM) em cada poço. A placa foi submetida a incubação novamente por 5 h.

Na mesma placa, os controles negativos (sem tratamento e com solvente a 0,5 % nível tolerado pelo parasito) e positivo, com 5 μg/mL de Pentamidina, foram ensaiados. A leitura foi realizada em Espectrofotômetro de Microplacas nos comprimentos de fluorescência (530 nm e 590 nm). A absorbância obtida pelas células controle não tratada foi considerada como 100% de viabilidade celular.

Resazurina, substância utilizada no ensaio leishmanicida, é um indicador redox (coloração azul profundo) e quando adicionado em cultura de células viáveis com metabolismo ativo, é reduzido ao produto resorufin com coloração rosa fluorescente (FIGURA 8) (RISS et al., 2016).

Figura 8 - Estrutura do substrato resazurina e do produto resorufin fluorescente rosa resultante da redução de células viáveis.



FONTE: RISS, et al., 2016.

Os valores obtidos foram usados para os cálculos de viabilidade parasitária com base na seguinte equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{Absorbância teste} - \text{Absorbância Branco}) \times 100}{(\text{Absorbância controle sem tratamento} - \text{Absorbância Branco})}$$

3.6.3 Valores de IC_{50}

O IC_{50} corresponde à concentração do óleo essencial que inibi o crescimento dos parasitas em 50 % (IC_{50}), após um período de incubação de 5 dias. Compostos com valores de IC_{50} menores ou iguais a 100 $\mu\text{g/mL}$ são considerados ativos, e acima deste limiar, inativos (COSTA et al., 2006). Programa Origen foi utilizado para o cálculo do IC_{50} através de Interpolação linear.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Teor do óleo essencial de *Piper marginatum*

O clima do Amazonas é classificado como equatorial quente e úmido. Apresenta apenas duas estações, ao longo do ano: chuvoso (inverno) entre os meses de novembro e junho, período em que a temperatura é mais amena; seca (verão) de julho a outubro, período de sol intenso e temperaturas elevadas, em torno de 38° C (IBGE, 2018). Para verificar a influência do clima no rendimento do óleo essencial de *Piper marginatum* foram realizadas análises do OE de coletas bimestrais ao longo de dois anos.

Durante o processo de extração foi possível detectar que a maior quantidade de óleo foi extraída nas duas primeiras horas do experimento, e manteve-se em proporções menores nas horas restantes. O óleo apresentou odor forte e coloração amarelada, conforme pode ser observado na Figura 9. Na Tabela 1 podem ser observados os dados referentes às coletas bimestrais para extração de PM, códigos das amostras, massas do vegetal utilizado para extração, volume de óleo obtido e os rendimentos de óleos essenciais calculados. Enquanto que na Tabela 2 encontra-se os nomes dos constituintes químicos identificados, na ordem de índice de retenção.

Figura 9 – Óleo essencial extraído das folhas de *P. marginatum*



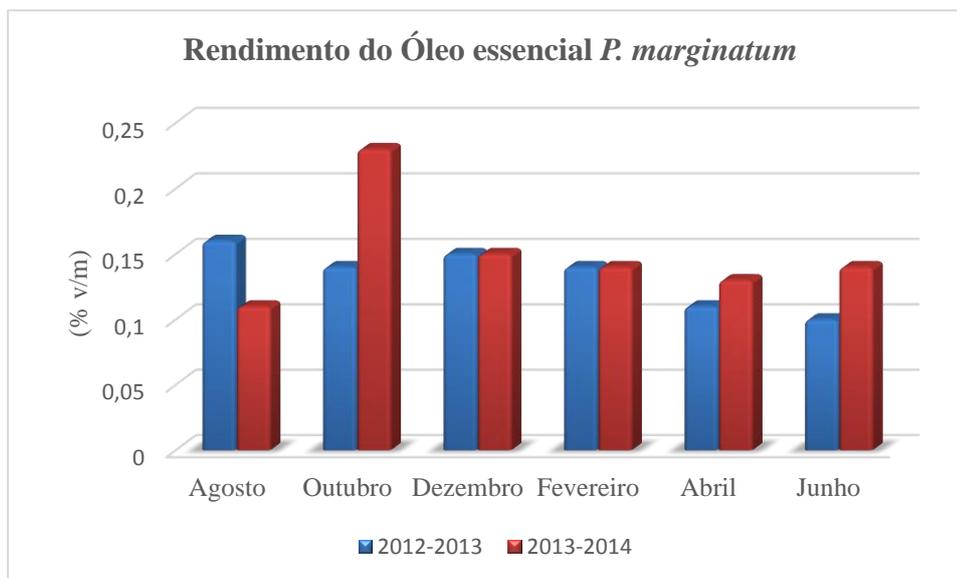
FONTE: Autora

Tabela 01. Rendimentos de óleo essencial de *Piper marginatum*

Amostra	Mês/Ano	Código da amostra	Massa do material vegetal (g)	Volume OE (µL)	Rendimento (% v/m)
1	Ago/2012	PM-04.08.12	511	820	0,16
2	Out/2012	PM-27.10.12	829	1160	0,14
3	Dez/2012	PM-21.12.12	736	1070	0,15
4	Fev/2013	PM-09.02.13	797	1080	0,14
5	Abr/2013	PM-19.04.13	791	860	0,11
6	Jun/2013	PM-15.06.13	777	720	0,09
7	Ago/2013	PM-21.08.13	655	772	0,11
8	Out/2013	PM-30.10.13	513	1186	0,23
9	Dez/2013	PM-13.12.13	767	1146	0,15
10	Fev/2014	PM-22.02.14	602	840	0,14
11	Abr/2014	PM-26.04.14	711	960	0,13
12	Jun/2014	PM-28.06.14	722	1010	0,14

Observou-se que as diferentes datas de coleta interferiram nos rendimentos dos óleos. No geral, o rendimento do óleo essencial manteve-se constante, com exceção para os meses de junho de 2013 com menor rendimento observado e outubro de 2013 com maior rendimento, obtendo 0,09% e 0,23%, respectivamente. Na Figura 10 pode ser visualizado o gráfico com valores de rendimento do óleo essencial para os meses coletados.

Em estudo realizado por Costa et al., (2010), o rendimento de óleo essencial das folhas de *P. marginatum* foi de 0,8%, superior ao obtido neste trabalho. No entanto, o rendimento do óleo essencial foi realizado baseando-se no peso seco do material vegetal, enquanto o rendimento obtido neste trabalho foi calculado baseando-se no peso fresco do material vegetal, sendo por isso inferior. Na literatura há relatos de variação do rendimento do óleo essencial de 0,3 a 2 % de espécimes coletadas em diferentes partes da Amazônia Brasileira (ANDRADE et al., 2008). Fatores ambientais e intrínsecos podem explicar essas variações (GOBBO NETO & LOPES, 2007).

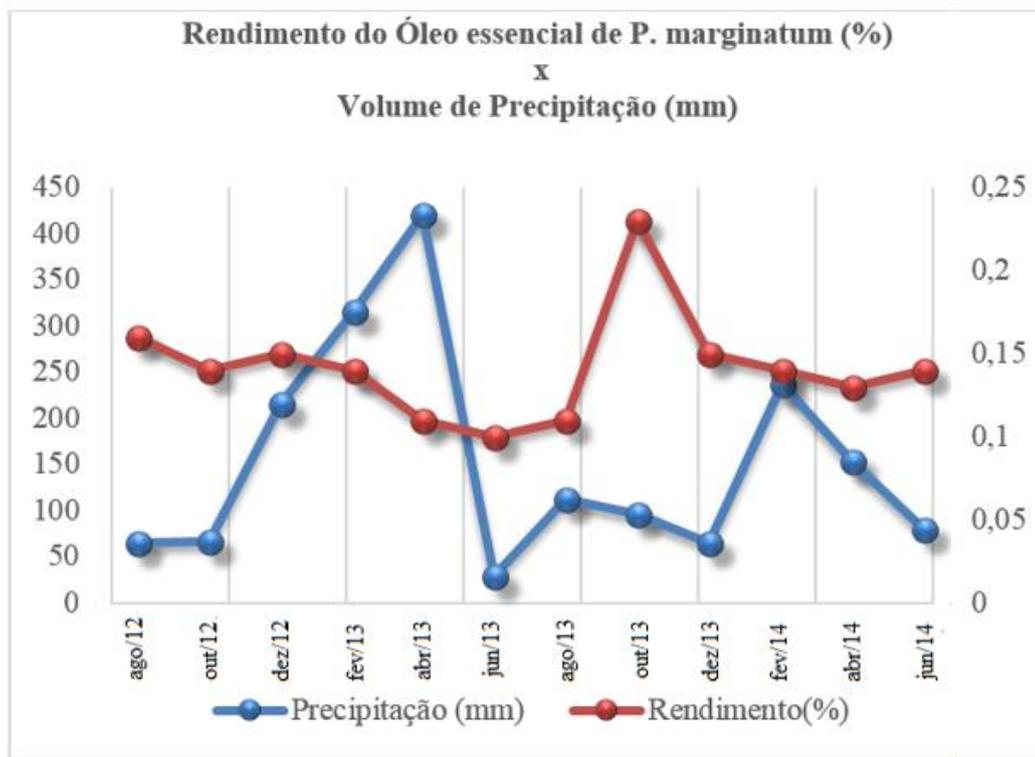
Figura 10 – Rendimento do óleo essencial de *P. marginatum*

É importante ressaltar que o vegetal estudado neste projeto se encontrava a sombra de uma mangueira (*Mangifera sp.*) e azeitoneira (*Syzygium sp.*), e localizado próximo a locais úmidos. De acordo com Simões et al. (2003), os raios solares representam um dos maiores fatores que podem afetar a variação no teor de metabólitos secundários, principalmente de óleos voláteis.

4. 2 Efeito do regime hídrico no rendimento do óleo

Verificou-se a relação do rendimento do óleo essencial de *P. marginatum* com o volume de precipitação de água na região de Itacoatiara no período de 08/2012 a 06/2014, dados coletados da Agência Nacional de Águas (ANA, 2018). Analisando o gráfico de rendimento do óleo essencial X volume de precipitação (FIGURA 11), é possível observar que há uma tendência de diminuir o volume de óleo com o aumento da precipitação no período de fev/2013, abr/2013 e fev/2014. O oposto também foi observado, um aumento do volume de óleo essencial e conseqüentemente uma diminuição da precipitação no período de ago/2012, out/2013 e jun/2014. Podendo sugerir uma correlação nos rendimentos dos óleos essenciais com os volumes de precipitação.

Figura 11 – Rendimento do óleo essencial de *P. marginatum* x Volume de Precipitação



De maneira geral, as plantas apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de metabólitos secundários em seus tecidos, podendo ocorrer variação tanto no período de um dia como em épocas do ano (SIMÕES et al., 2003).

Andrade et al., (2008) analisaram 22 amostras de folhas de *P. marginatum* coletadas em diferentes áreas da Amazônia brasileira, o teor de óleo variou de 0,3 a 2,0%. Costa et al., (2010) analisaram o óleo essencial das folhas secas de *P. marginatum* coletada no estado da Paraíba e obtiveram um rendimento de 0,8%. Os rendimentos dos óleos encontrados por esses autores foram calculados baseado no peso seco do material vegetal. Enquanto, o rendimento do óleo essencial do presente trabalho, foi calculado baseado no peso fresco do material vegetal.

Sánchez et al., (2011) obtiveram um rendimento de 2,8% do óleo essencial das folhas frescas de *P. marginatum* coletadas em Cuba. Rendimento superior ao obtido no presente trabalho. Vogle et al., (2006) em estudo com óleo essencial de espécies de *Piper* de Monteverde na Costa Rica, obtiveram 0,24% de rendimento do óleo extraído das folhas de *Piper marginatum*.

Moraes et al., (2014) em um estudo sobre a variação circadiana do óleo essencial de *P. marginatum* coletadas no mês de julho no estado de Pernambuco, obtiveram 0,17 % no rendimento do óleo essencial para coleta realizada as 6:30 h da manhã. Valores de rendimentos próximos aos encontrados no presente trabalho.

Autran et al. (2009) e colaboradores obtiveram um rendimento de 0,39% de óleo essencial extraído das folhas frescas de *P. marginatum*, coletada em Pernambuco no mês de agosto de 2006. De acordo com a Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC, 2018) é inverno esse período do ano, e a principal característica é o final da quadra chuvosa, onde os índices pluviométricos chegam a 725 mm. Os rendimentos obtidos no presente trabalho para os meses de Ago/2012 e Ago/2013 são de 0,16% e 0,11%, respectivamente. Sendo, portanto, inferiores. Porém, na Amazônia esse período do ano é considerado verão, e o índice de precipitação para os meses coletados foram de 66 mm e 111,9 mm, respectivamente.

As diferenças de teores encontradas para o óleo essencial de *P. marginatum* coletadas em diferentes localidades, corroboram com a ideia de que populações naturais de plantas, embora pertencendo à mesma espécie, apresentam variações na constituição genética e fisiológica em função da variação ambiental (SANTANA, 2013).

4.3 Análise qualitativa e quantitativa dos constituintes dos óleos essenciais.

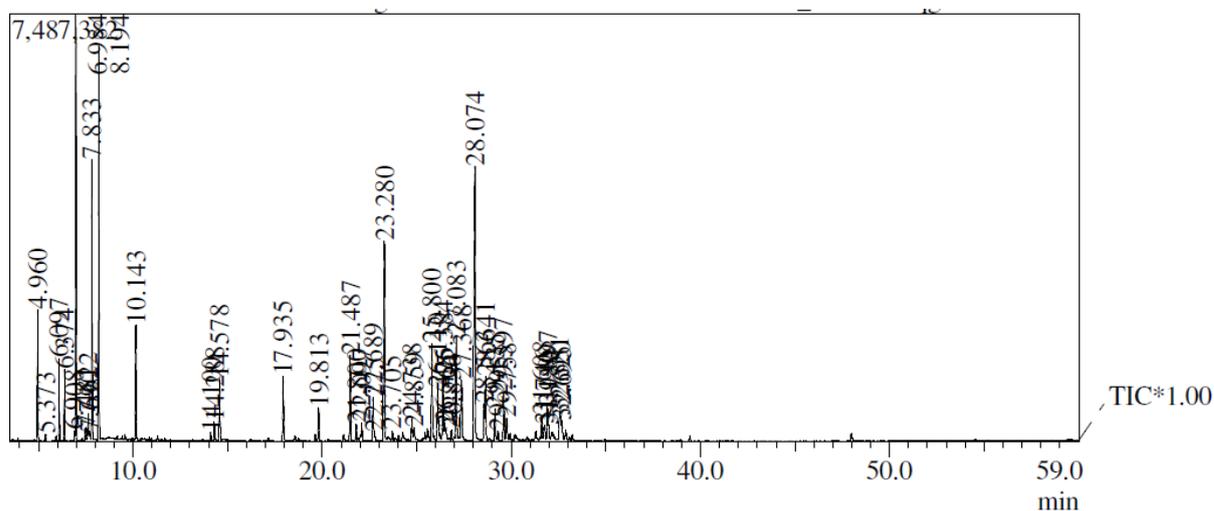
A análise da composição química foi realizada comparando-se as amostras coletadas em diferentes épocas. Os resultados obtidos (Tabela 2) indicam que a composição química dos óleos sofreu variações nas concentrações dos compostos ao longo do ano.

O cromatograma, resultante da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas do óleo essencial de *P. marginatum* coletada em 04/08/2012 está representado na Figura 12, os cromatogramas das demais amostras encontram-se no Apêndice de A1 – A10. Os componentes químicos identificados incluindo seus respectivos índices de retenção e porcentagens, estão sumarizados na Tabela 2.

A análise cromatográfica (CG-EM) do óleo essencial extraído das folhas de *P. marginatum* permitiu a identificação de 73 compostos, perfazendo a maior parte (83% a 94 %) da composição do óleo essencial (TABELA 2), apresentando 2 classes de substâncias, sendo elas terpenos e fenilpropanoides. O OE revelou ser constituído predominantemente por monoterpenos (21,91% a 54,51%), seguidos de sesquiterpenos (24,79% a 42,34%),

fenilpropanoides (6,02% a 37,79%) e em menor proporção de diterpenos (0,72% a 1,32%). As variações da concentração das substâncias identificadas estão expressas na Tabela 2.

Figura 12 - Cromatograma obtido por CG/EM do óleo essencial de *P. marginatum* (04/08/2012).



As substâncias majoritárias apresentadas foram: os monoterpenos: δ -3-careno, (*Z*) β -ocimeno, (*E*) β -ocimeno, α -terpinolene e linalol, os sesquiterpenos; *E*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno e α -copaeno, fenilpropanoides; miristicina, 3,4-(metilenodioxo)propiofenona (FIGURA 13). Os demais constituintes ocorrem em proporções inferior a 5 %.

Figura 13 - Componentes majoritários do óleo essencial de *P. marginatum*

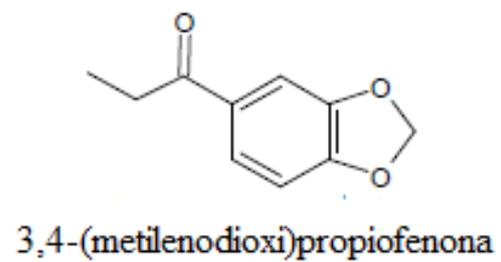
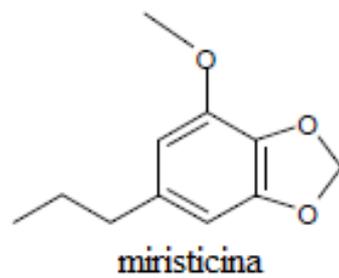
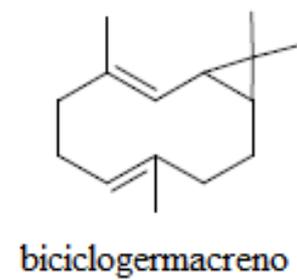
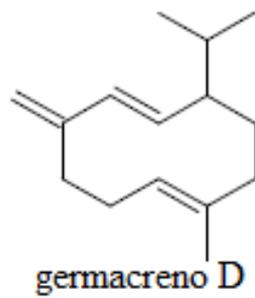
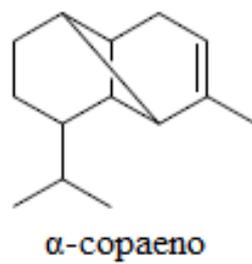
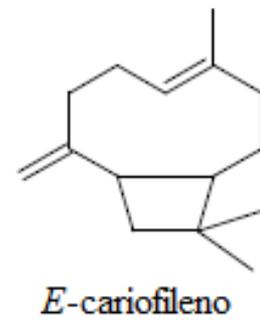
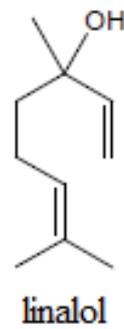
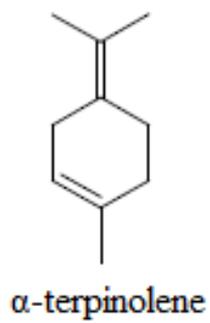
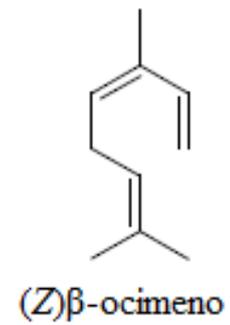
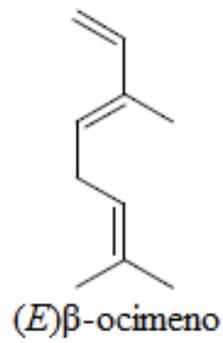
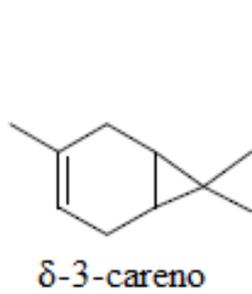


Tabela 2. Composição química quantitativa do óleo essencial de *P. marginatum*

Composto	Concentração relativa (%) ^c													Identificação ^d
	IRL ^a	IRL ^b	Ago/12	Out/12	Dez/12	Fev/13	Abr/13	Jun/13	Ago/13	Out/13	Dez/13	Fev/14	Jun/14	
α-tujeno	924	904			0,06	0,04	0,03		0,04					IR, MS
α-pineno	932	926	2,46	1,87	2,64	1,72	1,90	2,69	1,71	1,36	1,93	3,73	3,71	IR, MS
α-fencheno	945	935					0,03		0,04					IR, MS
canfeno	946	940	0,11		0,05	0,03	0,04		0,04					IR, MS
sabineno	969	958			0,11	0,07	0,09	0,06	0,06					IR, MS
β-pineno	974	964	1,75	1,31	1,77	0,11	1,54	1,87	1,18	0,96	1,29	2,45	2,42	IR, MS
β-mirreno	988	976	1,51	1,32	1,71	1,05	1,26	1,51	1,26	0,96	1,33	1,51	1,61	IR, MS
α-felandreno	1002	999	0,21	0,17	0,42	0,35	0,33	0,20	0,67	0,10	0,35	0,35	0,45	IR, MS
δ-3-careno	1008	1003	9,93	8,66	12,52	11,12	7,89	13,51	11,2	6,59	8,92	15,78	14,95	IR, MS
α-terpineno	1017	1005				0,030			0,04					IR, MS
p-cimeno	1020	1013	0,31	0,22	0,27	0,15	0,15	0,34		0,13	0,20		0,28	IR, MS
limoneno	1024	1020	0,71	0,51	0,69	0,50	0,57	0,72	0,63	0,31	0,53	0,52	0,52	IR, MS
β-felandreno	1025	1026		0,14	0,23	0,19	0,19	0,20	0,22		0,19			IR, MS
1,8-cineol	1026	1030			0,08	0,02	0,07		0,07					IR, MS
(Z)β-ocimeno	1032	1033	6,94	5,98	7,65	4,92	6,51	6,41	6,79	4,56	6,87	15,78	14,94	IR, MS
(E)β-ocimeno	1044	1043	9,97	9,04	12,38	8,32	11,02	9,75	11,85	6,94	11,01	23,49	24,11	IR, MS
γ-terpineno	1054	1045			0,05	0,06	0,07		0,10					IR, MS
α-terpinolene	1086	1072		0,11	0,27	0,26	0,27	0,16	0,30		0,16	6,68		IR, MS
linalol	1095	1092	3,16	2,74	3,95	2,65	3,99	6,25	5,54	2,85	4,91		4,04	IR, MS
α-terpineol	1186	1182					0,03		0,06					IR, MS
estragol	1195	1190	0,29		0,26	0,17	0,26	0,20	0,26		0,22			IR, MS
safrol	1285	1275	2,14	0,22	2,47	1,84	2,93	2,13	3,09			3,06	1,48	IR, MS
E-isosafrol	1298	1287								0,90	1,96			IR, MS
δ-elemeno	1335	1318	1,13	0,54	1,03	2,12	1,67	1,02	0,19	0,64	1,17	1,53	1,46	IR, MS
α-cubebeno	1345	1320				0,05	0,09							IR, MS
ciclosativeno	1369	1340			0,32	0,31	0,27		0,14					IR, MS
α-copaeno	1374	1368	3,03	1,95	3,15	3,11	3,83	3,81	2,42	4,63	3,49	5,39	4,33	IR, MS

β-bourboneno	1387	1378	0,56		0,42	0,33	0,36	0,27	0,27	0,61	0,26		0,26	IR, MS
β-cubebeno	1387	1383			0,18	0,16	0,16			0,21				IR, MS
B-elemenno	1389	1385	0,52	0,44	0,74	0,85	0,76	0,44	0,54	0,84	0,60	0,55	0,47	IR, MS
metil eugenol	1403	1390		1,08	0,91	0,86	1,44	1,31	1,61		1,49		0,37	IR, MS
<i>E</i>-cariofileno	1417	1412	7,62	4,60	6,10	6,26	7,96	6,23	6,27	8,56	7,90	8,63	8,80	IR, MS
aromadendreno	1439	1430			0,16	0,21	0,30		0,17		0,19			IR, MS
α-humuleno	1454	1445	0,76	1,00	1,06	1,09	1,12	0,96	1,04	1,07	0,86	0,81	0,82	IR, MS
croweacina	1457	1450					0,85							IR, MS
α-amorfenno	1483	1460		0,29		0,1								IR, MS
germacreno D	1484	1475	3,50	2,55		4,39	5,45	3,79	4,22	6,65	4,82	5,99	4,75	IR, MS
β-selineno	1489	1483	1,88	1,41	1,95	2,57	2,35	2,02	1,76	2,85				IR, MS
naftaleno	1494	1483										1,81		IR, MS
viridifloreno	1496	1486			0,25	0,29	0,37		0,33	0,30				IR, MS
α-selineno	1498	1486											1,83	IR, MS
biciclogermacreno	1500	1490		2,40	5,17	6,03	5,62	3,27	5,10	5,09	4,91			IR, MS
α-muuroleno	1500	1494	0,39	0,28	0,53	0,65		0,37	0,42	0,62	0,34			IR, MS
γ-muuroleno	1500													IR, MS
germacreno A	1509	1500	0,36	0,25	2,84		0,31	0,16	0,18	0,48	0,37		0,31	IR, MS
γ-cadineno	1513	1509						0,21						IR, MS
miristicina	1517	1512	3,90	2,11	2,84	7,43	1,89	5,19	1,99	13,26	2,36	1,97	4,93	IR, MS
δ-cadineno	1522	1514		0,84				2,33	1,01	0,94		1,47		IR, MS
3,4-(metilenodioxo) propiofenona	1545	1532	12,68	28,2	4,66	7,55	6,24	9,42	6,42	7,65	10,04		2,95	IR, MS
hedicariol	1546	1540		1,58						1,75	1,29			IR, MS
α-elemol	1548	1544				2,74	2,64					0,83	0,88	IR, MS
elemicina	1555	1546		2,04	3,30					2,43	2,22	0,99		IR, MS
Germacreno B	1559	1553				0,14	0,11		0,07					IR, MS
<i>E</i> nerolidol	1561	1559	1,09	0,92	0,88	0,96	1,17	0,65	1,22	0,93	0,97	0,87	1,00	IR, MS
γ-asarone	1572	1560		0,29	0,26	0,21	0,27		0,18	0,44	0,3			IR, MS
espatulenol	1577	1571	1,74	1,14	1,10	0,71	0,53	1,60	0,60	1,4	0,73	0,93	0,68	IR, MS
óxido de cariofileno	1583	1575	0,88	0,48	0,37	0,19	0,27	0,75	0,27	0,76	0,31	0,53	0,48	IR, MS

globulol	1590	1580		0,35	0,41	0,34	0,38		0,54	0,43	0,28		IR, MS
viridiflorol	1592	1588			0,15	0,11			0,37				IR, MS
cubeban-11-ol	1595	1590							0,13				IR, MS
rosifoliol	1600	1601							0,27				IR, MS
ledol	1602	1562					0,21						IR, MS
10-epi-γ-eudesmol	1622	1621			0,74				0,43	0,56	0,36	0,42	IR, MS
Epi-γ-eudesmol	1630	1623		0,54	0,62								IR, MS
2-hidroxi-4,5 (metilenodioxi)propiofenona	1642	1631	1,50	4,14	0,42		1,81				1,47		IR, MS
cubenol	1645	1588				0,29	0,37						IR, MS
β-eudesmol	1650	1648	1,21	1,70		0,37	0,04			1,67	1,20	0,77	IR, MS
Z-asarone	1653	1649							3,21				IR, MS
α-cadinol	1654	1650	0,77	0,63	0,21	0,21	0,29			1,28	0,95	1,94	IR, MS
intermedeol	1665	1652										0,48	IR, MS
junipercamfor	1675	1657	0,64	0,68	0,64	0,68	0,55	0,46	0,71	0,57	0,65		IR, MS
Fitol	1942	1811				1,32	0,76	0,72					IR, MS
<i>Classe de compostos</i>													
Monoterpenos (hidrocarbonetos)			33,90	29,33	40,82	28,92	31,89	37,42	36,13	21,91	32,78	54,51	48,04
Monoterpenos oxigenados			3,16	2,74	4,03	2,67	4,09	6,25	5,67	2,85	4,91		4,04
Monoterpenos totais			37,06	32,07	44,85	31,59	35,98	43,67	41,8	24,76	37,69	54,51	52,08
Sesquiterpenos (hidrocarbonetos)			19,75	16,48	24	28,45	32,76	23,56	23,75	32,55	24,72	26,18	22,21
Sesquiterpenos oxigenados			6,33	8,31	5,54	7,02	7,02	3,46	8	9,79	7,23	5,52	4,29
Sesquiterpenos totais			26,08	24,79	29	35,47	39,78	27,02	32	42,34	31,95	31,70	26,50
Fenilpropanoides			20,51	37,79	15	17,85	13,61	20,06	13	24,24	19,76	6,02	9,73
Diterpeno oxigenado						1,32	0,76	0,72					
Total identificados			83,65	94,65	88,99	86,23	90,13	91,47	87,02	91,34	89,4	92,23	88,31

^a Índice de retenção linear obtido na literatura (Adams, 2007). ^b Índice de retenção linear obtido através da equação de van den Dool e Kratz (1963). ^c A quantificação dos compostos foi realizada pela normalização da área dos picos. ^d IR, comparação do IR com a literatura; MS, comparação do espectro de massas com aqueles encontrados nas bibliotecas de espectros WILEY 7. *compostos majoritários encontram-se em negrito; os demais são compostos traços.

Contrastando o presente trabalho com a literatura, observamos que muitos dos principais compostos presentes nos óleos essenciais desta planta são os mesmos, tendo uma maior variação em seus teores. Segundo RAMOS *et al.* (1986) também foram identificadas na composição química de *P. marginatum* coletada próximo ao município de Itacoatiara-AM os constituintes δ -3-careno (3,33%), (*Z*) β -ocimeno (1,32%), (*E*) β -ocimeno (2,31%), *E*-cariofileno (5,57%), miristicina (9,23%) e 3,4-(metilenodioxo) propiofenona (8,92%). Andrade *et al.*, (2008) identificou (*Z*) β -ocimeno (5,3%), (*E*) β -ocimeno (13,5%), *E*-cariofileno (6,0%), miristicina (9,3%) e 3,4-(metilenodioxo) propiofenona (5,0%) em amostras de óleo essencial coletadas na Amazônia brasileira. Diferindo do trabalho de Santana *et al.*, (2015) que não identificou esses componentes no óleo essencial de *Piper marginatum* coletada em Rondônia.

A Figura 14, apresenta as variações de área (%), dos monoterpenos majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *P. marginatum*.

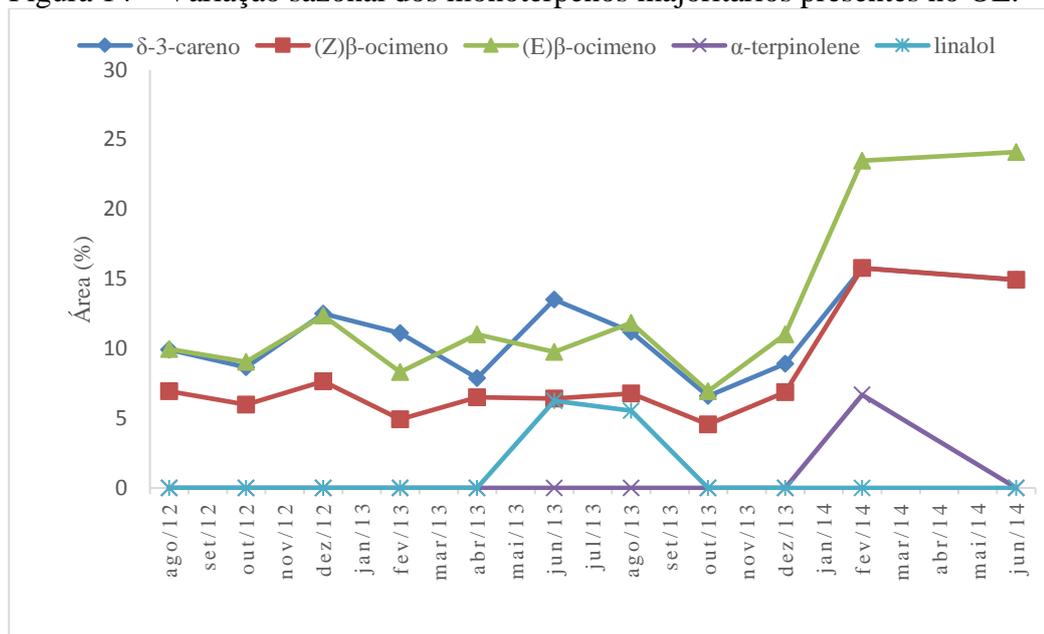
O δ -3-careno apresentou uma diminuição na sua porcentagem de área nos meses de Out/2012, Abr/2013 e Out/2013 e aumento em Dez/2012, Jun/2013, Dez/2013, Fev/2014 e Jun/2014, inclusive foi o mês que apresentou sua maior área (14,95%).

O (*Z*) β -ocimeno, (*E*) β -ocimeno apresentaram comportamento semelhante ao δ -3-careno, com exceção nos meses de Abr/2013 em que o (*E*) β -ocimeno apresentou um aumento e em Jun/2013 em que ocorreu uma diminuição em sua área.

O α -terpinolene apresentou sua maior área apenas no mês de Fev/2014, com valor de 6,68%, nos demais meses apresentou-se abaixo de 5%. Os maiores percentuais de linalol foram identificados nos meses de Jun/2013 e Ago/2013 com área de 6,25% e 5,54%, respectivamente (TABELA 2)

Ramos *et al.*, (1986) destacaram a presença de δ -3-careno (3,33 %), (*Z*) β -ocimeno (1,32%), (*E*) β -ocimeno (2,31 %). Autran *et al.*, (2009) apontou a presença de δ -3-careno (0,3 %), (*Z*) β -ocimeno (0,5 %). Andrade *et al.*, (2008) identificou linalol com valor de área de 0,1 a 3,1%. Valores inferiores aos encontrados no presente trabalho. Os resultados obtidos e a literatura demonstram diferentes concentrações de acordo com as regiões coletadas mostrando que a composição e concentração dos constituintes dos óleos essenciais podem variar dependendo do local de coleta.

Figura 14 – Variação sazonal dos monoterpenos majoritários presentes no OE.



Na Figura 15, podemos observar as variações de área (%), dos sesquiterpenos majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *P. marginatum*.

O α -copaeno apresentou uma diminuição em sua porcentagem de área nos meses de Out/2012, Fev/2013 e Out/2013 e aumento nos meses de Dez/2012, Abr/2013, Jun/2013, Dez/2013 e Jun/2014, estando ausente apenas no mês de Fev/2014.

Andrade et al., (2008) apontou valor de área de α -copaeno de 0,3 a 11,4% para óleo essencial das folhas de *P. marginatum* coletadas na Amazônia brasileira. Enquanto que no óleo essencial de coleta realizada em Pernambuco, α -copaeno obteve 0,6% de área (AUTRAN et al., 2009).

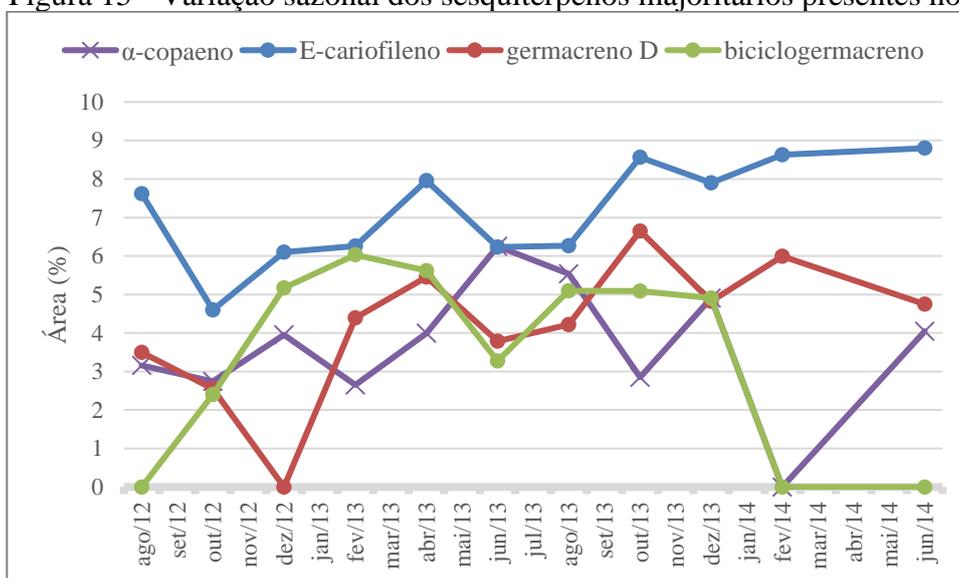
De maneira geral pôde-se verificar que existe uma tendência de o (*E*)-cariofileno se apresentar como composto majoritário ao longo dos meses, com área máxima de 8,8 %, com exceção para o mês de Outubro/2012 onde apresentou uma baixa em sua área, com mínima de 4,60 %.

O germacreno D apresentou os maiores percentuais nos meses de Abr/2013, Out/2013 e Fev/2014 com área de 5,45 %, 6,65 % e 5,99 % respectivamente. Nos meses de Out/2012, Jun/2013 e Dez/2013 houve uma diminuição em sua área, não sendo identificado no mês de Dez/2012.

Os maiores percentuais de biciclogermacreno foram nos meses de Dez/2012, Fev/2013, Abr/2013, Ago/2013 e Out/2013. No mês de Jun/2013 houve uma diminuição no seu valor de área, estando ausente nos meses de Ago/2012, Fev/2014 e Jun/2014.

Os sesquiterpenos são biossinteticamente relacionados, devido apresentarem precursor incomum, o difosfato de farnesila (FPP). A ionização do FPP leva a formação do cátion farnesílico, que pode sofrer uma série de ciclizações (DEGENHARDT et al., 2009). Desta forma, o aumento do rendimento de um desses componentes pode levar a redução do outro.

Figura 15 - Variação sazonal dos sesquiterpenos majoritários presentes no OE.



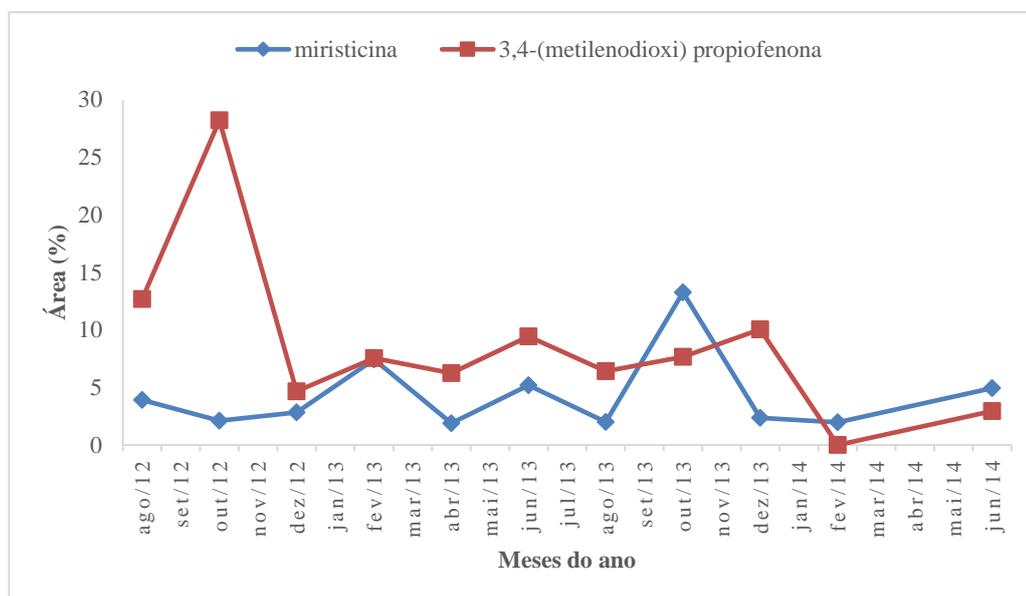
Na Figura 16, podemos observar as variações de área (%), dos fenilpropanoides majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *P. marginatum*.

A miristicina apresentou os maiores percentuais nos meses Fev/2013 e Jun/2013 com área de 7,43 % e 5,19 %, respectivamente. No mês de Out/2013 foi obtido o maior percentual de área, chegando a 13,26%. Vale ressaltar que nesse período da coleta (Out/2013) as folhas de *Piper marginatum* apresentavam acentuada herbívora, e o aumento na produção de miristicina pode estar associada a esta condição. Em trabalho de Srivastava et al. (2001), miristicina isolada das flores de *Piper mullesua* demonstraram atividade inseticida sobre a *Spilarctia obliqua* Walker (Lepidoptera: Arctiidae), desempenhando um papel ativo na defesa indireta de insetos.

A substância 3,4-(metilenodioxi) propiofenona esteve presente em maior concentração em Out/2012 com valor de área de 28,20%, mas quando comparado ao mesmo período do ano seguinte, sofreu uma redução brusca na sua área, reduzindo para 7,65. Na amostra coletada no mês de Fev/2014 esta substância não foi identificada.

A síntese de fenilpropanoides ocorre a partir da produção de aminoácidos aromáticos pela via do ácido chiquímico. O aminoácido fenilalanina, e em menos frequência a tirosina, são utilizados como substrato numa reação catalisada pela enzima fenilalanina amônio liase (PAL) (SANGWAN *et al.*, 2001). A atividade da PAL está sob controle de vários fatores internos e externos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões (SIMÕES *et al.*, 2003). Neste contexto é importante ressaltar que as folhas de *Piper marginatum* coletadas no mês de outubro (2012) apresentavam herbívora acentuada e manchas, que podem ter influenciado na composição e concentração das substâncias presentes.

Figura 16 – Variação sazonal dos fenilpropanoides majoritários presentes no OE.



No trabalho de Ribeiro *et al.* (2016), com amostra coletada em Pernambuco, destacaram a presença das substâncias β -cariofileno (16,0 %), (Z)-asarone (30,4 %), (E)-asarone (6,4 %) e patchoulol (7,5 %) como compostos majoritários do óleo essencial das folhas de *P. marginatum*. Sendo que (E)-asarone e patchoulol não foram identificados neste trabalho.

Costa et al. (2010) em coleta realizada na Paraíba, identificaram como compostos majoritários do óleo essencial das folhas de *P. marginatum* os compostos iso-elemicina (21,7%), apiol (20,1%), δ -guaiano (16,7%), valeno (6,8%) e (E)-cariofileno (6,8%). Sendo apenas este último identificado no presente trabalho como composto majoritário.

Sánchez et al. (2011) e colaboradores em coletada realizada em Guantánamo – Cuba, identificaram como compostos majoritários do óleo essencial extraído das folhas de *P. marginatum* os compostos isosafrol (37,31%) e notosmirnol (22,72%). As demais substâncias identificadas conhecidas com as identificadas no presente trabalho, variando apenas seu teor, dentre elas pode-se citar: safrol, β -elemeno, metil eugenol, miristicina, α -copaeno, biciclogermacreno, elemol, elemicina, nerolidol e β -eudesmol.

Pela descrição da literatura para as amostras de óleo essencial de *P. marginatum* coletadas em diferentes regiões, comparando com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar que existe uma variação entre os compostos majoritários presentes. Sendo que, o óleo essencial do presente estudo pode ser classificado nos quimiotipos III e IV, dos sete quimiotipos proposto por Andrade et al (2008). Estas variações podem ser atribuídas a fatores edafoclimáticas em comparação com os estudos sobre *Piper marginatum* (ANDRADE et al., 2008; AUTRAN et al., 2009; SANTANA et al, 2015), em que diferentes composições e concentrações foram descritas. Essa variabilidade na concentração desses constituintes majoritários, demonstra a existência de quimiotipos diferentes em uma mesma espécie, reforçando a importância do estudo desta espécie cultivada em diferentes regiões.

4.3.1 Espectros de massas e análise das fragmentações das substâncias majoritárias.

Os espectros de massas obtidos foram comparados com os padrões contidos nos bancos de dados da biblioteca de espectros WILEY7, instalado no equipamento e com espectros registrados na literatura (ADAMS, 2007).

Segue espectro obtido por CG/EM e proposta de fragmentação do δ -3-careno, (Z) β -ocimeno, (E) β -ocimeno, α -terpinoleno e linalol (FIGURA 17 – 26).

A substância com tempo de retenção de 6.989, mostrou padrão de fragmentação m/z = 136 (15), 121 (24), 105 (15), 93 (100), 79 (32), 67 (7), 41 (6) (FIGURA 17). Apresentou pico de íon molecular com m/z de 136 [M⁺]. O pico com m/z 94 [M-42], devido provável

perda de fragmento neutro ($-C_3H_6$). O pico fragmento com m/z 79 devido perda do grupamento metila [M-15], seguido da eliminação de dois hidrogênios, formando o pico com m/z 77, compatível com o padrão de fragmentação do δ -3-careno da base de dados Wiley da biblioteca espectral. A proposta de fragmentação pode ser observada na Figura 18.

As Figuras 19 e 20 correspondem aos monoterpênicos, (*E*) β -ocimeno e (*Z*) β -ocimeno ($C_{10}H_{16}$) de massa molecular de 136 [M^+], o que está de acordo com a literatura (ADAMS, 2007). Na comparação dos dois espectros foi possível notar que as fragmentações são semelhantes e ambos os constituintes possuem o mesmo pico base com m/z 93 (C_7H_9), resultante da perda do cátion isopropílico m/z 43. O pico com m/z 67 [M-26], resultou da perda do etino, seguido de mais uma perda de $-C_2H_2$, gerando o pico do íon fragmento m/z 41. Na Figura 21 pode ser observado a proposta de fragmentação. A distinção entre os dois isômeros foi possível através do cálculo do índice de retenção comparado ao da literatura (ADAMS, 2007).

A substância com tempo de retenção de 9.571, foi identificado como α -terpinolene (FIGURA 22), com pico base com m/z 93, provavelmente devido à perda de um fragmento neutro m/z 43, provavelmente ocorra uma cisão hemolítica na ligação C-C do isopropil e do anel. Seguido da perda de $-C_4H_4$, formando o íon fragmento com m/z 41. A formação do pico m/z 121 [M-15] a partir do íon molecular é característico de perda do grupamento metila. Os picos m/z 79 e m/z 77 [M-42-2], resultaram da perda de um fragmento neutro ($-C_3H_6$), seguido da eliminação de dois hidrogênios, como proposto na Figura 23.

A identificação do linalol (FIGURA 24) com tempo de retenção de 10.148, foi possível através da comparação do padrão de fragmentação em comparação com a literatura e a biblioteca espectral. O pico do íon molecular m/z 154 [M^+] não ficou visível, o que era esperado, já que álcoois normalmente possuem a intensidade do íon molecular baixa ou ausente. Essa característica deve-se ao processo de desidratação. O pico de m/z = 136 [M-18] é característico da perda de água. O pico m/z 93 [M-43], resultou da perda cadeia isopropílica ($-C_3H_7$). A eliminação de dois hidrogênios gerou um pico relativamente intenso com m/z 91. Partindo do íon fragmento m/z 93 ocorre a perdas sucessivas de $-C_2H_2$, gerando os íons fragmentos m/z 67 e m/z 41 [M-26-26]. A partir do íon molecular ocorre uma provável perda de $-C_6H_{11}$, gerando o pico base de m/z 71. A proposta de fragmentação pode ser observada na Figura 25.

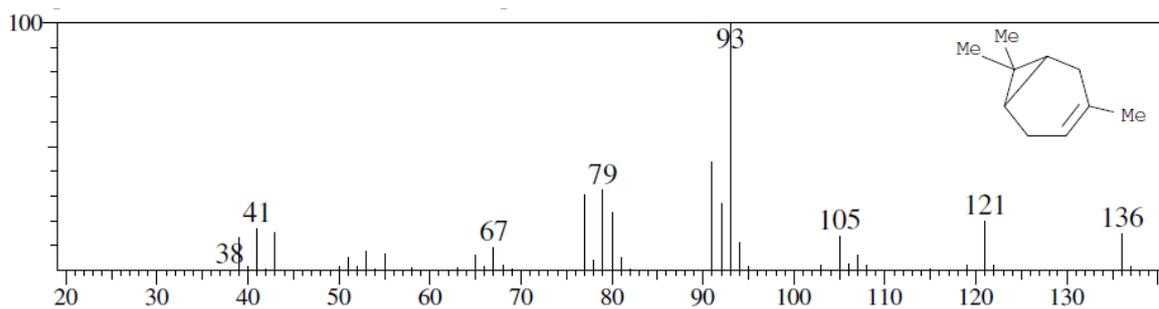
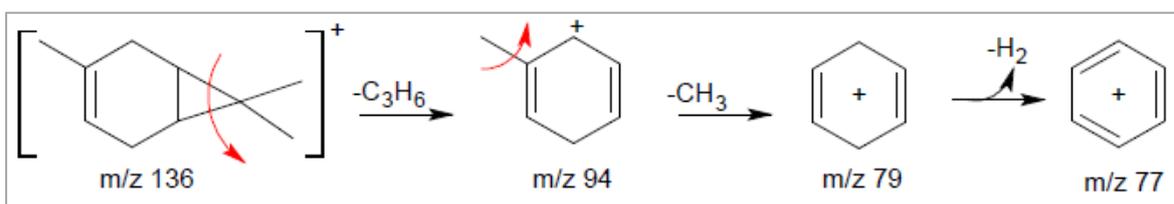
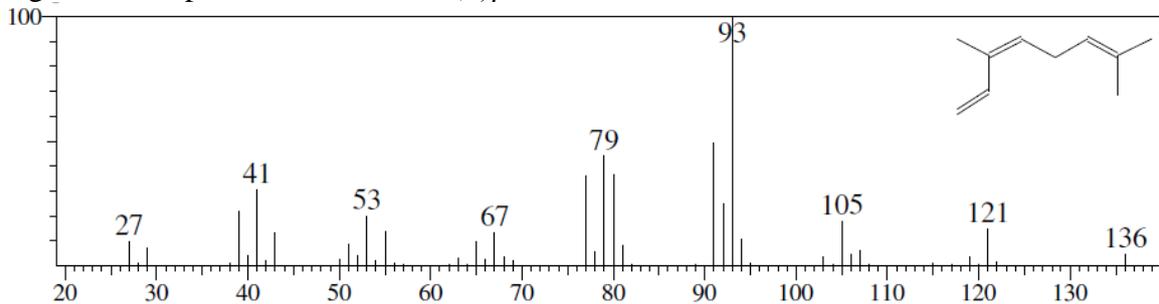
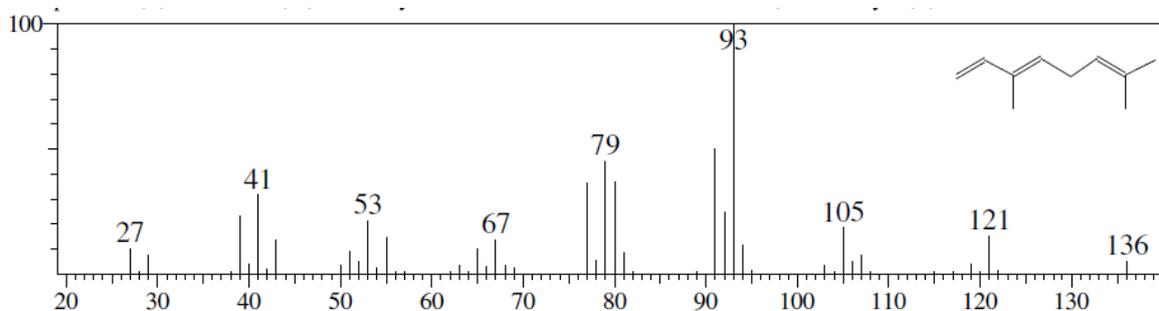
Figura 17 - Espectro de massas do δ -3-careno.Figura 18 – Proposta de fragmentação do δ -3-careno.Figura 19 - Espectro de massas do (Z) β -ocimeno.Figura 20 - Espectro de massas do (E) β -ocimeno.

Figura 21 – Proposta de fragmentação do (Z) β -ocimeno e (E) β -ocimeno.

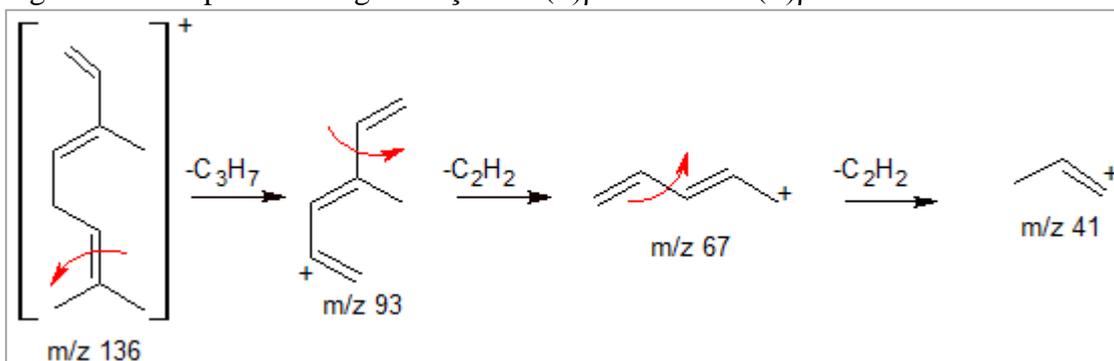


Figura 22 - Espectro de massas do α -terpinolene.

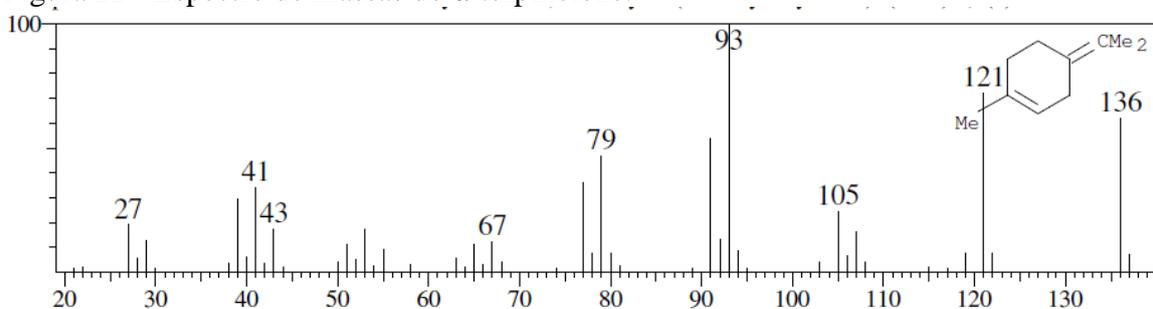


Figura 23 – Proposta de fragmentação do α -terpinolene.

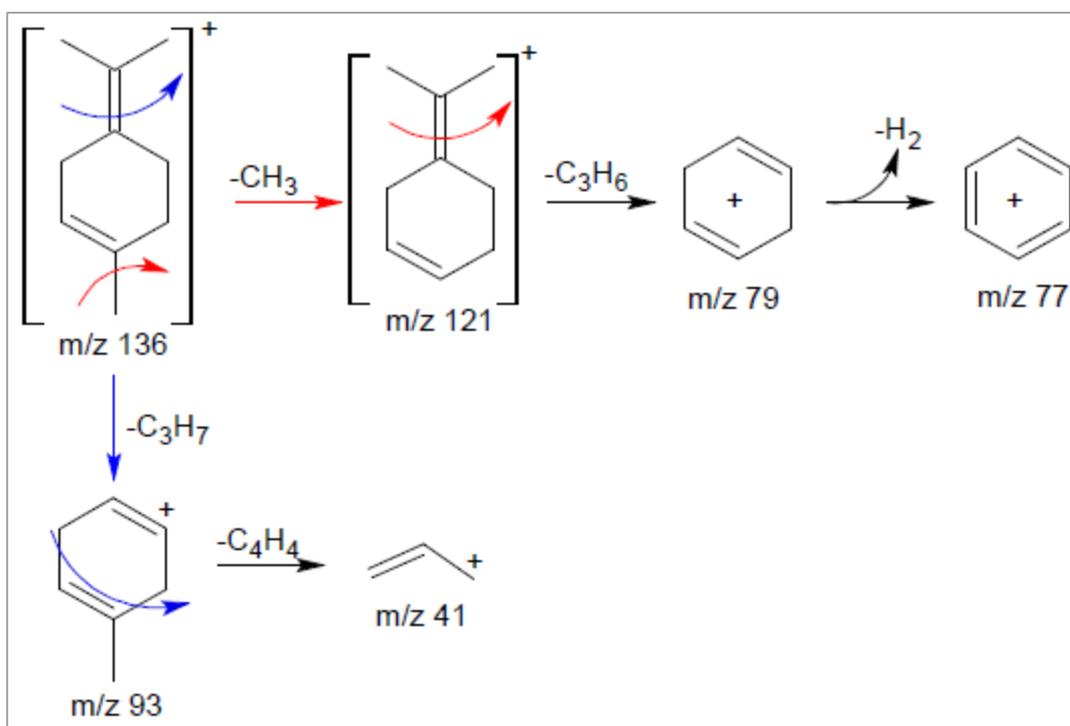


Figura 24 - Espectro de massas do linalol.

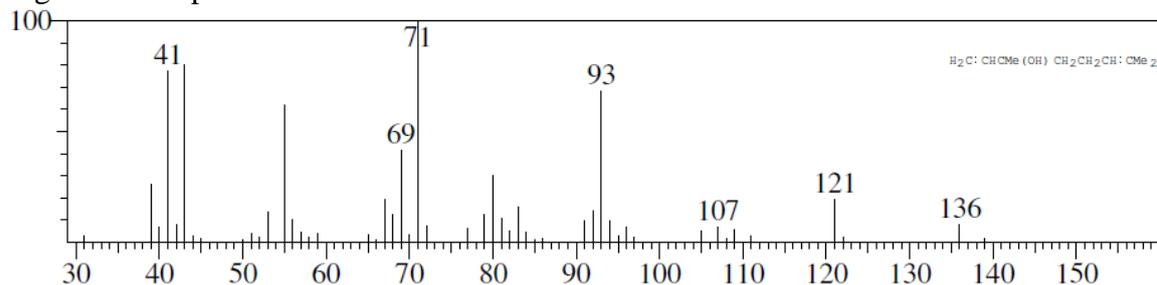
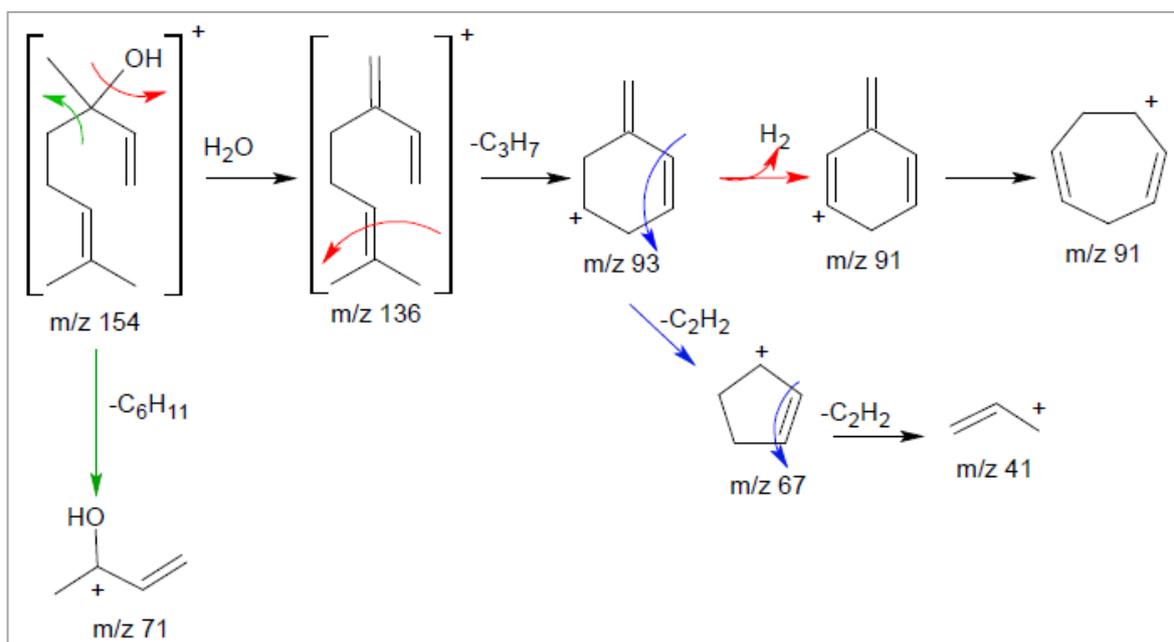


Figura 25 – Proposta de fragmentação do linalol.



Segue espectro obtido por CG/EM do α -copaeno, *E*-cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno (FIGURA 26 – 33).

A substância α -copaeno (FIGURA 26) obteve tempo de retenção de 21.489, sendo identificado através da comparação e similaridade de seu espectro com os da literatura. Apresentou pico do íon molecular em 204 [M^+]. A perda $-C_3H_7$ com m/z 43 deu origem ao pico 161, provavelmente devido a perda do radical isopropílico m/z 43, seguido da perda de $-C_2H_4$, gerando o pico m/z 91. O pico do íon com m/z 189 é característico da perda do grupamento metila ($-CH_3$). Ainda a partir do íon molecular ocorre a perda de $-C_2H_6$, sequenciado de $-C_2H_6$, formando os íons com m/z 147 e m/z 105, respectivamente. O pico do íon fragmento m/z 69 [$M-135$], resultou da perda de $-C_{10}H_{15}$, de acordo com o proposto na Figura 27.

A substância com tempo de retenção de 25.803, (FIGURA 28), apresentou íon molecular de 204, o padrão de fragmentação observado é característico do germacreno D, conforme comparação com a literatura (ADAMS. 2007) e biblioteca do sistema EM. A proposta de fragmentação pode ser observada na Figura 29. A partir do íon molecular $[M^+]$ 204, ocorre a eliminação de um radical isopropila $[M-43]$, originando um fragmento de m/z 161. O pico m/z 105 e m/z 79 $[M-56-26]$ resultaram de clivagens sucessivas do anel. E a perda de H_2 gerou o pico com m/z 77.

O composto identificado como *E*-cariofileno apresentou tempo de retenção de 23.282. Conforme pode ser observado na Figura 30, o íon molecular aparece em 204 $[M^+]$ e o pico m/z 189 $[M-15]$ deve-se a perda de grupo metila. A perda de $-C_3H_8$ formou o íon m/z 133, sequenciado da perda de $-C_2H_4$, $-C_2H_2$ e H_2 , formando os íons m/z 105, 79 e 77, respectivamente. Partindo do íon molecular ocorre a formação dos picos m/z 93 e m/z 91 $[M-111-2]$, devido à perda de $-C_8H_{15}$ e H_2 . Ainda a partir do íon molecular ocorre a perda do radical isopropílico $[M-43]$, gerando o pico do íon fragmento com m/z de 161. A perda de $-C_8H_{10}$, gerou o pico com m/z 55, como pode ser observado na proposta de fragmentação da Figura 31.

A substância com tempo de retenção 26.387 foi identificada como biciclogermacreno (FIGURA 32) através da comparação do padrão de fragmentação com a literatura. O pico do íon molecular apareceu com baixa intensidade com m/z 204. O pico de $m/z = 189$ $[M-15]$ é característico de perda do grupo metila. O pico m/z 147 $[M-42]$, resultou da perda de um fragmento neutro. Partindo do íon fragmento m/z 147, foi proposto três possíveis rotas de fragmentações denominadas a, b e c. A rota a, originou os picos m/z 105, m/z 79 e m/z 77 $[M-43-26-2]$, a partir de clivagens sucessivas do anel e perda de H_2 . A rota b, originou os íons fragmentos m/z 93 e m/z 91 $[M-43-2]$, resultando da eliminação de um radical isopropila e perda de H_2 . A rota c, originou o íon fragmento m/z 67 $[M-94]$. Conforme o proposto na Figura 33.

Figura 26 - Espectro de massas do α -copaeno.

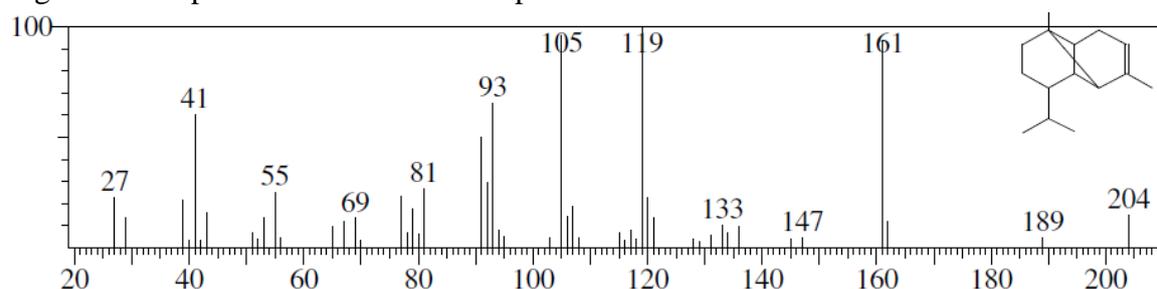


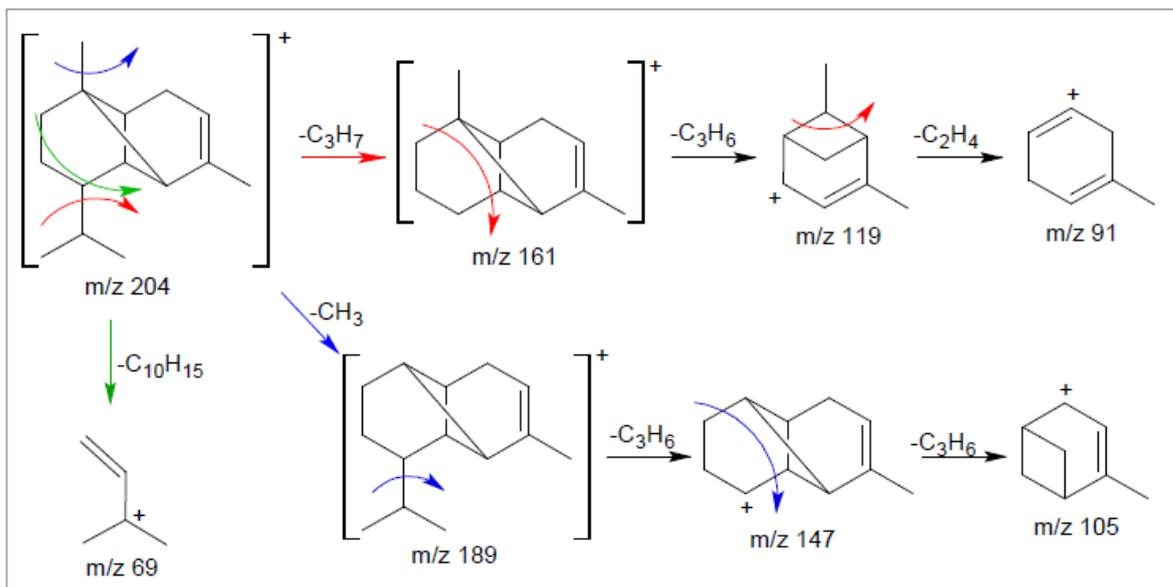
Figura 27 – Proposta de fragmentação do α -copaeno.

Figura 28 - Espectro de massas do germacreno D

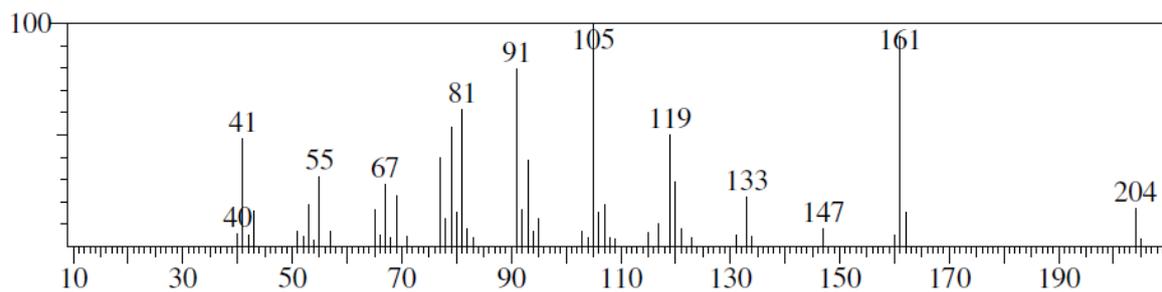


Figura 29 – Proposta de fragmentação do germacreno D.

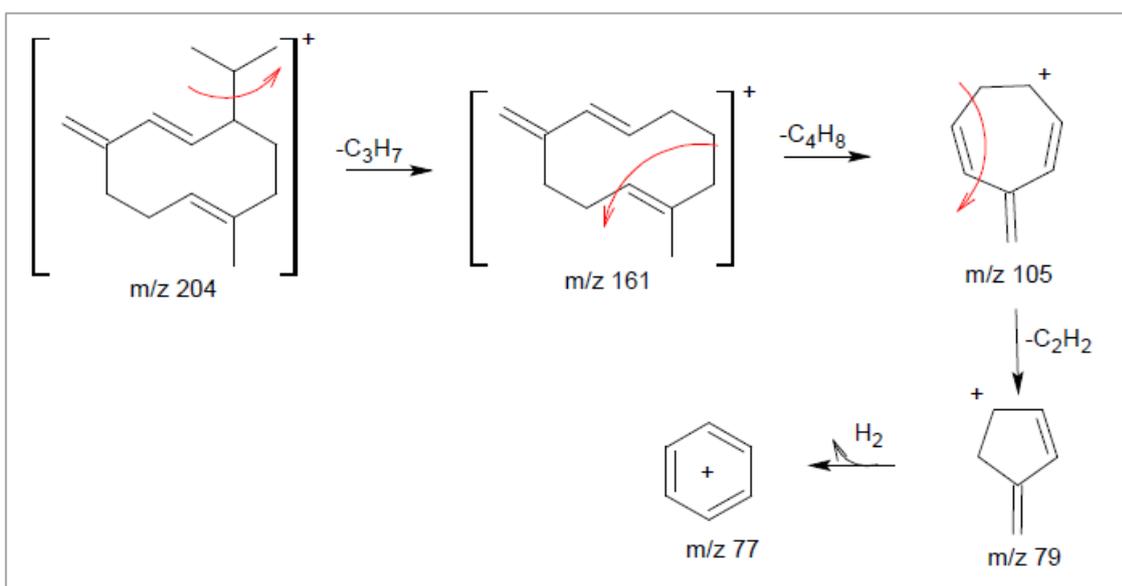


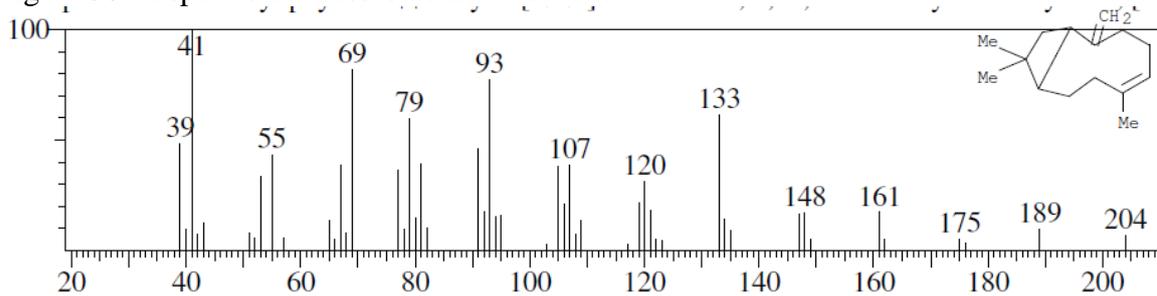
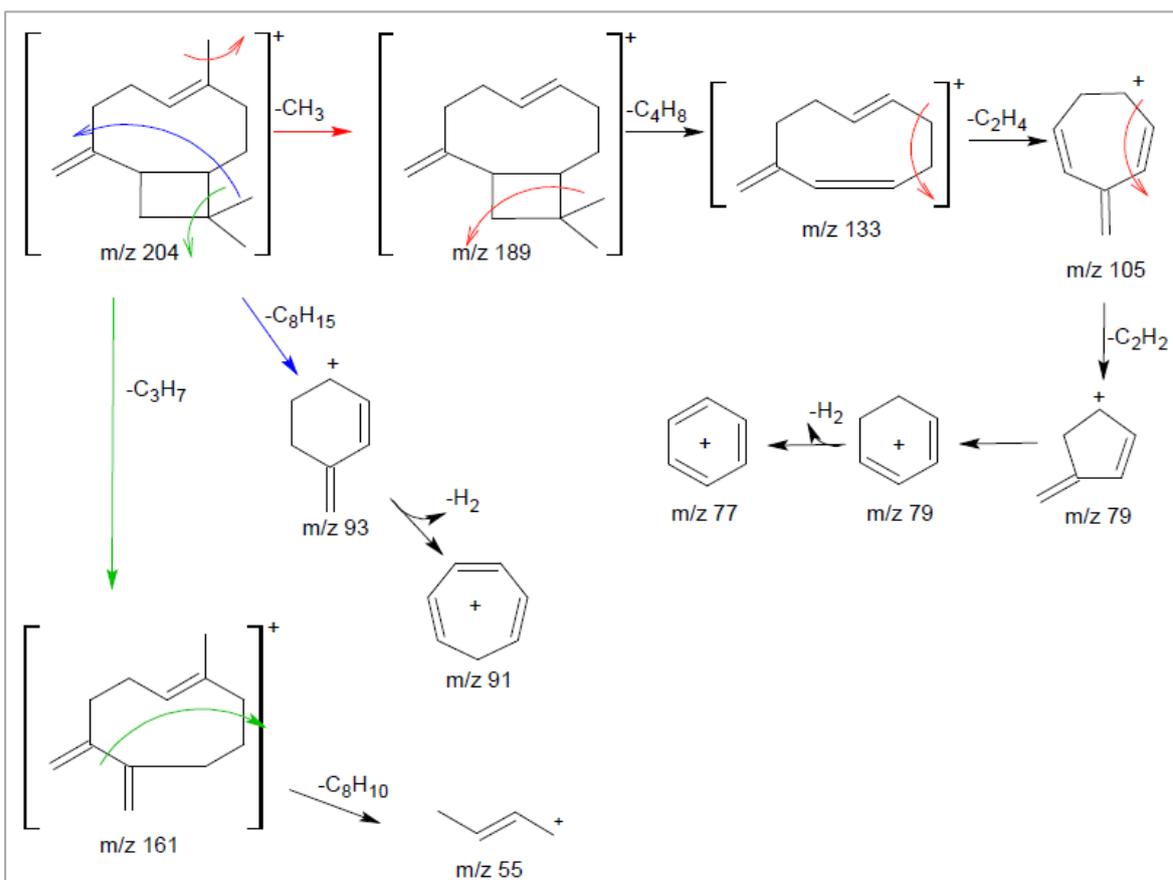
Figura 30 - Espectro de massas do *E*-cariofileno.Figura 31 – Proposta de fragmentação do *E*-cariofileno.

Figura 32 - Espectro de massas do biclogermacreno.

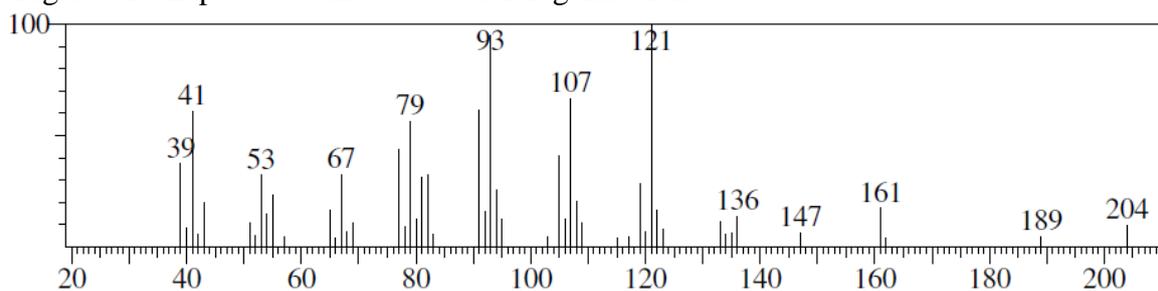
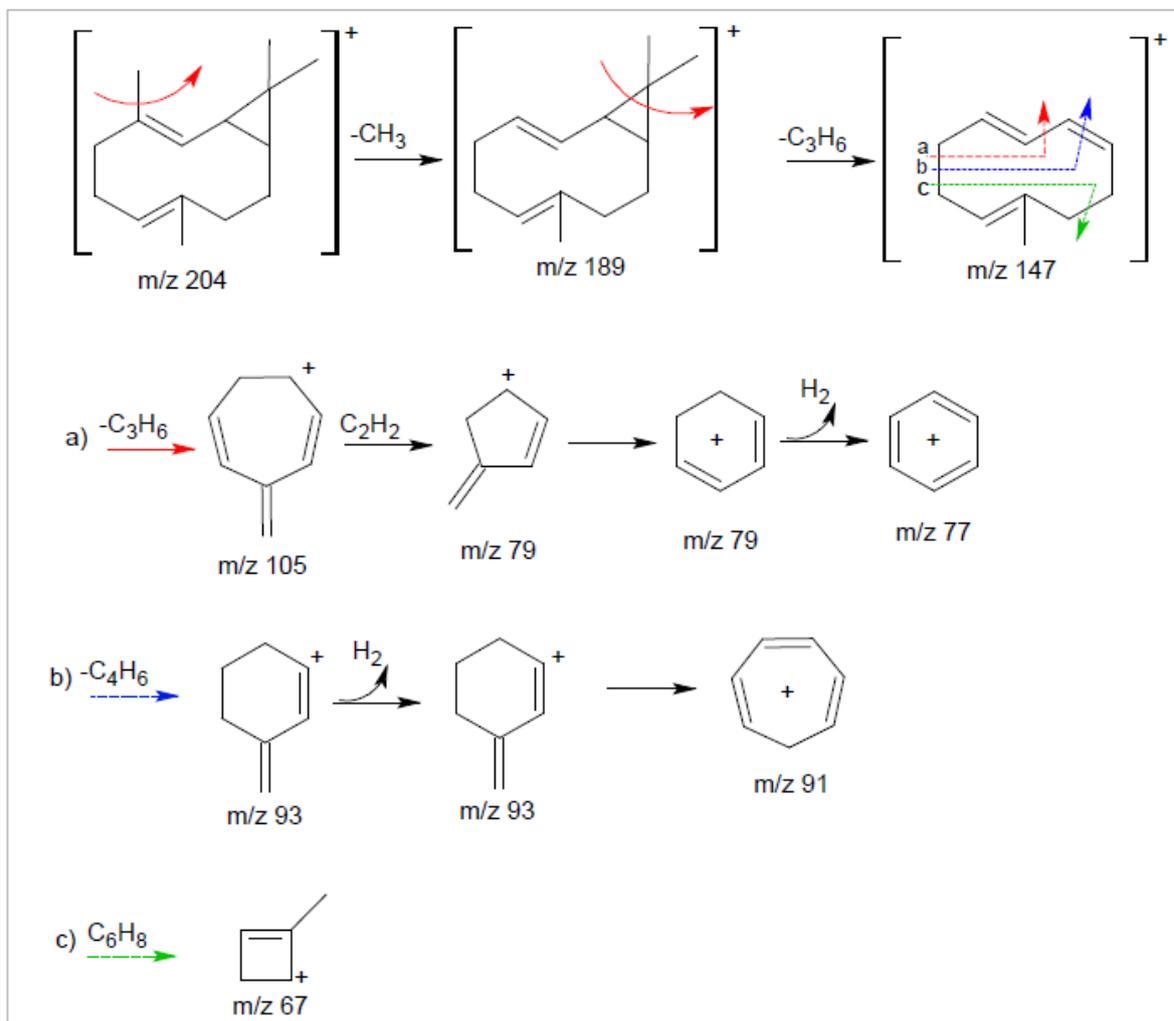


Figura 33 – Proposta de fragmentação do biciclogermacreno.



Segue espectro obtido por CG/EM e proposta de fragmentação da miristicina e 3,4-(metilenodioxí) propiofenona (FIGURA 34 -37).

O constituinte de tempo de retenção de 27,083 foi identificado como sendo a miristicina (FIGURA 34), baseado na similaridade do padrão de fragmentação. O pico base foi o íon molecular, com massa molecular de m/z de 192. O pico m/z 165 [M-27], resultou da perda do grupo vinil ($\text{-C}_2\text{H}_3$). Os grupos metoxila, radical formila e monóxido de carbono foram evidenciados, respectivamente por m/z 134 [M-31], m/z 105 [M-29] e m/z 77 [M-28]. O pico do íon fragmento m/z 177 [M-15], resultou da perda do grupo metila, partindo do íon molecular. Ainda, partindo do íon molecular, ocorre a perda do grupamento metoxila (-OCH_3), gerando o pico m/z 161, seguido da seguimentação alquila ($\text{M-C}_3\text{H}_5$), dando origem o pico m/z 120, como pode ser observado na proposta de fragmentação da Figura 35.

A substância com tempo de retenção de 28.166 apresentou um pico do íon molecular com m/z 178 $[M^+]$, sendo identificado como 3,4-(metilenodioxi) propiofenona (FIGURA 36) através de comparação com a literatura. Apresentou pico m/z 178 indicando a perda de uma metila. A segmentação alfa do grupo alquila com m/z de 29 $[M^+ - C_2H_5]$, deu origem ao pico base 149. E a perda do grupo monóxido de carbono foi evidenciado por m/z 28 $[M^+ - CO]$, dando origem ao pico 121, de acordo com o observado na proposta de fragmentação da Figura 37.

Figura 34 - Espectro de massas da miristicina.

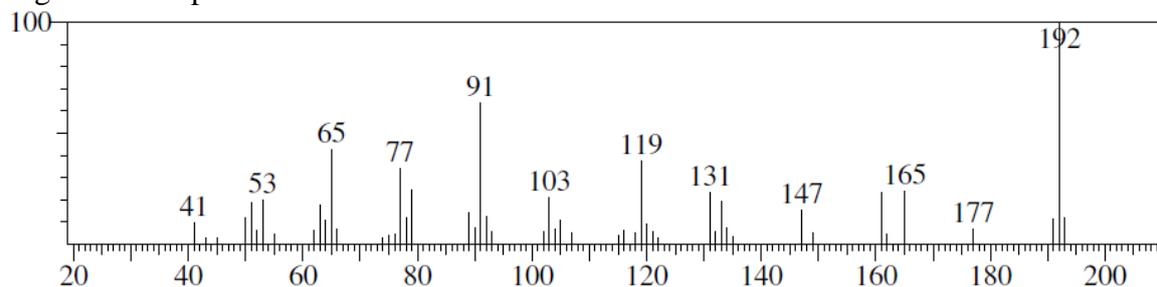


Figura 35 – Proposta de fragmentação da miristicina.

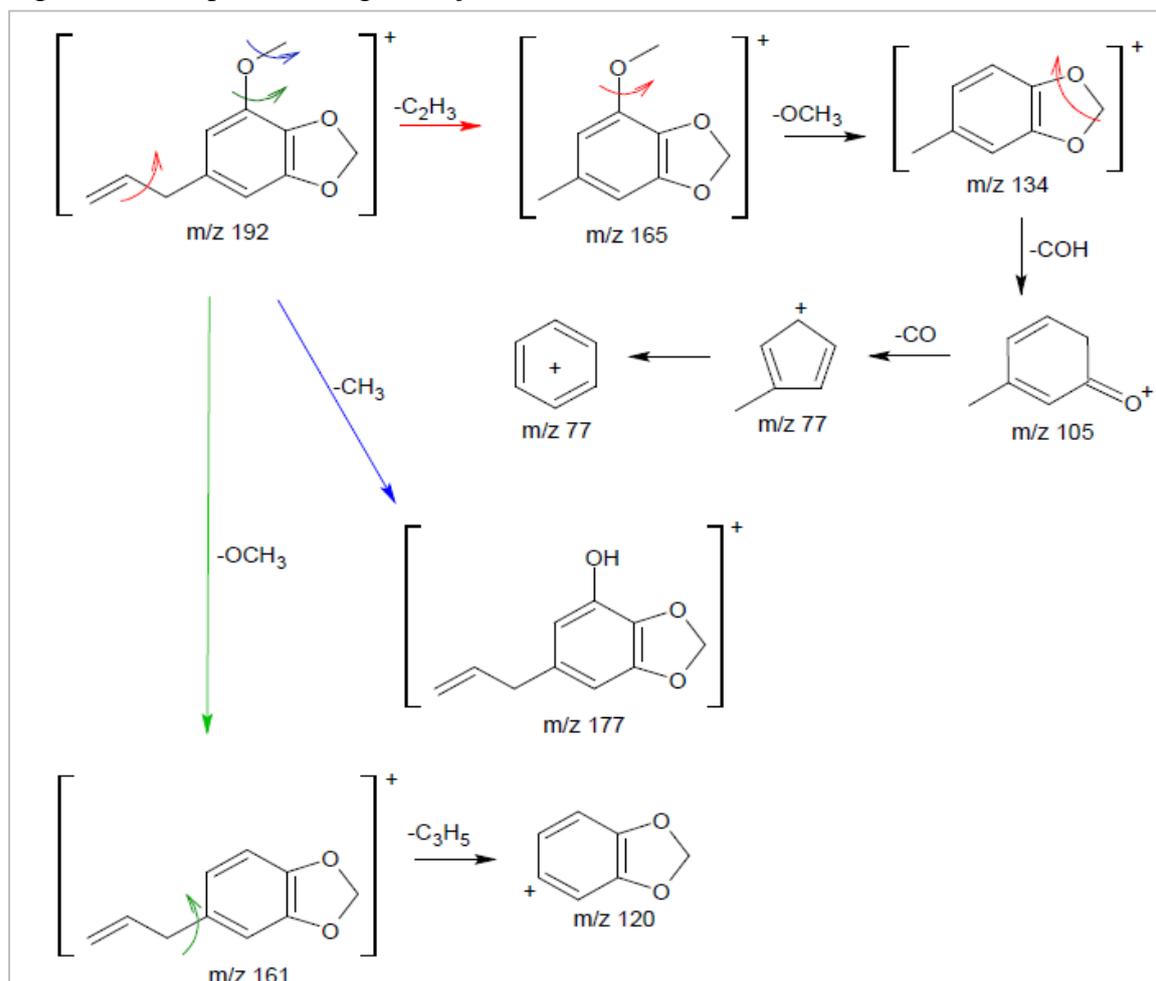


Figura 36 - Espectro de massas do 3,4-(metilenodioxi) propiofenona.

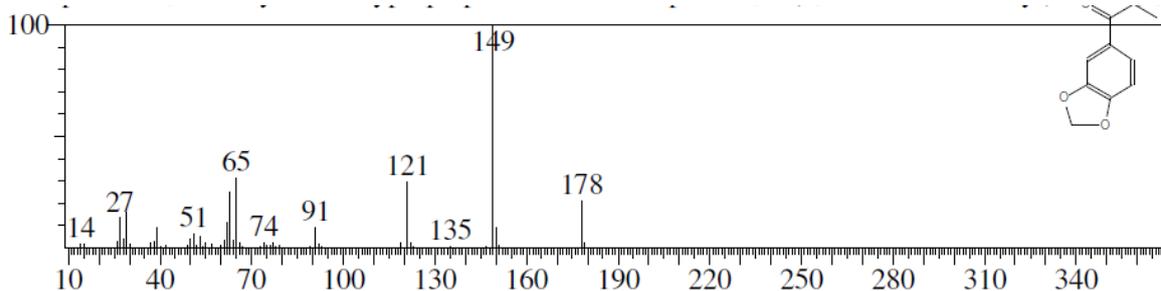
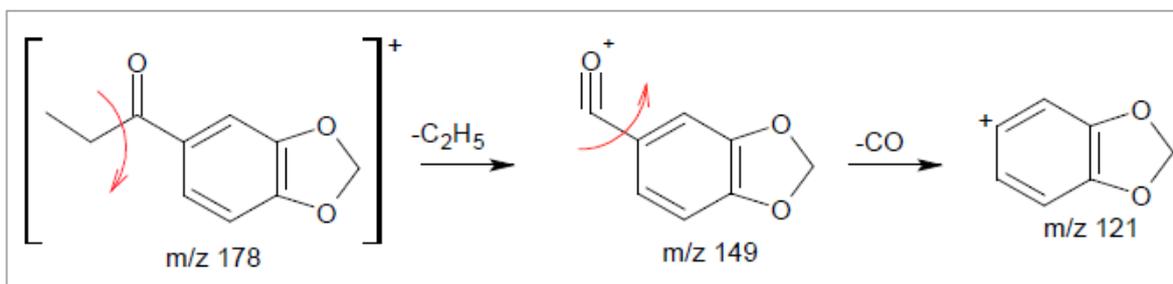


Figura 37 – Proposta de fragmentação do 3,4-(metilenodioxi) propiofenona.



4.4 Atividade Esquistossomicida *in vitro*

Apesar de vários estudos apresentarem os potenciais efeitos de extratos e substâncias isoladas do gênero *Piper* frente aos parasitos de *S. mansoni* (CAMPELO et al., 2017; MAGALHÃES et al, 2016; CASTRO et al., 2015; SIMÕES et al, 2015; COSTA et al., 2014; MORAES et al, 2012), até o presente momento não há relatos na literatura quanto à atividade esquistossomicida do óleo essencial de *Piper marginatum*.

O potencial esquistossomicida do óleo essencial de *P. marginatum* foi avaliado *in vitro* frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. As amostras foram testadas nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, utilizando-se praziquantel como controle positivo. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.

O óleo essencial estudado causou alteração na viabilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, reduzindo a motilidade e causando a morte dos parasitas de forma diretamente proporcional a concentração e ao tempo de incubação. Na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de promover a morte de 25% dos parasitos após 48 horas de incubação e morte de 100 % dos parasitos após 120 horas de incubação na mesma concentração.

A motilidade do parasita e o efeito das substâncias sobre essa atividade baseiam-se, principalmente, na observação visual. A análise macroscópica da atividade motora apresenta a vantagem de ser um método simples, direto, de baixo custo e facilidade operacional (NOEL, 2008).

No presente trabalho, a atividade motora de *S. mansoni* baseada na observação microscópica dos vermes foi diariamente monitorada. O óleo em estudo promoveu a redução da atividade motora dos parasitas em todas as concentrações testadas. Quando avaliado na concentração de 12,5 mg/mL, este óleo foi capaz de causar 100% da diminuição da atividade motora dos vermes após 24 horas de incubação (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *P. marginatum* sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

Amostra ^a	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^b	Redução atividade motora (%)
Controle negativo	24	0	0
	120	0	0
PZQ ^c	24	100	-
	120	100	-
6,25 µg/mL	24	0	50
	48	25	50
	72	25	50
	120	25	50
12,5 µg/mL	24	0	100
	48	25	75
	72	25	75
	120	25	75
25 µg/mL	24	0	100
	48	12,5	62,5
	72	12,5	62,5
	120	12,5	87,5
50 µg/mL	24	0	100
	48	25	75
	72	25	75
	120	100	0
100 µg/mL	24	100	0
	48	100	0
	72	100	0
	120	100	0

^a Em DMSO 1 % no meio RPMI

^b Porcentagem em relação a 8 vermes

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ)

O controle positivo (Praziquantel a 12,5 µg/mL) causou 100 % de mortalidade, como pode ser observado na Tabela 3. Enquanto o controle negativo (1 % de DMSO + meio RPMI) não apresentou qualquer alteração na mortalidade, atividade motora e tegumento dos vermes adultos, comprovando que o meio não exerce efeito sobre os parasitos avaliados, conforme literatura (MELO et al., 2011). Nenhuma das amostras foi capaz de provocar alteração tegumentar (dados não mostrados).

A atividade esquistossomicida apresentada pelo óleo essencial pode ser atribuído a uma ou mais moléculas presentes no óleo. Estudos vem sugerindo que a eficácia demonstrada por alguns óleos essenciais decorre principalmente em função da rápida difusão através das membranas, devido à alta lipossolubilidade dos compostos, o que danifica as estruturas celulares do parasito, podendo causar lise de células (MAGALHÃES, et al., 2012).

Com relação aos estudos já realizados com espécies do gênero *Piper*, Castro et al. (2015) avaliou a atividade de uma chalcona isolada do extrato de *Piper aduncum*, demonstrando sua capacidade de matar vermes adultos de *S. mansoni* em baixas concentrações. MORAES et al. (2012) demonstrou propriedades de Piplartina isolada do extrato de *Piper tuberculatum*, contra formas esquistossomulas de diferentes idades, com concentração de 7,5 µM Piplartina foi capaz de causar morte de todos os vermes dentro de 120 h. Magalhães et al. (2012) verificou o potencial esquistossomicida *in vitro* do óleo essencial de *Piper cubeta* frente as formas adultas de *S. mansoni*. O constituinte majoritário do óleo de *Piper* em comum com as substâncias identificadas do óleo de *Piper marginatum* foi o δ -3-careno (5,34 %).

Matos-Rocha et al. (2013) avaliou a atividade do β -cariofileno, substância majoritária em comum com a do presente trabalho, frente a formas adultas de *S. mansoni*, não observando atividade esquistossomicida. Estudos adicionais da atividade esquistossomicida devem ser realizados com as demais substâncias majoritárias isoladas, no intuito de se encontrar qual ou quais compostos são efetivamente ativos frente ao *S. mansoni*.

4.5 Atividade Tripanocida *in vitro*

O resultado referente à avaliação da atividade anti *T. cruzi* do óleo essencial de *Piper marginatum* está expresso na Tabela 4. As seguintes informações podem ser encontradas nessa tabela: concentração inibitória (CI₅₀) sobre o parasito; concentração inibitória (CI₅₀) sobre células do hospedeiro vertebrado e índice de seletividade (IS). O valor de CI₅₀ sobre o

parasito indica a concentração do composto que reduz o crescimento parasitário em 50 %; os valores de CI_{50} sobre células do hospedeiro indicam a concentração do composto que induz a morte de 50 % dessas células. O índice de seletividade (IS) determina a ausência (ou não) de efeitos citotóxicos nas células do hospedeiro vertebrado. De acordo com Romanha et al. (2010), compostos que apresentam um índice de seletividade igual ou superior a 50 são altamente seletivos, sendo recomendados para testes *in vivo*. Este é o primeiro relato da atividade tripanocida do óleo essencial de *Piper marginatum*.

O óleo essencial do *P. marginatum*, na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, provocou a mortalidade de 71% dos parasitos. Os resultados mostraram que o óleo essencial testado foi substancialmente menos potente que o controle positivo (benzonidazol), apresentando CI_{50} 17 vezes maior. Na determinação da dose tóxica para células host L929 não infectadas, o óleo essencial induziu a morte celular em dose menor que 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O valor do índice de seletividade foi de <2,3 (Tabela 4). O índice de seletividade reflete a extensão em que cada composto está ativo contra o parasita sem induzir a toxicidade em direção à célula hospedeira (SALES JUNIOR, et al., 2014). De acordo com Romanha et al., (2010), um composto promissor para o tratamento da doença de Chagas deve ter atividade contra formas tripomastigotas semelhantes ou maiores do que o fármaco de referência benzonidazol e mostrem um índice de seletividade igual ou superior a 50. O óleo essencial testado não cumpre todos estes parâmetros. Com base nos critérios de Romanha et al., (2010) para determinação da eficácia de novas drogas contra *T. cruzi*, o óleo essencial de *P. marginatum* não seria considerado para testes *in vivo*, devido ao índice de seletividade estar abaixo de 50 ($IS < 50$).

Tabela 4. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *P. marginatum* sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* de cultivo celular.

Composto	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Atividade ¹ (%)	CI_{50} sobre o parasita ² ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CI_{50} sobre células ³ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IS ⁴
PM	40	Morte celular ⁵			
	20	71	17	< 40	< 2,3
	10	0			
Benzonidazol ⁵	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3,81 μM)	-	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	625 $\mu\text{g}/\text{mL}$	625

¹ Porcentagem de redução das formas tripomastigotas sob ação do composto.

² Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário.

³ Concentração do composto que induz 50% de morte celular (L929).

⁴ CI_{50} do composto sobre as células dividido pelo IC_{50} do composto sobre o parasita.

⁵ Controle positivo

⁶ 100% de morte das células hospedeiras L929.

Os valores de IC_{50} foram calculados através de interpolação linear.

Este resultado difere dos encontrados na literatura para outras espécies de *Piper*. Leite et al. (2013) testou cariofileno contra formas epimastigotas de *T. cruzi* obtendo uma inibição de 67 % dos parasitos na concentração de 100 µg/mL. Piperina, um alcaloide isolado de *Piper nigrum*, demonstrou ser uma potente substância tripanocida, sendo mais tóxica para amastigotas intracelulares que para epimastigotas com IC₅₀ de 7,36 µM e 4,91 µM, respectivamente (RIBEIRO et al., 2004).

Cruz et al., (2011) demonstrou atividade tripanocida dos extratos de *Piper jacquemontianum* e *Piper variable* com CI₅₀ de 51,9g/mL e 45,8 g/mL, respectivamente. Nota-se que o CI₅₀ do óleo essencial testado neste trabalho é menor que o obtido por Cruz et al., (2011), porém o índice de seletividade apresentado está muito abaixo do observado para o Benzonidazol.

Santoro et al., (2007) destacaram que óleos essenciais que contêm linalol em sua composição química apresentam ação *in vitro* contra células epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

Neste contexto, vários metabólitos secundários de espécies de *Piper* têm se mostrado ativo contra *T. cruzi*. A triagem dos metabólitos de plantas é uma estratégia válida visto que esses produtos naturais são explorados para descobrir agentes tripanocidas (LUIZE et al., 2006; HOLETZ et al., 2002).

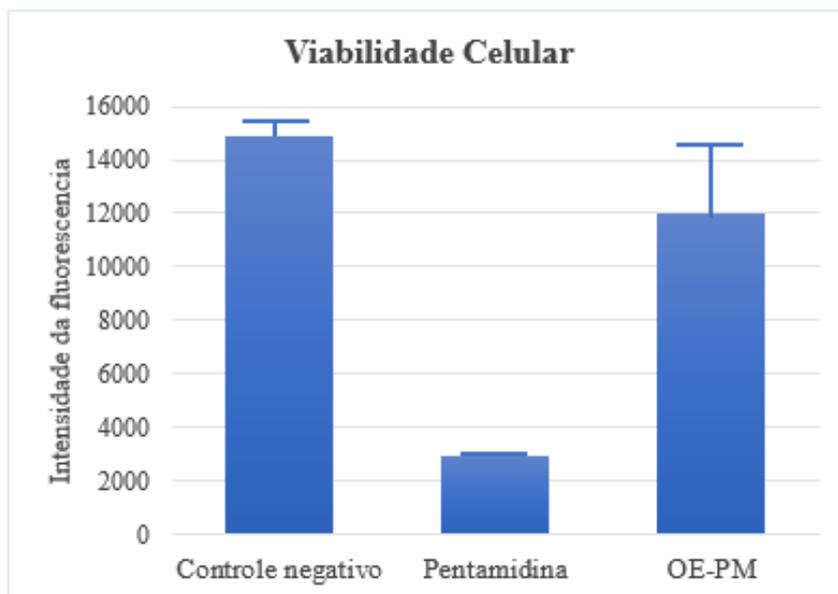
4.6 Atividade Leishmanicida

Leishmania amazonensis, parasita que foi utilizado no trabalho, provoca lesões cutâneas simples e em baixa porcentagem de indivíduos infectados há evolução para a leishmaniose cutânea difusa, estando presente principalmente na região Amazônica (RODRIGUES, 2009).

O óleo essencial de *P. marginatum* foi testado *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. O estágio promastigotas é o mais frequentemente utilizado por ser a forma infecciosa do parasita (MESSARITAKIS et al., 2010).

No ensaio de viabilidade celular, utilizando a substância resazurina como agente redutor, foi possível observar a mudança de coloração nos poços da placa, sugerindo a presença de células viáveis. A absorbância obtida foi semelhante à do controle negativo como pode ser observada na Figura 37, indicando que o óleo essencial testado não apresentou atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, quando comparado a Pentamidina (controle positivo).

Figura 38 - Viabilidade celular utilizando o teste de resazurina.



No ensaio de CI_{50} , as formas promastigotas de *L. amazonensis* testadas não foram sensíveis ao tratamento com o óleo essencial de *P. marginatum*, apresentando CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) superior a 200, como pode ser observado na Tabela 5. Sendo, portanto, considerado inativo nas condições ensaiadas, reforçando o resultado obtido no teste de resazurina.

Tabela 5 - Atividade leishmanicida (CI_{50}) do óleo essencial de *P. marginatum*.

Composto	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
PM	≥ 200
Pentamidina*	$0,15 \pm 0,03$

*Controle positivo

Os resultados obtidos neste trabalho discordam em relação a citotoxicidade de plantas do gênero *Piper* já existentes. Segundo Ferreira et al. (2010) o ácido propano 3-(3, 4, 5-trimetoxifenil), purificado dos frutos de *Piper tuberculatum*, inibiu o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, com valor CI_{50} de $145 \mu\text{g/mL}$. No estudo realizado por Flores et al. (2009), foi verificado um potencial leishmanicida de derivados de espécies de *Piper*. Estes resultados podem ser justificados porque as espécies são diferentes e consequentemente apresentam alguns metabólitos secundários diferentes. Além do que, no presente trabalho foi testado o óleo essencial, enquanto o trabalho dos referidos autores foram testadas substâncias isoladas dos extratos das plantas.

5. CONCLUSÃO

A espécie *Piper marginatum* coletada na região de Itacoatiara-AM, apresentou maior rendimento do óleo essencial das folhas em outubro de 2013 (verão).

A análise do óleo estudado mostra que a espécie apresenta uma grande diversidade química, havendo predomínio de monoterpenos (44,59 %), seguido de sesquiterpenos (34,89 %), fenilpropanoides (20,23 %) e diterpeno (0,28 %) em menor proporção.

Os compostos majoritários identificados no óleo essencial foram; δ -3-careno, (Z) β -ocimeno, (E) β -ocimeno e α -terpinolene, E-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno e α -copaeno, linalol, miristicina, 3,4-(metilenodioxo)propiofenona. Sua composição química está de acordo com a literatura.

O resultado para o teste esquistossomicida indica que o óleo essencial de *P. marginatum* foi consideravelmente eficaz contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni* testados, com efeitos diretamente dependentes da concentração e do tempo de incubação dos vermes.

Na avaliação da atividade tripanocida contra as formas infectantes *Trypanosoma cruzi*, o óleo essencial demonstrou-se ativo, mas apresentou baixa seletividade.

A avaliação *in vitro* realizada sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* mostraram ausência de atividade biológica das substâncias avaliadas sobre essa forma do parasito.

Estudos adicionais de avaliação da atividade esquistossomicida devem ser realizados com os compostos majoritários isolados do óleo essencial de *P. marginatum* com o intuito de se identificar quais as substâncias responsáveis pela atividade, podendo assim incentivar a busca de novos fármacos através de produtos naturais contra a esquistossomose.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Illions-USA, Allured Publishing Corporation, 2007.
- ADENOWO, A.F. et al. Impact of human schistosomiasis in sub-Saharan Africa, Braz. **Journal of Infectious Diseases**, v.19, n. 2, p. 196–205, mar./apr. 2015.
- ANA. Agência Nacional de Águas. Dados de Precipitação de Itacoatiara. Mensagem recebida por <andreлина@ana.gov.br/hidro@ana.gov.br> 01.03.2018.
- ALEXANDER, J. et al. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, aug. 1999.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Variability in Essential-Oil Composition of *Piper marginatum* sensu lato. **Chemistry & Biodiversity**, v.5, n.1, p.197-208, aug./dec. 2008.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- APAC. Agência Pernambucana de Águas e Clima. **Meteorologia**. Disponível em <<http://www.apac.pe.gov.br/meteorologia/estacoes-do-ano.php?estacao=verao>>. Acesso em: 25 de jun. 2018.
- ARAÚJO, E.R. et al. Extratos de *Piper marginatum* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum scovillei* em pimentão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 2, p. 88-94, fev. 2014.
- ARGOLO, A. M. et al. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro: Imperial Novo Milenio, 2008.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfo-anatômica. In: FIGUEIREDO, A. C. S. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências da Portugal. Centro de Biotecnologia Vegetal, p.19-28. 2007. (Curso Teórico- Prático).
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, dec. 2015

AUTRAN, E.S. et al. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 7, n. 100, p. 2284-2288, 2009.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p. 75-446, fev. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008.

BARBOSA, Artur Felipe Santos. “Descoberta de novos quimioterápicos para tratamento da doença de chagas”. **2010**. 93f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

BARBOSA, L.G.N. DOENÇA DE CHAGAS¹⁹⁰⁹⁻²⁰⁰⁹. **Revista LOGOS**, n. 17, 2009.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira** v.29, n. 5, p.555-557, set./out. 2004.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitology*, v. 18, p. 309-314, 2002.

BERNHARD, V. et al. Chemical Constituents of the Essential Oils of Three *Piper* Species from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 9, n. 3, p. 230-238, mar. 2006.

BEZERRA, A.M.E. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 26-29, jan./mar. 2008.

BRAGA, N. de P.; CREMASCO, M.A. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) para a obtenção de isosafrol. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 4, p. 737-740, 2010.

BRANQUINHO, L.S. et al. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 372-378, feb. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. “**Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**”. Boletim Epidemiológico. Secretaria de vigilância em saúde, V. 46, 1-9, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 200-2002, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Brasília/DF, ed. 8, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Normas e Manuais técnicos**. Brasília, DF: 7ª ed., 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

BUCKNER F.S. et al., Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, aug. 2004.

CAFFREY, C.R. Schistosomiasis and its treatment. Review Special Focus Issue: Schistosomiasis. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 675–676, may 2015.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179-89, 2005

CAMPELO, Y.D.M. et al. Synergistic effects of *in vitro* combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 488-499, april 2017.

CARVALHO, M.F. et al. Amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* detected in a renal allograft. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 223-226, july/aug. 1997.

CASTRO, Dulce Maria. Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.)N. E. Br ex Britt. & Wilson (Verbenaceae). 2001. 132f. Tese

(Doutorado em Horticultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2001.

CASTRO, C.C.B. et al. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. **Phytomedicine**, v.22, n. 10, p. 921–928, sep. 2015.

CASTRO, J. A. et al. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas´ disease (American trypanosomiasis). **Human Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, aug. 2006.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Chagas Disease. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em 20.03.2018.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/> . Acesso em 20.03.2018.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Schistosomiasis. <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html> Acesso em 20.03.2018.

CHAVES, M.C.O. et al. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 1, p. 75-77. jan. 2006.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCIA, L. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, p. 3-9, July 2003.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**. v. 465, suppl. COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a *stronger in vitro* ‘proof-of-concept’. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

COLLEY, D.G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 28, p. 2253-2264, jun. 2014.

COSTA, E. S. et al. *In vitro* schistosomicidal evaluation of lignans from *Piper cubeba* against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Planta Médica**, v. 80, n. 16, p. 1463-1463, 2014.

COSTA, J. et al. Composição química e toxicidade de óleos essenciais de espécies de *Piper* frente a larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 463-467, jan. 2010.

COURA, J.R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 30-33, jan./mar. 2003.

CRUZ, S.M. et al. Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and methanol extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, 587-593, july/aug. 2011.

DEGENHARDT, J. et al. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1621-1637, oct./nov. 2009.

DI STASI, L.C.; HIRUMA - LIMA, C. A. Piperales medicinais. In DI STASI, L.; HIRUMA-LIMA, C.A. 2002. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2da ed. São Paulo, 2002.

DIAS, J.C.P. Chagas disease, environment, participation, and the state. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17(Suplemento): 165 -169, 2001.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296-300, mai-jun, 2008.

DIAS, L.C; DESSOY, M.A. “Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos”. **Química Nova**, v. 32, p. 2444 – 2457, 2009.

DOENHOFF, M.J. et al. “Praziquantel: mechanisms of action, resistance e new derivatives for schistosomiasis.” **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.21, n. 6, p. 659-667, jan. 2008.

DUARTE, M.C.T. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 06-08. 2004.

DVORAK, J.A. New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interaction. *New Approaches Am. Trypanosom.* **Scientific Research Publishing**, v. 318, p. 109-120, 1975.

DYER, L.A.; PALMER, A.D.N. ***Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution***. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2004.

FELIPPE, L.G. et al. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 445-450, jan. 2008.

FERREIRA, M.G.P.R. et al. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, 1003-1006, dez. 2010.

FERREIRA, R.T. et al. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: um desafio para a Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária Debate**, v. 2, n. 04, p. 4-11, 2014.

FIGUEIREDO, F.G. et al. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 149-154, 2014.

FILES, V.S. The study of the vector-parasite relationships in *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 41, p. 264-269, 1951.

FLORES, N. et al. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 621-627, march 2009.

GIROLA, N. et al. Camphene isolated from essential oil of *Piper cernuum* (Piperaceae) induces intrinsic apoptosis in melanoma cells and displays antitumor activity *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 4, p. 928-934, nov. 2015.

GOBBO - NETO, L.; LOPES, P.N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374 - 381, mar./apr. 2007.

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

GUTIERREZ, R.M.P. et al. Alkaloids from *Piper*: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 163-193. 2013.

HOLETZ, F. B. et al. Effect of plant extractus in folk medicine on cell growth na d differentiation of *Herpetomonas samuelpeessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined médium. **Acta Scientiarum**, v.24, n.3, p.657-662, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Amazônia Brasileira. 2009. Disponível em:< http://raisg.socioambiental.org/system/files/Amazonia_Brasileira.pdf>. Acessado em: 10 fev. 2018.

JARAMILLO, M.A.; MARQUIS, R. *Future research in Piper biology*. In. DYER, L.A.; PALMER, A.D.N. (Ed.) *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution, chemical ecology, and trophic interactions*. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, Boston, p. 199-203, 2004.

KAMTO, E.L.D. et al. An aromatic amide C-glycoside and a cyclitol derivative from stem barks of *Piper guineense* Schum and Thonn (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. 76- 81, dec. 2014.

LEITE, N.F. et al. Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. **Revista cubana de plantas medicinais**, v. 18, n. 4, p. 522-528, dec. 2013.

LEWINSOHN, R. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte II). *Jornal da Unicamp*, (287), 9 a 15 de maio de 2005.

LIMA, R.K. et al. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, n. 3, p.523-528, march 2012.

LINDOSO, J.A.L.; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 5, n. 51, p. 247-253, sept./oct. 2009.

LUIZE, P.S. Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Cortez DAG, Nakamura CV. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.)C. DC. var. *pallescens*(C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 10, p. 2126-30, nov. 2006.

LUNA J.S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n. 2, p. 199- 206, fev. 2005.

LUPE, F. A. Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MADUREIRA, A.S.; RAMOS, E.M.B.; SENA, J.P. Inovação em saúde no Brasil: o caso das doenças negligenciadas. **Congresso Iberoamericano de Direito Sanitário**, v. 2, n. 2, p. 658-667, jul./dez. 2013.

MAGALHÃES, L.G. et al. Effects of (-)-6,6'-dinitrohinokinin on adult worms of *Schistosoma mansoni*: a proteomic analyses. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 334-341, may/june 2016.

MAGALHÃES, L.G. et al. *In Vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v.110, n. 5, p. 1747-1754, may 2012.

MAGALHÃES-SANTOS, I.F. Transmissão oral da Doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p. 226-235, mai./ago. 2014.

MAIA, J.G.S. et al. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 595-622, 2009.

- MARZZOCO, A. E TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- MASMOUDI, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, v. 7, n. 2, p. 31–41, june 2013.
- MATOS-ROCHA, T.J. et al. *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Planta medica**, v. 79, n. 14, p. 1307, aug. 2013.
- MELO, N.I. et al. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 762-773, 2011.
- MESSARITAKIS, I. et al. *Leishmania donovani* s.l.: evaluation of the proliferation potential of promastigotes using CFSE staining and flow cytometry. **Experimental Parasitology**, v.125, n. 4, 384-388, 2010.
- MORAES, J. et al. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 222–227, oct. 2012.
- MORAES, M.M. et al. Cicardian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. **Boletín Latino americano y Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 3, p. 270–277, may 2014.
- MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561–77, oct. 2005.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 9, p. 754-765, aug. 2008.
- NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Dinâmica**, 3^o ed., São Paulo: Atheneu, 2009.
- NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão interdisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008.
- NOVAES, A. DA S. et al. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 523–528, 15 mar. 2014.
- NUNES, C.S. et al. Leishmaniose mucosa: considerações epidemiológicas e de tratamento. **Revista Brasileira de Medicina Familiar e Comunidade**, v.6, n. 18, p.52-26, jan./mar. 2011.

- OLIVEIRA, D.R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná.- Brazil. **Journal Ethnopharmacol**, v. 108, p. 103-108, nov. 2006.
- PARMAR, V.S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, out. 1997.
- PARRA, J. E. et al. A new benzoic acid derivative isolated from *Piper cumananse* Kunth (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 590-592, nov. 2013.
- PEREIRA, R. J. & CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n.4, p. 146-152, nov. 2012.
- PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba –São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004.
- PESSINI, G. L. et al. Neolignan e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 3, n. 15, p. 199-204, july/sept. 2005.
- POTZERNHEIM, C. L. et al. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p. 246-251, abr./jun. 2006.
- PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SCUSSEL, V.M. (Org.). **Armazenagem de grãos**. Campinas: IBG, 2002.
- QUINTANS-JÚNIOR, L.J. et al. Plants with anticonvulsant properties - a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 798-819, 2008.
- RAMOS, L.S. et al. Essential oil of *Piper marginatum*. **Journal of Natural Products**, v.49, n.4, p. 712-741, july 1986.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- REA, A, et al. Solumarin isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 12, p. e2556, dec. 2013.
- REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

RIBEIRO, N. et al. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.76, n.1, p. 71-76, mar. 2016.

RIBEIRO, T.S. et al. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 13, p. 3555-3558, july 2004.

RISS, T.L. et al. **Cell Viability Assays** (chapter), “Assay Guidance Manual” (e-book), published May 1, 2013; updated July 1, 2016.

RODON, F.C.M. et al. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira Parasitologia**, v. 21, n. 3, p.185-191, july/sept. 2012.

RODRIGUES, K.C. Avaliação do efeito leishmanicida de derivados de lignanas dibenzilbutirolactônicas. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas a Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ROMANHA, A.J. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 233-238, march 2010.

SALES JUNNIOR, P.A. et al. The *in vitro* activity of fatty diamines and amino alcohols against mixed amastigote and trypomastigote *Trypanosoma cruzi* forms. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 362-364, april 2014.

SAMAIN, M.S. et al. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany**, v. 105, n. 5, p. 677–688, 1 maio 2010.

SANCHEZ, Y. et al. Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq. **Revista de Protección Vegetal**, v. 26, n. 3, p. 170-176, sept./dic. 2011.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 3–21. 2001.

SANTANA, Hellen Cristina Dias. **Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal**. 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SANTANA, H. T. et al. Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.17, n.1, p.105-111, jan./mar. 2015.

SARTORATTO, A. et al. Composition na antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 80-275, oct./dec. 2004.

SANTORO, G.F. et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283-290, july 2007.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 38-43. 2000.

SILVA, D.M. & BASTOS, C.N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p.143-145, mar./abr. 2007.

SILVA, J.K.R. et al. Essential oils of Amazon *Piper* species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 55–60, july 2014.

SILVA, M.H.L. **Tecnologia de Cultivo e produção racional de Pimenta longa (*Piper hispidinercium* C. DC.)**. 1993. 87f. Dissertação (Mestrado em Fitotequimia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1993.

SIMIONATTO, E. et al. Composition na antimicrobial activity of the essential oil from *Aloysia sellowii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p. 62-1458. nov./dec. 2005.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. “**Farmacognosia: da Planta ao medicamento**”. Porto Alegre: UFRGS , 2007.

SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Research**. v. 88, n. 12, p. 1013-102, july 2002.

SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 695–700, 1965.

- SRIVASTAVA, S. et al. Insecticidal Activity of Myristicin from *Piper mullesua*. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 226–229, sept. 2001.
- TELES, C.B.G. et al. Activity of the Lupane Isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 936-942, 2011.
- TRANCOSO, M.D. Projeto óleos essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Praxis**, v. 9, p. 89-96. 2013.
- VAN DER WERF, M.J. et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropical**, v. 86, p. 125-139, 2003.
- VIEGAS Jr. C. et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar./apr. 2006.
- VIOTTI, R. et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, 724–734, may 2006.
- VOGLER, B. et al. Cytotoxic flavonoids from the bark of *Lonchocarpus haberi* from Monteverde, Costa Rica. *Pharmacologyonline*, v. 3, p. 850-855, 2006.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance**. Weekly epidemiological record. No 38, V. 92, 557–572, 2017.
- WHO. World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**; 2018a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em 19.04.18
- WHO. World Health Organization. **Neglected tropical diseases**. 2018b. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
- WHO. World Health Organization. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization; 2010.
- YUAN, H. et al. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, apr. 2016.

Apêndice – A

Figura 1A. Cromatograma do óleo essencial de PM-27.10.12

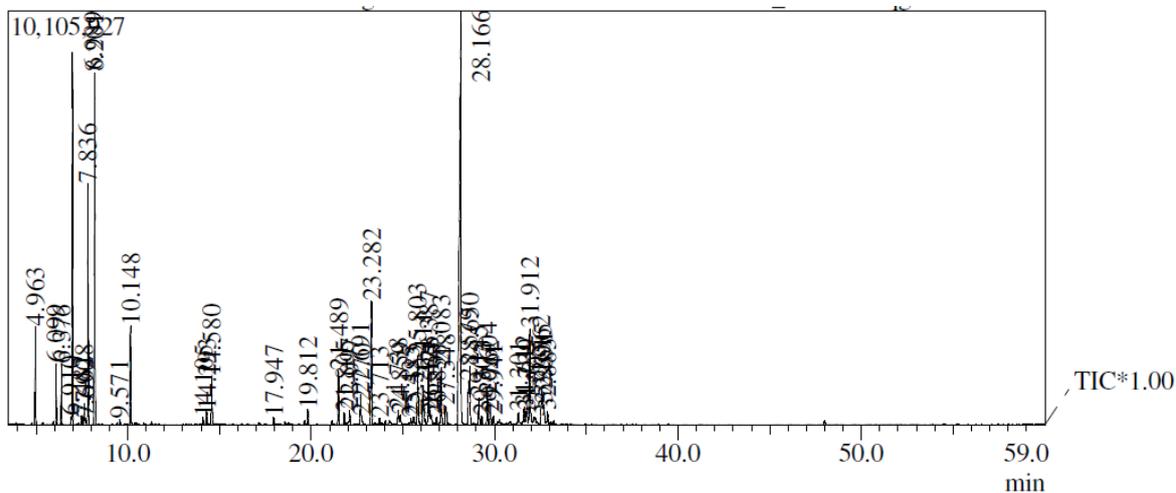


Figura 2A. Cromatograma do óleo essencial de PM-21.12.12

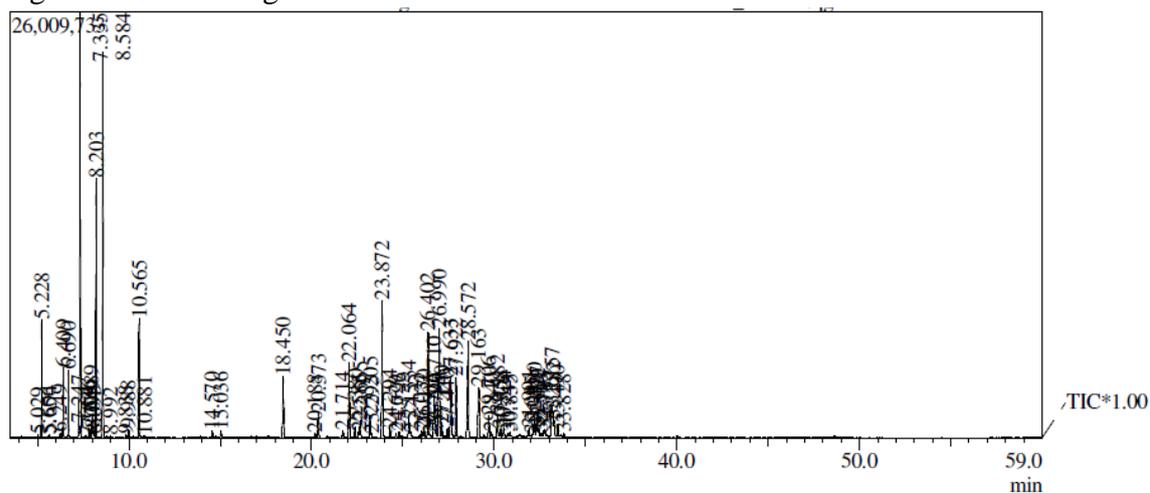


Figura 3A. Cromatograma do óleo essencial de PM-09.02.13

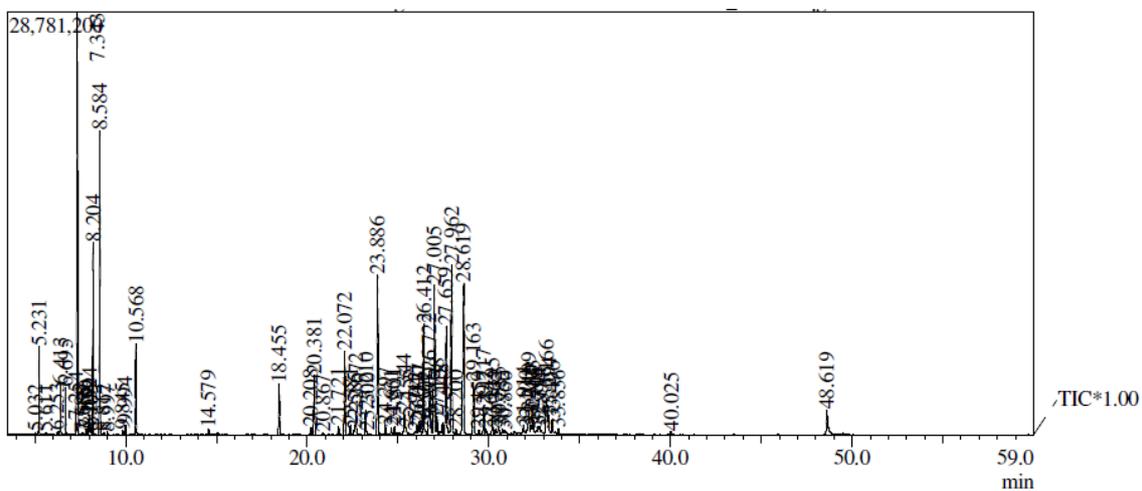


Figura 7A. Cromatograma do óleo essencial de PM-30.10.13

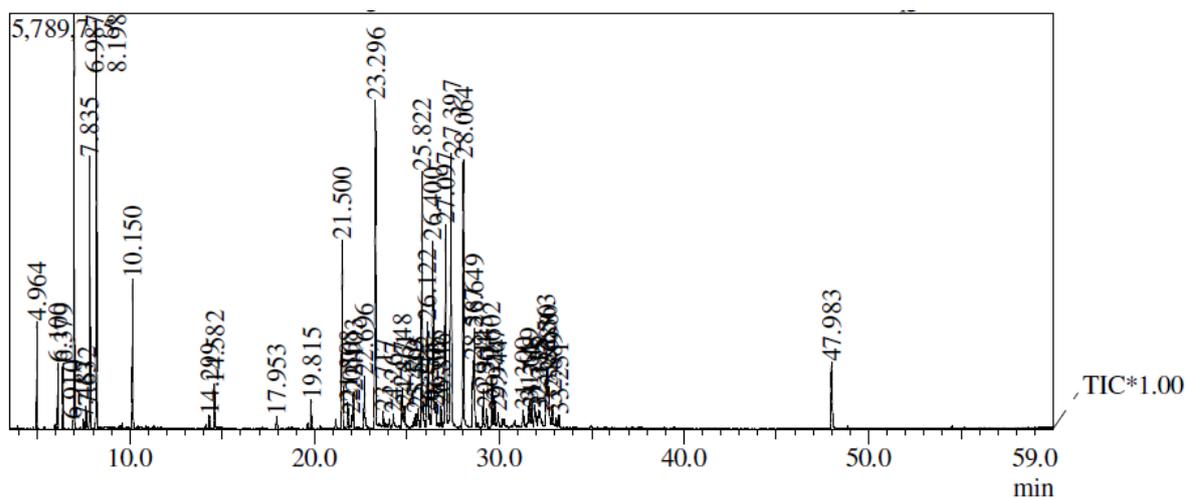


Figura 8A. Cromatograma do óleo essencial de PM-13.12.13

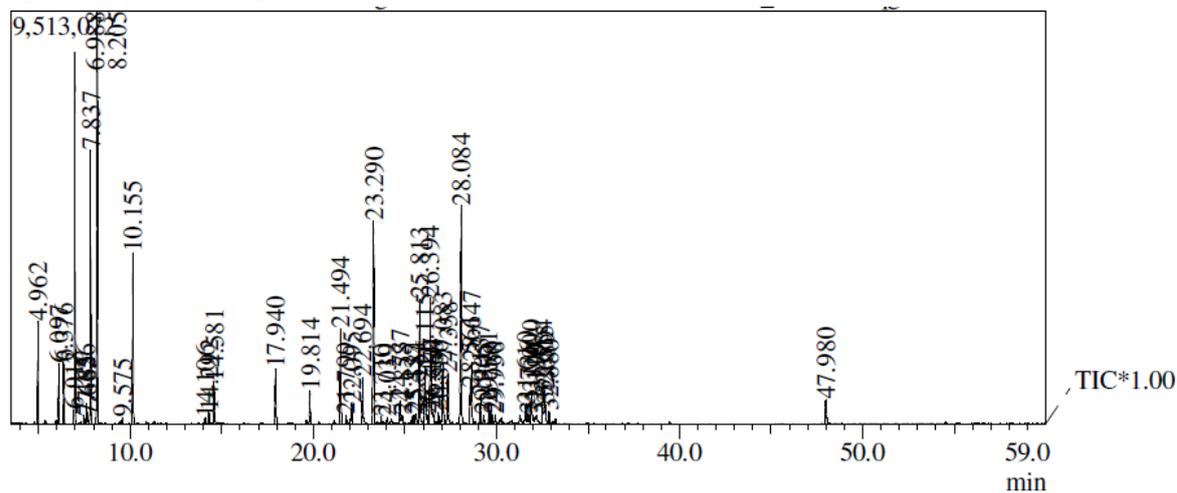


Figura 9A. Cromatograma do óleo essencial de PM-22.02.14

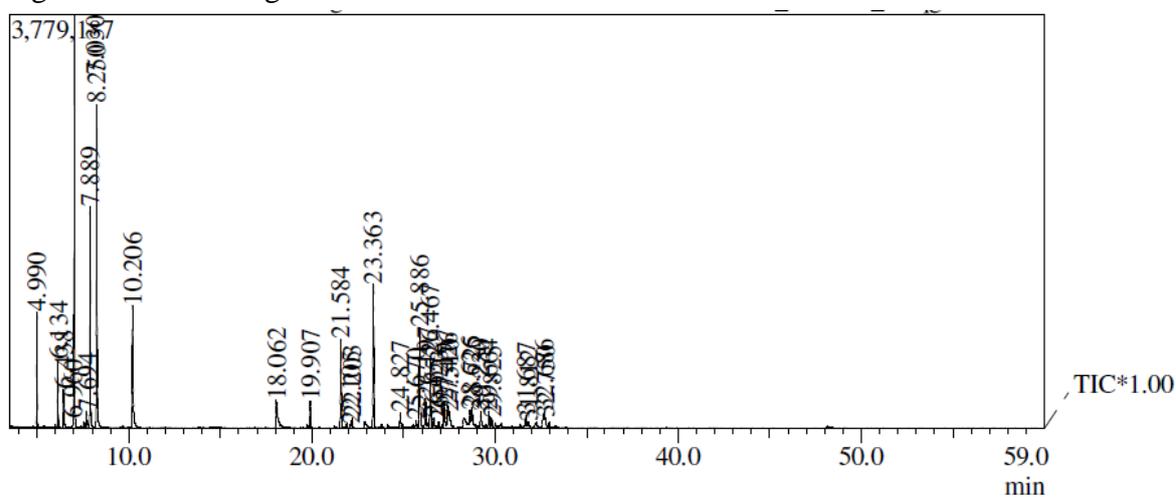


Figura 10A. Cromatograma do óleo essencial de PM-28.06.14

