



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

JOSÉ NAZIOBERTO DUDA DE FARIAS

Metodologia de extração, caracterização química e atividade biológica do óleo
essencial de *Piper tuberculatum* Jacq, (PIPERACEAE)

Rio de Janeiro
2018



UFRJ

JOSÉ NAZIOBERTO DUDA DE FARIAS

Metodologia de extração, caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Piper tuberculatum* Jacq, (PIPERACEAE)

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan

Prof^a. Dr^a. Morgana Teixeira Lima Castelo Branco

Rio de Janeiro
Dezembro/2018

Farias, José Nazioberto Duda de

Metodologia de extração, caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Piper tuberulatum* Jacq, (PIPERACEAE). / José Nazioberto Duda de Farias. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

63 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Maria Auxiliadora Coelho Kaplan.

Coorientadora: Morgana Teixeira Lima Castelo Branco.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

Referências: f. 60-63.

1. Piperaceae / química. 2. Óleos Voláteis / uso terapêutico. 3. Ritmo Circadiano. 4. . Pesquisa Biomédica. - Dissertação. I. Kaplan, Maria Auxiliadora Coelho. II. Branco, Morgana Teixeira Lima Castelo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro,

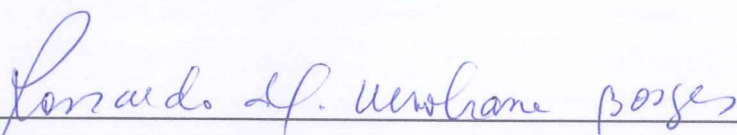
“Metodologia de extração, caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Piper tuberculatum* Jacq, (PIPERACEAE)”

JOSÉ NAZIOBERTO DUDA DE FARIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

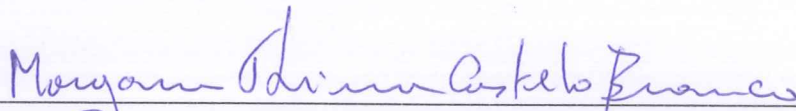
Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2018.



DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)



DRA. MARIA AUXILIADORA COELHO KAPLAN (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR



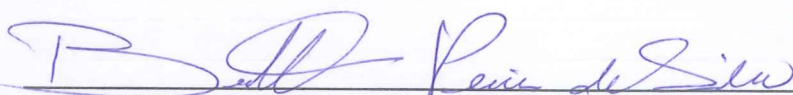
DRA. MORGANA TEIXEIRA LIMA CASTELO BRANCO (DOUTOR – UFRJ) – COORIENTADOR



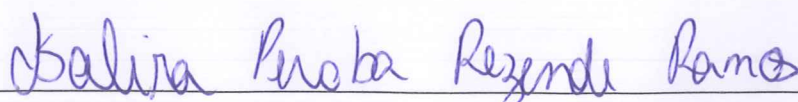
DR. LUIZ EDUARDO BAGGIO SAVIO (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR



DRA. ALINE CRISTINA DE ABREU MOREIRA DE SOUZA (DOUTOR – UFRJ)



DRA. BERNADETE PEREIRA DA SILVA (DOUTOR – UFRJ)



DRA. ISALIRA PEROBA REZENDE RAMOS (DOUTOR – UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que eu saiba ser merecedor de todas as suas bênçãos, e que possa retribuí-las através do meu trabalho.

A toda minha família, em especial meus pais, esposa e meus filhos Lucas e Bruna por me apoiarem nos momentos mais difíceis e por me ajudarem a persistir.

A minha orientadora, Professora Maria Auxiliadora Coelho Kaplan, com quem aprendi muito, contribuindo com meu crescimento intelectual e pessoal. Agradeço a orientação, o incentivo e principalmente a confiança em mim depositada.

A professora Morgana Teixeira Lima Castelo Branco que aceitou desde o início fazer minha orientação nos ensaios de atividade biológica deste projeto.

Ao Professor Heitor Siffert Pereira de Souza, que me concedeu a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisas. Por ter cedido gentilmente seu laboratório para a realização dos ensaios biológicos, pelos seus conselhos valiosos e pela amizade.

Ao professor Rodrigo Soares Fortunato, em especial, a aluna Jéssica pela contribuição na realização do ensaio de atividade antioxidante com DPPH

Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) e o Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) que tornaram esse projeto possível.

Aos professores do Programa de Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica pelos ensinamentos transmitidos.

A doutoranda Hayandra Ferreira Nanini, pela contribuição para realização dos ensaios de cultura de células, pelo aprendizado que me proporcionou e que serão úteis para a minha carreira.

A doutoranda Simone Lima, pelo seu apoio e ajuda com a leitura dos cromatogramas e espectros de massas e tudo mais.

Aos amigos e colegas do laboratório de química de produtos naturais: André, Carina, Clarissa, Vinícios, e outros mais que me auxiliaram transmitindo seus conhecimentos de fitoquímica experimental.

Aos amigos do laboratório multidisciplinar de pesquisas do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho: Cláudio, Kátia, Carla, Alessandra, Beatriz, Siane, Aline e, especialmente, aos meus companheiros de trabalho que tive o privilégio de conhecer: Cesônia de Assis Martinusso, (*in memoriam*), que me incentivou a ingressar no mestrado, hoje ficaria orgulhosa dos resultados, e Alyson do Rosário Junior que me ensinou a dar os primeiros passos na pesquisa científica.

RESUMO

FARIAS, José Nazioberto Duda. Metodologia de extração, caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Piper tuberculatum* Jacq, (PIPERACEAE). Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Introdução: Piperaceae é uma família botânica que reúne 10 gêneros e cerca de 3500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta. *Piper tuberculatum* pertence ao gênero *Piper* da família Piperaceae, e a atividade antitumoral já foi observada em substâncias isoladas desta espécie. O presente trabalho tem como objetivo extrair óleo essencial de *Piper tuberculatum* (OEPT) em um estudo circadiano e sazonal, determinar o seu rendimento e avaliar sua bioatividade *in vitro* utilizando células humanas e murinas. **Metodologia:** Folhas de *P. tubercularum* foram coletadas em agosto de 2015 no Campus da UFRJ para o estudo circadiano que consistiu na coleta durante um dia a cada 3 h. No estudo sazonal a coleta ocorreu uma vez a cada estação do ano às 16 h. O óleo foi extraído por hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado e caracterizado em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 SHIMADZU). A composição química do óleo circadiano foi identificada e, em seguida, a atividade antioxidante do composto foi avaliada por DPPH. A citotoxicidade do OEPT foi estudada por MTT utilizando células HCT-8, HFF-1 e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. A proliferação das células HCT-8 foi avaliada pelo BrdU e o ensaio de migração celular também foi realizado. **Resultados:** O teor do OEPT foi expressivo em folhas secas no estudo circadiano (0,0489%). Os constituintes majoritários nas folhas secas foram: germacreno D (14,98%) e *trans*-nerolidol (13,98%), enquanto que o patchulano (11,60%) e fitol (23,95%) nas folhas frescas. A atividade antioxidante do OEPT foi observada (29%) a 500 µg/mL. O OEPT mostrou-se tóxico em altas concentrações (500 – 300 µg/mL) e em frações menores propiciou um aumento na sobrevivência de todos os tipos celulares estudados. O OEPT induziu proliferação em células HCT-8 pela técnica do BrdU, mas retardou a migração nessas células. **Conclusão:** Esses achados abrem portas para novos estudos baseados no OEPT e em seus componentes isoladamente, com o objetivo de encontrar uma aplicação terapêutica efetiva para esse composto.

Palavras-chave: Piperaceae, *Piper tuberculatum*, óleo essencial, atividade biológica

ABSTRACT

FARIAS, José Nazioberto Duda. Metodologia de extração, caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Piper tuberculatum* Jacq, (PIPERACEAE). Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Introduction: Piperaceae is a botanical family that gathers 10 genera and about 3500 species distributed throughout the tropical and subtropical regions of the planet. *Piper tuberculatum* belongs to the genus *Piper* of the family Piperaceae, and the antitumor activity has already been observed in substances isolated from this species. The present work aims to extract essential oil of *Piper tuberculatum* (OEPT) in a circadian and seasonal study, determine its yield and evaluate its bioactivity *in vitro* using human and murine cells. **Methodology:** *P. tubercularum* leaves were collected in August 2015 at the UFRJ Campus for the circadian study that consisted of the collection during one day every 3 h. In the seasonal study the collection occurred once every season at 4:00 p.m. The oil was extracted by hydrodistillation with modified Clevenger apparatus and characterized in gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GCMS-QP2010 SHIMADZU). The chemical composition of the circadian oil was identified and then the antioxidant activity of the compound was evaluated by DPPH. OEPT cytotoxicity was studied by MTT using HCT-8 cells, HFF-1 and BALB / c mouse peritoneal macrophages. HCT-8 cell proliferation was evaluated by BrdU and the cell migration assay was also performed. **Results:** The OEPT content was expressive on dry leaves in the circadian study (0.0489%). The major constituents in the dry leaves were: germacrene D (14.98%) and trans-nerolidol (13.98%), while patchulan (11.60%) and phytol (23.95%) in fresh leaves. The antioxidant activity of OEPT was observed (29%) at 500 µg / mL. The OEPT was toxic at high concentrations (500-300 µg / mL) and in smaller fractions resulted in an increase in survival of all cell types studied. The OEPT induced proliferation in HCT-8 cells by the BrdU technique, but delayed migration in these cells. **Conclusion:** These findings open the door to new studies based on OEPT and its components alone, in order to find an effective therapeutic application for this compound.

Keywords: Piperaceae, *Piper tuberculatum*, essential oil, biological activity

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| µg /mL | Microgramas por mililitros |
| BrdU | 5-bromo-2'-desoxiuridina |
| °C | Graus centígrados |
| DMEM | <i>Dulbeco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DO | Densidade ótica |
| DPPH | 2,2difetil-1-picril-hidrazil |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| CG-MS | Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas |
| HDCM | Hidrodestilação com Clevenger modificado |
| HCT-8 | Células epiteliais intestinais humanas |
| HFF-1 | Fibroblastos de pele humana |
| ISO | International Standard Organization |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide |
| nm | Nanômetro |
| OE | Óleo essencial |
| OEPT | Óleo essencial de <i>Piper tuberculatum</i> |
| OEPTFS | Óleo essencial de folhas secas de <i>P. tuberculatum</i> |
| OEPTFF | Óleo essencial de folhas frescas de <i>P. tuberculatum</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> |
| TR | Tempo de retenção na coluna cromatográfica |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| FIGURA 1 | Distribuição geográfica da família Piperaceae | 14 |
| FIGURA 2 | Distribuição geográfica do gênero <i>Piper</i> | 15 |
| FIGURA 3 | <i>Piper tuberculatum</i> Jacq (PIPERACEAE)..... | 18 |
| FIGURA 4 | Aparelho de Clevenger modificado..... | 23 |
| FIGURA 5 | Mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante..... | 29 |
| FIGURA 6 | Redução do sal tetrazólio (MTT) à formazana..... | 31 |
| FIGURA 7 | Variação circadiana do percentual dos componentes majoritários identificados nos óleos essenciais obtidos das folhas secas e frescas de <i>P. tuberculatum</i> Jacq..... | 40 |
| FIGURA 8 | Representação estrutural dos componentes majoritários presentes no óleo essencial de folhas de <i>P. tuberculatum</i> Jacq..... | 41 |
| FIGURA 9 | Ensaio de atividade antioxidante..... | 43 |
| FIGURA 10 | Ensaio de viabilidade celular com células HCT-8 frente ao tratamento com OEPT..... | 45 |
| FIGURA 11 | Ensaio de viabilidade celular com células HFF-1 frente ao tratamento com OEPT..... | 46 |
| FIGURA 12 | Ensaio de viabilidade celular com macrófagos peritoneais murinos tratados com OEPT..... | 47 |
| FIGURA 13 | Alterações morfológicas em células HCT-8 e HFF-1 induzidas pelo tratamento com OEPT..... | 48 |
| FIGURA 14 | Ensaio de proliferação de células HCT-8..... | 49 |
| FIGURA 15 | Ensaio de migração de células HCT-8..... | 52 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|----|
| TABELA 1 | Rendimento circadiano dos óleos essenciais obtidos das folhas frescas e secas de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq (Piperaceae)..... | 35 |
| TABELA 2 | Composição química circadiana (%) dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq (Piperaceae)..... | 37 |
| TABELA 3 | Índice Kovats do óleo essencial de folhas frescas de <i>Piper tuberculatum</i> coletadas no horário de 16 h..... | 38 |
| TABELA 4 | Rendimento dos óleos essenciais sazonais das folhas frescas coletadas às 16 h de <i>Piper tuberculatum</i> Jacq (Piperaceae)..... | 42 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 14 |
| 2.1. Piperaceae..... | 14 |
| 2.2. <i>Piper L</i> | 15 |
| 2.3. <i>Piper tuberculatum</i> | 18 |
| 2.4. Óleos Essenciais | 21 |
| 2.5. Métodos de Extração de Óleos Essenciais | 23 |
| 2.6. Atividade Biológica do Óleo Essencial de <i>P. tuberculatum</i> | 23 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 26 |
| 4. OBJETIVOS | 27 |
| 4.1. Objetivo Geral | 27 |
| 4.2. Objetivos Específicos | 27 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 28 |
| 5.1. Estudo Circadiano | 28 |
| 5.2. Estudo Sazonal | 28 |
| 5.3. Herborização | 28 |
| 5.4. Obtenção dos Óleos Essenciais | 28 |
| 5.5. Análise dos componentes do OEPT | 29 |
| 5.6. Método de Captação de Radicais..... | 29 |
| 5.7. Ensaio de Atividade Antioxidante | 30 |
| 5.8. Cultura de Células | 30 |
| 5.9. Obtenção de Macrófagos Peritoneais Murinos | 31 |
| 5.10. Tratamento das Células | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 5.11. Redução do Sal de Tetrazólio (MTT)..... | 31 |
| 5.12. Ensaio de Viabilidade Celular | 32 |
| 5.13. Ensaio de Proliferação Celular | 32 |
| 5.14. Ensaio de Migração Celular | 33 |
| 5.15. Análise Estatística dos Dados..... | 34 |
| 6. RESULTADOS | 35 |
| 6.1. Estudo Circadiano | 35 |
| 6.1.1. Rendimento dos Óleos Essenciais Circadianos de <i>P. tuberculatum</i> Jacq..... | 35 |
| 6.1.2. Análise Circadiana dos Componentes dos Óleos Essências de <i>P. tuberculatum</i> Jacq | 37 |
| 6.1.3. Avaliação dos Componentes Majoritários Presentes nas Folhas Frescas e Secas de <i>P. tuberculatum</i> Jacq..... | 40 |
| 6.2. Estudo Sazonal | 43 |
| 6.2.1. Rendimento Sazonal dos Óleos Essenciais de <i>P. tuberculatum</i> Jacq..... | 43 |
| 6.3. Avaliação do Ensaio de Atividade Antioxidante..... | 44 |
| 6.4. Avaliação do Ensaio de Viabilidade Celular | 45 |
| 6.5. Alterações Morfológicas em Células HCT-8 e HFF-1 Tratadas com OEPT | 49 |
| 6.6. Avaliação do Ensaio de Proliferação celular..... | 50 |
| 6.7. Avaliação do Ensaio de Migração Celular | 51 |
| 7. DISCUSSÃO | 54 |
| 8. CONCLUSÃO..... | 60 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma impressionante biodiversidade vegetal, abrigando entre 40 a 55 mil espécies, sendo que, dessas, 10 mil podem ser consideradas medicinais, aromáticas e utilizáveis. Ainda assim, muito poucas dessas plantas (menos de 1%) já foram estudadas quanto a sua composição química e propriedades biológicas (SILVA *et al.*, 2002).

Produtos naturais, especialmente com origem em plantas medicinais, são fontes abundantes de moléculas com potencial medicinal que podem ser explorados através das metodologias e técnicas modernas disponíveis na pesquisa científica atual. Entre as plantas medicinais, as espécies aromáticas são particularmente interessantes pelo grande número de substâncias com diferentes classes químicas produzidas por essas plantas, as quais podem ser usadas com fins terapêuticos (HAIDA *et al.*, 2007).

Dentre essas substâncias pode-se destacar o grupo de compostos denominados metabólitos secundários aos quais pertencem os óleos essenciais (OE) que apresentam uma composição química altamente diversificada, e talvez por essa razão, com diversas propriedades medicinais (ORLANDA, 2011).

Considerada tradicionalmente aromática, a família Piperaceae possui diversas espécies produtoras de OE com grande importância econômica e medicinal (POTZERNHEIM *et al.*, 2006). Neste contexto, destaca-se a *P. tuberculatum*, uma espécie nativa e com ampla distribuição em todas as regiões brasileiras. Essa planta tem sido amplamente pesquisada na última década, sobretudo pelas suas propriedades antiparasitárias encontradas em extratos brutos, subfrações e OE (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004; SIMÕES, 2015).

O efeito anticancerígeno de *P. tuberculatum* já foi comprovado por diversos estudos envolvendo metabólitos fixos obtidos principalmente de raízes e frutos dessa planta (BEZERRA *et al.*, 2006; RODRIGUES, 2009; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010). O óleo essencial de *Piper tuberculatum* (OEPT), extraído principalmente de suas folhas, embora esteja bem caracterizado, suas propriedades biológicas são pouco conhecidas e seu efeito antitumoral, sobretudo em células humanas, ainda não foi investigado. É de importância fundamental, portanto, realizar um estudo pioneiro que consiste em estabelecer uma metodologia com emprego de boas práticas de coleta e processamento de material botânico para extração do OEPT, determinar o seu rendimento e composição química e avaliar suas propriedades biológicas tendo em vista obter um produto com uso terapêutico e medicinal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Piperaceae

A família Piperaceae está inserida na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Piperales e pertence ao grupo primitivo das Angiospermas basais (YUNCKER, 1972). Piperaceae reúne 10 gêneros, os quais se encontram bem distribuídos por todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta, como pode ser observado na **Figura 1**. Essas plantas normalmente se desenvolvem bem em florestas úmidas ocupando ambientes frequentemente sombreados (CRONQUIST, 1981).

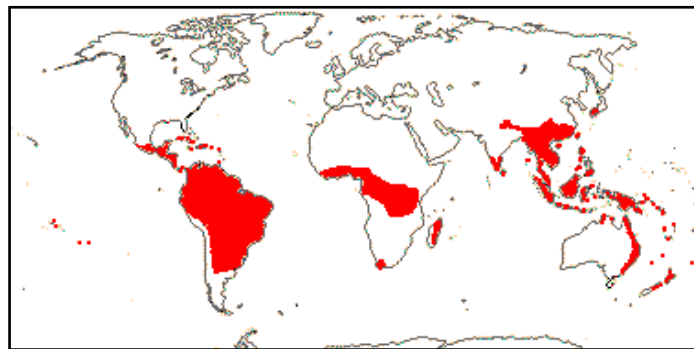


Figura 1: Distribuição geográfica da família Piperaceae.
 Fonte: (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>)

De acordo com Guimarães e Carvalho-Silva (2012), a família Piperaceae é constituída atualmente por cerca de 3500 espécies identificadas. As espécies representantes desta família são predominantemente herbáceas, arbustivas ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas, usualmente com mais de três metros de altura. Essas plantas são reconhecidas por suas folhas simples alternadas de consistência e formas diversas. Apresentam frutos e flores muito pequenos reunidos em inflorescências do tipo espiga. Seus frutos são em drupa, sésseis ou pedicelados (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

No Brasil são encontrados cinco gêneros de Piperaceae: *Piper* L., *Peperomia* Ruiz & Pav., *Ottonia* Spreng., *Pothomorphe* Miq. e *Sarcorhachis* Trel., com um total aproximado de 450 táxons (BARDELLI *et al.*, 2008). Suas espécies se distribuem principalmente nos biomas da Mata Atlântica e da região Amazônica, onde é previsto que existam em torno de 300 indivíduos (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Os gêneros mais representativos da família Piperaceae são *Piper* e *Peperomia*, sendo o gênero *Piper* o que possui o maior número de espécies (YUNCKER, 1972).

2.2 *Piper* L

O gênero *Piper* é o mais diverso entre as Angiospermas basais e numericamente o mais expressivo da família Piperaceae. Esse gênero abriga mais de 1000 espécies, as quais se encontram largamente distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas dos dois hemisférios, como pode ser visto na **Figura 2**. A maior diversidade de espécies de *Piper* ocorre nos trópicos americanos (700 spp.), seguido pelo sul da Ásia (300 spp.). Os padrões de distribuição das espécies de *Piper* variam de ser localmente endêmico a generalizado. Existem várias espécies restritas a um centro específico de diversidade (por exemplo, Andes, América Central) e outras ocorrem ao longo dos Neotrópicos ou dos Paleotrópicos (JARAMILLO; MANOS, 2001).

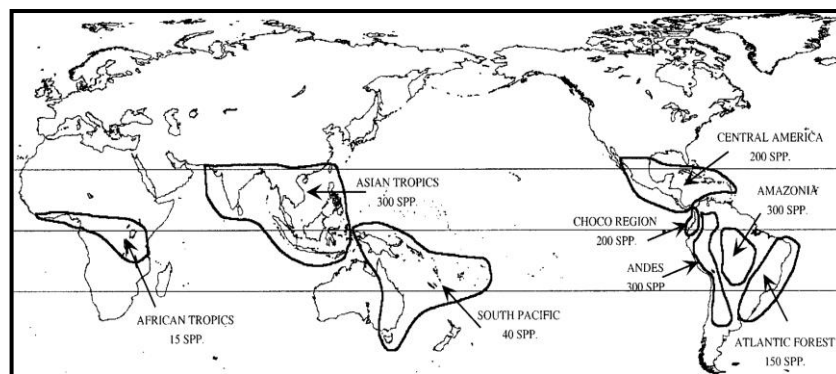


Figura 2: Distribuição geográfica do gênero *Piper*

Fonte: (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2307/2657072>)

No Brasil, aproximadamente 290 espécies de *Piper* já foram descritas, incluindo ervas, arbustos, subarbustos e pequenas árvores, que medem normalmente de 1 a 5 metros e podem atingir até 10 metros de altura. Essas plantas são reconhecidas facilmente por suas inflorescências opostas às folhas pedunculadas que se dispõem alternadamente no caule (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

As espécies do gênero *Piper* que ocorrem no Sudeste do Brasil são polinizadas pelo vento ou por morcegos. Por conseguinte, a reprodução dessas plantas coincide com a intensidade dos ventos ou pela presença do morcego frugívoro *Carollia perspicillata*, que ao se alimentar dos seus frutos promove a dispersão das sementes nas proximidades. Acredita-se que este polinizador seja atraído pelo aroma do OE que, em última análise, acaba por cumprir um papel importante na reprodução das espécies deste gênero (JUNIOR, 2007).

As espécies de *Piper* são citadas por sua importância econômica e medicinal (CREMASCO; BRAGA, 2010). A pimenta-do-reino (*P. nigrum*), originária da Índia, foi

introduzida no Brasil no século XVII pelos portugueses no período das Grandes Navegações (RODRIGUES, 2009). Essa espécie é utilizada desde os tempos antigos e atualmente é considerada a espécie de valor econômico mais importante, destacando-se por sua importância como condimento nos mercados em todo o mundo. O fruto maduro de *P. nigrum* é usado para obter a pimenta branca, enquanto que, do fruto verde, se obtém a pimenta-do-reino (PARMAR, *et al.*, 1997).

Na medicina tradicional, muitas espécies do gênero *Piper* são usadas para tratar enfermidades incluindo doenças ginecológicas, distúrbios do estômago e do intestino (CREMASCO; BRAGA, 2010). Vários povos ao redor do mundo fazem uso medicinal de plantas do gênero *Piper* para tratar os mais variados tipos de doenças, a exemplo do que ocorre na China, onde um chá das folhas de *Piper futokasura* é usado para tratar taquicardia e acessos de asma. Na Jamaica, uma infusão de folhas de *Piper aduncum* e *Piper hispidum* é utilizada para aliviar dores no estômago. Enquanto que, no México e no Brasil, é comum tratar infecções do fígado e baço com folhas de pariparoba (*Piper amalago*) (FACUNDO, *et al.*, 2008).

Conhecida como matico ou erva do soldado, (*Piper aduncum*) é nativa do sul do México e abundante nas regiões tropicais da América do Sul. Essa planta é muito empregada no Peru para eliminar hemorragia e como aplicação local para tratar feridas, e tem sido usada na medicina tradicional européia no tratamento de doenças dos órgãos geniturinários. Também tem sido descrito como remédio em disenteria e diarreia e especialmente como hemostático local, utilizado muitas vezes na forma de pó embora o extrato fluido seja a forma preferível para administração interna (TAYLOR, 2006).

Nesse contexto, outras espécies de *Piper* como *Piper aduncum* L.; *Piper arboreum* Aubl.; *Piper caldense* C. DC. e *Piper tuberculatum* Jacq, conhecidas popularmente em vários locais da Mata Atlântica como aperta-ruão, alecrim-de-angola, pimenta d'água e pimenta de macaco, respectivamente, são usadas de forma empírica para tratar doenças do trato gastrointestinal, doenças sexualmente transmissíveis, infecção urinária e até como repelentes de insetos (PARMAR *et al.* 1997). Além desses mencionados, uma preparação tópica de folhas de *P. marginatum* e *P. tuberculatum* é utilizada pelas populações locais no Nordeste do Brasil para tratar envenenamento por picada de cobra e como sedativo local (FACUNDO *et al.*, 2008).

Pohlit e colaboradores (2004) prepararam e testaram extratos aquosos, etanólicos e metanólicos obtidos de 56 espécies de plantas encontradas no Estado do Amazonas contra larvas do mosquito da espécie *A. aegypti*. Os extratos metanólicos foram, em geral, os que

apresentaram maior atividade larvicida, destacando-se sete espécies cujos extratos levaram a morte de todas as larvas desse inseto, dentre elas *P. aduncum* (folha e raiz) e *P. tuberculatum* (folha, fruto e talos).

Óleos essenciais de quatro espécies de *Piper* oriundas da região Amazônica: *Piper gaudichaudianum*, *Piper permucronatum*, *Piper humaytanum* e *Piper hostmanianum*, foram testados com êxito contra larvas do mosquito da espécie *Aedes aegypti*. Além desses, óleos extraídos de outras plantas do gênero *Piper*, coletadas também na região Amazônica, apresentaram quantidade apreciável do dilapiol, um produto com ação inseticida comprovada (RODRIGUES, 2009). Cabe mencionar que a maioria dos compostos isolados de espécies *Piper* como OE, lignanas, arilpropanóides e sesquiterpenos são substâncias com grande importância médica e econômica. O óleo de sassafrás, o safrol, é uma matéria-prima utilizada pela indústria química para síntese de heliotropina, um fixador de fragrâncias, e butóxido de piperolina, usado como inseticida natural e pesticida (FACUNDO *et al.*, 2008).

Extratos obtidos de muitas outras espécies de *Piper* possuem indicações medicinais devido às suas propriedades bactericidas e fungicidas entre outras. Adicionalmente, estudos fitoquímicos de espécies pertencentes ao gênero *Piper* revelaram a presença de substâncias com ação psicotrópica, antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, inseticida, fungicida e anti-leishmania (POTZERNHEIM *et al.*, 2006).

Estudos desenvolvidos revelaram a presença de substâncias derivadas de espécies de *Piper* as quais apresentaram atividade antiparasitária comprovada contra diversas formas do parasito de *Leishmania*. O extrato de *Piper betle* mostrou atividade contra promastigotas de *Leishmania donovani*, *Piper chaba* foi eficaz contra promastigotas de cepas de *L. donovani*, *Piper hispidum* foi efetivo contra a forma amastigota de *L. amazonensis* e os extratos e frações de *Piper ovatum* apresentaram atividade contra promastigota e amastigota de *L. amazonensis*. Extratos e frações de *Piper reginelli* (Mic) DC. var *pallescens* (C. DC.) Yunck eliminou formas promastigotas de *L. Amazonensis* (SALES *et al.*, 2018).

Substâncias obtidas das espécies do gênero *Piper* são consideradas agentes biológicos poderosos com propriedades medicinais incluindo antitumorais. O extrato clorofórmico do caule de *P. aborescens*, por exemplo, apresentou atividade citotóxica para células KB (carcinoma nasofarínge), P-388 (leucemia linfocítica) e HT-29 (carcinoma de cólon) *in vitro* (BEZERRA *et al.*, 2006).

Piper cubeba é uma espécie com valor alimentar muito empregada na culinária da Europa, Arábia, Índia, Indonésia e Marrocos, e que possui diversas moléculas bioativas, dentre elas uma lignana chamada cubebina. A cubebina possui várias atividades biológicas conhecidas,

com ação analgésica e antiinflamatória, tripanocida, anti-leishmania e atividade antitumoral. A atividade antitumoral da cubebina foi avaliada utilizando oito diferentes linhagens tumorais humanas, e seu efeito “*in vivo*” foi testado contra o tumor sólido de Ehrlich em um modelo experimental. Neste trabalho, o autor constatou inibição de crescimento celular em 6 das 8 linhagens estudadas, e alta seletividade para a linhagem K562 (leucemia). Em relação ao tumor, não foi observada diferença estatística significativa entre os controles utilizados no estudo (PEREIRA, 2016).

2.3 *Piper tuberculatum* Jacq

Dentro do gênero *Piper* encontra-se a espécie *Piper tuberculatum*, comumente conhecida como pimenta longa, pimenta d’arda ou pimenta de macaco (FACUNDO *et al.*, 2008). A mesma pode ser observada na **Figura 3**. Essa planta é um arbusto, medindo aproximadamente 2-4 metros de altura, seus ramos são glabros e verruculosos com 6 mm de diâmetro. As folhas são simples, oblongas e membranáceas, glabras em ambas as faces e com glândulas translúcidas, apresentando nervuras providas de tricomas. Essa espécie possui flores e frutos diminutos, medindo de 1-1,5 mm, agrupados em inflorescências que se dispõem de forma ereta oposta as folhas (GUIMARÃES; CARVALHO-SILVA, 2012).



Figura 3: *Piper tuberculatum* Jacq (PIPERACEAE)
Jardim Didático de Botânica - CCS/UFRJ

A *Piper tuberculatum* ocorre, geralmente, em locais elevados com altitudes acima de 500 metros do nível do mar, em solos úmidos e locais brejosos (CASTRO, 2007). Em 2002, Scott e colaboradores relataram que essa espécie é muito comum na Costa Rica, onde ela é utilizada para construir cerca viva. Com relação a sua distribuição geográfica, a *Piper tuberculatum* está amplamente distribuída pelas Américas, do México à Argentina. No Brasil ela ocorre nos Estados do Amazonas, Pará, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso, São Paulo e Mato Grosso do Sul (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Muitas espécies pertencentes à família Piperaceae já foram largamente estudadas, no entanto, a espécie *P. tuberculatum* ainda é pouco investigada do ponto de vista químico e biológico (CASTRO, 2007). Este cenário tem mudado na última década com novos trabalhos de pesquisas publicados envolvendo essa espécie, principalmente devido à ação de suas amidas: pipartina e piperina, as quais possuem importantes propriedades biológicas comprovadas com ação antitumoral, hipotensora, fungicida e inseticida, entre outras (SIMÕES, *et al.*, 2015).

Em 2009, Rodrigues investigou a atividade antinociceptiva de extratos e compostos isolados de frutos de *Piper tuberculatum* Jacq em modelo animal, utilizando camundongos e ratos. Nesse estudo foi constatado que a administração por via oral e intraperitoneal, tanto de extratos quanto de substâncias isoladas, foram capazes de reduzir de forma significativa e dose dependente a nocicepção, que é o termo equivalente a dor em animais de experimentação, avaliado pelo modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Em 2015, Simões e colaboradores avaliaram através de ensaios *in vitro* a ação do extrato de *Piper tuberculatum* sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni* da cepa BH. Os testes revelaram que quando usado em altas concentrações (1000 e 2000µg/ml), este extrato levou a morte de todos os espécimes expostos em até 2 horas. Porém, quando usado em dosagens mais baixas (25 a 750µg/ml), matou todos os exemplares testados somente após 72 horas de exposição.

Estudos envolvendo espécies do gênero *Piper* permitiram isolar e identificar substâncias de diferentes classes químicas, dentre as quais os denominados metabólitos secundários. Essas moléculas apresentaram importantes propriedades biológicas, podendo ser citado como exemplo, a pipartina, um alcalóide/amida extraída de espécies do gênero *Piper*,

incluindo a *P. tuberculatum* que apresentou ação antitumoral *in vivo* e *in vitro* (BEZERRA *et al.*, 2006).

Bezerra e colaboradores (2006) testaram a atividade antitumoral da piplartina e da piperina extraídas de raízes de *P. tuberculatum* através de modelo *in vivo* utilizando ratos transplantados com células de sarcoma 180. Seus resultados demonstraram que ambas as substâncias foram capazes de reduzir o crescimento de tumores tornando essas substâncias potencialmente promissoras no combate ao câncer.

Posteriormente, esses autores examinaram a ação antiproliferativa apenas da piplartina em linhagens de células de leucemia humana HL-60. Os tratamentos preliminares com 6 e 12 horas de exposição, mostrou um declínio discreto e constante na viabilidade celular após 24 horas de tratamento na concentração de 10 µg/mL. Além disso, os autores constataram que as células tratadas com piplartina em uma concentração mais baixa (2,5 µg/ml) resultaram em morte celular por apoptose. Estes resultados indicam que a piplartina é capaz de reduzir a sobrevivência de células de leucemia humana desencadeando eventos de apoptose e/ou necrose em função dos tempos e das concentrações utilizadas (BEZERRA *et al.*, 2007).

Diferentes trabalhos avaliaram o efeito de substâncias vegetais com potencial farmacológico promissor, dentre as quais se destaca a piplartina, extraída das raízes de *P. tuberculatum* por processos químicos simplificados. A importância desta substância deve-se, sobretudo, ao seu potencial citotóxico e anticancerígeno. Foi comprovado que a piplartina associada ao 5-fluorouracil potencializou o efeito antitumoral deste fármaco, diminuindo o crescimento de tumores *in vitro* e *in vivo*. Esse estudo concluiu que quando as duas substâncias são administradas juntas produzem melhores resultados do que separadamente. Além disso, a combinação das duas drogas foi capaz de reverter a leucopenia causada em animais tratados apenas com 5-fluorouracil (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010)

Mais recentemente, foi avaliada a atividade citotóxica da piplartina obtida da espécie *P. tuberculatum* contra o câncer colorretal, utilizando células de carcinoma colorretal HCT-116. Para isso, foram utilizados três tipos celulares diferentes: selvagem e deficiente para as proteínas Bax, p21 e p53, e uma cultura celular não tumoral (Hek-293), as quais foram tratadas com diferentes concentrações da piplartina. Observou-se uma diminuição na viabilidade das células HCT-116, independentemente do tipo celular usado. Surpreendentemente, a piplartina apresentou seletividade para células tumorais, com baixa toxicidade para a cultura celular não tumoral (Hek-293). Os dados apresentados neste trabalho

sugerem que a piplartina é uma substância com propriedade anticancerígena promissora que poderá ser usada na terapia do câncer colorretal (MACHADO, 2016).

2.4 Óleos essenciais

OE ou essências são misturas complexas produzidas pelas plantas aromáticas, especificamente pelo metabolismo secundário dessas espécies. O metabolismo das plantas pode ser subdividido em duas classes distintas de acordo com o grupo de substâncias presentes e a sua funcionalidade. O metabolismo primário ou essencial está relacionado com o crescimento e desenvolvimento do vegetal e é formado por substâncias que a planta produz para o seu próprio consumo. Enquanto que, o metabolismo secundário ou especial, é responsável pela defesa natural das plantas aromáticas contra as agressões do meio ambiente. Esse metabolismo é constituído por um grupo de compostos denominados metabólitos secundários, dentre os quais se encontram os OE (SIMÕES *et al.*, 1999).

Os óleos essenciais estão primordialmente envolvidos nos mecanismos de defesa natural das plantas aromáticas contra predadores herbívoros. Apresenta também, importante papel relacionado à reprodução de espécies aromáticas promovendo a atração de polinizadores para dispersão de pólenes e sementes, além de desempenhar diversas outras funções, tais como a retenção da umidade e defesa contra agentes patogênicos como bactérias, fungos e vírus (FERREIRA, 2014).

A distribuição dos OE não é homogênea em todo o vegetal. Podem estar presentes em órgãos anatômicos como folhas, ramos, raízes, rizomas, flores, frutos, sementes, madeira e casca do caule. Contudo, são encontrados com maior frequência nas partes verdes, devido às rotas metabólicas da fotossíntese (ORLANDA, 2011).

As principais características de um OE, especialmente após sua extração, são o odor marcante e a sua volatilidade em temperatura ambiente (MOCHI, 2005). Outras características peculiares aos OE são a sua aparência oleosa a temperatura ambiente, baixa solubilidade em água, aspecto incolor ou levemente amarelado e instabilidade ao calor e ao ar; por isso devem ser armazenados em frasco de vidro âmbar bem vedado e sob refrigeração (MORAIS, 2009).

Diversos fatores podem ser apontados como responsáveis pela variação no teor e composição química de OE nas plantas: a localização geográfica, tipo de solo e idade do vegetal, época do ano e horário de coleta de material para extração são os mais mencionados. Além desses, a escassez de água e o aumento da radiação luminosa, são apontados como

fatores que favorecem o a produção de OE pelas plantas e tem um papel fundamental na sua composição quantitativa e qualitativa (FERREIRA, 2014).

A precipitação pluviométrica é um fator relevante na alteração no metabolismo de síntese de OE pela planta, de maneira que a exposição do vegetal a um ambiente de chuvas intensas e constantes culmina na perda de substâncias hidrossolúveis presentes principalmente nas folhas e flores. Recomenda-se, portanto, aguardar no mínimo três dias depois de uma chuva para fazer coletas de material vegetal para extração, considerando que este seria um tempo seguro até que os teores de OE retornem aos níveis normais (MORAIS, 2009).

A norma ISO 9235:2013 se enquadra no âmbito do trabalho de normalização dos óleos essenciais. Em sua redação atual, esta norma introduziu novas terminologias para definir os óleos essenciais por termos como águas destiladas aromáticas, matéria-prima natural de origem vegetal obtida por hidrodestilação, ou ainda, produto obtido por processamento mecânico a partir do pericarpo dos frutos cítricos (BUZATO *et al.*, 2014).

O mercado mundial de OE gira a quantia astronômica de US\$15 milhões/ano, com previsão de crescimento aproximado de 11% por ano. O Brasil se destaca entre os principais países fornecedores dos OE de laranja, limão, lima e outros cítricos, contribuindo anualmente com 5% do total de óleos importados. Além disso, o Brasil ocupa lugar de destaque na produção mundial de OE, posicionando-se ao lado da Índia, China e Indonésia, que, juntos, são considerados os 4 grandes produtores mundiais (BIZZO *et al.*, 2009).

2.5 Métodos de extração de óleos essenciais

Diversos métodos podem ser empregados para a extração de OE de plantas aromáticas, dentre os quais, a hidrodestilação, a maceração, a extração por solvente, a enfleuragem, gases supercríticos e por microondas são as técnicas mais utilizadas (MOCHI, 2005). São identificados ao menos dois métodos diferentes do processo de destilação utilizando água/vapor na extração de OE: a hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado (HDCM), **Figura 4**, e destilação com arraste a vapor de água (SANTOS *et al.*, 1999). Na extração por vapor de água e na hidrodestilação observa-se o mesmo princípio, nos quais ambas retiram os OE por arraste a vapor, diferindo apenas no modo de preparação do material. Na extração a vapor de água, o vapor perpassa a amostra através de serpentinas e na hidrodestilação a amostra botânica é depositada na água como um chá onde permanece submersa ou flutuando e os OE são arrastados pelos vapores produzidos durante a ebulição da água (ORLANDA, 2011).



Figura 4: Aparelho de Clevenger modificado.

Fonte: (<https://www.indiamart.com/proddetail/clevenger-apparatus-14999654162.html>)

2.6 Atividade biológica do óleo essencial de *P. tuberculatum*

Medicamentos a base de plantas com atividade biológica são conhecidos desde 1500 a.C. No entanto, o estudo racional e organizado de plantas (fitoquímica) como fontes de agentes anticancerígenos somente começou na década de 40, quando pela primeira vez, substâncias de origem vegetal foram testadas e associadas com a atividade antitumoral (HARTWELL, 1967).

Nos últimos anos, o interesse por plantas medicinais cresceu muito, especialmente em áreas prioritárias como no tratamento do câncer, de modo que aproximadamente 50% dos medicamentos utilizados atualmente na terapia contra o câncer, os quais estão disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento, são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais (RODRIGUES, 2009).

Dentre as diversas substâncias de importância médica obtidas de vegetais, destacam-se os OE. A relevância desses produtos reside na sua composição abundante e diversificada, razão pela qual têm sido alvo de vários estudos por parte de pesquisadores em todo o mundo. Acredita-se que, devido a essas características, os OE apresentem a propriedade de inibir o crescimento de células tumorais testadas *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, o estudo com OE, sobretudo aqueles obtidos de espécies pouco estudadas dos pontos de vista fitoquímico e biológico, pode representar um avanço importante na busca por novas substâncias mais ativas e menos tóxicas que podem ser usadas no tratamento contra várias doenças (SOUZA, 2013).

As atividades biológicas presentes nas plantas medicinais aromáticas geralmente são atribuídas aos seus metabólitos secundários, como os óleos voláteis, que na maioria das vezes possuem estrutura química complexa com a presença de centros químicos bioativos responsáveis pelos mais variados tipos de substâncias com ação farmacológica. É possível que tanto o óleo quanto um determinado constituinte isolado apresente respostas biológicas semelhantes, o que permite supor que o constituinte que apresentar efeito muito semelhante ao do óleo é a sua substância ativa, podendo este ser ou não o constituinte predominante no óleo (ORLANDA, 2011).

Foram raros os estudos com OEPT que resultaram em avaliação da sua atividade biológica, destacando-se entres os quais, um ensaio antifúngico realizado por Navickiene *et al* (2006), no qual os autores testaram separadamente os OE dos frutos de *P. aduncum* e *P. tuberculatum*, constatando em ambos os óleos, alta atividade contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. Sphaerospermum*. Uma pesquisa realizada por Lavor e colaboradores (2012), avaliou o efeito larvicida do OEPT contra larvas de terceiro estágio do mosquito da dengue (*A. aegypti*). Neste ensaio, o óleo testado apresentou um alto valor de letalidade, permitindo concluir que este óleo poderá ser usado como um larvicida natural de maneira bastante eficaz.

Foi investigada a atividade antibacteriana do OEPT em associação com diferentes antibióticos contra as culturas de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*. Determinou-se como parâmetro uma concentração inibitória mínima (CIM) de 256 µg/mL considerada clinicamente relevante. O resultado encontrado neste trabalho revelou uma atividade antibacteriana do OEPT com CIM de 1024 µg/mL contra todas as cepas de bactérias. Do total das drogas testadas, o OEPT apresentou uma melhor atividade quando associado ao Imipenem (TIENAN®) frente todas as bactérias avaliadas, demonstrando que este óleo pode representar uma alternativa viável no desenvolvimento de novas drogas antibacterianas com origem em produtos naturais (SALES *et al.*, 2017).

Um estudo publicado recentemente avaliou a atividade antiparasitária do OEPT contra linhagens de *Leishmania braziliensis* (MHOM / CO / 88 / UA301), *Leishmania infantum* (MHOM / ES / 92 / BCN83) e *Trypanosoma cruzi* (clone LC-B5). Os resultados obtidos neste trabalho constataram que o óleo induziu a morte celular de mais de 87% contra as formas de *L. infantum* em todas as concentrações estudadas. Na forma anterior a promastigota de *L. infantum*, causou a morte de 50,5% dos parasitas. A letalidade do óleo contra promastigotos de *L. braziliensis* foi de 77%, e contra *T. cruzi*, resultou em 65% de morte contra este parasita (SALES *et al*, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

A família Piperaceae, sobretudo as espécies pertencentes ao gênero *Piper*, exibem um histórico de uso na medicina popular em todo o mundo como demonstrado pela revisão de literatura. Além disso, estudos comprovaram diversas propriedades com ação biológica antiparasitária, fungicida, bactericida, entre outras, envolvendo espécies de Piperaceae.

A atividade antitumoral de substâncias obtidas de extratos de *Piper*, incluindo *Piper tuberculatum*, foi observada em estudos realizados *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, existem poucos estudos explorando o efeito citotóxico de OE de espécies de *Piper* e, especificamente, nenhum trabalho foi encontrado avaliando a atividade biológica do óleo essencial de *Piper tuberculatum* (OEPT) em células epiteliais tumorais humanas. Para suprir essa necessidade, é importante estabelecer uma metodologia de extração bem definida, com um protocolo otimizado de coletas de material botânico em diferentes horários e época do ano, que permita prever quais as condições ideais para se obter melhor rendimento e perfil de componentes químicos dos óleos essenciais dessa planta para ser utilizado nos ensaios de atividade biológica. Neste sentido, este trabalho pretende contribuir para o conhecimento químico dos produtos voláteis de dessa espécie e investigar o efeito citotóxico dos seus óleos essenciais sobre diferentes tipos celulares.

Adicionalmente, é importante ressaltar que o conhecimento da composição química e das propriedades biológicas do óleo essencial de *P. tuberculatum* poderá contribuir para direcionar ações de conscientização e preservação dessa espécie na natureza.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

- Estabelecer uma metodologia para avaliar melhor as possíveis variações no teor e na composição dos constituintes químicos dos óleos essenciais extraídos das folhas frescas e das folhas secas de *Piper tuberculatum* (OEPT) coletadas em diferentes momentos, avaliar a sua propriedade antioxidante e a sua ação biológica em células humanas e murinas.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar um estudo dos óleos essenciais das folhas frescas e das folhas secas coletadas em diferentes horários durante um dia (fase diurna), através da coleta do material, extração por HDCM e análises por cromatografia com fase gasosa associada à espectrometria de massas (CG/EM);
- Verificar a influência sazonal no rendimento dos óleos essenciais extraídos das folhas frescas coletadas durante as estações do ano no horário de maior rendimento, identificada no estudo circadiano, através da extração por HDCM;
- Avaliar o efeito *in vitro* do OEPT sobre a viabilidade, proliferação e migração de células epiteliais intestinais humanas (HCT-8), e/ou fibroblastos de pele humana (HFF-1) e macrófagos peritoneais murinos (MO).
- Investigar o efeito antioxidante do OEPT pela metodologia de DPPH;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Estudo circadiano

A coleta das folhas de *P. tuberculatum* foi realizada no Jardim Didático de Botânica da UFRJ (Campus da Ilha do Fundão) em agosto de 2015. As coletas ocorreram a cada três horas a partir das 7 até as 16 horas perfazendo quatro coletas diurnas. O total de folhas coletadas foi de 1 kg por coleta, e destas, 100 g foram separadas para a extração à fresco e utilizadas imediatamente para realizar a extração de óleos das folhas frescas. As folhas separadas para a extração a seco (900 g), foram deixadas por 48 horas em estufa de secagem para plantas com circulação de ar a temperatura de 40°C. Após o tempo de secagem, as folhas secas foram novamente pesadas para obter o peso das folhas secas (obtidas a partir das folhas frescas) e utilizadas para fazer a extração de óleos a seco.

5.2. Estudo sazonal

Para avaliar as possíveis variações sazonais ocorridas ao longo de um ano, quatro coletas (100 g) de folhas de *P. tuberculatum* foram realizadas durante este período, sendo uma coleta por estação. As coletas foram feitas no horário de maior rendimento de óleo identificado no estudo circadiano, descrito anteriormente (16 horas). As folhas coletadas, ainda frescas, foram pesadas, trituradas e encaminhadas imediatamente para extração dos óleos essenciais.

5.3. Herborização

Foi realizada uma coleta da espécie de estudo contendo as estruturas aéreas como folhas, galhos, frutos e sementes. Todo material coletado foi dessecado em folhas de jornal utilizando um prensa de madeira por 72 horas para confeccionar uma exsicata. A identificação botânica da espécie foi realizada pela Dra. Elsie Franklin Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ). Uma cópia da exsicata encontra-se depositada sob o registro RFA N° 40.760 para *P. tuberculatum* no Herbário do Departamento de Botânica da UFRJ.

5.4. Obtenção dos óleos essenciais

As folhas frescas e secas de *P. tuberculatum* foram pesadas, trituradas manualmente e transferidas, por sua vez, para um balão de vidro de 2 L contendo 1250 mL de água destilada e algumas pedras de cerâmica. A seguir, o balão foi acomodado a uma manta aquecedora

apropriada com controle de temperatura. Em seguida, foi adaptado um condensador na extremidade superior do aparelho de Clevenger modificado para refrigerar o sistema. O conjunto foi adaptado à saída do balão de destilação e iniciou-se o aquecimento. Após a formação da primeira gota do condensado, estabilizou-se a temperatura da ebulição até o final da destilação, durante 2 horas a partir da ebulição da água, quando o aquecimento foi desligado.

Os óleos obtidos foram extraídos da fase aquosa por decantação e partição líquido-líquido com diclorometano (3 x 10 mL) utilizando funil de separação tipo Liebig. O óleo produzido foi seco com sulfato de sódio anidro, acondicionado em frascos de vidro e mantido sob refrigeração para evaporar o solvente. O rendimento dos OE foi obtido de acordo com as expressões: T_{ff} (teor de óleo de folha fresca) = massa do óleo (g) / massa de folha fresca (g) x 100 e T_{fs} (teor de óleo de folha seca) = massa do óleo (g) / massa de folha seca (g) x 100.

5.5. Análise dos componentes do OEPT

As análises dos OE foram realizadas na Central Analítica do IPPN-UFRJ, utilizando um cromatógrafo com fase gasosa (GC2010 Gas Chromatograph Shimadzu) associado a um espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus Gas Chromatograph Mass Spectrometer Shimadzu) equipado com uma coluna de sílica DB-5ms (25m x 0,25mm x 0,25 μ m). As temperaturas programadas foram: injetor 260°C, temperatura interfase 200°C e temperatura fonte 200°C com gradiente de aquecimento de 60 °C à 240°C (3°C/min). Gás carreador (Hélio) a 1.0 mL x min⁻¹ para a CG/EM. As substâncias presentes nos óleos foram identificadas pelos cromatogramas e espectros de massas, utilizando os tempos de retenção e respeitando os valores dos índices de similaridade.

5.6. Método de captação de radicais

A captação de radicais é o principal mecanismo de ação dos antioxidantes. O método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) baseia-se na transferência de elétrons pela ação de uma espécie antioxidante, através da qual o radical (DPPH) que possui cor púrpura é reduzido formando hidrazina (DPPH reduzido), de coloração amarela. (**Figura 5**). Normalmente são utilizados como veículos de diluição, solventes orgânicos polares, como por exemplo, metanol, incubados em temperatura ambiente, na maioria dos casos após 30 minutos depois de iniciada a reação. A captação deste radical é medida através da diminuição da absorbância no comprimento de onda de 515 nm (NASCIMENTO, 2011).

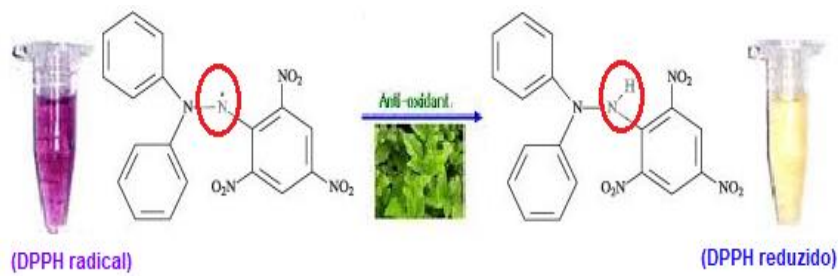


Figura 5: Mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante.

Adaptado de <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html> 2018

5.7. Ensaio de atividade antioxidante

Para a análise da atividade antioxidante do OEPT, foi preparada uma solução de DPPH (50 μM) em álcool metílico para controle negativo e uma solução padronizada de ácido ascórbico (25 μM) que foi usada como controle positivo da reação. As concentrações do OEPT usadas neste ensaio foram 500, 250, 150, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ utilizando o metanol como veículo de diluição. Todas as amostras foram feitas em triplicatas e preparadas a partir da solução estoque do OEPT 1 mg/mL esterilizada em membrana de 0,22 μm (Millipore). Em cada amostra preparada foram adicionados 600 μL da solução de DPPH 50 μM exceto no controle de branco (amostra sem DPPH) que recebeu igual volume do veículo de diluição. As amostras foram incubadas por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. A variação da absorbância foi mensurada utilizando espectrofotômetro UV (Perkin Elmer) a 515 nm. A atividade antioxidante (AA) foi calculada pela equação: $\text{AA} (\%) = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$

Em que: A_0 controle (-) = Absorbância da solução de DPPH sem a amostra; A_t = Absorbância da amostra com o DPPH.

5.8. Cultura de células

As células epiteliais intestinais humanas de linhagem HCT-8 e fibroblastos de pele humana HFF-1, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para conduzir os ensaios, as células foram previamente cultivadas em garrafas plásticas de cultura com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Life Technologies), suplementado com 4,5 g/L de glicose, 10% de soro fetal bovino inativado (SIGMA), 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (SIGMA) e 2 mM de L-glutamina (SIGMA), intitulado como meio DMEM completo. As células foram mantidas na estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de

CO₂. Em intervalos de dois ou três dias, as culturas foram expandidas utilizando Triple Express (Life Technologies) ou Tripsina (SIGMA) para fazer o repique e troca do meio de cultura.

5.9. Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Para obtenção de macrófagos peritoneais, camundongos da linhagem BALB/c foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, o peritônio foi exposto e foram injetados 10 mL de PBS gelado. A cavidade peritoneal foi massageada e o líquido foi aspirado, transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado a 1300 rpm por 10 minutos. A seguir o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em 1 mL de meio DMEM incompleto. As células obtidas foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em meio DMEM por 1 hora na estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS e o meio de cultura foi renovado.

5.10. Tratamento das células

Após 24 horas de plaqueamento, as células HCT-8, HFF-1 e os macrófagos peritoneais foram tratados em triplicata com diferentes concentrações de óleo essencial circadiano de *P. tuberculatum*, mantendo um intervalo de um poço entre as diferentes concentrações para evitar contaminação do poço vizinho por evaporação. As concentrações de OEPT estudadas foram de 500 a 3,12 µg/mL, obedecendo aos tempos de tratamento de 24, 48 e/ou 72 horas. O OEPT (obtido de folhas frescas e secas no estudo circadiano) foi pesado em balança analítica, diluído em DMSO para obter uma solução estoque de 1 mg/mL e filtrado em membrana de 0,22 µm (Millipore). As concentrações de uso foram obtidas a partir da solução estoque por diluição em meio DMEM completo. Para cada concentração de óleo utilizada foram testadas concentrações correspondentes de DMSO, para aferir sua toxicidade para a célula, bem como foram feitos controles contendo apenas meio DMEM completo e controle positivo de morte celular utilizando Triton 1%.

5.11. Redução do sal de tetrazólio (MTT)

O MTT é muito utilizado em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular. Esta técnica baseia-se na medida do dano causado pela substância-teste ao metabolismo celular de açúcares, principalmente na atividade das enzimas mitocondriais desidrogenases presentes nas células viáveis, as quais são responsáveis por converter o sal tetrazólio (sal de coloração amarela e solúvel em água) à formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em

água) conforme mostrado na **Figura 6**. A variação de cor produzida por esta reação pode ser quantificada por espectrofotometria. Desse modo, a quantidade de formazan produzido será proporcional ao número de células viáveis presentes na cultura (MOSMANN, 1983).

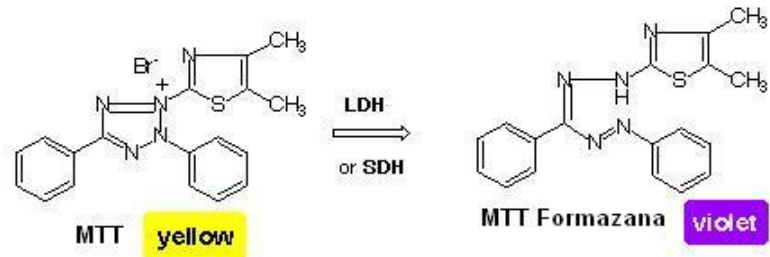


Figura 6. Redução do sal tetrazólio (MTT) à formazana (MOSMANN, 1983).

5.12. Ensaio de viabilidade celular

As células HCT-8, HFF-1 e MO foram semeadas na densidade de 5×10^4 células por poço em placas de cultura de 96 poços por 24 horas. Após 24 horas o meio de cultura foi renovado e as células foram submetidas ao tratamento como descrito no item 5.10. Após o término dos tratamentos, a placa de cultura foi centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o meio foi renovado e a viabilidade total das células foi avaliada através de um ensaio colorimétrico utilizando o reagente MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Molecular Probes). O MTT foi diluído em PBS estéril na concentração de (5 mg/mL), em seguida, foi adicionado 10 μ l de MTT por poço e as células foram incubadas por 2 horas na estufa à 37°C e a 5% de CO₂. Depois disso, a placa foi novamente centrifugada a 1300 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 μ l de DMSO por poço. A placa foi novamente incubada por 10 minutos na estufa de CO₂ a 37°C e, em seguida, o resultado da variação de cor foi determinado através de um leitor de placas (BIOTECMod Power Wazexs) com filtro para captação do comprimento de onda na faixa de 585 nm.

5.13. Ensaio de proliferação celular

As células HCT-8 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5×10^4 células por poço. Após 24 horas, o meio de cultura foi renovado e as células receberam os tratamentos por 72 horas com OEPT como descrito no item 5.10. O ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando um kit comercial (BrdU Cell Proliferation Assay, Millipore), onde 4 horas antes do término dos tratamentos, as células foram incubadas com BrdU diluído

em meio de cultura, permanecendo até o final dos tratamentos. Após as 4 horas de incorporação celular de BrdU pelas células HCT-8, o sobrenadante foi descartado e as mesmas foram incubadas com solução fixadora por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, a solução fixadora foi descartada e as células foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem, seguido da incubação com o anticorpo anti-BrdU por 1 hora à temperatura ambiente. A próxima etapa foi lavar as células 3 vezes com tampão de lavagem e incubar com o anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:2000, ZIMED) diluído em PBS por 30 min à temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem, seguido de uma última lavagem com água destilada. Para finalizar o ensaio, as células receberam TMB (3, 3', 5, 5' - Tetramethylbenzidine), o substrato da reação via peroxidase, por 30 min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. O kit utilizado nessa análise é baseado em um ensaio colorimétrico, onde o resultado da variação de cor foi aferido em leitor de placas (BIOTECS Mod Power Wazexs) com filtro para captação para o comprimento de onda de 450nm.

5.14. Ensaio de migração celular

As células HCT-8 foram semeadas em placas de 24 poços por 24 horas a fim de obter-se uma monocamada de células parcialmente confluyente. Em seguida, com o auxílio de uma ponteira P1000 estéril foi realizado um risco em forma de cruz na cultura celular, produzindo mecanicamente uma lesão na cultura de células. O meio de cultura foi renovado e as células receberam diferentes tratamentos com OEPT nas concentrações teste de 200, 150 e 100 µg/mL. Logo em seguida, a cultura de células foi fotografada em microscópio óptico invertido, a fim de verificar e registrar a configuração da cultura celular após os tratamentos no “tempo zero”. O campo fotografado foi registrado e após 48 e 72 horas as células foram novamente fotografadas, no mesmo campo do “tempo zero”, para a avaliação da migração celular. As imagens em contraste de fase foram capturadas em um microscópio óptico, na objetiva de 4x, acoplado a uma câmera. A aquisição das imagens foi realizada utilizando um programa computadorizado (BEL Eurisko). A análise do experimento foi realizada utilizando o programa computadorizado de captura de imagens (Leica QWin Plus V 3.5.1, Leica Microsystems Ltd), onde subtraímos do tamanho total da imagem o espaço na cultura de células produzido com o risco. Em seguida, o espaço medido foi comparado entre as imagens adquiridas no “tempo zero” e as imagens captadas 48 e 72 horas depois dos tratamentos.

5.15. Análise estatística dos dados

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho foram organizados e representados graficamente em planilhas. Para a realização da análise estatística dos dados foi utilizado o programa computadorizado GraphPad Prism 5 (La Jolla, EUA), e o teste estatístico empregado foi o teste t de Student para comparações múltiplas, no qual os tratamentos são comparados a um tratamento controle de referência ou controle padrão. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos para o nível de significância $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Estudo circadiano

6.1.1 Rendimento dos óleos essenciais circadianos de *P. tuberculatum* Jacq

O resultado obtido neste estudo permitiu observar que o rendimento dos óleos essenciais circadianos manteve seu percentual irregular ao longo do dia para as frações foliares frescas e secas, atingindo seu maior rendimento às 16 horas para ambas as frações. O rendimento do óleo obtido das folhas secas foi comparativamente maior em relação às frescas, com exceção das coletas feitas às 13 horas, quando não houve diferença. Comparando-se os resultados obtidos às 16 horas para ambas as frações, constatou-se que, embora a fração das folhas secas ofereçam um maior rendimento em relação às frescas, esta mostrou ser a mais vantajosa se considerarmos que o seu consumo de biomassa foi comparativamente nove vezes menor. Desta maneira, pode-se concluir que o maior rendimento efetivo de óleos essenciais na espécie estudada é obtido utilizando folhas frescas coletadas às 16 horas. Todos esses resultados podem ser observados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Rendimento dos óleos essenciais circadianos obtidos das folhas frescas e secas de *Piper tuberculatum* Jacq (Piperaceae).

| Coletas | Massa das folhas frescas (100g) | Massa das folhas secas (a partir de 900g de folhas frescas) | Rendimento dos óleos essenciais circadianos (%) | |
|---------|---------------------------------|---|---|---------|
| | | | Fresca | Seca |
| 7h | 100 | 94 | 0,0129 | 0,0375 |
| 10h | 100 | 76 | 0,007 | 0,0253 |
| 13h | 100 | 94 | 0,0168 | 0,0164 |
| 16h | 100 | 86 | 0,02649 | 0,04895 |

6.1.2. Análise circadiana dos componentes dos óleos de *P. tuberculatum*

O perfil cromatográfico dos óleos essenciais analisados das folhas frescas e secas mostrou, ao longo da experiência, a presença de quatro componentes percentualmente majoritários, oito componentes com destaque mediano e grande número de componentes minoritários. Como podem ser observados na **Tabela 2**, os principais constituintes detectados nos óleos essenciais extraídos das folhas secas e a variação dos seus percentuais relativos ao longo da experiência são: cariofileno (2,91%-4,52%); beta-farneseno (2,15%-3,75%); germacreno D (8,96%-14,98%); germacreno B (0,81%-3,77%); delta-cadineno (3,06%-4,17%); *trans*-nerolidol (12,53%-13,98%); espatulenol (3,49%-5,12%); óxido de cariofileno (2,74%-3,06%); patchulano (4,47%-7,30%) e fitol (3,29%-7,62%). A análise detalhada dos resultados obtidos na extração das folhas secas permitiu verificar que os componentes majoritários foram o germacreno D e o *trans*-nerolidol. Os principais constituintes detectados nos óleos essenciais extraídos das folhas frescas e a variação dos seus percentuais relativos ao longo da experiência são: cariofileno (1,46%-6,66%); beta-farneseno (0,35%-2,51%); germacreno D (4,11%-14,05%); germacreno B (0,81%-2,73%); delta-cadineno (1,51%-4,95%), *trans*-nerolidol (8,96%-13,92%); espatulenol (3,16%-4,12%); óxido de cariofileno (1,29%-2,40%); patchulano (6-19%-11,60%) e fitol (2,89%-23,95%). Os componentes percentualmente majoritários nos óleos essenciais das folhas frescas foram o patchulano e o fitol. Os índices de Kovats das substâncias identificadas no óleo essencial de folhas frescas de *Piper tuberculatum* coletadas no horário de 16 horas estão mostrados na **Tabela 3**.

Tabela 2: Composição química circadiana (%) dos óleos essenciais das folhas frescas e secas de *Piper tuberculatum* Jacq (Piperaceae).

| Substâncias | TR | 7h | | 10h | | 13h | | 16h | |
|--|-------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| | | Folha Fresca %A | Folha Seca %A | Folha Fresca %A | Folha Seca %A | Folha Fresca %A | Folha Seca %A | Folha Fresca %A | Folha Seca %A |
| 3-hexen-1-ol | 3,72 | - | 3,56 | - | 2,89 | 2,43 | 1,05 | 1,64 | - |
| Copaeno | 21,24 | 0,17 | 0,89 | 2,21 | 1,10 | 0,26 | 0,64 | 0,69 | 1,08 |
| Cariofileno | 22,93 | 1,84 | 3,31 | 6,66 | 3,60 | 1,46 | 2,91 | 3,05 | 4,52 |
| Alfa-cariofileno | 24,30 | 0,73 | 1,33 | 2,24 | 1,19 | 3,56 | - | 2,89 | 2,43 |
| Beta-farneseno | 24,37 | 1,08 | 2,44 | 0,35 | 2,15 | 0,83 | 2,78 | 2,51 | 3,75 |
| Germacreno D | 25,36 | 5,70 | 12,63 | 14,05 | 8,96 | 4,11 | 12,89 | 9,96 | 14,98 |
| Germacreno B | 25,85 | 1,20 | 2,86 | 2,73 | 1,95 | 0,81 | 2,69 | 2,33 | 3,36 |
| Epiglobulol | 26,61 | 0,53 | 1,04 | 0,66 | 0,84 | 0,64 | 0,72 | 1,25 | 0,74 |
| Delta-cadineno | 26,75 | 1,54 | 3,06 | 4,95 | 3,12 | 1,51 | 3,82 | 2,98 | 4,17 |
| Trans-nerolidol | 28,51 | 8,96 | 12,53 | 10,36 | 13,78 | 9,19 | 13,98 | 13,92 | 12,75 |
| Espatulenol | 28,88 | 4,23 | 4,43 | 3,19 | 5,12 | 4,12 | 4,16 | 3,96 | 3,49 |
| Óxido de cariofileno | 29,02 | 1,29 | 2,74 | 2,10 | 2,99 | 0,85 | 3,06 | 2,40 | 2,74 |
| Óxido de ledeno | 29,13 | 1,21 | 1,36 | 0,95 | 1,36 | 1,30 | 1,19 | 1,29 | 1,10 |
| 10-peroxi-murolan-3,9(11)-dieno | 30,66 | 2,22 | 2,96 | 2,51 | 3,35 | 2,19 | 2,91 | 2,49 | 2,37 |
| 1-beta-cadin-4-en-10 | 31,39 | 3,07 | 1,44 | 1,66 | 1,34 | 1,74 | 1,02 | 1,29 | 0,89 |
| Alfa-cadinol | 31,67 | 6,14 | 4,10 | 3,67 | 4,50 | 5,51 | 4,12 | 0,70 | 3,45 |
| 7R,8R-8-hidroxi-4-isopropilideno-7-metilbicyclo[5.3.1] undec-1-eno | 31,76 | 0,60 | 1,88 | 1,74 | 2,04 | 2,72 | 1,79 | - | 1,32 |
| Cadala-1(10),3,8-trieno | 31,99 | 1,08 | 0,81 | 0,86 | 1,02 | 0,48 | 0,62 | 0,93 | 0,53 |
| Patchulano | 32,71 | 11,60 | 6,26 | 3,67 | 7,30 | 11,45 | 5,93 | 6,19 | 4,47 |
| Fitol | 46,23 | 23,95 | 3,29 | 2,89 | 4,66 | 20,62 | 7,62 | 7,43 | 4,60 |
| Total identificado (%) | | 77,14 | 72,92 | 65,89 | 64,30 | 72,94 | 73,92 | 64,79 | 73,00 |

TR= tempo de retenção de cada substância na coluna cromatográfica em minutos.%A= porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa das substâncias no óleo essencial.

Tabela 3: Índice Kovats do óleo essencial de folhas frescas de *Piper tuberculatum* coletadas no horário de 16 horas.

| Substâncias | TR | IR calculado | IR literatura | Folha Fresca 16 h %A |
|------------------------------------|-------|--------------|---------------|----------------------|
| 3-hexen-1-ol | 3,72 | 851 | 850 | 1,64 |
| Copaeno | 21,24 | 1372 | 1374 | 0,69 |
| Cariofileno | 22,93 | 1415 | 1417 | 3,05 |
| Alfa-cariofileno | 24,30 | 1451 | 1452 | 2,89 |
| Beta-farneseno | 24,37 | 1453 | 1454 | 2,51 |
| Germacreno D | 25,36 | 1478 | 1484 | 9,96 |
| Germacreno B | 25,85 | 1491 | 1559 | 2,33 |
| Epiglobulol | 26,61 | 1511 | - | 1,25 |
| Delta-cadineno | 26,75 | 1515 | 1522 | 2,98 |
| Trans-nerolidol | 28,51 | 1563 | 1561 | 13,92 |
| Espatulanol | 28,88 | 1573 | 1577 | 3,96 |
| Óxido de cariofileno | 29,02 | 1577 | 1582 | 2,40 |
| Óxido de ledeno II | 29,13 | 1580 | - | 1,29 |
| 10-peroxi-murolan-3,9 (11) - dieno | 30,66 | 1622 | - | 2,49 |
| Alfa-cadinol | 31,39 | 1643 | 1652 | 1,29 |
| Delta-cadinol | 31,67 | 1651 | 1644 | 0,70 |
| Cadala-1(10),3,8-trieno | 31,99 | 1660 | - | 0,93 |
| Patchulano | 32,71 | 1680 | - | 6,19 |
| Fitol | 46,23 | 2017 | 1942 | 7,43 |
| Total identificado (%) | | | | 64,79 |

TR=tempo de retenção, IR calculado=índice de retenção calculado e índice de retenção encontrado na literatura (ADAMS, 2017), %A=porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa das substâncias no óleo essencial.

6.1.3 Avaliação dos componentes majoritários presentes nas folhas frescas e secas de *P. tuberculatum* Jacq

Os componentes majoritários germacreno D e *trans*-nerolidol, presentes na fração seca, apresentaram composição relativamente constante em seu percentual em todas as coletas realizada durante o dia (**Figura 7A**). Por outro lado, os componentes mais abundantes na fração fresca, apresentaram uma grande variação no seu percentual ao longo do dia, alternando seu percentual em metade do rendimento para o patchulano, assim como uma variação drástica de quase 90% no teor do fitol foi observada no intervalo entre as duas primeiras coletas da manhã. (**Figura 7B**). Constatamos também que o *trans*-nerolidol apresentou um perfil de rendimento semelhante para ambas as frações foliares conforme observado na **Tabela 2**. Na **Figura 8** pode ser observada a estrutura química dessas moléculas.

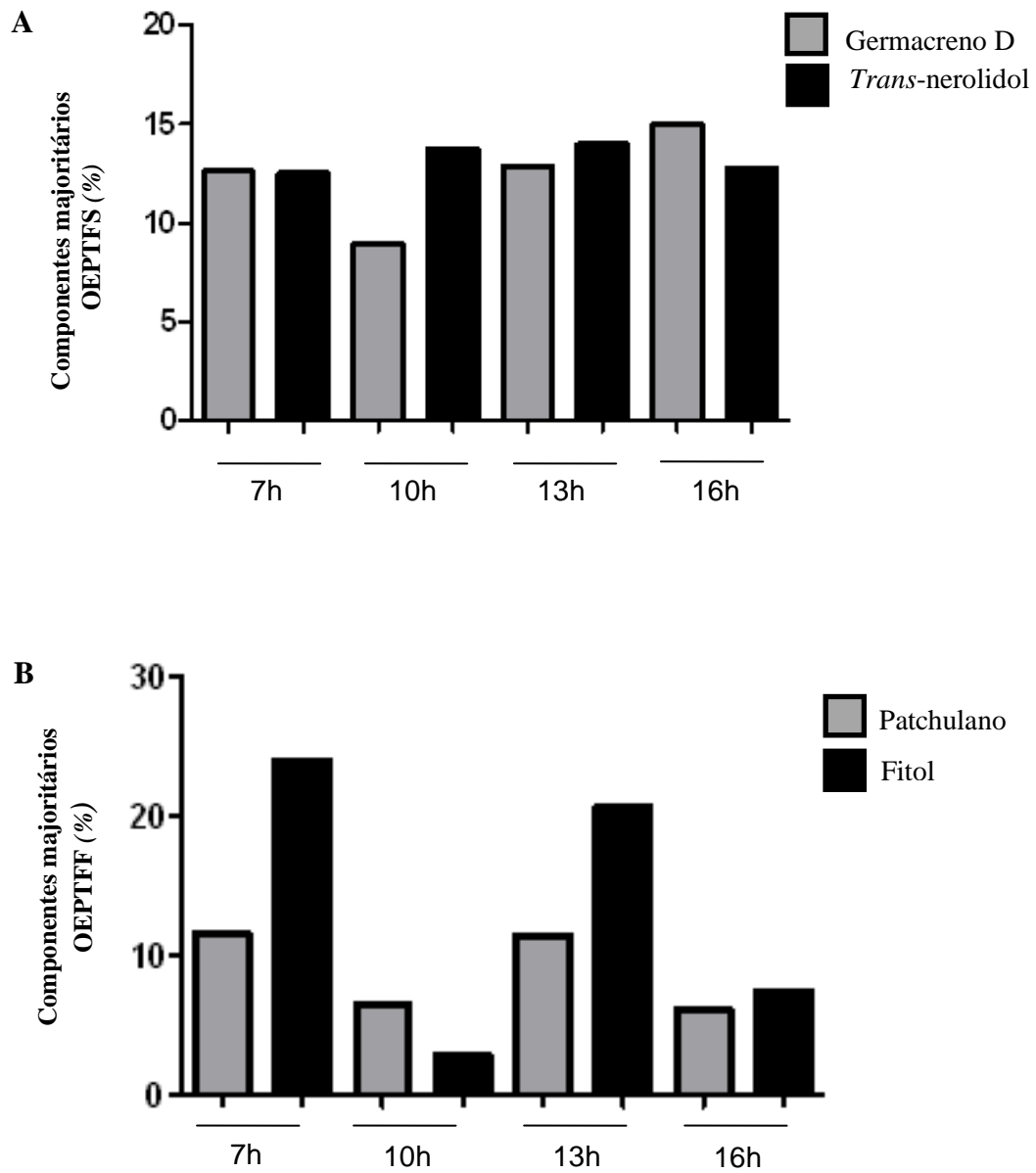


Figura 7. Variação circadiana do percentual dos componentes majoritários identificados nos óleos essenciais obtidos das folhas secas e frescas de *P. tuberculatum* Jacq. **A:** Gernacreno D e *Trans*-nerolidol. **B:** Patchulano e Fitol.

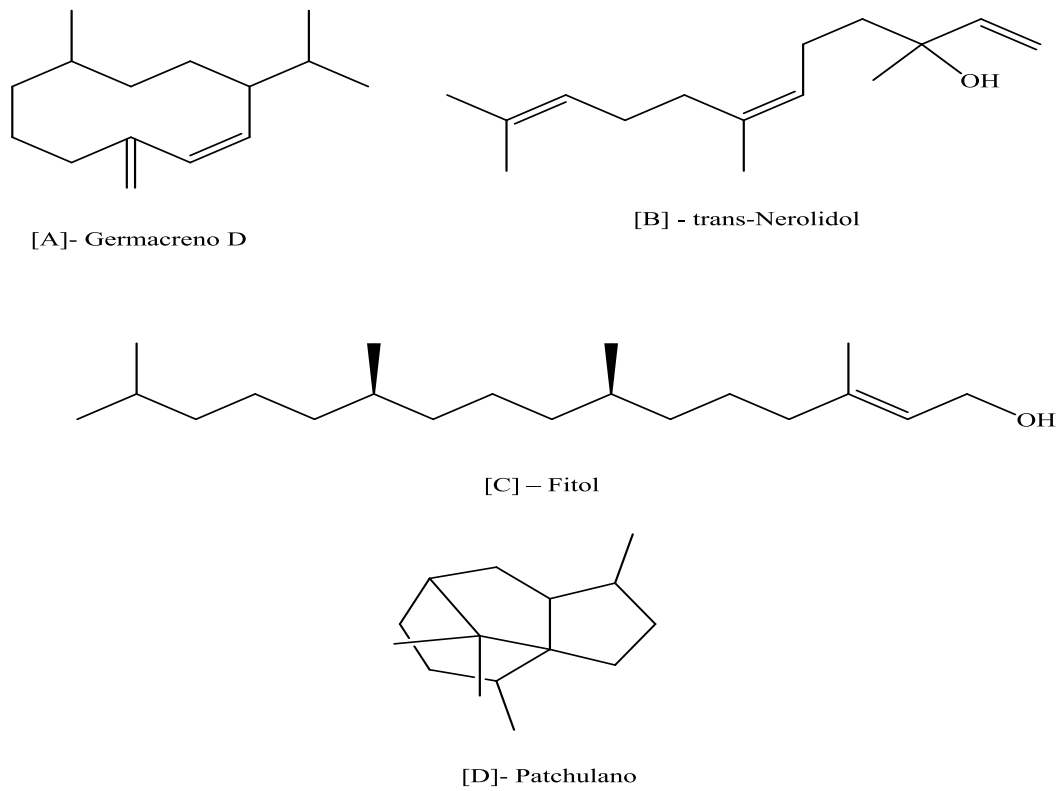


Figura 8. Representação estrutural dos componentes majoritários presentes no óleo essencial de folhas de *P. tuberculatum* Jacq. Folhas secas: [A]: Germacreno D, [B]: trans-Nerolidol e folhas frescas, [C]: Fitol e [D]: Patchulano. (Adaptado de Zeng *et al.*, 2007).

6.2. Estudo sazonal

6.2.1 Rendimento sazonal dos óleos essenciais de *P. tuberculatum* Jacq

Na **Tabela 4** podemos verificar os resultados do rendimento sazonal dos óleos essenciais extraídos das folhas frescas coletadas às 16 horas, que correspondeu ao horário de maior rendimento observado no estudo circadiano. Essa análise permitiu constatar que não houve variação apreciável no teor percentual dos óleos essenciais para as coletas realizadas durante as diferentes estações do ano, com exceção da coleta de verão que apresentou um aumento expressivo em relação às demais.

O rendimento de óleos essenciais pode apresentar variação de percentual ao longo do ano. O aumento deste percentual no verão, observado neste trabalho, provavelmente está relacionado ao incremento da radiação luminosa e dos processos fotossintéticos nesta época do ano.

Tabela 4: Rendimento sazonal dos óleos essenciais das folhas frescas *Piper tuberculatum* coletadas às 16 horas

| Coletas | Massa das folhas coletadas às 16 h (g) | Rendimento do óleo essencial por estações do ano (%) |
|-----------|--|--|
| Outono | 100 | 0,0235 |
| Inverno | 100 | 0,0265 |
| Verão | 100 | 0,0850 |
| Primavera | 100 | 0,0218 |

6.3. Avaliação da atividade antioxidante do OEPT

Com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial circadiano, obtidos de folhas frescas e secas de *P. tuberculatum*, foram preparadas individualmente para análise, diferentes concentrações de OEPT as quais foram tratadas com DPPH a 50 μ M. Constatou-se que a amostra mais concentrada de OEPT (500 μ g/mL) apresentou efeito redutor apreciável com um percentual de 29% de atividade antioxidante, seguida da amostra com 250 μ g/mL com 7,0% considerada relativamente baixa. As demais concentrações testadas (150, 100 e 50 μ g/mL) obtiveram valores negativos, não apresentando, portanto, nenhuma atividade antioxidante detectada conforme observado na **Figura 9**.

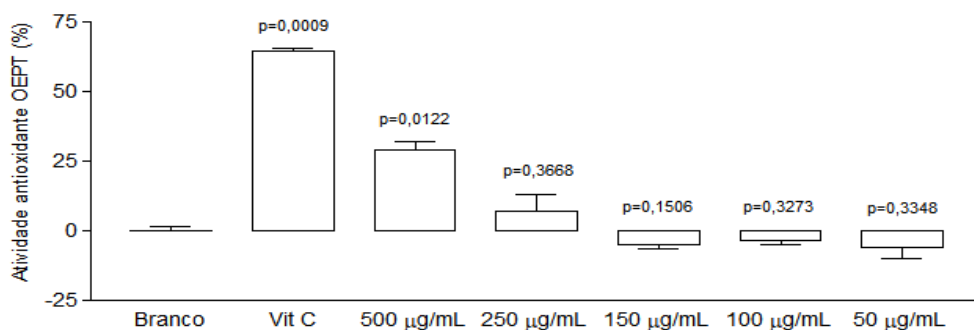


Figura 9. Ensaio de atividade antioxidante. As amostras de OEPT foram diluídas em metanol, e a seguir receberam DPPH na concentração de 50 μ M por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm. Branco: DPPH + Metanol; Vit C: Ácido Ascórbico 25 μ M foi usado como controle positivo da reação. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante foi correspondente à quantidade de DPPH consumido em cada amostra analisada. O gráfico é representativo de um experimento realizado em triplicata.

6.4. Avaliação do ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade do óleo essencial circadiano de *P. tuberculatum* (OEPT), que contem as frações reunidas de folhas frescas e folhas secas, foi determinada *in vitro* pelo ensaio de viabilidade celular baseado no método do MTT. As células HCT-8, HFF-1 e macrófagos peritoneais foram tratados com diversas concentrações de OEPT por 24, 48 e/ou 72 horas.

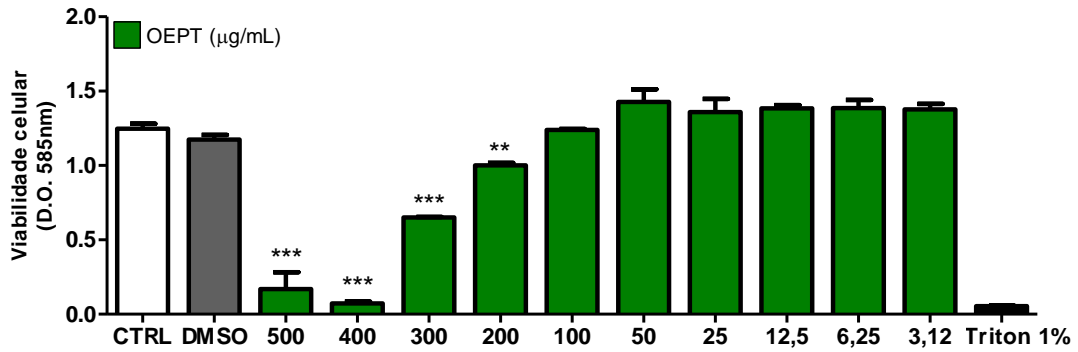
As células HCT-8 tratadas por 24 horas com altas concentrações de OEPT (500 – 300 µg/mL) apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) na sua viabilidade celular, seguida de uma queda moderada ($p < 0,005$) observada no tratamento utilizando a concentração de 200 µg/mL do óleo essencial em comparação com as células controle. As demais concentrações testadas mantiveram um perfil de viabilidade constante equiparado ao controle celular utilizado. Após 48 e 72 horas, as concentrações de 300 e 250 µg/mL do óleo foram fortemente tóxicas para essas células ($p < 0,001$). Por outro lado, foi observado um aumento significativo na viabilidade das células HCT-8 tratadas com as concentrações de 200 e 150 µg/mL de OEPT após 48 horas ($p < 0,005$ e $p < 0,05$, respectivamente) e, nas concentrações de 200, 150, 100 e 50 µg/mL, após 72 horas de tratamento comparados ao controle da reação. (**Figura 10 A, B e C**).

Em células HFF-1, o tratamento com altas concentrações (500 - 300 µg/mL) de OEPT por 24 horas resultou em uma diminuição expressiva na viabilidade dessas células ($p < 0,0016$). Além disso, a concentração 200 µg/mL de OEPT proporcionou uma queda moderada na sua viabilidade após 24 e 48 horas de tratamento. Entretanto, o tratamento após 48 horas com o OEPT na concentração de 100 µg/mL culminou num aumento na viabilidade de fibroblastos ($p < 0,05$), comparado ao controle utilizado (**Figura 11 A e B**).

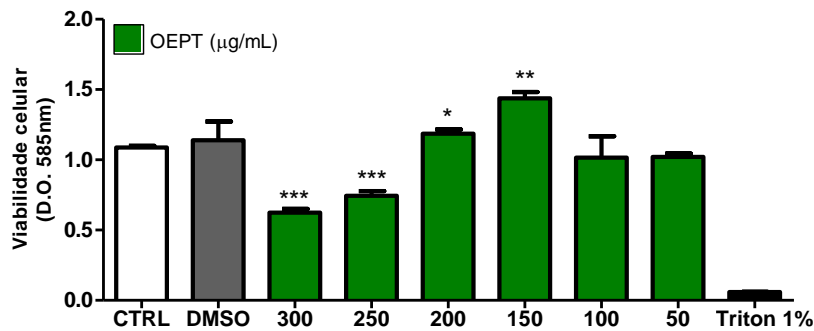
Macrófagos peritoneais foram tratados com 250 µg/mL de OEPT por 24 e 48 horas. Constatou-se que essa concentração foi tóxica para esse tipo celular em todos os tempos de tratamento ($p < 0,0003$ e $p = 0,0005$). Entretanto, os tratamentos nas concentrações de 125 µg/mL por 24 horas ($p = 0,0079$) e 62,5 µg/mL por 48 horas ($p = 0,0081$) induziu um aumento estatisticamente significativo na viabilidade de macrófagos em comparação ao controle da reação (**Figura 12 A e B**).

Nesse trabalho, utilizou-se o DMSO como controle, pois o mesmo foi utilizado como veículo de diluição do OEPT. Os tratamentos realizados com o DMSO ocorreram na mesma proporção que o OEPT e sua concentração final ficou em torno de 0,1%. Foi observado que esta molécula não alterou a viabilidade das células em todos os tempos e concentrações estudadas em comparação com o controle. Para o controle positivo de morte celular, foram incubadas células com Triton X-100 a 1% por 30 minutos.

A



B



C

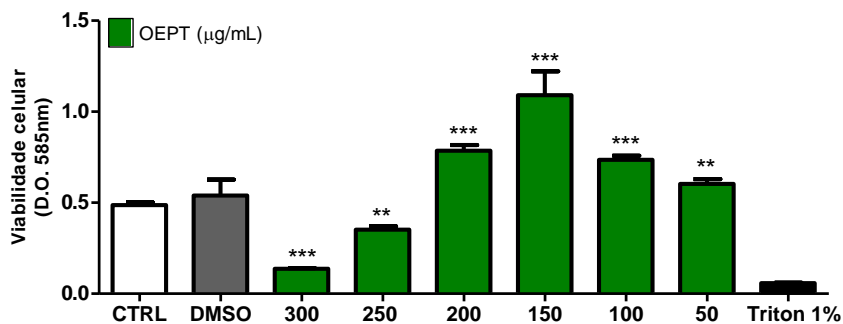
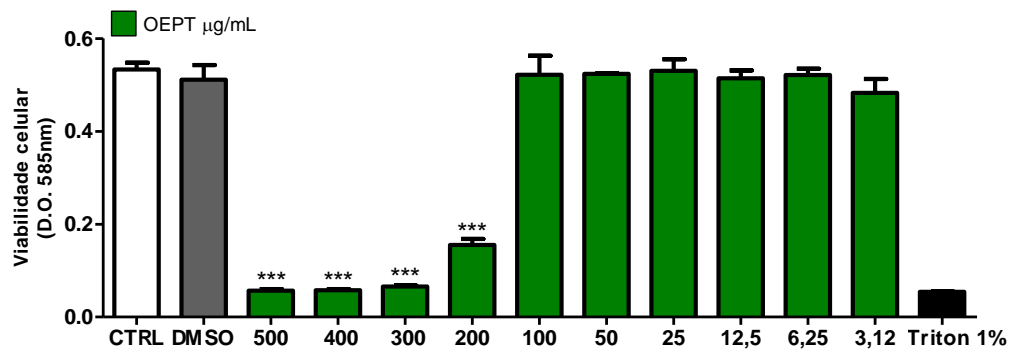


Figura 10. Ensaio de viabilidade celular com células HCT-8 frente ao tratamento com OEPT. As células HCT-8 foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células/poço. Após 24h, o sobrenadante foi renovado e as células foram tratadas com OEPT e DMSO (maior concentração utilizada) por diferentes concentrações e tempos. A seguir, as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com MTT. A variação de cor foi mensurada por um leitor de placas (BIOTECMod Power Wazexs) no comprimento de onda de 585nm. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes em triplicata. **A:** 24h, *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,005$ **B:** 48h, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,005$ e * $p < 0,05$ **C:** 72h, *** $p < 0,0001$ ou $0,0009$; ** $p < 0,006$.

A



B

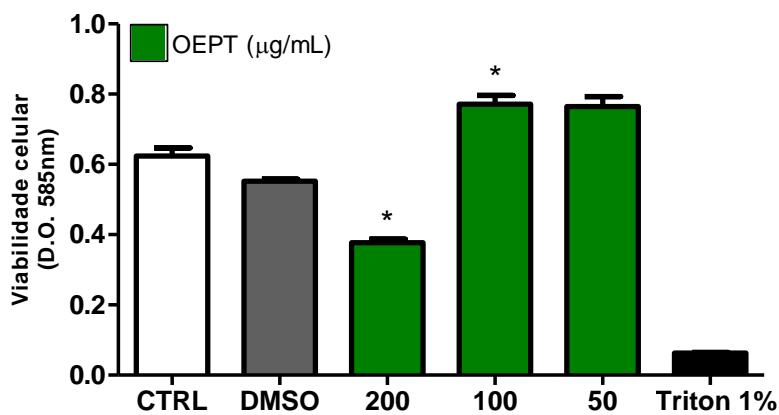
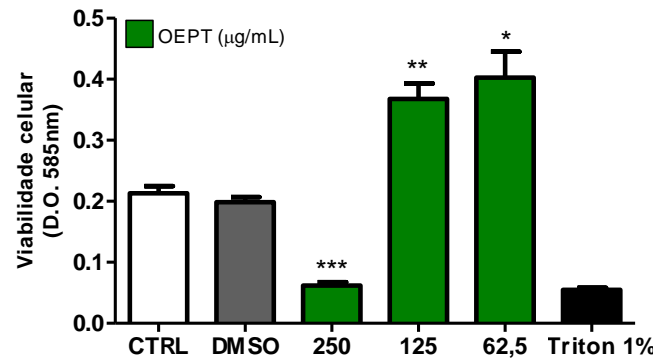


Figura 11. Ensaio de viabilidade celular com células HFF-1 frente ao tratamento com OEPT. As células HFF-1 foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Após 24h, o sobrenadante foi renovado e as células foram tratadas com OEPT e DMSO (maior concentração utilizada) por diferentes concentrações e tempos. Após os tratamentos as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com MTT. A variação de cor foi mensurada pelo leitor de microplacas (BIOTECMod Power Wazexs) no comprimento de onda de 585 nm. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes em triplicata. **A:** 24 horas, $**p < 0,0016$ e **B:** 48 horas, $*p < 0,05$.

A



B

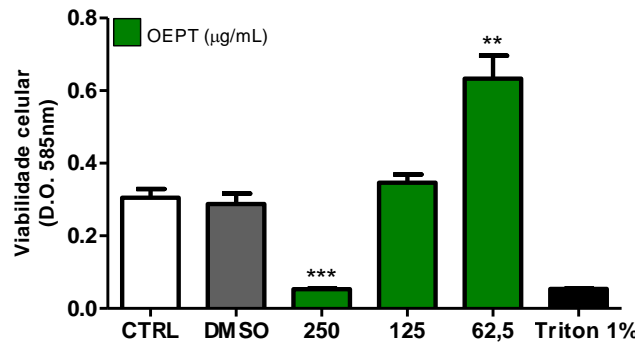


Figura 12. Ensaio de viabilidade celular com macrófagos peritoneais murinos tratados com OEPT. Macrófagos peritoneais foram semeados na densidade de 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas, o sobrenadante foi renovado e as células foram tratadas com OEPT e DMSO (maior concentração utilizada) com diferentes concentrações e tempos. Após os tratamentos, as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com MTT. A variação de cor foi mensurada pelo leitor de placas (BIOTECHMod Power Wazexs) no comprimento de onda de 585 nm. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes em triplicata **A**: 24h, *** $p < 0,0003$ ** $p = 0,0079$ e * $p = 0,0127$. **B**: 48h, *** $p = 0,0005$ ** $p = 0,0081$.

6.5. Alterações morfológicas em células HCT-8 e HFF-1 tratadas com OEPT

As células HCT-8 (500 e 250 $\mu\text{g/mL}$) e HFF-1 (500 e 200 $\mu\text{g/mL}$) foram, por sua vez, submetidas a diferentes tempos de tratamento (24 e 48 horas) com OEPT e, em seguida, foram fotografadas em microscópio invertido, utilizando o programa computacional BelEurisko. Observou-se que após o tratamento por 24 e 48 horas com OEPT as células HCT-8 e HFF-1 apresentaram drásticas alterações morfológicas em todas as concentrações estudadas em comparação com o controle. Tais mudanças são compatíveis com as observadas em células em vias de morte celular (**Figura 13 A e B**).

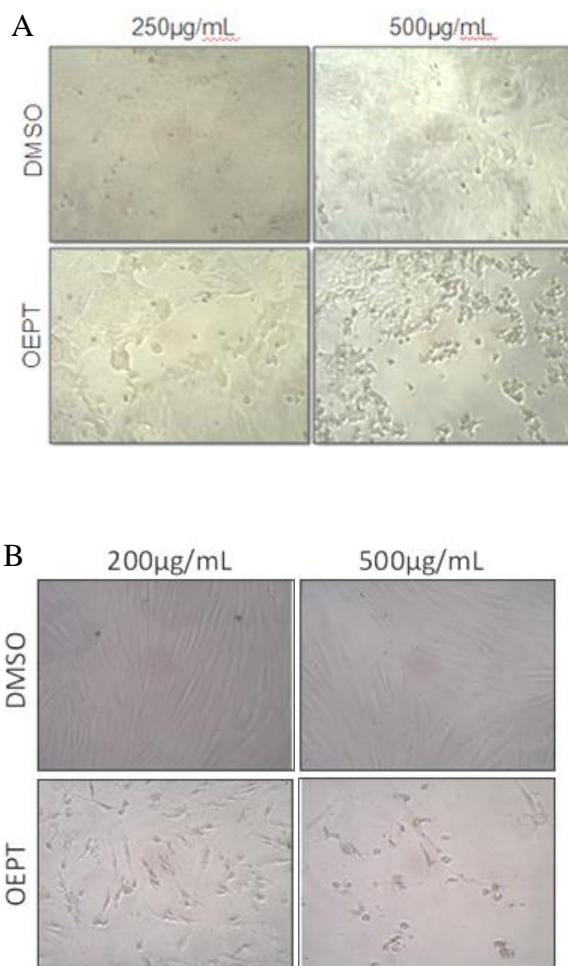


Figura 13. Alterações morfológicas em células HCT-8 e HFF-1 induzidas pelo tratamento com OEPT. As células foram semeadas em placa de 96 poços na densidade de 5×10^4 células por poço. Após 24h, o meio de cultura foi renovado e as células foram tratadas com diferentes concentrações de OEPT e DMSO por 24 ou 48h. Em seguida, as células foram fotografadas em microscópio óptico acoplado a uma câmera. A captura das imagens foi realizada utilizando o programa computacional BelEurisko. **A.** Células HCT-8 tratadas por 24horas. **B.** Células HFF-1 tratadas por 48horas.

6.6. Avaliação do ensaio de proliferação celular

O tratamento por 72 horas utilizando menores concentrações de OEPT resultou num aumento da viabilidade de células HCT-8. Para verificar efetivamente se o OEPT pode induzir a proliferação dessas células, as fitas de DNA recém-sintetizadas foram identificadas pelo ensaio de proliferação celular utilizando o kit de BrdU. O resultado obtido constatou que o tratamento durante 72 horas com OEPT induziu um aumento significativo na proliferação de células HCT-8 em todas as concentrações estudadas (200, 150 e 100 $\mu\text{g/mL}$), quando comparado com o controle (**Figura 14**).

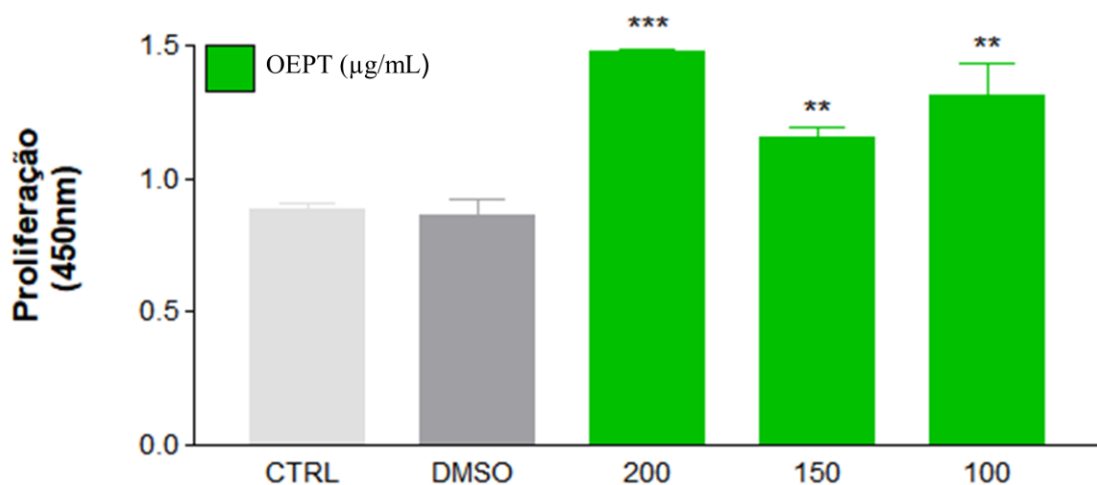
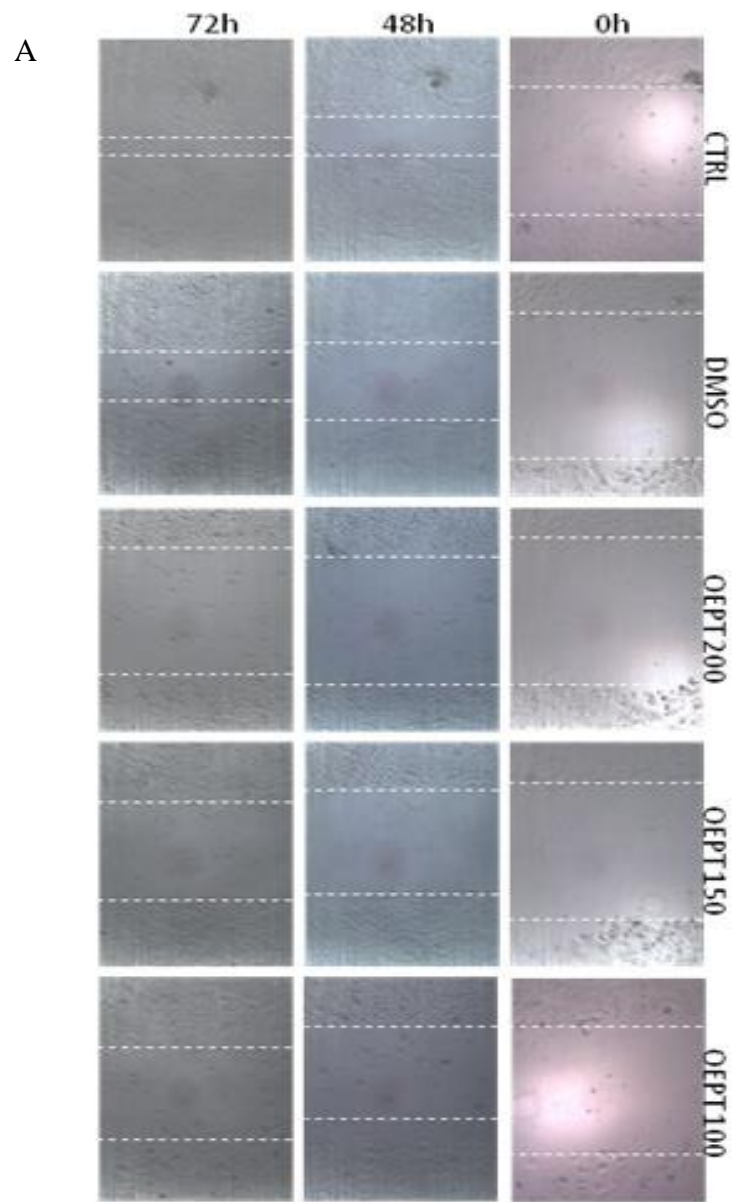


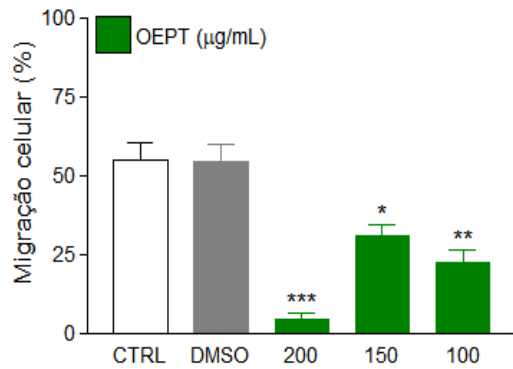
Figura 14. Ensaio de proliferação celular. Células HCT-8 foram tratadas com diferentes concentrações de OEPT por 72 horas. Em seguida, as células foram encubadas com BrdU e a incorporação deste pela célula foi avaliada pela imunomarcagem utilizando o anticorpo anti-BrdU. A proliferação celular foi mensurada através da alteração da cor produzida pelo substrato da reação por espectrofotometria no comprimento de onda na faixa de 450 nm. O gráfico é representativo de um experimento realizado em triplicata. *** $p < 0,0001$, ** $p \leq 0,005$.

6.7. Avaliação do ensaio de migração celular

Além de avaliar a proliferação celular, este trabalho investigou se o OEPT era capaz de promover a migração de células HCT-8 em condições *in vitro*, sobretudo nas mesmas concentrações estudadas no ensaio de proliferação. Com esse objetivo, um risco simulando uma lesão epitelial foi produzido mecanicamente na cultura de células HCT-8, para avaliar se o tratamento com OEPT pode interferir na migração dessas células a fim de recuperar a lesão produzida e restaurar a integridade da barreira epitelial intestinal. A avaliação da cicatrização foi feita através da medição da lesão no “tempo zero” comparada com o tamanho resultante da medição da lesão após 48 e 72 horas de tratamento com OEPT. Como pode ser observado na **Figura 15**, as células HCT-8 (controle) migraram em direção a ferida na tentativa de cicatrizar a lesão provocada mecanicamente. Todavia, os tratamentos realizados com as concentrações de 200, 150 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de OEPT retardaram de modo significativo a migração das células HCT-8 em todos os tempos de tratamento comparado ao controle da reação. O DMSO utilizado como veículo de diluição do OEPT não interferiu na velocidade de migração celular apresentando um resultado equiparado ao controle utilizado.



B



C

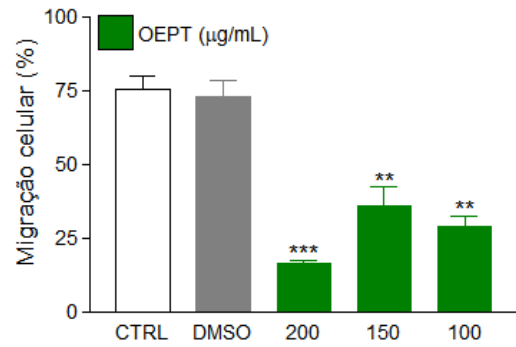


Figura 15. Ensaio de migração de células HCT-8 tratadas com OEPT. As células HCT-8 foram semeadas em placas de 24 poços por 24 horas a fim de obter-se uma monocamada de células confluentes. O meio foi renovado e as células receberam diferentes tratamentos com DMSO (maior concentração utilizada) e OEPT nas concentrações teste de 200, 150 e 100 µg/mL. **A:** As imagens foram capturadas utilizando o programa BEL Eurisko a fim de registrar a configuração da cultura celular após os diferentes tempos de incubação. **B:** Percentual de migração das células HCT-8 após 48 horas **C:** Percentual de migração das células HCT-8 após 72 horas. Os resultados são representativos de 5 experimentos independentes em triplicata. **B.** 48 horas *** $p=0,0010$ ** $p=0,0095$ * $p=0,0234$. **C.** 72 horas *** $p=0,0003$ ** $p=0,0075$ ** $p=0,0014$.

7. DISCUSSÃO

Os estudos que visam obter OE de plantas aromáticas, especialmente para serem utilizados em ensaios biológicos, devem estabelecer parâmetros criteriosos com relação ao horário e o período do ano de coleta do material botânico para extração, não apenas para priorizar o teor de rendimento, mas também, para determinar o perfil dos componentes dos OE obtidos. Souza e colaboradores (2013) observaram dois padrões distintos de respostas relacionadas ao teor percentual e composição química de OE extraídos ao longo do dia e durante o ano. Segundo esses autores, o horário interfere no rendimento e na composição percentual dos OE ao longo do dia, enquanto que durante o ano, as variações climáticas sazonais promovem alterações de maior dimensão, porém de maneira mais lenta.

Este trabalho avaliou a influência circadiana no teor e na composição química do OEPT extraído por hidrodestilação com aparelho de Clevenger modificado. Foram utilizadas neste estudo folhas frescas e folhas secas em estufa a 40°C por dois dias. O rendimento obtido das folhas secas foi maior em relação às folhas frescas, com um pico de rendimento identificado às 16 horas para ambas as frações foliares, variando entre 0,03% e 0,05%, como mostrado na **Tabela 1**. Com relação à composição química do óleo analisado, constatou-se que a secagem das folhas favoreceu o aumento no teor dos componentes majoritários germacreno D e do *trans*-nerolidol, enquanto que as frações de folhas frescas foram ricas nos componentes pathulano e fitol.

Contextualizando esses resultados, um estudo que avaliou o efeito do tempo de secagem no teor e na composição do OE de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, verificou que a secagem das plantas por dois dias em estufa a 65°C aumentou o teor de óleos em relação à secagem à temperatura ambiente. A secagem em estufa foi mais eficiente, sendo o teor significativamente superior após dois dias de secagem. Além disso, a secagem por esse período não prejudicou o rendimento dos constituintes majoritários patchoulol e pogostol, ainda que maiores teores tenham sido obtidos após seis ou oito dias de secagem (STORCK; DESCHAMPS, 2015). Adicionalmente, (MOCHI *et al.*, 2005) relataram um acréscimo substancial no teor de OE de folhas de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) submetidas ao processo de secagem por dois dias em estufa a 65°C. De acordo com esses autores, o aumento no rendimento do OE em folhas secas ocorreu devido à redução do volume da amostra pela perda de água ter permitido utilizar uma maior quantidade de folhas no mesmo balão usado para a extração de óleo das folhas frescas.

No nosso estudo foi possível identificar um aumento na produção do OEPT no período da tarde, coincidindo com o horário de temperaturas mais amenas, em relação ao período da manhã com as temperaturas mais quentes do dia. Esses resultados demonstraram que houve influência circadiana no rendimento do OE em função da temperatura ambiente e do horário das coletas realizadas, sendo a coleta feita às 16 horas a mais produtiva. A influência circadiana também foi observada por (NASCIMENTO *et al.*, 2006) que verificaram o efeito do horário de corte sobre o rendimento do OE do capim-limão (*Andropogon sp.*). Os horários de corte pesquisados foram 7, 9, 11, 13, 15 e 17 horas. Esses autores constataram que houve diferença estatística entre os horários de corte e o rendimento do OE obtido. Em contraste com nossos resultados, verificou-se que o corte realizado às 7 horas apresentou maior rendimento com 5,06 mL/kg de folhas.

Além do efeito circadiano, o presente trabalho avaliou a influência da sazonalidade no rendimento do OEPT. Foi verificado que houve aumento expressivo no teor do óleo essencial sazonal extraído de folhas frescas coletadas no verão em comparação com os resultados encontrados nas demais coletas realizadas durante as outras estações do ano. Em um estudo realizado com *Salvia officinalis*, no qual se avaliou a influência da sazonalidade no rendimento e na composição química do seu OE, verificou-se que o maior rendimento foi obtido no primeiro ano de cultivo, em corte realizado no verão (MORAIS, 2009).

No presente trabalho, foi identificada a presença de 20 diferentes constituintes voláteis majoritários no OEPT com um percentual de caracterização em torno de 75%. Os constituintes mais abundantes do OE presentes nas folhas secas foram o germacreno D (14,98%) identificado às 16 horas e o *trans*-nerolidol (13,98%) às 13 horas. Os percentuais desses constituintes, correspondentes nas folhas frescas, identificados nos mesmos horários de coleta, foram menores, com 9,96% e 9,16%, respectivamente. Na fração foliar fresca, os componentes percentualmente majoritários foram o patchulano (11,60%) e o fitol (23,95%), ambos detectados às 7 horas. Desse modo, em relação às concentrações dos compostos do óleo essencial, foi possível observar que a secagem em estufa por dois dias a 40°C proporcionou aumento das concentrações dos constituintes voláteis germacreno D e *trans*-nerolidol.

Dentre os trabalhos que descrevem a extração de OEPT, destacam-se três realizados no Brasil e dois na Venezuela. Os óleos venezuelanos extraídos das folhas frescas revelaram o dilapiol (72,4%) e o espatulenol (11,37%) como componentes majoritários nas cidades de Mérida e Cancamure respectivamente (MORA *et al.*, 2008; ORDAZ *et al.*, 2010). No Brasil, os constituintes majoritários identificados nos óleos dos frutos e talos finos dessa espécie,

localizada em Rondônia, foram óxido de cariofileno (32,1%) e (26,6%), e (*E*)-cariofileno (17,7%) e (12,3%) respectivamente (FACUNDO *et al*, 2008). Nesse Estado, um estudo mais recente identificou o germacreno D-4-ol, o nerolidol e o Carvona como componentes principais encontrados nas folhas secas desta espécie (SOBREIRA *et al* 2017). Por sua vez, a espécie estudada no Estado do Ceará revelou o germacreno D (11,81%) como componente mais abundante encontrado em folhas frescas (CYSNE *et al*, 2005). Sendo assim, pode-se afirmar que a composição química do OEPT nem sempre é uniforme (CYSNE *et al.*, 2005; FACUNDO *et al.*, 2008; NAVICKIENE *et al.*, 2006; POTZERNHEIM *et al.*, 2006). Esses resultados podem ser atribuídos a uma gama variada de fatores, como a localização geográfica e idade da planta, variações ambientais circundantes, horário e período de coletas de material, entre muitos outros fatores.

O germacreno D é frequentemente encontrado em OE de espécies do gênero *Piper*, tendo sido identificado em pelo menos 7 de 9 espécies estudadas (MESQUITA *et al.*, 2005). Já foram descritas para este composto ação biológica contra diversos patógenos humanos. O caráter lipofílico do germacreno D permite a sua interação com os lipídios da bicamada fosfolipídica aumentando a permeabilidade da membrana celular. Essa propriedade pode contribuir para a penetração de outros componentes presentes no OE no interior das células desencadeando os efeitos encontrados nos ensaios de atividade biológica (FRANCESCATO *et al.*, 2007).

É importante frisar que a composição do OE pode alterar o padrão de respostas encontradas durante os ensaios de atividade biológica, pois o componente bioativo responsável pela provável ação biológica pode ter sua concentração no óleo alterada, devido, por exemplo, a coletas em horários diferentes (MORAIS, 2009). Neste trabalho, a extração de OEPT foi realizada também com o objetivo de avaliar o seu efeito em ensaios de atividade biológica *in vitro*. Desta maneira, as coletas circadianas e sazonais foram feitas uma única vez, considerando-se que, coletas posteriores ofereceriam sempre diferenças no rendimento e na composição dos OE decorrentes das variações ambientais as quais a planta está exposta.

A terapia nutricional com uso de vitaminas antioxidantes vem sendo empregada como suplementação ao tratamento quimioterápico convencional. Os únicos compostos capazes de inibir a formação de radicais livres são os antioxidantes, como as vitaminas A, C e E, que impedem lesão tecidual e morte celular em doenças crônicas como o câncer. Outro fato positivo observado, é que a terapia nutricional com antioxidantes associados ao tratamento quimioterápico reduz os efeitos colaterais causados por estes medicamentos, uma vez que, a administração concomitante dos mesmos, diminui a toxicidade do tratamento pelo uso de

menores doses de quimioterápicos e pelo efeito adjuvante dos antioxidantes ao neutralizar radicais livres (SANTOS; CRUZ, 2001)

Nesse contexto, nós investigamos se o OEPT apresenta potencial antioxidante, podendo ser usado como um alvo terapêutico contra o câncer. O resultado encontrado neste trabalho permitiu constatar que a atividade antioxidante do OEPT foi expressiva apenas na maior concentração utilizada (29% a 500 µg/mL), decrescendo à medida que essa concentração diminuiu, estando, inclusive, ausente nas menores concentrações testadas. Salientamos que a fração antioxidante do óleo essencial identificada neste ensaio foi altamente tóxica para as células HCT-8. Com base nesses resultados, podemos afirmar que a queda na viabilidade dessas células tratadas com as concentrações intermediárias do OEPT não está associada ao efeito adjuvante de moléculas antioxidantes na eliminação de células tumorais.

A citotoxicidade do OEPT foi avaliada quanto ao seu efeito em células epiteliais intestinais humanas da linhagem HCT-8, fibroblastos de pele humana e macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Através do ensaio de viabilidade celular foi possível observar que houve uma diminuição drástica na viabilidade das células HCT-8 tratadas com as concentrações de 500 - 300 µg/mL de OEPT em todos os tempos de incubação. Constatou-se que em concentrações abaixo de 100 µg/mL não houve alteração na viabilidade das células HCT-8 nas primeiras 24 horas de tratamento.

As alterações morfológicas observadas nas células HCT-8 e HFF-1 tratadas com altas concentrações do OEPT se mostraram compatíveis com as observadas em células em vias de morte celular após 24 e 48 horas de tratamento respectivamente. Assim, foi possível identificar que o OEPT apresentou alta toxicidade para as células de linhagem tumoral HCT-8 nas maiores concentrações analisadas (500 -250 µg/mL). É referido um limite de concentração entre 500 a 400 µg/mL como ponto de corte para uso de amostras derivadas de produtos naturais a serem usadas em ensaios de atividade biológica, embora outros autores estabeleçam um teste inicial em concentração única de 50 µg/mL para extratos, 20 µg/mL para frações e 5 µg/mL para substâncias puras na avaliação da citotoxicidade em células tumorais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

Para investigar se a diminuição da viabilidade celular causada pelo OEPT em altas concentrações era seletiva para as células de linhagem tumoral, foi avaliada a viabilidade celular de fibroblastos de pele humana (HFF-1) e de macrófagos peritoneais murinos com diversas concentrações de OEPT. De modo similar ao observado em células HCT8, houve uma diminuição acentuada na viabilidade celular de fibroblastos e macrófagos peritoneais submetidos às concentrações de 500 - 300 µg/mL e 250 µg/mL de OEPT respectivamente.

Entretanto, ocorreu uma diferença na viabilidade celular entre as culturas tumorais e não tumorais tratadas na concentração de 200 µg/mL, com um aumento de sobrevivência das células HCT-8 em relação aos fibroblastos. Estes resultados foram parcialmente corroborados pelo trabalho de (SALES *et al*, 2018) que também investigaram a viabilidade de fibroblastos tratados com OEPT. Esse estudo encontrou diferentes percentuais de morte celular (1,75%, 87,12%, 98,19% e 100%) em fibroblastos submetidos às concentrações de 125, 250, 500 e 1000 µg / mL do OEPT, respectivamente. Cabe ressaltar que a concentração de 250 µg / mL de OEPT apresentou forte toxicidade para fibroblastos com porcentagem citotóxica de 87,12%.

Pode ser afirmado que, em altas concentrações, o OEPT apresentou forte toxicidade para as células tumorais HCT-8. No entanto, esse efeito não foi exclusivo para esse tipo celular, pois foi igualmente tóxico para células não tumorais nas mesmas concentrações e tempos de tratamento. Entretanto, os tratamentos subsequentes realizados demonstraram que concentrações menores de OEPT (150 – 62,5 µg/mL) por 48 e/ou 72 horas foram capazes de promover um aumento significativo na sobrevivência em todos os tipos celulares utilizados nesse estudo, com base na técnica de MTT.

Nesse contexto, partiu-se para investigar se o OEPT apresenta propriedade proliferativa baseado nos resultados encontrados no ensaio de viabilidade celular. Para avaliar se o óleo essencial era efetivamente capaz de induzir proliferação celular em menores concentrações, foi realizado um ensaio de proliferação celular pela técnica de incorporação de BrdU. O resultado desse ensaio demonstrou que o tratamento por 72 horas com OEPT induziu um aumento estatisticamente significativo na proliferação de células HCT-8 em todas as concentrações estudadas (200, 150 e 100µg/mL) em comparação com as células controle

A homeostase epitelial intestinal é mantida por um equilíbrio dinâmico entre a proliferação celular na base das criptas e a posterior migração dessas células em direção ao ápice das vilosidades. Essas células migram da base da cripta para a zona apical do intestino, passando por processos de maturação. Desse modo, a camada epitelial apresenta um equilíbrio estrito entre proliferação, migração e morte das células epiteliais a fim de conferir a integridade da barreira intestinal (NEGRONI, A., *et al.*, 2015).

Para avaliar o efeito do OEPT na migração de células HCT-8, essas células foram tratadas com as concentrações testes de 200, 150 e 100 µg/mL do óleo essencial por 48 e 72 horas. Os resultados obtidos nesse ensaio revelaram que o OEPT inibiu de maneira significativa a migração de células HCT-8 em todas as concentrações testadas e em todos os tempos de tratamento. Assim, foi possível constatar que sob as condições estudadas, o OEPT induziu

proliferação em células HCT-8 em 72 horas, mas retardou a migração dessas células após 48 e 72 horas de incubação.

Uma importante limitação desse trabalho foi não poder avaliar qual (is) componente (s) presente (s) no óleo essencial está (ão) relacionado (s) aos efeitos encontrados durante os ensaios de atividade biológica realizados. Portanto, serão necessários novos experimentos utilizando os componentes isolados do OEPT para estudar os efeitos individuais de cada molécula sobre células de linhagem e/ou de origem primária.

Os resultados encontrados nesse trabalho permitem especular que o OEPT pode ser aplicado em condições patológicas onde o reparo, a regeneração e a cicatrização são importantes para restaurar a homeostase tecidual. Esses achados abrem portas para novos estudos baseados no OEPT e em seus componentes isoladamente, com o objetivo de encontrar uma aplicação terapêutica efetiva para esse composto.

8. CONCLUSÃO

1. A metodologia de extração e caracterização química dos óleos essenciais de *P. tuberculatum* foi estabelecida, com a elaboração de um protocolo de coleta e tratamento do material botânico em um estudo circadiano e sazonal, nos quais foi possível determinar melhores condições de rendimento e perfil dos constituintes voláteis dos óleos essenciais na espécie estudada.
2. No estudo circadiano, o maior rendimento de óleos essenciais da espécie *P. tuberculatum* foi obtido utilizando folhas secas coletadas às 16 horas;
3. O teor percentual do óleo essencial sazonal foi expressivo no verão em relação às demais estações do ano;
4. A atividade antioxidante do óleo essencial foi significativa na concentração de 500 µg/mL com 29%
5. Altas concentrações de OEPT apresentaram efeito tóxico em células HCT-8, HFF-1 e macrófagos peritoneais murinos após 24, 48 e/ou 72 horas de tratamento;
6. Em concentrações mais baixas, o OEPT induziu um aumento de sobrevida em células HCT-8, HFF-1 e MO após 24, 48 e/ou 72 horas de tratamento;
7. O óleo essencial induziu proliferação em células HCT-8 em 72 horas, mas retardou a migração *in vitro* dessas células após 48 e 72 horas de tratamento.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4.1 Edition, Allured Publishing Corporation, 2017.
- AMARAL, R.G. Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial da *Mentha villosa* (Lamiaceae). Mestrado em Ciências Fisiológicas (MCF), Universidade Federal de Sergipe (UFS), 2014
- BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A.V.G. O gênero *Piper* L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea** v.35(4), p. 553-561, 2008.
- BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M. COSTALOTUFO, L.V. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. 39: 801-807, 2006.
- BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; COSTA-LOTUFO, L.V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**. 21: 1-8, 2007.
- BIZZO, H.R; HOVELL, A.M.C; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, p.588-594, 2009.
- BUSATO, N.V.; SILVEIRA, J.C.S.; COSTA, A.O.S.; JUNIOR, E.F.C. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. **Ciência Rural** v.44, n.9, p.1574-1582, 2014.
- CASTRO, M.J.P. Potencial inseticida de extratos de *Piper tuberculatum* jacq.(Piperaceae) sobre a fase larval de *Spodoptera frugiperda* (j. e. smith). Piauí, 2007.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LNOE). Universidade Federal do Ceará (UFC). **Revista Virtual Química**, v.2 (1), p. 47-58, 2010.
- CREMASCO, M. A. E BRAGA, N. D. P. Isomerização do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC) para a obtenção de isosafrol. **Acta Amazônica**, v. 40, n. 4, p. 737-740, 2010.
- CRONQUIST, A. An integrated system of Classification of flowering plants. **New York Colombia University Press**. 1262, 1981.
- CYSNE, J.B., CANUTO, K.M.C., PESSOA, O.D.L.P.;*, NUNES, E.P. SILVEIRA, E.R. Leaf Essential Oils of Four *Piper* Species from the State of Ceará - Northeast of Brazil **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 16, No. 6B, 1378-1381, 2005.
- FACUNDO, V. A., POLLLI, A. R., RODRIGUES, R. V., MILITÃO, J. S. L. T., STABELLI, R. G. E CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 4, p. 743-748, 2008.

- FERREIRA, A.R. Uso de óleos essenciais como agentes terapêuticos. Faculdade de Ciências da Saúde (FSS) Universidade Fernando Pessoa (UFP), 2014.
- FRANCESCATO, L.N; DEUSCHLE, R.A.N; MALLMANN, C.A; ALVES1, S.H; HEINZMANN, B.M. Atividade antimicrobiana de *Senecio heterotrichius* DC. (Asteraceae) **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.
- GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.
- GUIMARÃES, E.F.; CARVALHO-SILVA, M. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**. v.7, p. 263-320, 2012.
- HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R., INÁCIO, C. V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, p. 185-192, set./dez. 2007.
- HARTWELL, J.L. Plants used against cancer. A. **Survey Lloydia (cinci)**, 30, 379 - 436, 1967.
- JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in The Genus Piper (Piperaceae). **American Journal of Botany** v.88 (4): p.706–716. 2001.
- JUNIOR, J.F.A Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Piper permucronatum* Yuncker (Piperaceae). Universidade Federal de Rondônia (U.F.R), 2007.
- LAVOR, P. L.; SANTIAGO, G. M. P.; GOIS, R. W. S.; SOUSA, L. M.; BEZERRA, G. P.; ROMERO, N. R.; ARRIAGA, A. M. C.; LEMOS, T.L. G.; ALVES, P. B.; GOMES, P. C. S. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from northeast Brazil. **CAPLUS**, 7(10), 1391-1392. 2012.
- MACHADO, F.S. Avaliação da atividade citotóxica e indução de apoptose em linhagem de câncer colorretal tratada com piplartina. Instituto de Biotecnologia (IB), Universidade de Caxias do Sul (UCS), 2016.
- MESQUITA, J.M.O ; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A.P.; LOMBARDI, J.A. ; OLIVEIRA, A.B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, **Brazilian Journal of Pharmacognosy** v.15(1): p. 6-12, 2005.
- MOBOT. Manual de plantas. Disponível em www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/
Acessado em: 14/07/2018.
- MOCHI, V.T. Efeito da temperatura de secagem no rendimento do óleo essencial e teor de 1,8-cineol presentes nas folhas de *eucalyptus camaldulensis*. Faculdade de Engenharia Química (FEQ) Universidade Estadual de Campinas (UEC), 2005.
- MORA, F.D.; PEÑA, J.; ROJAS, L.B.; USUBILLAGA, A.; MELÉNDEZ, P. Composición química de los aceites esenciales de *Piper dilatatum* L.C. Rich. y *Piper tuberculatum* Jacq. de Mérida, Venezuela. **Ciencia** v.16 n.3 Maracaibo jul. 2008.
- MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**, v. 27, n. 2, S4050- S4063. (Suplemento - CD Rom), 2009.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunol Methods**, v. 65, p. 55, 1983.

NASCIMENTO, J.C; LAGE, L.F.O; CAMARGOS, C.R.D; AMARAL, J.C; COSTA, L.M; SOUSA, A.N; OLIVEIRA, F.Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata*. **Revista Brasileira de Farmácia (RBF)**, v. 92(4): p. 327-332, 2011.

NASCIMENTO, I.B; INNECCO R; MATOS S.H; BORGES N.S.S; MARCO, C.A. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim santo (*Andropogum sp.*). **Revista Caatinga** v.19: p.123-127, 2006.

NASCIMENTO, J. C. D.; PAULA, V. F. D.; DAVID, J. M. ; DAVID, J. P. Occurrence, biological activities and ¹³C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2288-2311, 2012.

NAVICKIENE, H. M.; MORANDIM, A. A.; ALÉCIO, A. C.; REGASINI, L. O.; BERGAMO, D. C. B.; TELASCREA, M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; MARQUES, M. O. M.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Química Nova**. 29 (3): 467-470, 2006.

NEGRONI, A., CUCCHIARA, S., STRONATI, L. Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. **Mediators of Inflammation**. v. 2015, p. 1-10, 2015.

ORLANDA, J.F.F. Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens Linneau* (RUTACEAE), Universidade Federal da Paraíba (UFB) Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), 2011.

ORDAZ, G.D'ARMAS, H.; YÁÑEZ, D & MORENO, S. Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela Vol. 59 (2): p. 585-595, 2010.

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 of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v.46 (4): p.597-673, 1997.

PEREIRA, C.C.S.S. Avaliação da atividade antitumoral “*in vitro*” e “*in vivo*” da cubebina (tumor sólido de Ehrlich), isolada do extrato bruto de *Piper cubeba* (Piperaceae), Universidade Estadual de Campinas (UFC) Instituto de Biologia (IB), Campinas, 2016.

POHLIT, A.M; QUIGNARD, E.L.J.; NUNOMURA, S.M.; TADEI, W.P.; HIDALGO, A.F.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, S.K.R.; SARAIVA, R.C.G.; MING, L.C.; ALECRIM, A.M.; FERRAZ, A.B.; PEDROSO, A.C.S.; DINIZ, A.V.; FINNEY, E.K.; GOMES, E.O.; DIAS, H.B.; SOUZA, K.S.; OLIVEIRA, L.C.P.; DON, L.C.; QUEIROZ, M.M.A.; HENRIQUE, M.C.; SANTOS, M.; LACERDA JÚNIOR, O. S.; PINTO, P.S.; SILVA, S.G.; GRAÇA, Y.R. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazonica**, v.34, n.1, p.97-105, 2004.

POTZERNHEIM, M., BIZZO, H.R., COSTA, A.T.S., VIEIRA, R.F., CARVALHO, C. M., GRACINDO, L.A.M.B. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 10-12, 2006.

RODRIGUES, R.V. Estudo fitoquímico dos frutos de *Piper tuberculatum* (Jacq.) e avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos e constituintes isolados. Núcleo de Saúde (NS). Universidade Federal de Rondônia (UFR), 2009.

SALES, V.L.S.; NASCIMENTO, E.P.; MONTEIRO, A.B.; COSTA, M.H.N.; DELMONDES, G.A.; SOARES, T.R.C.; TINTINO, S.R.; SOBREIRA, F.R.; FIGUÊIREDO, D.N.; RODRIGUES, C.K.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; FELIPE, C.F.B.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R. Modulação *in vitro* da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. **Revista Cubana de plantas médicas**; 22 (1), 2017.

SALES, V.S.L.; MONTEIRO, A.B.; DELMONDES, G.A.; NASCIMENTO, A, E.P., FIGUÊIREDO, F.R.S.D.N.; RODRIGUES, C.K.S.; LACERDA, J.F.E.; FERNANDES, C.N.; BARBOSA, M.O.; BRASIL, A.X.; TINTINO, S.R.; GOMEZ, M.C.V.; CORONEL, K.; COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.R.M.; FELIPE, C.F.B.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R. Antiparasitic Activity and Essential Oil Chemical Analysis of the *Piper Tuberculatum* Jacq Fruit. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research** (2018), 17 (1): 268-275.

SANTOS, A. S. Desenho modificado do extrator de óleos essenciais em testes no laboratório de agroindústria do CPATU. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1999. 2 p.(não publicado).

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47(3), p. 303-308, 2001.

SCOTT, I.M.; PUNIANI, E.; DURST, T.; PHELPS, D.; MERALI, S.; ASASSABGUI, R.A.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGÈNE, B.J.R.; ARNASON, J.T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, Londres, v. 4, p. 137-144, 2002.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** ·Editor da UFSC, 821p, 1999.

SIMÕES, L. F., KAWANO, T., ALLEGRETTI, S. M., LINHARES, A. X., MAGALHÃES, L. A. E ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.. Efeito do extrato de *Piper tuberculatum* sobre adultos de *Schistosoma mansoni*: testes *in vitro* e *in vivo*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, 2015.

SOBREIRA, P.H.M.; HERNANDEZ, A.E.F.; SOUZA, A.C.R.. Inventário das espécies de Piperaceae ocorrentes em três áreas de Porto Velho - RO e caracterização dos óleos essenciais de *Piper tuberculatum* Jacq com potencial ação de controle de fitopatógenos. Universidade Federal de Rondônia (UFR), Porto Velho, Brasil, 2017.

SOUSA, T.K.G. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do óleo essencial das folhas de *Croton grewioides* (Euphorbiaceae). Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) Universidade Federal da Paraíba (UFP), 2013.

STORCK, R.C.; DESCHAMPS, C. Teor e composição do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) após diferentes tempos de secagem em estufa e temperatura ambiente. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, p.570-576, 2015.

TAYLOR, LESLIE. (2006). «Technical data report for Matico (*Piper aduncum, angustifolium*)». Tropical Plant Database (em inglês). p. 28. Consultado em 31 de março de 2018.

YUNCKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil**. Hoehnea 2: 19-366. 1972.

ZENG, Y.X.; ZHAO, C.X.; LIANG, Y.Z.; YANG, H.; FANG, H.Z.; YI, L.Z.; ZENG, Z.D. Comparative analysis of volatile components from Clematis species growing in China. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, p. 328-339, 2007.