

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO E  
ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE UMA  
PLANTA MEDICINAL DO MÉDIO AMAZONAS

Bolsista: Yury Oliveira Lugo, FAPEAM

ITACOATIARA  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL  
PIB-E/0029/2008  
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO E  
ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ÓLEO ESSENCIAL DE UMA  
PLANTA MEDICINAL DO MÉDIO AMAZONAS

Bolsista: Yury Oliveira Lugo, FAPEAM  
Orientador: Msc. Geone Maia Corrêa

ITACOATIARA  
2009

## RESUMO

A família Piperaceae está entre as mais primitivas das Angiospermas e tem uma distribuição de aproximadamente 2000 espécies e 14 gêneros em todo planeta. Quimicamente a família apresenta em sua composição éteres e ésteres fenólicos, alcalóides, flavonóides e lignanas (GIBBS, 1974; EVANS, 1996). Motivo pelo qual, vem sendo extensivamente investigada como fonte de novos produtos naturais com potenciais antitumorais, antimicrobiano, antifúngico e inseticida. O gênero Piper, um dos mais abundantes e estudados, vem destacando-se pela sua grande importância econômica, devido ao acúmulo de metabólitos fixos e voláteis (óleos), que são industrialmente utilizados para os mais diversos fins (ALBIERO, 2005). *P. callosum*, é uma espécie de arbusto de 1,00 a 1,20m, de caule e ramos nodosos, folhas alternas, oblongas acuminadas, de nervuras salientes na face dorsal, flores diminutas, amareladas, dispostas em espigas carnosas (BERG, 1982). Tem denominações populares como: elixir-paregórico, ventre-livre, óleo-elétrico, e é utilizada como afrodisíaco, adstringente, digestiva, antidiarréica, hemostática local, antileucorréica, etc. Em função disto o presente trabalho teve como objetivos: caracterizar quimicamente a composição do óleo essencial das folhas de *P. callosum* através de CG-EM, efetuar ensaio frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e observar a variação da composição química por acompanhamento sazonal. A espécie estudada, foi coletada na estrada AM-010, Km 8, próximo ao município de Itacoatiara-AM. Suas folhas foram submetidas ao processo de destilação por arraste com vapor d'água por 6h, usando um sistema de Clevenger. A análise química do óleo obtido foi realizada por cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) em cromatógrafo SHIMADZU QP 2010 provido de uma coluna DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m), modo de ionização de impacto de elétrons injetor a 250°C (3°C/min), interface a 250°C, com variação de temperatura de 60° a 240°C (3°C/min) sendo hélio o gás de arraste (1.3 ml/min). O detector usado foi um espectrômetro de massas modelo QP2010. Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados através do cálculo dos índices de retenção de cada componente e posterior comparação com o banco de dados do espectrômetro e literatura especializada. Durante a hidrodestilação foi obtido da espécie estudada um óleo essencial com propriedades físicas diferentes, sendo primeiramente obtido um óleo incolor mais denso que a água (OE+) e posteriormente um óleo de coloração amarela, menos denso que a água (OE-). As análises do óleo essencial de *Piper callosum*, por CG-EM demonstraram alto teor de safrol 80,91% e 40,79% respectivamente nas folhas para ambos os óleos obtidos. Foi verificado ainda que, para os dois, os compostos  $\beta$ -pineno 5.08% e metil-eugenol 9.24% são uns dos constituintes principais, sendo que estes estão presentes também em outras espécies da mesma família. Quanto à variação no teor de óleo foi observado o maior rendimento no mês de março e menor em junho, os ensaio do óleo essencial obtido frente a *A. salina* revelou DL50 = 20,79  $\mu$ g/mL, sendo considerado tóxico conforme a literatura.

## ABSTRACT

The Piperaceae family is among the most primitive of angiosperms and has a distribution of approximately 2000 species and 14 genera on the world. Chemically the family has present ethers and esters in the composition, and other such as: phenolic compounds, alkaloids, flavonoids and lignans (Gibbs, 1974, Evans, 1996). For this Reason, has been extensively investigated as a source of new natural products with potential anticancer, antimicrobial, antifungal and insecticide. The genus Piper, is one of the most abundant and very studied, has been standing out for its great economic importance due to the accumulation of fixed and volatile metabolites (oils), which are industrially used for different purposes (ALBIERO et al., 2005) . *P. callosum*, is a shrub from 1.00 to 1.20 m, stem branches, leaves alternate, oblong acuminate, prominent veins on the dorsal surface, flowers small, yellowish, fleshy ears arranged Berg et al. 1982). It has popular names such as, elixir paregórico, ventre livre, óleo elétrico, and is used as an aphrodisiac, astringent, digestive, anti-diarrheal, hemostatic local antileucorrheic, etc.. Because of this the present study aimed to characterize the chemical composition of essential oil from leaves of *P. callosum* by GC-MS, realize testing against the brine shrimp and observe the variation of chemical composition by monitoring seasonal. The species studied were collected on the road AM-010, Km 8, near the town of Itacoatiara-AM. The essential oils were extracted by steam distillation with water vapor for 6 hours, using a system of Clevenger. Chemical analysis of the oil obtained was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS) on Shimadzu QP 2010 gas chromatograph equipped with a DB-5MS column (30m x 0.25 mm x 0.25 µm), mode of ionization Impact of electron to 250 ° C (3 ° C / min), interface to 250 ° C, with temperature range of 60 to 240 C (3 ° C / min) and helium carrier gas (1.3 mL / min). The detector used was a mass spectrometer model QP2010. The constituents of essential oils were identified by calculating the retention indices of each component and for comparison with the database of the spectrometer and literature. During hydrodistillation was obtained from the studied species essential oil with different physical properties, first obtained a colorless oil more dense than water (OE +) and then a yellow oil, less dense than water (OE-). The analysis of essential oil of *Piper callosum*, by GC-MS showed high content of safrole 80.91% and 40.79% respectively in leaves  $\alpha$ -pinene 5.08% for both oils obtained. It was found that, for the two compounds methyl-eugenol and 9.24% are a major constituent, and these are also present in other species of the same family. The variation in oil content had the highest income in the month of March and lowest in June, the test of essential oil obtained compared to *A. saline* showed DL50 = 20.79 mg / mL considered toxic to brine shrimp according to the literature.

## LISTA DE FIGURAS

FIG. 1: Estrutura química da morfina	8
FIG. 2: Estrutura química da cocaína	8
FIG. 3: Flavonóide	8
FIG. 4: Fenilpropanóide	9
FIG. 5: Óleo essencial	9
FIG. 6: Espécie do gênero <i>Piper</i>	9
FIG. 7: <i>Piper callosum</i>	11
FIG. 8: Safrol	15
FIG. 9: Metil-eugenol	15
FIG. 10: $\beta$ -pineno	15
FIG. 11: $\alpha$ -pineno	15
FIG. 12: $\gamma$ -terpineno	15
FIG. 13: ( <i>E</i> )-cariofileno	15
FIG. 14: $\alpha$ -copaeno	15

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Rendimentos de OE	14
Gráfico 1: Rendimento de OE das amostras de nov/08 a jun/09	14
Tabela 2: OESLS-	16
Tabela 3: OESLS+	16
Tabela 4: OESES-	17
Tabela 5: OESES+	18
Tabela 6: OESI-	18
Tabela 7: OESI+	19

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	8
1.1 Plantas medicinais	8
1.2 Óleos essenciais	8
1.3 Família Piperaceae	9
2.0 REVISÃO BIBLIOGÁFICA	10
3.0 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4.0 MÉTODOS UTILIZADOS	13
4.1 Material Vegetal	13
4.2 Obtenção do óleo essencial	13
4.3 Análises dos óleos (CG-EM)	13
4.4 Variação sazonal	13
4.5 <i>Artemia Salina</i>	13
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	14
6.0 CONCLUSÕES	20
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

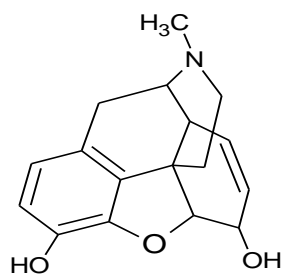
# 1.0 INTRODUÇÃO

## 1.1 Plantas medicinais:

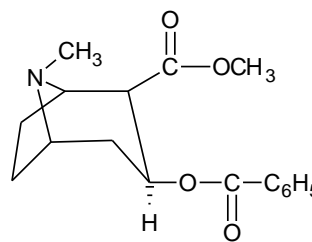
As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado de saúde tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos. Elas aparecem como parte do cuidado tradicional de saúde em muitas partes do mundo ao longo de décadas e têm despertado o interesse de vários pesquisadores (CUNHA, 1995; COWAN, 1999; MICHELIN *et al.*, 2005).

O conhecimento tradicional de grupos sociais que fazem uso das plantas é a fonte essencial para a descoberta dos princípios ativos (substâncias capazes de exercer uma ação de cura) responsáveis no combate de doenças (DI STASI, 1996).

Após séculos de uso empírico, os primeiros estudos científicos de plantas medicinais datam do século XIX. Nesta época foram isolados alguns compostos de plantas que se afirmaram como princípios ativos eficazes e de grande importância para a Medicina, a exemplo da cânfora, da quinina, da morfina (FIGURA 1), da estriquinina e da cocaína (FIGURA 2) (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991).

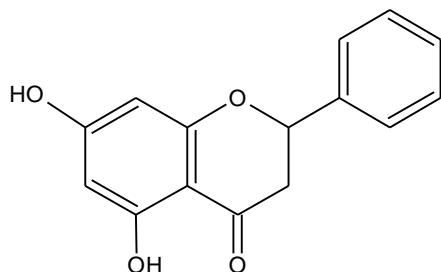


1. Morfina



2. Cocaína

Em toda parte da planta podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e que dão origem a uma série de substâncias conhecidas como alcalóides, flavonóides (FIGURA 3), cumarinas, saponinas, entre outras, além dos óleos essenciais (SIMÕES E SPITZER *et al.*, 2004).



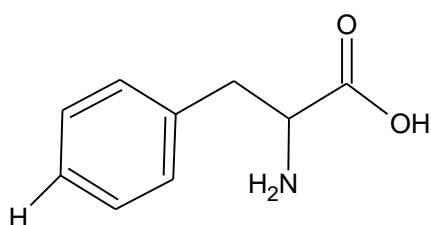
3. Flavonóide (5,7-diidroxi flavanona)

## 1.2 Óleos essenciais:



Uma das classes mais importante é a dos óleos essenciais, que são princípios ativos presentes em plantas aromáticas constituído de uma mistura de substâncias voláteis e hidrofóbicas. Suas características mais peculiares são ter, além do aroma agradável, sabor, volatilidade, insolubilidade ou pouca solubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos e, quando liberados pelas plantas, agem como sinais químicos para a comunicação entre espécies, na proteção contra microorganismos, herbívoros e intempéries ambientais. Geralmente apresentam atividade ótica, coloração do incolor ao amarelado que em temperatura ambiente está na forma oleosa (SIMÕES E SPITZER *et al.*, 2004).

A composição destes óleos é bastante complexa, uma vez que se podem encontrar diversos compostos aromáticos e alifáticos, derivados de fenilpropanóides (FIGURA 4) e terpenóides. Apresentam, normalmente, um ou dois compostos majoritários na sua constituição (GONÇALVES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).



4. Fenilpropanóide (fenilalanina)



5. Óleo essencial

### 1.3 Família Piperaceae:

Sob o ponto de vista químico a família Piperaceae é citada pela presença de ésteres e éteres fenólicos, alcalóide pirrolidínicos, óleos voláteis e lignanas (GIBBS, 1974; EVANS, 1996). O mais pesquisado é, sem dúvida, o gênero *Piper* L. tendo sido isoladas várias substâncias pertencentes a alguns dos grandes grupos como: alcalóides, principalmente os amídicos, lignanas, flavonóides, lactonas, butenólidos, ciclohexano-epóxidos (CALLE-ALVAREZ, 1983; BURKE & NAIR, 1986; SENGUPTA & RAY, 1987). A família Piperaceae vem sendo extensivamente investigada como fonte de novos produtos naturais com potenciais antitumorais, antimicrobiano, antifúngico e inseticida (LAGO *et al.*, 2005; PARMAR *et al.*, 1997).



6. Espécie do gênero *Piper* (Piperaceae) ([www.henriettesherbal.com](http://www.henriettesherbal.com))

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo a OMS (WHO, 2002), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos”.

Fitoterápico, de acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária (portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995), é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefícios para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas”.

A natureza tem fornecido um número expressivo de substâncias orgânicas, sendo os organismos do Reino Vegetal um dos principais contribuintes. O fascinante potencial de fornecimento de novas substâncias deve-se à incrível capacidade desses organismos em biossintetizar os mais variados tipos de estruturas moleculares. A diversidade e a complexidade das moléculas é algo realmente fantástico e, portanto seria um desperdício não se beneficiar da enorme capacidade de síntese das plantas (COWAN, 1999).

Embora os vegetais contenham milhares de constituintes químicos, as propriedades terapêuticas estão especialmente relacionadas com os chamados metabólitos secundários. Os metabólitos secundários são compostos micromoleculares evolutivamente selecionados para conferir vantagens adaptativas às plantas. Essas substâncias participam diretamente das interações bioquímicas de convivência e comunicação entre as plantas e os vários organismos vivos no sistema ambiental (COWAN, 1999).

Os óleos essenciais, por exemplo, são substâncias orgânicas, puras, voláteis e extremamente potentes. Eles têm uma composição complexa, podendo conter mais de 400 componentes. A composição desses pode variar quando também variarem as condições externas. O clima, altitude e a composição do solo influenciam no teor dos compostos do óleo essencial que são, entre outros, os terpenos, cetonas, aldeídos, alcoóis, ésteres, ácidos carboxílicos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). A substância química majoritária e a relação entre todos os compostos determinam o aroma e a aplicação do óleo essencial (SIMÕES E SPITZER *et al.*, 2004).

Podem ser encontrados em pêlos glandulares (Lamainaceae), canais oleíferos (Apiaceae), bolsas lisígenas ou esquisolisígenas (Pinaceae, Rutaceae) e células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), e podem estar presentes em diferentes órgãos da planta, como flores, caules, raízes, frutos e folhas, entre outros (SIMÕES E SPITZER *et al.*, 2004).

São utilizados na via oral e dérmica – com aplicação terapêutica; flavorizantes, perfumaria e aromaterapia. Diferenciam-se dos óleos fixos, pois ao entrarem em contato com o papel formam manchas gordurosas, porém desaparecem em pouco tempo – devido à alta volatilidade do óleo essencial. São obtidos principalmente por hidrodestilação (destilação por arraste de vapor), decantação, aparelho de Soxhlet, extração a quente e a frio, expressão

(prensa). A conservação dos óleos essenciais é feita condicionando o material sob o abrigo de luz, calor e água com impurezas. Isso é indispensável, pois, os óleos essenciais em ambiente com temperaturas altas, podem ser volatilizados levando junto o princípio ativo; local sob a luz pode promover a oxidação de princípios fotossensíveis e acondicionados em local úmido e sujo pode gerar o crescimento de fungos e microorganismos que degradarão do material (CALIXTO, 2005).

O controle de qualidade é realizado a partir da identificação e do doseamento dos princípios ativos contidos no óleo essencial. O óleo essencial pode ser analisado por métodos químicos, físicos e cromatográficos (CALIXTO, 2005).

Grande parte das espécies do gênero *Piper* destaca-se pelo seu uso na medicina popular e por sua vasta importância econômica devido ao acúmulo de metabolitos fixos e voláteis de grande utilidade para a indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola (SILVA & MACHADO, 1999; PARMAR *et al.*, 1997).

A família Piperaceae pertence à ordem das Piperales, é considerada uma das famílias mais primitivas entre as angiospermas. É composta por aproximadamente 14 gêneros e cerca de 2000 espécies (MABBERLEY, 1997). É pantropical com espécies distribuídas pelas Américas desde o México até o sudoeste da Argentina, encontrando-se plantas de porte arbustivo, herbáceo ou arbóreo com mais de três metros de altura (FIGUEIREDO & SAZIMA, 2000; ALBIERO *et al.*, 2005). Desta família, os gêneros *Piper* e *Peperomia* são os mais abundantes com aproximadamente 700 e 600 espécies respectivamente (JOLY, 1985; PARMAR *et al.*, 1997), e também os mais estudados quimicamente.

*Piper callosum*, exemplar da família Piperaceae, popularmente conhecido como 'panquilé', João Brandim, elixir-paregórico, ventre-livre, óleo-elétrico, etc., é uma espécie de arbusto de 1,00 a 1,20m, de caule e ramos nodosos; folhas alternas, oblongas acuminadas, de nervuras salientes na face dorsal; flores diminutas, amareladas, dispostas em espigas carnosas, (FIGURA 7) (BERG *et al.*, 1982). É utilizada como afrodisíaco, adstringente, digestiva, anti-diarréica, hemostática local, antileucorréica, em picadas de mosquito, etc. (ALBUQUERQUE, 1989 e VIEIRA, 1991).



7. *Piper callosum*

## 3.0 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral:

- Realizar caracterização fitoquímica de óleo essencial das folhas de *Piper callosum*.

### 3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar quimicamente a(s) substância(s) por CG-EM.
- Observar a variação da composição química por acompanhamento sazonal
- Efetuar ensaio frente ao microcústáceo *A. salina*.

## 4.0 MÉTODOS UTILIZADOS

### 4.1 Material Vegetal

As amostras de *P. callosum* foram coletadas bimestralmente durante o período de novembro 2008 a junho de 2009. Foram definidos três pontos de coleta: No município de Itacoatiara, na estrada AM-010, Km 8 e Lago do Cerpa. Totalizando doze amostras analisadas.

### 4.2 Obtenção do óleo essencial

Procedeu-se à extração dos óleos voláteis das folhas de *Piper callosum* por hidrodestilação, em aparelho de Clevenger modificado, de acordo com a técnica descrita na Farmacopéia Européia (1999) e (GOTTLIEB & MAGALHÃES, 1960).

Os rendimentos dos óleos obtidos foram determinados para cada uma das amostras processadas em relação à matéria prima *in natura*.

### 4.3 Análises dos óleos (CG-EM)

A análise química do óleo obtido foi realizada por cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS) em cromatógrafo SHIMADZU QP 2010 provido de uma coluna DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm), modo de ionização de impacto de elétrons injetor a 250°C (3°C/min), interface a 250°C, com variação de temperatura de 60° a 240°C (3°C/min) sendo hélio o gás de arraste (1.3 ml/min). O detector usado foi um espectrômetro de massas modelo QP2010.

Os constituintes dos óleos essenciais foram identificados através do cálculo dos índices de retenção de cada componente e posterior comparação com o banco de dados do espectrômetro e literatura especializada.

### 4.4 Variação sazonal

A espécie selecionada foi coletada a cada dois meses, a fim de observar a variação do perfil químico da espécie.

### 4.5 Artemia Salina

Em um aquário de vidro, os cistos de *A. salina* foram incubados na solução salina (10 mg de cistos/100 mL de solução), sob iluminação artificial a 28°C. Após 24 horas foram transferidos o primeiro estágio larval-(náuplio), para outro aquário com solução salina, e mantido em nova incubação por mais 24 horas, sob mesmas condições. Após essa incubação, obtiveram-se apenas estágios de metanáuplios do microcrustáceo.

Os ensaios foram preparados em triplicata, a partir do óleo obtido nas concentrações de (10, 20, 30, 50 e 80 µg/mL) em DMSO, e transferidos para tubos de ensaio, sendo ainda adicionados as larvas de *A. salina* (10/tubo), em um volume final de 5 mL de solução salina. As culturas de *A. salina* foram incubadas a 28°C, após 24 horas, os microcrustáceos imóveis e/ou depositados no fundo do tubo de ensaio foram considerados como mortos.

A determinação do número de sobreviventes e de mortos foram calculados em porcentagens de mortos e posteriormente transformados através de análise estatística pelo programa Jandel scientific, para cálculo da DL<sub>50</sub>.

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizadas coletas bimestrais da espécie estudada, sendo devidamente codificadas de acordo com as características do local e mês de coleta apresentadas na tabela abaixo:

Tabela 1: Rendimentos de óleo essencial

Mês	local	Código	Temp. de coleta	Massa da amostra	Tempo de extração	Rendimento
Nov	Lago	OESLS	26°C	554,30 g	6h	0,40%
Nov	Ramal	OESES	26°C	201,55 g	6h	0,65%
Nov	Cidade	OESI	28°C	303,77 g	6h	0,53%
Jan	Lago	OEJLS	27°C	1920,71g	6h	0,38%
Jan	Ramal	OEJES	24°C	502,65g	6h	0,51%
Jan	Cidade	OEJI	25°C	370,90g	6h	0,47%
Mar	Lago	OEMLS	24°C	188,87g	6h	1,68%
Mar	Ramal	OEMES	25°C	324,70g	6h	1,12%
Mar	Cidade	OEMI	26°C	141,20g	6h	0,52%
Jun	Lago	OEJULS	27°C	697,93g	6h	0,38%
Jun	Ramal	OEJUES	28°C	351,30g	6h	0,48%
Jun	Cidade	OEJUI	27°C	47g	6h	0,40%

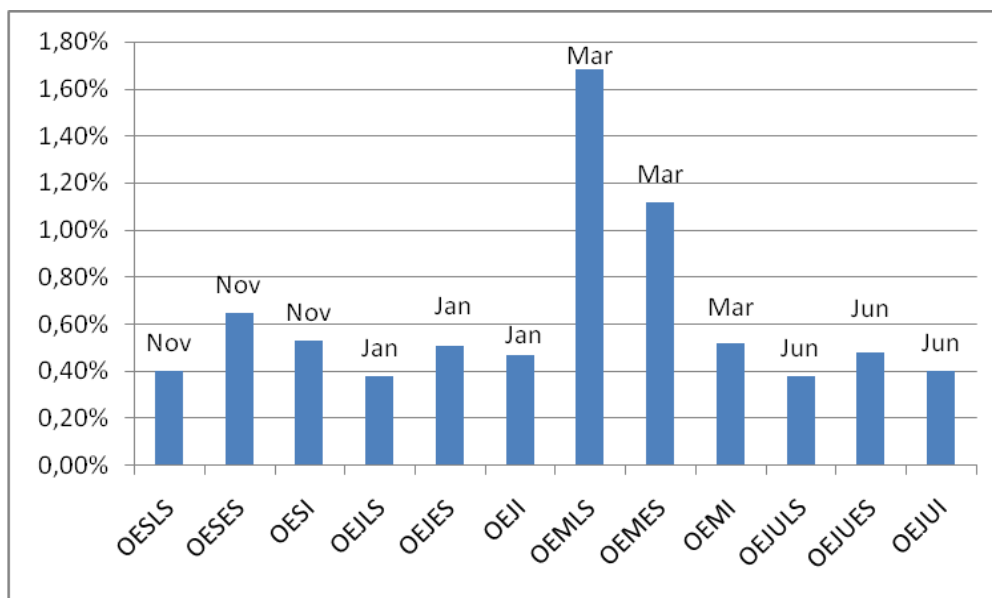
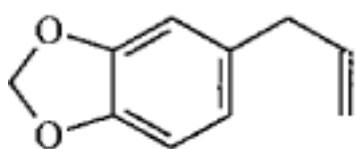


Gráfico 1: Rendimentos de óleo essencial das amostras de nov/08 a jun/09

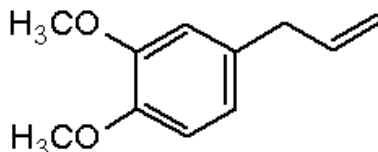
Os rendimentos de óleos essenciais das amostras acima correspondem a coletas realizadas no final do tempo de seca (nov/08), na cheia (jan e mar/09)

e fim da cheia (jun/09). Pode-se observar uma pequena diferença no rendimento de óleo quando comparadas as amostras coletadas nos meses de novembro, janeiro e junho. Entretanto não se pode dizer o mesmo para o mês de março, que apresentou um aumento significativo no rendimento de óleo para as amostras coletadas no lago e no ramal, porém as amostras da cidade mantiveram o padrão. Essa variação é descrita na literatura por GOBBO-NETO & LOPES (2007), onde é destacado que o rendimento dos óleos é inibido tanto pela variação tanto pela variação da temperatura como pelo tempo de colheita, como é o caso de *P. callosum* que produz melhor na cheia como mostrado no Gráfico 1.

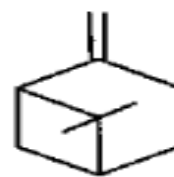
Durante a hidrodestilação foi obtido da espécie estudada, rendimentos variados de 0.40%, 0.65% e 0.53% no mês de novembro que foi o único analisado por CG-EM. Obteve-se um óleo essencial com propriedades físicas diferentes, sendo primeiramente obtido um óleo incolor mais denso que a água (OE+) e posteriormente um óleo de coloração amarela, menos denso que a água (OE-). As análises por CG-EM de OE+ revelaram a presença de 22 compostos, tendo o safrol como constituinte majoritário, com 80.91%. Para essa amostra foi detectado também:  $\beta$ -pineno (5.08%), metil-eugenol (4.04%),  $\alpha$ -pineno (1,76%),  $\gamma$ -terpineno (1.58%). Para OE- foram observadas 38 substâncias das quais o safrol e  $\beta$ -pineno apresentaram maior concentração com áreas de 40.79% e 11.35% respectivamente. O metil-eugenol (9.24%),  $\alpha$ -pineno (7.27%), euasareno (4.78%),  $\gamma$ -terpineno (3.55%),  $\beta$ - eudesmol (2.65%), germacreno D (2.53%), trans-cariofileno (1.96%),  $\alpha$ -copaeno (1.37%) como constituintes minoritários.



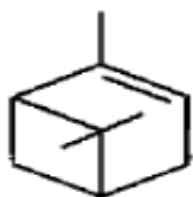
8. Safrol



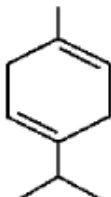
9. Metil-eugenol



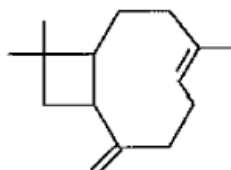
10.  $\beta$ -pineno



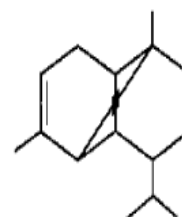
11.  $\alpha$ -pineno



12.  $\gamma$ -terpineno



13. (*E*)-cariofileno



14.  $\alpha$ -copaeno

Os constituintes voláteis foram, na sua maioria, tentativamente identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca computacional e pela determinação experimental dos índices de Kováts, aplicando-se uma série homóloga de n-alcenos nas mesmas condições usadas para a injeção dos óleos essenciais. Os valores assim obtidos foram, então, comparados com os índices de Kováts disponíveis na literatura. A identificação definitiva de alguns constituintes voláteis foi realizada

pela co-injeção de padrões químicos aos óleos essenciais. Somente as identificações baseadas nos dados de espectrometria de massas associada à coeluição dos óleos com compostos padrões foram consideradas definitivas, demonstradas nas tabelas abaixo.

Tabela 2: OESLS-

Componentes	IR <sub>Lit.</sub>	IR <sub>Expe.</sub>	% relativa
$\alpha$ -tujeno	931 <sup>a</sup>	924	0,11%
$\alpha$ -pineno	939 <sup>c</sup>	932	7,27%
Canfeno	952 <sup>a</sup>	948	0,66%
Sabineno	975 <sup>b</sup>	971	0,86%
$\beta$ -pineno	979 <sup>b</sup>	977	11,35%
$\beta$ -mirceno	991 <sup>b</sup>	987	0,57%
$\alpha$ -felandreno	1003 <sup>b</sup>	1007	0,10%
$\alpha$ -terpineno	1018 <sup>a</sup>	1016	1,31%
Limoneno	1029 <sup>c</sup>	1027	0,59%
1,8-cineol	1031 <sup>c</sup>	1031	1,04%
$\gamma$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1056	3,55%
$\alpha$ -terpinoleno	1088 <sup>a</sup>	1084	0,85%
Terpinen-4-ol	1177 <sup>a</sup>	1179	0,38%
Safrol	1289 <sup>e</sup>	1291	40,79%
$\alpha$ -copaeno	1377 <sup>b</sup>	1372	1,60%
Metil-eugenol	1404 <sup>d</sup>	1400	9,24%
Trans-cariofileno	1418 <sup>a</sup>	1415	1,96%
$\alpha$ -humuleno	1454 <sup>d</sup>	1455	0,53%
$\alpha$ -amorfenol	1478 <sup>f</sup>	1471	1,37%
Germacreno - D	1485 <sup>c</sup>	1476	2,53%
$\alpha$ -muuroleno	1500 <sup>c</sup>	1494	0,47%
$\delta$ -cadineno	1523 <sup>a</sup>	1514	1,49%
$\alpha$ -cadinol	1654 <sup>c</sup>	1640	0,33%
Naftaleno	1638 <sup>a</sup>	1642	1,20%
$\beta$ -eudesmol	1651 <sup>b</sup>	1650	2,65%
25 componentes			92,80%

a= Torres et al, 2008; b= Cysne et al, 2005; c= Barros et al, 2009; d= Silva et al, 1999; e= Adams et al, 1995; f= Vallilo et al, 2006.

Tabela 3: OESLS+

Componentes	IR <sub>Lit.</sub>	IR <sub>Expe.</sub>	% relativa
$\alpha$ -pineno	939 <sup>b</sup>	932	1,36%
Canfeno	954 <sup>a</sup>	948	0,24%
Sabineno	975 <sup>b</sup>	971	0,34%
$\beta$ -pineno	979 <sup>b</sup>	977	4,08%
$\beta$ -mirceno	991 <sup>b</sup>	987	0,22%
$\alpha$ -felandreno	1003 <sup>b</sup>	1007	0,10%



1,8-cineol	1031 <sup>c</sup>	1031	1,06%
$\gamma$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1056	1,28%
$\alpha$ -terpinoleno	1088 <sup>a</sup>	1084	0,27%
Linalol	1097 <sup>b</sup>	-	-
Isoborneol	1156 <sup>c</sup>	1162	0,18%
Terpinen-4-ol	1177 <sup>a</sup>	1179	0,15%
Safrol	1289 <sup>e</sup>	1291	80,92%
Metil-eugenol	1404 <sup>d</sup>	1400	4,04%
Trans-cariofileno	1419 <sup>b</sup>	1415	1,26%
$\alpha$ -humuleno	1450 <sup>b</sup>	1455	0,53%
Naftaleno	1638 <sup>a</sup>	1642	1,0%
$\beta$ -eudesmol	1651 <sup>b</sup>	1650	2,35%
18 componentes			99,38%

a= Torres et al, 2008; b= Cysne et al, 2005; c= Barros et al, 2009; d= Silva et al, 1999; e= Adams et al, 1995.

Tabela 4: OESES-

Componentes	IR <sub>Lit.</sub>	IR <sub>Expe.</sub>	% relativa
$\alpha$ -tujeno	924 <sup>a</sup>	924	0,09%
$\alpha$ -pineno	939 <sup>b</sup>	932	6,85%
Canfeno	954 <sup>a</sup>	948	0,35%
Sabineno	975 <sup>b</sup>	971	2,01%
$\beta$ -pineno	979 <sup>b</sup>	977	7,70%
$\beta$ -mirceno	991 <sup>b</sup>	987	0,68%
$\alpha$ -felandreno	1003 <sup>b</sup>	1007	0,14%
$\alpha$ -terpineno	1018 <sup>a</sup>	1016	0,67%
m-cimeno	1022 <sup>b</sup>	1023	0,26%
Limoneno	1029 <sup>c</sup>	1027	0,67%
1,8-cineol	1031 <sup>c</sup>	1031	2,33%
$\beta$ -ocimeno	1040 <sup>b</sup>	1043	2,33%
$\gamma$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1056	2,8%
$\alpha$ -terpinoleno	1088 <sup>a</sup>	1084	0,40%
Linalol	1097 <sup>b</sup>	-	0,16%
Terpine-4-ol	1177 <sup>a</sup>	1179	0,56%
Safrol	1289 <sup>e</sup>	1291	41,67%
$\alpha$ -copaeno	1377 <sup>b</sup>	1372	1,60%
Metil-eugenol	1404 <sup>d</sup>	1400	11,97%
Trans-cariofileno	1419 <sup>b</sup>	1415	1,84%
$\alpha$ -humuleno	1450 <sup>b</sup>	1455	0,50%
$\alpha$ -amorfenol	1478 <sup>f</sup>	1471	1,47%
Germacreno - D	1485 <sup>c</sup>	1476	3,56%
$\alpha$ -muuroloeno	1500 <sup>d</sup>	1494	0,65%
$\delta$ -cadineno	1523 <sup>a</sup>	1514	1,20%
Elimicin	1543 <sup>a</sup>	1547	4,72%
Nerolidol	1563 <sup>c</sup>	1560	0,17%
Calareno	1635 <sup>c</sup>	1638	0,35%
$\alpha$ -candinol	1639 <sup>b</sup>	1640	0,36%

$\delta$ -cadinol	1638 <sup>c</sup>	1643	1,20%
$\beta$ -eudesmol	1651 <sup>d</sup>	1650	0,18%
31 componentes			99,44%

a= Torres et al, 2008; b= Cysne et al, 2005; c= Barros et al, 2009; d= Silva et al, 1999; e= Adams et al, 1995; f= Vallilo et al, 2006.

Tabela 5: OESES+

Componentes	IR <sub>Lit.</sub>	IR <sub>Expe.</sub>	% relativa
$\alpha$ -pineno	939 <sup>b</sup>	932	1,30%
Canfeno	940 <sup>d</sup>	948	0,15%
Sabineno	975 <sup>b</sup>	971	0,44%
$\beta$ -pineno	979 <sup>b</sup>	977	2,74%
$\beta$ -Myrceno	991 <sup>b</sup>	987	0,14%
$\alpha$ -terpineno	1018 <sup>a</sup>	1016	0,36%
m-cimeno	1022 <sup>b</sup>	1023	0,10%
Limoneno	1029 <sup>c</sup>	1027	0,16%
1,8-cineol	1031 <sup>c</sup>	1031	1,85%
$\gamma$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1056	0,96%
$\alpha$ -terpinoleno	1088 <sup>a</sup>	1084	0,23%
Linalol	1097 <sup>b</sup>	-	0,46%
Isoborneol	1156 <sup>c</sup>	1162	0,11%
terpine-4-ol	1177 <sup>a</sup>	1179	0,18%
Safrol	1289 <sup>e</sup>	1291	84,20%
Metil-eugenol	1404 <sup>d</sup>	1400	5,19%
Germacreno - D	1485 <sup>c</sup>	1476	0,08%
Elimicin	1543 <sup>a</sup>	1547	0,55%
$\delta$ -cadinol	1638 <sup>c</sup>	1643	0,10%
$\beta$ -eudesmol	1651 <sup>b</sup>	1650	0,32%
20 componentes			99,62%

a= Torres et al, 2008; b= Cysne et al, 2005; c= Barros et al, 2009; d= Silva et al, 1999; e= Adams et al, 1995.

Tabela 6: OESI-

Componentes	IR <sub>Lit.</sub>	IR <sub>Expe.</sub>	% relativa
$\alpha$ -tujeno	924 <sup>a</sup>	924	0,15%
$\alpha$ -pineno	939 <sup>b</sup>	932	12,70%
Canfeno	940 <sup>d</sup>	948	0,50%
Sabineno	975 <sup>b</sup>	971	2,22%
$\beta$ -pineno	979 <sup>b</sup>	977	10,26%
$\beta$ -mirceno	991 <sup>b</sup>	987	0,82%
$\alpha$ -felandreno	1003 <sup>b</sup>	1007	0,16%
$\alpha$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1016	1,34%
p-cimeno	1021 <sup>d</sup>	1023	0,22%
Limoneno	1029 <sup>c</sup>	1027	0,74%

1,8-cineol	1031 <sup>c</sup>	1031	2,14%
$\gamma$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1056	3,44%
$\alpha$ -terpinoleno	1088 <sup>a</sup>	1084	0,84%
Linalol	1097 <sup>b</sup>	??	0,29%
Terpine-4-ol	1177 <sup>a</sup>	1179	0,82%
Safrol	1289 <sup>e</sup>	1291	34,53%
$\alpha$ -copaeno	1377 <sup>b</sup>	1372	1,16%
Germacreno - D	1485 <sup>c</sup>	1476	2,73%
Metil-eugenol	1404 <sup>d</sup>	1400	10,86%
Trans-cariofileno	1419 <sup>a</sup>	1415	1,28%
$\alpha$ -humuleno	1450 <sup>b</sup>	1455	0,37%
$\alpha$ -amorfenol	1478 <sup>f</sup>	1471	1,03%
$\alpha$ -muuroleno	1500 <sup>d</sup>	1494	0,42%
$\delta$ -cadinene	1523 <sup>a</sup>	1514	0,30%
Elemicin	1543 <sup>a</sup>	1547	0,22%
$\beta$ -eudesmol	1651 <sup>d</sup>	1650	3,20%
<b>26 componentes</b>			<b>92,74%</b>

a= Torres et al, 2008; b= Cysne et al, 2005; c= Barros et al, 2009; d= Silva et al, 1999; e= Adams et al, 1995; f= Vallilo et al, 2006.

Tabela 7: OESI+

Componentes	IR <sub>Lit.</sub>	IR <sub>Expe.</sub>	% relativa
$\alpha$ -Tujeno	924 <sup>a</sup>	924	0,05%
$\alpha$ -pinene	939 <sup>b</sup>	932	3,31%
Canfeno	954 <sup>a</sup>	948	0,85%
Sabineno	975 <sup>b</sup>	971	0,95%
$\beta$ -pineno	979 <sup>b</sup>	977	4,66%
$\beta$ -mirceno	991 <sup>b</sup>	987	0,30%
$\alpha$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1016	0,66%
p-cimeno	1021 <sup>d</sup>	1023	0,13%
Limoneno	1029 <sup>c</sup>	1027	0,31%
1,8-cineol	1031 <sup>c</sup>	1031	3,64%
$\gamma$ -terpineno	1062 <sup>a</sup>	1056	1,65%
$\alpha$ -terpinoleno	1088 <sup>a</sup>	1084	0,40%
Linalol	1097 <sup>b</sup>		0,54%
Isoborneol	1156 <sup>c</sup>	1162	0,15%
Terpinen-4-ol	1177 <sup>a</sup>	1179	0,40%
Safrol	1289 <sup>e</sup>	1291	71,60%
Metil-eugenol	1404 <sup>d</sup>	1400	6,37%
Germacreno D	1485 <sup>c</sup>	1476	0,38%
$\delta$ -cadinene	1523 <sup>a</sup>	1514	0,19%
$\delta$ -cadinol	1638 <sup>c</sup>	1643	0,25%
$\beta$ -eudesmol	1651 <sup>d</sup>	1650	0,96%
<b>21 componentes</b>			<b>97,75%</b>

a= Torres et al, 2008; b= Cysne et al, 2005; c= Barros et al, 2009; d= Silva et al, 1999; e= Adams et al, 1995.

A análise do óleo essencial frente ao microcrustáceo *A. salina* revelou uma DL<sub>50</sub> = 20,79 µg/mL, sendo considerada tóxica, uma vez que segundo Dolabela (1997) avaliando CL<sub>50</sub> em *A. salina* de extratos brutos e substâncias puras, propôs que os extratos brutos com CL<sub>50</sub> menores que 250 µg/mL e substâncias puras com CL<sub>50</sub> menor que 40 µg/mL eram consideradas tóxicas. Após a determinação dessas correlações, vários estudiosos de produtos naturais utilizam esta referência para a avaliação prévia da atividade biológica de extratos de plantas conhecidas (JIMÉNEZ *et al.*, 2001), especificadamente antimicrobiana (BATTINELLI *et al.*, 2001) e citotóxica (ALALI *et al.*, 1998; COLOMBO *et al.*, 2001). (Buscar o intervalo da correlação atividade de antitumoral com *A. salina*)

## 6.0 CONCLUSÕES

Comparando-se os resultados obtidos através dos rendimentos, conclui-se que a espécie *P. callosum* produz melhor na época da cheia, tendo em vista o alto teor de óleos essenciais de 1.12% e 1.68% para as amostras do lago e do ramal respectivamente do mês de março. As chuvas foram um dos fatores positivos para que a variação dos teores de óleos obtidos entre os meses de janeiro, março e junho, ou seja, começo, meio e fim da cheia.

As análises do óleo essencial de *Piper callosum*, por CG-EM demonstraram alto teor de safrol nas folhas para os óleos obtidos. Foi verificado ainda que, os compostos β-pineno e metil-eugenol são uns dos constituintes principais, sendo que estes estão presentes também em outras espécies da mesma família.

Segundo a literatura, os testes com *Artemia Salina* revelaram o potencial citotóxico para o óleo de *P. callosum*.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; MCLAUGHLIN, J.L. 1999. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62, p. 504-540.
- ALBIERO, A. L. M., PAOLI, A. A. S., SOUZA, L. A., MOURÃO, K. S. M. (2005). Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H. B. & K. (Piperaceae). *Acta Bot. Bras.*, 19(2), 305-312.
- ALBUQUERQUE, J. M. 1989. Plantas medicinais de uso popular. Brasília, Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 96p.
- BATTINELLI, L.; TITA, B.; EVANDRI, M.G.; MAZZANTI, G. 2001. Antimicrobial activity of *Epilobium* spp. Extracts. *Il Farmaco* 56, p. 345–348.
- BERG, M. E. van den; “Plantas Medicinais da Amazônia”, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém (1982).
- BURKE, B., NAIR, M. – Phenylpropene, Benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of Jamaican *Piper* specie. *Phytochemistry*, Oxford, v. 25, p. 1427-30, 1986.
- CALIXTO, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 p.131–134.
- CALLE-ALVAREZ, J. – Contribuición al estudio de algunas especies de la familia Piperaceae. *Rev. Col. Quim. Farm.*, Bogotá, v 4, p. 47-57, 1983.
- COLOMBO, M.L.; BUGATTI, C.; MOSSA, A.; PESCALLI, N.; PIAZZONI, L.; PEZZONI, G.; MENTA, E.; SPINELLI, S.; JOHNSON, F.; GUPTA, R..C.; DASARADHI, L. 2001. Cytotoxicity evaluation of natural coptisine and synthesis of coptisine from berberine. *Il Farmaco* 56, 403–409.
- COWAN, M.N. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol Rev* 12: 564-582.

CUNHA, G. M. A. 1995. Atividade antimicrobiana de plantas popularmente usadas no Ceará. *Rev Bras Farm* 76:5-6.

DI STASI, L.C. 1996. Plantas Medicinais: arte e ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar. Ed. UNESP, São Paulo, 229 p.

DOLABELA, M.F. 1997. Triagem "in vitro" para atividade antitumoral e antitrypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Belo Horizonte: ICB-UFMG, 130p. (Dissertação de mestrado em ciências biológicas-Farmacologia).

EVANS, W. C.; *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 14th ed., WB Saunders Company: London, 1996, cap. 7.

FIGUEIREDO, R. A., SAZIMA, M. (2000) Pollination biology of Piperaceae species in southeastern Brazil. *Annals of Botany*, 85, 455-460.

FINNEY, D.J. 1971. Probits analysis, 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 77p.

GIBBS, R. D. – Chemotaxony of flowering plants. V. III London: McGill-Queen's University Press. 1974. p.1532-7.

GOBBO-NETO, L., LOPES, P. N., *Quim. Nova* Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007

GONÇALVES, L. A, BARBOSA, L. C. A, AZEVEDO, A. A, CASALI, V. W. D, NASCIMENTO, E. A. 2003. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6:8-14.

GOTTLIEB, O.R. & MAGALHÃES, M.T. 1960 - Modified distillation trap. *Chemist-Analyst*, 49: 114.

HAMBURGER, M, E HOSTETTMANN, K.; 1991. *Phytochemistry*, 30, p. 3864.

JIMÉNEZ, G.; HASEGAWA, M.; ESTRADA, A.; RODRIGUEZ, M.; MENDEZ, J.; CATILLO, A.; GONZALES-MUJICA, F.; MOTTA, N.; VASQUEZ, J.; ROMERO-VECHIONNE, E. 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons *Journal of Ethnopharmacology* 77 p. 77–83.

JOLY, A. B., *Introdução a taxonomia vegetal*, Ed. Nacional, 1985, São Paulo.

LAGO, J. H. G.; TANIZAKI, T. M.; YOUNG M. C. M.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J.; *J. Braz. Chem. Soc.* 2005, 16, 153.

MABBERLEY, D. J. *The Plant-book. A portable dictionary of the higher plants.* Cambridge Univ. Press. New York, 1997.

MICHELIN, D. C, MORESCHI, P. E, LIMA, A. C, NASCIMENTO, G. G. F, PAGANELLI, M. O, CHAUD, M. V. 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Ver Bras Farmacogn* 15: 316-320.

PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISTHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGY, D., PRASAD, A. K., WENGEL, J., OLSEN, C. E., BOLL, P. M. – *Phytochemistry of the genus Piper. Phytochemistry*, Oxford, v. 46, p. 597-673, 1997.

SENGUPTA, S., RAY, A. B. – The chemistry of Piper species: a review. *Fitoterapia*, Milano, v. 58, p. 147-66, 1987.

SILVA, A. F, BARBOSA, L. C. A, SILVA, E. A. M, CASALI, V. W. D, NASCIMENTO, E. A 2003. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6: 1-7.

SILVA, M. G. V.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W.; *Fitoterapia* 1999, 70, 32.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. Ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004.

VIEIRA, L. S. *Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Mediciniais*. 2ª Ed. São Paulo SP. Editora Ceres. 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2002. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis.

