

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC.

Thalita Gilda Santos e Ricardo Andrade Rebelo*

Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, 89012-900 Blumenau - SC, Brasil

Eduardo Monguilhott Dalmarco e Alessandro Guedes

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, 89012-900 Blumenau - SC, Brasil

André Luís de Gasper

Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, 89012-900 Blumenau - SC, Brasil

Alexandre Bella Cruz, Ana Paula Schmit e Rosana Cé Bella Cruz

Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, 88302-202 Itajaí - SC, Brasil

Mário Steindel e Rebeca Körting Nunes

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, 88040-970 Florianópolis - SC, Brasil

Recebido em 29/3/11; aceito em 20/8/11; publicado na web em 30/9/11

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LEAF ESSENTIAL OIL FROM *Piper malacophyllum* (C. Presl.) C. DC. This work reports the chemical composition as well as the antibacterial, antifungal and antiparasitic activities of the leaf essential oil from *Piper malacophyllum*. The oil was extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-FID, GC-MS and polarimetry. Among the 28 compounds identified, (+)-camphor was the major constituent. The essential oil showed activity against most of the microorganisms tested, especially antifungal action, with a MIC of 500 µg mL⁻¹ against *Trichophyton mentagrophytes* and *Cryptococcus neoformans*. This is the first study reporting the composition and biological properties of leaf essential oil from *P. malacophyllum*.

Keywords: *Piper malacophyllum*; antimicrobial evaluation; antifungal activity.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os antimicrobianos de origem vegetal têm recebido uma atenção especial, devido à resistência aos antibióticos tradicionais desenvolvida por alguns micro-organismos. Muitas plantas podem servir como alternativa terapêutica pela atividade antimicrobiana comumente associada aos seus óleos essenciais. Também é promissora a utilização destes óleos como aditivos alimentares, para retardar a deterioração dos alimentos ou para evitar o crescimento de patógenos alimentares e micro-organismos resistentes aos antibióticos.^{1,2}

Embora seja menos investigada, a utilização dos óleos essenciais para o tratamento de parasitoses vem adquirindo maior importância.³ Óleos essenciais podem ser eficazes no tratamento ou prevenção de doenças parasitárias, visto que propriedades como baixa densidade e rápida difusão através das membranas celulares em decorrência da sua lipossolubilidade podem melhorar a inserção intracelular dos componentes ativos do óleo essencial nos parasitas.⁴

A família Piperaceae é uma família tropical e subtropical, que ocorre em ambos os hemisférios, incluindo aproximadamente 4.000 espécies. Dos quatro gêneros hoje considerados para a família, *Zippelia*, *Piper*, *Peperomia* e *Manekia*, o gênero *Piper* é aquele com o maior número de representantes.^{5,6} Diversas espécies do gênero *Piper* são amplamente utilizadas na medicina popular em várias partes do mundo e têm sido relatadas por produzirem compostos com propriedades biológicas e farmacológicas diversas. Porém até 2004, apenas 10% das espécies de *Piper* foram fitoquimicamente estudadas.⁷

Muitas espécies de *Piper* são aromáticas e, como consequência,

a composição química dos seus óleos essenciais tem sido objeto de intenso estudo, revelando uma grande variedade de constituintes, destacando-se os terpenoides e arilpropanoides.⁸ Das propriedades biológicas investigadas, os óleos essenciais deste gênero têm sido sistematicamente submetidos a ensaios de toxicidade contra diversos micro-organismos de natureza bacteriana, fúngica e protozoária.⁹

A espécie *Piper malacophyllum* popularmente conhecida como pariparoba ou pariparoba-murta ocorre no Brasil, nos estados do Pará, Goiás, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e em todos os estados da região sul.^{6,10}

São poucas as publicações acerca da química da espécie *P. malacophyllum*. Lago *et al.*¹¹ realizaram o estudo fitoquímico biomonitorado do extrato diclorometânico das suas folhas, que resultou no isolamento do 4,6-dimetoxi-5*E*-fenilbutenolídeo e 4,6-dimetoxi-5*Z*-fenilbutenolídeo. Estes apresentaram potente atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Esta importante e significativa atividade associada aos butenolídeos conduziu ao desenvolvimento de metodologia analítica baseada em eletroforese capilar para a quantificação rápida desses metabólitos em extratos de *P. malacophyllum*.¹²

Neste trabalho, é descrita pela primeira vez a composição química e a atividade antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária do óleo essencial obtido a partir das folhas de *P. malacophyllum*.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e equipamentos

A análise do óleo essencial por CG-DIC foi realizada em cromatografia

*e-mail: ricardorebelo@furb.br

tógrafo gasoso Shimadzu GC-14B equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (Simplicity-1/Supelco, 30 m x 0,25 mm d.i. e filme de 0,25 µm de espessura) e a análise por CG-EM foi realizada em cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 equipado com uma coluna capilar (CP-Sil 8 CB, 30 m x 0,25 mm d.i. e filme de 0,25 µm de espessura) acoplado a um espectrômetro de massas Saturn 2000 operando por impacto eletrônico de 70 eV.

A rotação óptica foi medida em polarímetro automático digital Quimis modelo Q760M e a estereoquímica foi determinada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama, Shimadzu GC-14B, equipado com coluna de fase estacionária quiral Chrompack (CP 7502 Chirasil-Dex 25 m x 0,25 mm d.i. e espessura do filme de 0,25 µm).

A densidade óptica nos ensaios leishmanicida e tripanocida foi determinada em leitor de microplacas Tecan modelo Infinite M2000.

Material vegetal

A coleta foi realizada em fevereiro de 2009 em Florianópolis, Santa Catarina, região sul do Brasil (coordenadas 27° 35' 52,87" S e 48° 31' 24,90" W). As folhas coletadas foram cuidadosamente separadas e acondicionadas sob refrigeração (-10 °C) até a extração do óleo essencial. A espécie foi identificada pela Dra. E. F. Guimarães do Jardim Botânico, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Uma exsicata está depositada no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein da Universidade Regional de Blumenau – FURB, sob o número 10252.

Extração e análise do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído em triplicata a partir do material vegetal fresco (350 g), submetido à hidrodestilação em aparelho Clevenger modificado¹³ por 3 h sob atmosfera de nitrogênio. O óleo essencial e hidrolato foram coletados em proveta e mantidos em refrigerador por 24 h. A fase aquosa foi removida com o auxílio de uma pipeta Pasteur, sendo o óleo essencial seco com sulfato de magnésio anidro (Dinâmica). O rendimento do óleo foi calculado relacionando-se a massa de óleo obtida e a massa de material vegetal utilizado na extração (% m/m).

A análise química do óleo essencial foi realizada por CG-DIC e CG-EM. As amostras em triplicata foram diluídas a 1% (m/v) em hexano e foram caracterizadas utilizando as seguintes condições de análises: como gás de arraste foi empregado hélio com vazão de 1 mL min⁻¹, em modo *split* 1:100, estando o injetor a 220 °C e o detector de ionização de chama a 240 °C. Injetou-se 0,5 µL de amostra e empregou-se na análise a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60 °C (0 min) até 195 °C, com aquecimento de 3 °C min⁻¹, de 195-235 °C a taxa de aquecimento foi de 20 °C min⁻¹, permanecendo a 235 °C por 30 min.

A identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos seus espectros de massas com os espectros da base de dados NIST 02 (NIST *Mass Spectral Library*, 2002), por comparação com os dados da literatura¹⁴ e através de seus índices de retenção (IR), calculados em relação aos tempos de retenção de uma série de alcanos lineares (C₈ - C₁₉) analisados nas mesmas condições experimentais descritas. Padrões isolados de heptanal (Aldrich, 95%), benzaldeído (Vetec, 98%), limoneno (Aldrich, 97%), acetofenona (Vetec, 98%), *p*-cresol (Vetec, 98%), α-tujona (Fluka, 96%), 2-feniletanol (Fluka, 99%), cânfora (Fluka, 99%), citronelal (Aldrich, 98%), naftaleno (Vetec, 98,5%), decanal (Fluka, 95%), anisalaldeído (Vetec, 98%), safrol (Aldrich, 97%), vanilina (Vetec, 97%), 2,6-di-(*terc*-butil)-4-metilfenol (BHT) (Aldrich, 99%) e benzofenona (Vetec, 98%) foram empregados como referência para validar a metodologia.

A densidade foi determinada em triplicata pelo método do tubo capilar a 17 °C e expressa como média.¹⁵

O poder rotatório do óleo essencial foi determinado em polarímetro e para a identificação do estereoisômero da cânfora empregou-se cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama adaptado com coluna quiral. Como gás de arraste foi empregado hidrogênio, estando o injetor a 230 °C e o detector a 250 °C. Injetou-se 1 µL de amostra diluída a 1% (m/v) em clorofórmio e empregou-se na análise a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 70 °C com aquecimento de 2 °C min⁻¹ até 200 °C. Foram empregados os padrões (+)-cânfora (Aldrich, 99%) e (±)-cânfora (Fluka, 99%), comparando-se os seus tempos de retenção com o da amostra de óleo essencial.

Atividade antibacteriana

Micro-organismos

As cepas bacterianas foram adquiridas da coleção americana *American Type Culture Collection* (ATCC). A atividade antibacteriana do óleo essencial foi avaliada frente às bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978). A identificação das cepas foi confirmada pelo uso de ensaios bioquímicos, seguindo as recomendações do Manual de Microbiologia Clínica.¹⁶

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

O efeito antibacteriano foi avaliado pelo método da microdiluição em caldo conforme preconizado pelo *The National Committee for Clinical Laboratory Standards*.¹⁷ Inicialmente uma solução de 16 µL mL⁻¹ do óleo essencial foi preparada utilizando uma solução aquosa de DMSO a 20% (v/v). Foram transferidos 100 µL desta diluição para a microplaca contendo 100 µL de caldo Müller-Hinton. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas resultando nas concentrações de 8 a 0,0625 µL mL⁻¹. O inóculo contendo 5 x 10⁵ UFC mL⁻¹ (0,5 na escala McFarland) foi adicionado a cada poço. Foram reservados poços nas microplacas para controle de esterilidade do caldo, de crescimento bacteriano e da ação do antimicrobiano de referência (Gentamicina).¹⁸ As microplacas foram incubadas em condições de aerobiose de 18-24 h a 35 °C, quando 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio - CTT (5 mg mL⁻¹ em metanol) foram adicionados a cada poço para detecção da mudança de cor do CTT (incolor) para vermelho, que reflete o metabolismo bacteriano ativo. A CIM foi definida como a menor concentração de óleo que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano.¹⁹ Para a determinação da CBM, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada um dos poços contendo o óleo essencial e transferidas para placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. O surgimento de colônia bacteriana para uma determinada concentração indica que esta não foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado.²⁰ Os ensaios foram realizados em duplicata. A densidade do óleo foi empregada para converter µL mL⁻¹ em µg mL⁻¹. Esta última sendo usada para expressar a CIM e CBM.

Atividade antifúngica

Micro-organismos

Os fungos leveduriformes utilizados foram *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32264), fornecidos pela "Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello", Campinas, SP, e os fungos filamentosos *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 26934), *Rhizopus sp.* (CL 35), *Epidermophyton floccosum* (C114), *Microsporium canis* (C112), *Microsporium gypseum* (C115), *Trichophyton mentagrophytes*

(ATCC9972) e *Trichophyton rubrum* (C137) foram fornecidos pelo Centro de Referência Micológica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario, Argentina. Os fungos foram mantidos em ágar Sabouraud dextrosado.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada através da diluição dos óleos essenciais em ágar empregando a metodologia descrita em Machado *et al.*²¹ O óleo foi dissolvido em DMSO a 40% em água e, então, foram adicionados em séries em diferentes concentrações (1000 a 7,81 µg mL⁻¹). Em seguida, a cada frasco foi adicionado 1 mL de ágar Sabouraud dextrosado, seguido de imediata homogeneização da mistura. Para cada fungo filamentosos, a solução do inóculo foi ajustada para conter entre 1-5 x 10⁶ esporos mL⁻¹, sendo que a contagem foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer e de acordo com Petrikou *et al.*²² As leveduras foram preparadas como descrito por Pfaller *et al.*,²³ a suspensão foi ajustada espectroscopicamente para atingir uma transmitância equivalente a 10⁶ células mL⁻¹. Após a solidificação do meio de cultura, os micro-organismos, previamente ativados, foram inoculados e incubados à temperatura de 37 °C por 24-48 h para os fungos leveduriformes e à temperatura ambiente (25 °C) por 5-15 dias para os fungos filamentosos. Realizaram-se leituras da CIM através da verificação visual do crescimento microbiano. Para interpretação dos resultados foi considerado CIM a inibição total do crescimento microbiano. Durante os testes foram utilizados controles, com os meios de culturas e solvente utilizado na solubilização do óleo essencial, a fim de verificar seu efeito sobre os micro-organismos. Foi utilizado como controle o antifúngico Cetoconazol (Sigma K-1003). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade antiparasitária

Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida

O óleo essencial foi previamente solubilizado em DMSO, para uma concentração de 16 mg mL⁻¹. Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (cepa H3), cultivadas em meio Schneider, em uma concentração de 3 x 10⁶ parasitos mL⁻¹, foram semeadas e incubadas com diferentes concentrações do óleo essencial (500, 100, 20, 4 e 0,8 µg mL⁻¹) por 48 h a 26 °C. Como controle foi utilizado DMSO (1%) e anfotericina B (0,1 µM). A atividade antiparasitária foi avaliada através da técnica do MTT, conforme Sieuwerts *et al.*,²⁴ com adição de 50 µL de solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) e incubação a 26 °C por 4 h. O sobrenadante foi removido e foram acrescidos 100 µL de DMSO a fim de solubilizar os cristais de formazan. A densidade óptica foi determinada a 540 nm. A determinação da atividade antiparasitária dos compostos foi feita com base na leitura da densidade que corresponde ao percentual de células vivas.

Avaliação *in vitro* da atividade tripanocida

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) acrescido de 10% de SBF (Soro Fetal Bovino), penicilina 10 U mL⁻¹ e estreptomicina 10 µg mL⁻¹ em pH 7,2, foram semeadas em uma concentração de 5 x 10⁶ parasitos mL⁻¹ e incubadas com diferentes concentrações do óleo essencial (500, 100, 20, 4 e 0,8 µg mL⁻¹) por 48 h a 26 °C. Como controle foi utilizado DMSO (1%) e benzonidazol (10 µM). A atividade antiparasitária foi avaliada através da técnica do MTT, com adição de 50 µL de solução de MTT e incubação a 26 °C por 6 h. O sobrenadante foi removido e acrescidos 20 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% em HCl 0,01 mol L⁻¹, após 1 h sob as mesmas condições de incubação, 100 µL de DMSO foram adicionados a fim de solubilizar os cristais de formazan. A densidade óptica foi determinada a 540 nm. A determi-

nação da atividade antiparasitária dos compostos foi feita com base na leitura da densidade que corresponde ao percentual de células vivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição química

O óleo essencial das folhas frescas de *Piper malacophyllum* apresentou rendimento de 0,47% e densidade de 0,925 ± 0,010 g mL⁻¹ a 17 °C. Na Tabela 1 estão os 28 constituintes identificados, com suas respectivas concentrações e desvios padrões, representando 96,0% do óleo essencial. Este apresentou natureza terpênica, contendo mono e sesquiterpenos, sendo os monoterpênicos majoritários, respondendo por aproximadamente 63% da amostra. Os principais constituintes encontrados foram cânfora (32,8%) e canfeno (17,8%). Outros compostos

Tabela 1. Porcentagem dos constituintes do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum*

| Constituintes | Concentração (%) (média ± DP) | IR _{calc.} | IR _{lit.} ¹⁵ |
|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| α-pineno | 5,0 ± 2,1 | 929 | 932 |
| canfeno | 20,8 ± 0,8 | 944 | 946 |
| β-pineno | 1,2 ± 0,2 | 971 | 974 |
| β-mirceno | 1,2 ± 0,3 | 985 | 988 |
| limoneno | 1,8 ± 0,2 | 1023 | 1024 |
| eucaliptol | 0,2 ± 0,0 | 1025 | 1026 |
| cânfora | 32,8 ± 0,7 | 1141 | 1141 |
| borneol | 1,1 ± 0,5 | 1161 | 1165 |
| α-terpineol | 0,5 ± 0,0 | 1186 | 1186 |
| acetato de bornila | 1,1 ± 0,2 | 1280 | 1287 |
| α-copaeno | 0,7 ± 0,6 | 1370 | 1374 |
| β-elemeno | 1,6 ± 0,4 | 1387 | 1389 |
| α-gurjuneno | 0,2 ± 0,0 | 1405 | 1409 |
| β-cariofileno | 4,9 ± 0,7 | 1415 | 1417 |
| β-copaeno | 0,5 ± 0,0 | 1424 | 1430 |
| α-cariofileno | 2,9 ± 0,4 | 1449 | 1452 |
| γ-muroleno | 4,9 ± 0,2 | 1477 | 1478 |
| β-selineno | 0,4 ± 0,3 | 1487 | 1489 |
| α-selineno | 2,2 ± 0,8 | 1493 | 1498 |
| α-muroleno | 1,1 ± 0,2 | 1500 | 1500 |
| δ-amorfeno | 0,5 ± 0,0 | 1509 | 1511 |
| <i>trans</i> -calameneno | 0,9 ± 0,2 | 1519 | 1521 |
| α-cadineno | 0,5 ± 0,1 | 1537 | 1537 |
| <i>E</i> -nerolidol | 9,1 ± 0,6 | 1566 | 1561 |
| espatulenol | 0,5 ± 0,1 | 1580 | 1577 |
| ledol | 0,4 ± 0,0 | 1600 | 1602 |
| τ-cadinol | 0,5 ± 0,2 | 1638 | 1638 |
| α-eudesmol | 1,3 ± 0,2 | 1652 | 1652 |
| TOTAL | 96,0 | - | - |
| Hidrocarbonetos monoterpênicos | 27,2 | - | - |
| Monoterpenos oxigenados | 35,5 | - | - |
| Hidrocarbonetos sesquiterpênicos | 21,4 | - | - |
| Sesquiterpenos oxigenados | 11,9 | - | - |

encontrados em menores concentrações foram *E*-nerolidol (9,1%), α -pineno (5,0%), γ -muuroloeno (4,9%) e β -cariofileno (4,9%). A presença do canfeno em altas concentrações pode estar relacionada à rota biossintética da cânfora, bem como à presença de acetato de bornila e borneol.²⁵ A presença de cânfora como constituinte majoritário para óleos essenciais já foi relatada na literatura para o gênero *Piper*.^{26,27}

O poder rotatório (α_D) do óleo essencial de *P. malacophyllum* foi +36,8. A confirmação do enantiômero (+)-cânfora no óleo essencial, que representa 97,6% do total de cânfora presente, foi conduzida por cromatografia gasosa com coluna quiral. Os tempos de retenção do padrão comercial (+)-cânfora e do racemato (\pm)-cânfora comparados com o obtido para a cânfora do óleo essencial permitiram identificar de forma inequívoca o enantiômero presente, sendo este o primeiro trabalho que identifica o enantiômero (+)-cânfora em óleos essenciais do gênero *Piper*.

Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos para a avaliação da atividade antibacteriana são mostrados na Tabela 2. Aligiannis et al.²⁸ sugerem uma classificação para esta atividade, definindo como forte para óleos essenciais que possuem CIM até 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, moderada para CIM de 600 a 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e fraca para CIM acima de 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar de o óleo essencial apresentar uma CIM menor para *B. cereus* e *E. coli*, ambas de 1850 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para todas as bactérias analisadas o óleo essencial apresentou atividade classificada como fraca. Este resultado é mais promissor do que o observado para a maioria dos óleos do gênero *Piper* estudados previamente, onde valores de CIM $\geq 4,79 \text{ mg mL}^{-1}$ foram obtidos.⁸

Tabela 2. Atividade antibacteriana em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum*

| Micro-organismos | | Óleo essencial | Gentamicina |
|--------------------------------|-----|----------------|-------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | CIM | 3.700 | 1 |
| | CBM | 3.700 | 2 |
| <i>Bacillus cereus</i> | CIM | 1.850 | 1 |
| | CBM | 3.700 | 2 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | CIM | 3.700 | 1 |
| | CBM | 3.700 | 8 |
| <i>Escherichia coli</i> | CIM | 1.850 | 6 |
| | CBM | 3.700 | 12 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | CIM | 3.700 | 1 |
| | CBM | 3.700 | 4 |

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima

Os resultados obtidos da avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *P. malacophyllum* são apresentados na Tabela 3.

Diante do interesse em identificar óleos essenciais para uso clínico, o critério de classificação da atividade antifúngica adotado neste trabalho é aquele descrito por Bella Cruz et al.²⁹ e Holetz et al.³⁰ O óleo essencial apresentou atividade contra 6 dos 10 fungos analisados: fraca para *E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. rubrum* e a levedura *C. albicans*, e moderada para *T. mentagrophytes* e *C. neoformans*. Estes dois fungos têm importância clínica, pois *Trichophyton mentagrophytes* consiste no segundo fungo dermatófito (grupo de fungos que têm a capacidade invadir pele, cabelos e unhas para produzir uma infecção) mais comum depois do *T. rubrum*.³¹ Dermatofitoses, conhecidas como micoses, se tornaram comum nos últimos anos. De

Tabela 3. Atividade antifúngica em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum*

| Micro-organismos | Óleo essencial | Cetoconazol |
|------------------------------------|----------------|-------------|
| <i>Aspergillus flavus</i> | >1000 | 8 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | >1000 | 7 |
| <i>Rhizopus sp.</i> | >1000 | 4 |
| <i>Epidermophyton floccosum</i> | 1000 | 0,5 |
| <i>Microsporium canis</i> | >1000 | 8 |
| <i>Microsporium gypseum</i> | 1000 | 6 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 500 | 8 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> | 1000 | 4 |
| <i>Candida albicans</i> | 1000 | 0,3 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 500 | 6 |

fato, em algumas áreas do mundo é considerado um grande problema de saúde pública. *Cryptococcus neoformans* é um dos principais causadores de meningoencefalite fúngica em pacientes imunocomprometidos, sendo esta a infecção fúngica mais comum do sistema nervoso central e a terceira mais frequente complicação neurológica em pacientes com AIDS.³²

Foram conduzidos estudos relacionando a atividade biológica de extratos vegetais à presença de cânfora.^{26,33} Tirillini et al.²⁶ determinaram que *Piper angustifolium* apresenta em seu óleo essencial os constituintes majoritários cânfora e canfeno, e que a sua atividade antimicrobiana é moderada. Porém, os autores não identificaram o isômero da cânfora presente e observaram que a atividade antimicrobiana é perdida quando se analisam estes constituintes isoladamente. Esta diferença pode ocorrer devido ao sinergismo dos constituintes presentes no óleo ou pela presença de outros constituintes que podem ser ativos mesmo em pequenas concentrações. Esta situação pode ser compreendida com base em estudos que concluíram que os óleos essenciais têm uma maior atividade antibacteriana do que os constituintes majoritários misturados, o que sugere que os constituintes minoritários são cruciais para a atividade.²

Atividade antiparasitária

O óleo essencial analisado mostrou atividade contra formas de cultura de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* (CI₅₀ 311,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e >500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Estudos em culturas de promastigotas de *L. amazonensis* revelaram que o nerolidol possui atividade leishmanicida.³⁴ Embora o óleo de *P. malacophyllum* apresente este sesquiterpeno oxigenado em sua composição, sua concentração foi inferior a 10% (Tabela 1). Dados da literatura mostram que óleos essenciais de diferentes plantas têm mostrado promissora atividade antiparasitária contra *T. cruzi* e *Leishmania spp.*^{3,4} Entretanto, no presente estudo o óleo essencial de *P. malacophyllum* mostrou baixa atividade antiparasitária.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato sobre a composição química do óleo essencial de *Piper malacophyllum* e suas atividades biológicas. Foram identificados 28 compostos de natureza terpênica, sendo a (+)-cânfora o constituinte majoritário. O óleo essencial apresentou ampla atividade antimicrobiana, destacando-se a atividade antifúngica, que se apresentou como moderada contra o fungo leveduriforme *Cryptococcus neoformans* e o filamentosso *Trichophyton mentagrophytes*, ambos de interesse clínico. Tais resultados justificam estudos futuros

de fracionamento do óleo essencial das folhas de *P. malacophyllum* para a identificação dos seus constituintes ativos e a existência de efeitos sinérgicos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. E. F. Guimarães do Jardim Botânico pela identificação do material botânico, às Profas. M. da G. Nascimento, da UFSC pelo auxílio na realização da CG-quiral, e M. B. B. da Cunha, do FURB Idiomas pela revisão da língua inglesa. À FAPESC pela bolsa de mestrado concedida à T. G. Santos e à FURB pelo suporte financeiro e de infraestrutura.

REFERÊNCIAS

- Silva, C. J.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Montanari, R. A.; Pinheiro, A. L.; Dias, I.; Andrade, N. J.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 104.
- Burt, S.; *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223.
- Siqueira, C. A. T.; Oliani, J.; Sartoratto, A.; Queiroga, C. L.; Moreno, P. R. H.; Reimão, J. Q.; Tempone, A. G.; Fischer, D. C. H.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2011**, *21*, 33; Machado, M.; Santoro, G.; Sousa, M. C.; Salgueiro, L.; Cavaleiro, C.; *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 156.
- Anthony, J. P.; Fyfe, L.; Smith, H.; *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 462.
- Jaramillo, M. A.; Manos, P. S.; Zimmer, E. A.; *Int. J. Plant Sci.* **2004**, *165*, 403.
- Monteiro, D.; Guimarães, E. F.; *Rodriguésia* **2009**, *60*, 999.
- Dyer, L. A.; Richards, J.; Dodson, C. D. Em *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology and Evolution*; Dyer, L. A.; Palmer, A. D. N., eds.; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2004, chap. 7.
- Cysne, J. B.; Canuto, K. M.; Pessoa, O. L. D.; Nunes, E. P.; Silveira, E. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1378; Andrade, E. H. A.; Guimarães, E. F.; Maia, J. G. S.; *Variabilidade Química em Óleos Essenciais de Espécies de Piper da Amazônia*, UFPA Gráfica Universitária: Belém, 2009.
- Navickiene, H. M. D.; Morandim, A. A.; Alécio, A. C.; Regasini, L. O.; Bergamo, D. C. B.; Telascra, M.; Cavalheiro, A. J.; Lopes, M. N.; Bolzani, V. S.; Furlan, M.; Marques, M. O. M.; Young, M. C. M.; Kato, M. J.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 467; Setzer, W. N.; Park, G.; Agius, B. R.; Stokes, S. L.; Walker, T. M.; Haber, W. A.; *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 1367; Silva, D. R.; Endo, E. H.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V.; Svidzinski, T. I. E.; de Souza, A.; Young, M. C. M.; Ueda-Nakamura, T.; Cortez, D. A. G.; *Molecules* **2009**, *14*, 1171; Guerrini, A.; Sacchetti, G.; Rossi, D.; Paganetto, G.; Muzzoli, M.; Andreotti, E.; Tognolini, M.; Maldonado, M. E.; Bruni, R.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *27*, 39; Carrara, V. D.; de Souza, A.; Dias, B. P.; Nakamura, C. V.; de Paulo, L. F.; Young, M. C. M.; Svidzinski, T. I. E.; Cortez, D. A. G.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2010**, *29*, 1459; Marques, A. M.; Barreto, A. L. S.; Batista, E. M.; Curvelo, J. A. D. R.; Velozo, L. S. M.; Moreira, D. D. L.; Guimarães, E. F.; Soares, R. M. A.; Kaplan, M. A. C.; *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1837; Morandim-Giannetti, A. D.; Pin, A. R.; Pietro, N. A. S.; de Oliveira, H. C.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Alécio, A. C.; Kato, M. J.; de Oliveira, J. E.; Furlan, M.; *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 1810; Morandim-Giannetti, A. D.; Pin, A. R.; Pietro, N. A. S.; Alécio, A. C.; Kato, M. J.; Young, C. M.; de Oliveira, J. E.; Furlan, M.; *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 6135.
- Guimarães, E. F.; Monteiro, D.; *Rodriguésia* **2006**, *57*, 567.
- Lago, J. H. G.; Tanizaki, T. M.; Young, M. C. M.; Guimarães, E. F.; Kato, M. J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 153.
- de Oliveira, A.; Silva, C. A.; Silva, A. M.; Tavares, M. F. M.; Kato, M. J.; *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 428.
- Gottlieb, O. R.; Magalhães, M. T.; *Chemist Analyst* **1960**, *49*, 114.
- Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography, Mass Spectroscopy*, 4th ed., Allured: Carol Stream, 2007.
- Mayo, D. W.; *Microscale: Techniques for the Organic Laboratory*, J. Wiley: New York, 1991.
- Murray, P. R.; *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., ASM Press: Washington, 2003.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). *Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico*: norma aprovada – 6^a ed., M7-A6, 2003, 23, 17.
- Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y.; *Methods* **2007**, *42*, 321.
- Rahman, M.; Kühn, I.; Rahman, M.; Olsson-Liljequist, B.; Möllby, R.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 2398.
- Bosio, K.; Avanzini, C.; D'Avolio, A.; Ozino, O.; Savoia, D.; *Lett. Appl. Microbiol.* **2000**, *31*, 174.
- Machado, K. E.; Cechinel Filho, V.; Cruz, R. C.; Meyre-Silva, C.; Cruz, A. B.; *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 1181.
- Petrikkou, E.; Rodríguez-Tudela, J. L.; Cuenca-Estrella, M.; Gómez, A.; Molleja, A.; Mellado, E.; *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 1345.
- Pfaller, M. A.; Burmeister, L.; Bartlett, M. S.; Rinaldi, M. G.; *J. Clin. Microbiol.* **1988**, *26*, 1437.
- Sieuwerts, A. M.; Klijn, J. H. M.; Peters, H. A.; Foekens, J. A.; *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1995**, *33*, 813.
- Pybus, D. H.; Sell, C. S.; *The chemistry of fragrances*, Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999.
- Tirillini, B.; Velasquez, E. R.; Pellegrino, R.; *Planta Med.* **1996**, *62*, 372.
- Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P.M.; *Phytochemistry* **1997**, *46*, 591.
- Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4168.
- Bella Cruz, A.; Eger, I.; Bueno, E. C.; Freitas, R. A. Em *Fármacos e Medicamentos: Uma Abordagem Multidisciplinar*; Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho, V., eds.; Santos: São Paulo, 2010, cap. 7.
- Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, A. G.; Nakamura, C. V.; Filho, D. B. P.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1027.
- Nenoff, P.; Herrmann, J.; Gräser, Y.; *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* **2007**, *5*, 198.
- Lin, X.; Heitman, J.; *Annu. Rev. Microbiol.* **2006**, *60*, 69.
- Kotan, R.; Kordali, S.; Cakir, A.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2007**, *62*, 507.
- Costa, E. V.; Pinheiro, M. L. B.; Silva, J. R. A.; Maia, B. H. L. N. S.; Duarte, M. C. T.; Amaral, A. C. F.; Machado, G. M. C.; Leon, L. L.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 78.