

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DOS FRUTOS DE *Piper alatabaccum*

Amanda Feitosa Cidade¹, Dhessi Rodrigues², Emelly B. S. Santos², Elza Paula Silva Rocha¹, Gabriela C. Oliveira², Jamile Macedo Mariano¹, João Vitor Souza de Oliveira², Jonas Soares de Mesquita², Maria Vitória Dunice Pereira², Minelly Azevedo da Silva¹⁻³, Nilton Fagner de Araújo¹ e Rebeca da Costa Rodrigues².

¹ Pesquisadores do Instituto Federal de Rondônia Campus – Calama, Porto Velho/RO

² Estudantes de IC do Instituto Federal de Rondônia Campus – Calama, Porto Velho/RO

³ Orientadora - Instituto Federal de Rondônia Campus – Calama, Porto Velho/RO

Resumo:

Os óleos essenciais são objeto de estudos que visam a identificação de seus compostos e a possível atividade biológica. Vários são utilizados na medicina natural para tratar doenças, aromatizar ambientes, na área de cosmética, etc. O referente estudo visa apresentar a caracterização química e atividade antioxidante do óleo essencial dos frutos de *Piper alatabaccum*. O óleo foi obtido por hidrodestilação e analisado por CG-EM, teve seu poder antioxidante avaliado por intermédio do método de sequestro de radicais livres utilizando 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). As análises realizadas permitiram identificar os compostos presentes no óleo essencial, assim como revelou potencial antioxidante pelo método DPPH.

Palavras-chave: Metabólitos secundários; *Piperaceae*; Antioxidantes.

Apoio financeiro: Instituto Federal de Rondônia – IFRO; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Introdução:

Os óleos essenciais têm sido amplamente utilizados nas indústrias alimentar, agronômica, sanitária, cosmética e perfumaria, etc. Nos últimos anos o interesse pela indústria farmacêutica também tem sido evidenciado, tendo em vista que vários testes tem demonstrado excelente atividade biológica. Os compostos majoritários despertam um maior interesse, pois há uma relação mais evidente entre a atividade biológica e o composto (Chechin-Filho & Yunes 2016).

Há referências que também descrevem as propriedades biológicas atribuídas aos óleos essenciais, são algumas delas: adstringente, antimicrobiano, analgésico, antidepressivo, antipirético, antiviral, estimulante, imunoestimulante e outras. No que diz respeito aos compostos terpênicos as atividades mais comuns realizadas são: herbicida, antimicrobiana, citotóxica, citostática e antitumoral (Bagheri, Abdul Manap, & Solati, 2014; Cruz *et al.*, 2011; Messiano *et al.*, 2013; Navickiene *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013; Parise-Filho *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2016; Sacchetti *et al.*, 2005; Setzer *et al.*, 2008; Souto, Harada, Andrade, & Maia, 2012; Taufiq-Ur-Rahman, Shilpi, Ahmed, & Hossain, 2005). A maioria dos óleos essenciais são extraídos utilizando a técnica de arraste a vapor, porém outros métodos também podem ser utilizados, tais como: hidrodestilação, fluido super crítico (CO₂), micro-ondas, extração com solvente orgânico, destilação a baixa ou alta pressão, enfloração, prensagem a frio, etc (Yusoff, Nordin, Rahiman, Adnan & Taib, 2011; Henriques, Danielli, Apel, 2016).

Em relação aos antioxidantes, os mesmos têm sido amplamente descritos nos estudos de compostos vegetais (extratos, óleos essenciais e compostos isolados). As substâncias naturais com ação antioxidante são encontradas em plantas e dependendo da estrutura química dos componentes bioativos e da concentração dos fitoquímicos, diferentes extratos de frutas, ervas, especiarias e chás podem apresentar essa capacidade de inibir, prevenir ou retardar a ação dos radicais livres (Mariutti e Bragagnolo, 2007; Melo *et al.*, 2006). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a extração, caracterização (identificação) e atividade antioxidante do óleo essencial dos frutos da espécie *Piper alatabaccum*.

Metodologia:

Coleta e extração

Os frutos de *Piper alatabaccum* foram coletados no município de Buritis – Rondônia, no mês de fevereiro (inverno amazônico). A extração do óleo essencial e a atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do IFRO – Porto Velho/Calama. Os frutos (200g) foram submetidos ao arraste a vapor em um aparelho de Clevenger adaptado por 3h. O hidrolato foi separado com diclorometano e posteriormente submetido à filtração em um funil de vidro provido de algodão e sulfato de sódio anidro. Uma alíquota de 2mL da amostra foi encaminhada para análise na central Analítica da FIOCRUZ-RJ.

Método DPPH

A atividade antioxidante foi realizada seguindo as orientações de (Scherer & Godoy, 2009). Após o preparo da solução metanólica de DPPH (0,06 mM), foi adicionado 3,9mL da solução metanólica a 0,1mL do óleo essencial nas concentrações de (250; 500; 750 e 1000µg.mL⁻¹). Como controle negativo foi utilizado 0,1mL de MeOH e 3,9mL da solução de DPPH, para o controle positivo foi utilizado butilhidroxitolueno (BHT) em diferentes concentrações (50; 100; 150; 200; e 250µg.mL⁻¹) e quercetina (50; 100; 150; 200 µg.mL⁻¹). As

soluções foram acondicionadas por 60 min em uma câmara escura a temperatura ambiente e depois procedidas às leituras das absorvâncias no espectrofotômetro no comprimento de onda de 517nm, as análises foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante foi avaliada pela capacidade das substâncias presentes na amostra captarem o radical livre DPPH. As atividades sequestrantes de DPPH das concentrações testadas foram expressas em porcentagem, a partir da seguinte fórmula:

$$I (\%) = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100; Abs_0 \text{ é a absorvância do branco e } Abs_1 \text{ é a absorvância da amostra.}$$

A CE₅₀ (quantidade suficiente para 50% de inibição) foi calculada através da equação da reta obtida da curva de calibração (concentração versus o índice DPPH correspondente). A ação antioxidante do extrato foi expressa pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) a partir da fórmula:

$$IAA = \frac{m_{DPPH}(\mu\text{g mL}^{-1})}{CE_{50}(\mu\text{g mL}^{-1})}$$

$$CE_{50}(\mu\text{g mL}^{-1})$$

m_{DPPH}= massa do DPPH

CE₅₀= concentração efetiva

Método FRAP

A atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) foi realizada seguindo as orientações de (Brito, Moraes, Sampaio & Saura-calixto, 2006). As soluções foram preparadas e usadas imediatamente. Foram preparadas as amostras do óleo essencial dos frutos de *Piper alatabaccum* e dos controles positivos BHT e quercetina nas concentrações de 100 µg.mL⁻¹, o metanol foi utilizado como solvente. As amostras foram mantidas em ambiente escuro. Alíquotas de 90 µL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio em triplicata. Depois foi acrescentado 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente de FRAP. As amostras foram homogeneizadas com o uso do agitador e mantidas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente foram realizadas as leituras das absorvâncias em comprimento de onda de 595 nm.

Resultados e Discussão:

O rendimento do óleo foi de 0,034%. Na Tabela 1, são apresentados os compostos identificados no óleo essencial dos frutos de *Piper alatabaccum*. Verificou-se a presença de sesquiterpenos (45,83%), fenilpropanoides (20,83%) e monoterpenos (16,67%).

TABELA 1. Resultados obtidos pela análise do CG-MS do óleo essencial dos frutos de *Piper alatabaccum*.

MONOTERPENOS – 16,67%			
CONSTITUINTES	T.R.	% Área	Pico
Alpha-pinene	5.000	0,32	1
Beta-pinene	6.122	0,51	2
Cis-ocimene	7.850	2,56	3
Trans-beta-ocimene	8.233	5,17	4
TOTAL		8,56	
SESQUITERPENOS – 45,83%			
CONSTITUINTES	T.R.	% Área	Pico
Alpha-copaene	21.342	0,40	7
Beta-elemene	21.949	0,61	8
Beta-caryophyllene	23.145	3,07	9
Germacrene-D	23.557	0,29	10
Alpha-humulene	24.575	0,87	11
Beta-cubebene	25.639	2,26	12
Bicyclogermacrene	26.194	0,74	13
Delta-cadinene	27.138	0,28	16
Spathulenol	29.416	1,12	19
Caryophyllene oxide	29.576	0,36	20
Viridiflorol	30.057	0,37	21
TOTAL		10,37	
FENILPROPANOIDES – 45,83%			
CONSTITUINTES	T.R.	% Área	Pico
Safrol	17.886	3,66	6
Croweacin	26.383	5,82	14
Myristicin	27.613	26,48	17
Elemicin	28.575	8,59	18
Dilapiol	31.367	34,81	22
TOTAL		79,36	
Não identificáveis – 16,67%			
-----	-----	0,30	5
-----	-----	0,46	15
-----	-----	0,60	23
-----	-----	0,35	24

TOTAL		1,71	
TOTAL		100%	

Não há registro na literatura acerca da análise do óleo essencial dos frutos desta espécie. Entretanto, boa parte dos constituintes já foram identificados no óleo essencial das folhas de *Piper alatabaccum* e de outras espécies do gênero *Piper*, algumas substâncias com rendimento maior e outras com rendimento menor (Nascimento, 2011; Santana, 2012). Curiosamente, um dos compostos majoritários do óleo essencial dos frutos foi a myristicine e o dilapiol. A myristicine é um fenilpropanoide que não foi identificado no óleo essencial das folhas de *Piper alatabaccum* já realizados por Nascimento (2011) e Santana (2012). Esse composto já foi identificado em várias espécies, nos frutos de *Piper gaudichaudianum* (Schindler, 2015); nas folhas de *Piper aduncum* (A. L. Silva, Chaves, Lameira, & Bizzo, 2014); e nas folhas e talos de *Piper hispidinervum* (Guilherme et al., 2001). O dilapiol não é citado como composto majoritário por Nascimento (2011) e no trabalho de Santana (2012) aparece em quantidade inferior ao que foi identificado nos frutos.

Atividade antioxidante

Preparou-se uma curva analítica de DPPH nas concentrações: 250; 500; 750 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, obtendo a equação de regressão linear $y = 0,0132x + 0,0036$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9995$. O valor correspondente à metade da absorbância da solução de DPPH puro (0,06 mM) foi substituído na equação do DPPH, para encontrar a concentração em μM de DPPH, correspondente a 50% da concentração inicial do radical e, em seguida, transformado para g de DPPH pela Equação:

$$g\text{DPPH} = (\mu\text{M DPPH} / 1.000.000) * 394,3 \text{ (peso molecular do DPPH)}$$

A concentração do DPPH utilizada foi de 23,66 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para uma solução de 0,06 mM. A avaliação da atividade antioxidante revelou que o IAA do óleo essencial difere do controle positivo BHT e da quercetina (Tabela 2).

A curva de calibração do método FRAP foi preparada com a solução de sulfato ferroso nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 μM . As leituras das absorbâncias foram plotadas no eixo Y e as concentrações de sulfato ferroso no eixo X, obtendo-se a Equação da reta $y = 0,0007x - 0,0283$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9996$.

Os valores médios das absorbâncias das amostras foram substituídos na equação de regressão linear obtida, para se determinar a capacidade das amostras em reduzir o Fe^{3+} presente na solução a Fe^{2+} , e o resultado equivalente a concentração em μM de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, o valor encontrado foi convertido em mg de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /óleo essencial e o resultado final expresso em mg de Fe^{2+} /óleo (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da atividade antioxidante pelos métodos DPPH do extrato.

AMOSTRAS	Método DPPH			Método FRAP
	Inibição (%) \pm DP	CE ₅₀ \pm DP ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IAA	(mg de Fe^{2+} / miligrama de óleo) \pm DP
Óleo essencial dos frutos de <i>Piper alatabaccum</i>	92,94 \pm 0,75	9,75 \pm 0,058	2,43	26,25 \pm 1,62
BHT	68,48 \pm 1,09	4,19 \pm 0,046	5,64	126,59 \pm 1,93
Quercetina	95,45 \pm 0,55	2,03 \pm 0,032	11,65	167,85 \pm 2,86

DP (desvio padrão); IAA (Índice de Atividade Antioxidante); BHT (butilhidroxitolueno); Concentrações para determinar o percentual de inibição (%): Óleo essencial (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$); BHT (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Quercetina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

A atividade antioxidante pode ser justificada pela presença de compostos fenólicos (flavonóides - antocianinas, flavonóis e seus derivados, ácidos fenólicos – ácido benzóico, cinâmico e seus derivados e cumarinas) (Ângelo, 2006). Porém, não se pode esquecer que o óleo essencial apresenta em sua composição química uma mistura de várias classes de substâncias que agem de forma sinérgica podendo influenciar na atividade produzindo um resultado diferente. Desta forma, objetiva-se futuramente avaliar os componentes majoritários do óleo essencial da espécie para reproduzir os experimentos e confirmar seus resultados.

Conclusões:

A composição química do óleo essencial dos frutos da espécie *Piper alatabaccum* apresentou uma grande variação de compostos. Alguns desses compostos não foram identificados em amostras de óleo essencial das folhas da espécie já realizados por outros pesquisadores. Os testes indicaram que o óleo essencial de *Piper alatabaccum*, quando analisado pelo método DPPH, apresenta potencial antioxidante significativo.

Referências bibliográficas

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. (2007). Phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v 66 (1); p 232-240.
- BAGHERI, H.; ABDUL MANAP; M. Y. BIN; SOLATI, Z. (2014). Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, 121, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.007>
- BRITO, E. S. DE, MORAIS, S. M. DE, SAMPAIO, C. D. G., & SAURA-CALIXTO, F. D. (2006). on line, 3–6. **Ci, B. A. C. D. E.**, Farmac, N., De, U. P., Naturais, E. M. P., Bioativos.

- CHECHINEL V.F.; YUNES R.A.; (1997). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Revista Química Nova**. Vol. 21.
- CRUZ, S. M.; CÁCERES, A.; ÁLVAREZ, L.; MORALES, J.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; GUPTA, M. P. (2011). Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variable* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and methanol extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21(4), 587–593. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000110>
- GUILHERME, J., PQ, S. M., HELENA, E., PQ, A. A., PQ, E. F. G., & HELIO, M. (2001). Um tipo químico rico em miristicina de *Piper hispiginervum* C. DC., com ocorrência no Mato Grosso, 1993.
- HENRIQUES, A. T.; DANIELLI, L. J.; APEL, M. A. (2016) **Óleos essenciais: Importância e perspectivas terapêuticas. Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia** / Valdir Cechinel Filho, Rosendo Augusto Nunes (Org) – 5 ed., rev. E ampl. – Itajaí, SC: Univali. pp 269-321
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. (2007). Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Braz. J. Food Technol**, v. 10, n. 2, p. 96-103, abr./jun.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. (2006). Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 26, n. 3, p. 639-644.
- MESSIANO, G. B.; SANTOS, R. A. DA S.; FERREIRA, L. D. S.; SIMÕES, R. A.; JABOR, V. A. P.; KATO, M. J.; DE OLIVEIRA, A. R. M. (2013). In vitro metabolism study of the promising anticancer agent the lignan (-)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 72, 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.028>
- NAVICKIENE, H. M. D.; MORANDIM, A. D. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; SP, S. P. (2006). **Artigo**, 29(3), 467–470.
- OLIVEIRA, G. L.; CARDOSO, S. K.; LARA JÚNIOR, C. R.; VIEIRA, T. M.; GUIMARÃES, E. F.; FIGUEIREDO, L. S.; KAPLAN, M. A. C. (2013). Chemical study and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oil of *Piper aduncum* L. (Piperaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 85(4), 1227–1234. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201391011>
- NASCIMENTO, K. M. (2011) Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Piper* frente a cepas de *Candida* spp. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual do Ceará. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/kalinenascimento.pdf>. Acesso realizado em 09 de novembro de 2017, às 21h25min
- PARISE-FILHO, R.; PASTRELLO, M.; PEREIRA CAMERLINGO, C. E.; SILVA, G. J.; AGOSTINHO, L. A.; DE SOUZA, T.; POLLI, M. C. (2011). The anti-inflammatory activity of dillapiole and some semisynthetic analogues. **Pharmaceutical Biology**, 49(11), 1173–1179. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.575793>
- ROCHA, D. S.; DA SILVA, J. M.; DO AMARAL FERRAZ NAVARRO, D. M.; CAMARA, C. A. G.; DE LIRA, C. S.; RAMOS, C. S. (2016). Potential antimicrobial and chemical composition of essential oils from *Piper caldense* tissues. **Journal of the Mexican Chemical Society**, 60(3), 148–151.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, 91(4), 621–632. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.031>
- SETZER, W. N.; PARK, G.; AGIUS, B. R.; STOKES, S. L.; WALKER, T. M.; HABER, W. A. (2008). Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of twelve species of *Piper* from Monteverde, Costa Rica. **NatProdComm**, 3(8), 1367–1374.
- SOUTO, R. N. P.; HARADA, A. Y.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. (2012). Insecticidal Activity of *Piper* Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, 41(6), 510–517. <https://doi.org/10.1007/s13744-012-0080-6>
- TAUFIQ-UR-RAHMAN, M.; SHILPI, J. A.; AHMED, M.; HOSSAIN, C. F. (2005). Preliminary pharmacological studies on *Piper chaba* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**, 99(2), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.055>
- YUSOFF, Z. M.; NORDIN, M. N. N.; RAHIMAN, M. H. F.; ADNAN, R.; TAIB, M. N. (2011) Characterization of Down-Flowing Steam Distillation System using Step Test Analysis. **IEEE CSGRC**, p. 197-201. <http://dx.doi.org/10.1109/ICSGRC.2011.5991856>. Acesso realizado em 25 de setembro de 2017, às 17h03min.
- SANTANA, H. T. (2012) Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: culicidae) em condições de campo simulado. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Rondônia. Disponível em: [http://www.pgbioexp.unir.br/downloads/2807_estudo_fitoquimico_de_piper_alatabaccum_\(hilamani_santana_&_valdir_alves_facundo\).pdf](http://www.pgbioexp.unir.br/downloads/2807_estudo_fitoquimico_de_piper_alatabaccum_(hilamani_santana_&_valdir_alves_facundo).pdf). Acesso realizado em 09 de novembro de 2017, às 22h32min
- SCHERER, R., & GODOY, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, 112(3), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>
- CHINDLER, B. (2015). Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth: RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE FUNGITÓXICA in vitro.
- SILVA, A. L., CHAVES, F. C. M., LAMEIRA, R. C., & BIZZO, H. R. (2014). Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 15(SUPPL. 1), 670–674. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500007>