

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE *Piper marginatum* JACQ. (PIPERACEAE)

Luiziani Mendonça FREITAS¹; Carlos Cleomir de Souza PINHEIRO²

¹Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; ²Pesquisador COTI/INPA

1. Introdução

A família Piperaceae é composta por cerca de 10 gêneros e aproximadamente 2000 espécies. São plantas de distribuição tropical, a maioria é herbácea (existem trepadeiras, arbustos e até raramente árvores) (Evans., 1991). Os dois gêneros da família: *Piper* e *Peperomia* encontram-se representados na flora brasileira (Joly, 1998). Espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas na medicina popular e, dentre as atividades biológicas descritas para este gênero, podem ser citadas as propriedades antitumorais de algumas amidas obtidas de *Piper tuberculatum* Jacq., assim como propriedades hipotensoras. Outra propriedade é a defesa contra insetos, induzido pela piperona, isoladas de *Piper futokadzura* Sieb. (Simões *et al.* 2000), assim como amidas identificadas em frutos de *Piper nigrum* (Park *et al.* 2002), além de alcalóides e amidas de *Piper longum* (Sung-eun Lee 2000). Sabendo que o gênero *Piper* apresenta em sua maioria das espécies ação farmacológica e fitoquímica, juntamente com o etnoconhecimento, o estudo da *Piper marginatum* Jacq. é de relevância importante para a comprovação destas atividades. Vendo que poucos estudos vêm sendo desenvolvidos a respeito da mesma, desenvolveu-se a grande necessidade de realizar novos estudos e testes ao seu respeito.

2. Material e Métodos

Foram realizadas as coletas de folhas de *Piper marginatum* Jacq. no herbário do INPA/Aleixo, Manaus-Am, pesados, secos em temperatura ambiente, triturados em liquidificador, pesados novamente e macerados para a extração pelo método de hidrodestilação para a obtenção do óleo essencial e extração com solventes de polaridade crescente: diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) para a obtenção dos extratos diclorometano (DCM) e hidroalcoólico, no período de 72 horas cada, de acordo com a metodologia (Kitayama 2001 ; Srivasta 2003). Amostras dos óleos essenciais da *Piper marginatum* Jacq. foram enviadas para o Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) onde foi realizada análise de CG-EM, sob o n° de solicitação 77/2013. Em resumo as amostras foram diluídas e injetadas no sistema CG-EM na concentração final 1mg/ml em diclorometano. A caracterização foi qualitativa comparativa dos espectros de massas com os tempos de retenção de acordo com a Literatura. Os extratos foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada (Chaves 1997), utilizando-se várias reações químicas, solventes ou misturas de solventes de diversas polaridades e reveladores como Iodo-ressublimado, Anisaldéido, Sulfato Cérico e Luz ultravioleta para a verificação e presença de compostos e substâncias presentes na *Piper marginatum* Jacq.: esteroides /triterpenóides, taninos /fenóis e saponinas. Para atividade farmacológica foram feitos ensaios de citotoxicidade com *Artemia salina* pela técnica (Meyer *et al.* 1982) para observar o nível de toxicidade da planta utilizando o óleo essencial e o extrato diclorometano (DCM).

3. Resultados e Discussão

Os óleos essenciais extraídos por hidrodestilação durante 8 horas apresentaram rendimento médio 2,4% (mL/100g da folha) com odor típico e coloração bege. Comparados com o rendimento do óleo essencial adquiridos na região da mata atlântica de Pernambuco que apresentaram um rendimento de 0,39%, os óleos essenciais obtidos no horto do Inpa tiveram um maior rendimento (Tabela 1). As diferenças encontradas para o rendimento do óleo essencial das amostras de *P. marginatum* de diferentes localidades podem ser explicadas, entre outros fatores, pelas condições climáticas de cada região.

Tabela 1. Rendimento dos óleos essenciais das folhas de *piper marginatum* Jacq.

Amostra	Rendimento volume (mL/100g)	Rendimento em peso (g/100g)
1	1,6	1,37
2	2,2	2,12
3	3,6	2,0

A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum*. Da amostra enviada para a análise via CG-EM, foram identificados um total de 30 substâncias, as quais representam 99,98% da área relativa do óleo essencial, que são apresentadas na Tabela 2.

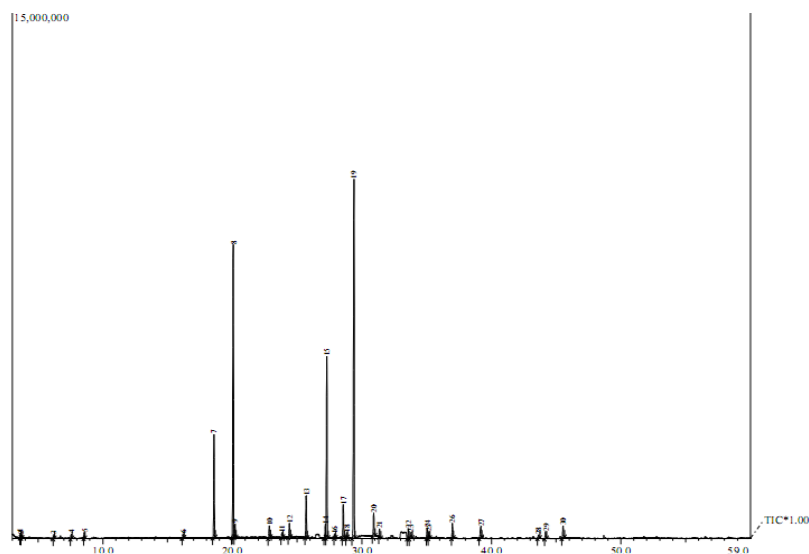


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Piper marginatum*.

Tabela 2: Substâncias identificadas no óleo essencial das folhas de *Piper marginatum*.

Tempo	Ind.cal	Ind.Liter	Substância	Área (%)
1	3.626	263669	2-Methyl-4-pentanol	0.20
2	3.717	212863	Ethyl 2-hydroxyisobutyrate	0.16
3	6.224	297281	2-Pinene	0.23
4	7.568	318268	Nopinene	0.25
5	8.559	437005	trans-.beta.-Ocimen	0.34
6	16.198	383290	Methyl chavicol	0.30
7	18.584	10102316	Anethol	7.78
8	20.065	29829700	Anethol	22.98
9	20.211	1306200	6-(1-Propenyl)-1,3-benzodioxole	1.01
10	22.852	1302091	Engenol	1.00
11	23.828	501295	alpha.-Copaene	0.39
12	24.406	1433102	beta.-Elemene	1.10
13	25.696	4406530	trans-Caryophyllene	3.40
14	27.183	1676478	alpha.-Humulene	1.29
15	27.293	19175052	Methyl Eugenol	14.77
16	27.899	425645	beta.-Elemene	0.33
17	28.564	3751337	beta.-Selinene	2.89
18	28.843	577359	alpha.-Guaiene	0.44
19	29.390	39983102	Methyl Eugenol	30.81
20	30.916	2632497	Elemol	2.03
21	31.364	816571	d-Nerolidol	0.63
22	33.581	966788	trans-2,4,5-Trimethoxypropenylbel	0.74
23	33.797	887950	Benzoic acid, 2,6-bis[(trimethylsilyl)	0.68
24	35.042	1275578	beta.-Eudesmol	0.98
25	35.176	654804	Juniper campho	0.50
26	36.991	1544191	trans-Asarone	1.19
27	39.185	1978890	Cyclononasiloxane, octadecamethyl- (CAS)	1.52
28	43.636	435480	MENTHYL CHLORIDE	0.34
29	44.181	793350	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-(CAS)	0.61
30	45.536	1418973	n-Hexadecanoic acid	1.09
		129787655		100.00

Das substâncias presentes, duas se apresentaram como majoritárias, com porcentagens de área entre 22,98% e 30,81%, sendo elas, o metil eugenol (30,81%) e anetol (22,98%). Estes compostos apresentam resultados semelhantes já relatados na literatura (Hurtado *et al.* 2012). A Figura 2 apresenta as estruturas moleculares para as substâncias majoritárias.

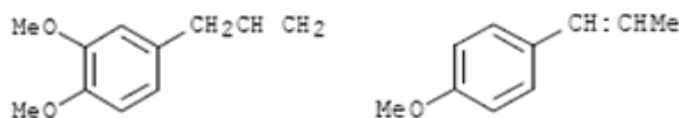


Figura 2. Estrutura do metil eugenol e anetol, respectivamente.

As placas cromatográficas dos óleos essenciais foram eluídas em acetato de etila/hexano (4:1) e não apresentaram mancha no espectro visível nem sob UV 365nm, observou-se apenas a presença de manchas isoladas sob UV 254 nm de coloração marrom escuro, prováveis sesquiterpenos.

O resultado dos testes cromatográficos com uso dos reveladores foram positivo para terpenos, terpenóides e flavonoides, sendo negativo para alcaloides sendo que o teste não exclui a presença desses compostos devido ser uma técnica preliminar, o que significa que eles estão em menor quantidade, de acordo com Silva *et al.* (2010).

A triagem fitoquímica foi realizada com o extrato hidroalcoólico e teve como resultado a coloração azul seguida de verde indicando a presença de taninos flobafênicos, e coloração verde permanente indicando a presença de esteroides livres e negativo para saponinas, pois não foi observada a formação de espumas.

Os testes de Citotoxicidade do óleo essencial e do extrato DCM com nauplios de *Artemia salina* tiveram toxicidade moderadamente tóxica e toxicidade fraca, respectivamente, como mostra a Tabela 3. A concentração letal média do óleo essencial (DL50) foi de 41,8µg/mL e a concentração letal do extrato DCM (DL50) 1402,3µg/mL sendo parâmetros importantes dentro da Farmacologia e Toxicologia.

Tabela 3. Citotoxicidade de larvas de *Artemia Salina* em diferentes concentrações do óleo essencial e o extrato DCM.

	N° de náuplios	Concentração µg/mL	Mortalidade (%)	
			24h	48h
Óleo essencial	90	40	27,8	48,8
		20	5,6	13,3
		10	0,0	0,0
Extrato DCM		1500	58,8	80,0
		1000	7,77	42,2
		500	0,0	6,66

4. Conclusão

Em virtude dos resultados obtidos, foi possível verificar que a espécie *Piper marginatum* Jacq. possui um considerável índice no rendimento do óleo essencial comparados com os resultados obtidos na literatura. Os compostos encontrados no óleo essencial são de grande interesse para a fitoquímica uma vez que possuem grandes propriedades para a produção de bioinseticidas e atividades fungitoxicas. O ensaio com *Artemia salina* mostrou que a citotoxicidade do óleo essencial foi altamente tóxica, revelando alto potencial farmacológico para atividade com células tumorais, uma vez que o ensaio com *Artemia salina* é o primeiro ensaio na busca com atividade antitumoral. Contudo, a citotoxicidade do extrato DCM foi moderadamente tóxica, mostrando potencial para a produção de biofármacos e biocosméticos. Além das atividades executadas e dos resultados obtidos com o projeto, realizar outros testes farmacológicos com a espécie será de grande importância para o potencial antiinflamatório e analgésico dentro da área farmacológica.

5. Referências Bibliográficas

- Chaves, M.H. 1997. Análise de extratos de plantas por Cromatografia em Camada Delgada: metodologia aplicada à disciplina "Química Orgânica". *Química Nova*, 20(5).
- Kitayama, T.; Yamamoto, K. 2001. Chemistry of zerumbone. Regulation of ring bond cleavage and unique antibacterial activities of zerumbone derivatives. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65(10): 2193-2199.

- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobson, L.B.; Nichols, D.E.; Mclaughlin, J.L.; Brine, S. 1982. A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Médica*, 4: 31-45.
- Park, I.K.; Lee, S.G.; Shin, S.C.; Park, J.D.; Ahn, Y.J. 2002. Larvacidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 1866-1870.
- Silva, N.L.A. da; Miranda, F.A.A.; Conceição, G.M. da. 2010. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, 6:025402.
- Simões, C.M.O.; Mentz, L.A.; Schenkel, E.P.; Irgang, B.E.; Stehann, J.R. 1988. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: UFRGS, ed. 5.
- Sung-eun Lee, S.E. 2000. Mosquito larvacidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum*. *Journal of American Mosquito Control Associatio*, 16(3): 245-247.