



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

KALLINE LUCIA MENEZES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum* L.**

RECIFE – PE

2022

KALLINE LUCIA MENEZES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper aduncum* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC2, como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa Dra. Jaciana dos Santos
Aguiar

Co-Orientador: Prof. Msc. Cléber José da Silva

RECIFE – PE

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Kalline Lucia Menezes dos.

Caracterização fitoquímicas e atividades biológicas do óleo essencial de *Piper aduncum* L. / Kalline Lucia Menezes dos Santos. - Recife, 2022.
36, tab.

Orientador(a): Jaciana dos Santos Aguiar
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2022.

1. Atividades biológicas . 2. Atividade antitumoral. 3. Atividade antioxidante .
I. Aguiar, Jaciana dos Santos. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar
(Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim
(Presidente e Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Erwelly Barros de Oliveira
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Bruno Oliveira de Veras
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

À minha família, minha mãe Cláudia e minha avó Lúcia. Aos meus irmãos Yuri e Júlia Menezes. A minha avó paterna Marli (in memoriam), e a Taynná Andrade. Por tornarem todo caminho mais leve e possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me permitir chegar até aqui, ter me dado forças físicas e mentais, por não ter me permitido perder a fé em nenhum momento, me fazendo acreditar até mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, Claudia, que sempre apoiou minhas escolhas e enfrentou cada desafio ao meu lado, do seu modo me fez acreditar que tudo é possível se você tiver fé. Obrigada por tudo.

À minha avó Lúcia, que está comigo desde que nasci, a senhora devo tudo, obrigada por todo amor e dedicação nesses anos, por cada oração e por cada pedido de proteção em cada dia que saí sem hora para voltar.

Ao meu irmão Yuri e minha irmã Júlia que me deram forças e proporcionaram momentos de alegria até nos dias mais difíceis.

À minha avó paterna Marli (*in memoriam*) que sempre acreditou que a educação transforma e me incentivou a chegar até aqui hoje. Da senhora guardo lembranças maravilhosas e lições valiosas para minha vida, agradeço muito pelo seu amor.

A todos da minha família que de forma direta ou indireta foram base para esse sonho se realizasse.

À Taynná que esteve comigo em todas as conquistas e desafios que a vida me ofereceu nesses 5 anos, obrigada por aguentar meu choro e compartilhar do meu sorriso, você foi essencial para pessoa que sou hoje e futura profissional.

Às minhas amigas, Camila e Rayssa, que nesses mais de dez anos de amizade, se fizeram presentes mesmo na ausência física, que sempre acreditaram na minha capacidade e me mostraram o valor de uma amizade.

Às minhas amigas, Ilka, Mariana, Eduarda Aquino, Eduarda Calumby, Gabriela e Thalya, juntas desde o primeiro período, deixaram toda jornada mais leve e prazerosa, sem vocês, chegar até aqui seria muito difícil, agradeço demais pelo “Farmácidas”.

A todos meus amigos, Istella e vários outros que perdoaram minha ausência para que meu objetivo fosse alcançado.

Ao grupinho mais famoso do Brasil, agradeço ao “Acoplamento” por todos os compartilhamentos de conhecimento, união, e desabafos nesses anos.

À professora Jaciana Aguiar, minha orientadora, por ter me dado a oportunidade de conhecer de perto a rotina da pesquisa científica, agradeço por todos os ensinamentos.

A Cléber, meu coorientador, que esteve comigo nesses últimos anos, agradeço por toda paciência e dedicação, fico muito feliz por ter compartilhado essa jornada com você.

A todos os membros do Laboratório de Experimentação in Vitro e in Vivo (LEVI) do Departamento de Antibióticos da UFPE.

A todo corpo docente do Departamento de Ciências Farmacêuticas.

À Universidade Federal de Pernambuco, por me acolher nesses 5 longos anos.

“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

(Josué 1:9)

RESUMO

O estudo de produtos derivados de plantas contribui amplamente para o desenvolvimento e síntese de possíveis novas drogas, bem como, a identificação de moléculas bioativas que podem ser introduzidas mundialmente em formulações farmacológicas. O gênero *Piper* distribuído no território brasileiro, compreende um grande grupo taxonômico, levando em consideração suas numerosas espécies, bem como seus constituintes fitoquímicos, sendo a espécie *Piper aduncum*, conhecida popularmente como pimenta-de-macaco, utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções, diabetes, pressão alta, dor de garganta, dentre outras patologias. Por tanto o presente trabalho teve por objetivo a caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antioxidantes e citotóxicas do óleo essencial de *Piper aduncum*. O óleo essencial foi obtido através das folhas de *Piper aduncum* em aparelho tipo Clevenger e caracterizado fitoquimicamente a partir de Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectômetro de Massas (CG-MS). A atividade antioxidante foi analisada através do sequestro dos radicais 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) – (ABTS⁺) e teste de atividade antioxidante total (AAT) através da redução do complexo fosfomolibdênio. Para análise da viabilidade celular foi utilizado o método colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), utilizando as linhagens celulares HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano), MCF-7 (câncer de mama humano), HeLa (adenocarcinoma de cérvix humana), Vero (células epiteliais de rim de macaco) e L929 (fibroblasto murino). O óleo essencial também foi analisado frente a células mononucleares de sangue periférico humano. Os resultados indicaram a presença de três compostos principais, dilapiol (58,58%), (E)-cariofileno (7,30%), biciclogermacreno (3,95%). A atividade antioxidante total (AAT) foi considerada o método mais eficaz, com CE₅₀ de 114,80 µg/mL. No que se refere a investigação citotóxica, o óleo essencial apresentou atividade citotóxica para as linhagens HeLa e HT-29, com CI₅₀ de 3,56 e 9,06 µg/mL, respectivamente. Frente ao resultado de PBMC, o óleo essencial de *P. aduncum* não apresentou citotoxicidade. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a espécie *P. aduncum* apresenta perfil citotóxico promissor, objetivando novos estudos nesta área.

Palavras-chave: antioxidante; *Piper sp.*; plantas medicinais; atividade citotóxica.

ABSTRACT

The study of plant-derived phytochemicals contributes largely to the development and synthesis of possible new drugs, as well as the identification of bioactive molecules that can be introduced worldwide in pharmacological formulations. The genus *Piper*, distributed in the Brazilian territory, comprises a large taxonomic group, taking into account its numerous species, as well as its phytochemical constituents, with the species *Piper aduncum*, popularly known as macaque pepper, being used in folk medicine for the treatment of infections, diabetes, high blood pressure, sore throat, among other pathologies. Therefore, the present work aimed at the phytochemical characterization and evaluating the antioxidant and cytotoxic activities of the essential oil of *P. aduncum*. The essential oil was obtained from the leaves of *P. aduncum* in a Clevenger-type apparatus and phytochemically characterized using a Gas Chromatograph Coupled to a Mass Spectrometer (GC-MS). Antioxidant activity was analyzed through 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) – (ABTS⁺) radical scavenging and total antioxidant activity test (AAT) by reducing the phosphomolybdenum complex. For cell viability analysis, the colorimetric method was used with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), using the HT-29 cell lines (human colorectal adenocarcinoma), MCF-7 (human breast cancer), HeLa (human cervix adenocarcinoma), Vero (monkey kidney epithelial cells) and L929 (murine fibroblast). The essential oil was also analyzed against human peripheral blood mononuclear cells. The results indicated the presence of three main compounds, dillapiolene (58.58%), (E)-caryophyllene (7.30%), bicyclogermacrene (3.95%). Regarding the antioxidant evaluation, the total antioxidant activity (AAT) was considered the most effective method, with an EC₅₀ (μg/mL) of 114.80. Regarding the cytotoxic investigation, the essential oil showed cytotoxic activity for the HeLa HT-29 strains, with IC₅₀ of 3.56 and 9.06, respectively. According to the results obtained, it is concluded that the species *Piper aduncum* has a promising cytotoxic profile, aiming at further studies in this area.

Keywords: antioxidant; *Piper* sp.; medicinal plants; cytotoxic activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados no óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	28
Figura 2 – Atividade antioxidante promovida pelo óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> em diferentes testes.....	29
Figura 3 – Porcentagem de inibição do óleo essencial de <i>P. aduncum</i> sobre as células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização fitoquímica do óleo essencial de <i>P. aduncum</i>	27
Tabela 2 – Resultados da atividade antioxidante, expressos em CE ₅₀ , do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	29
Tabela 3 - Atividade citotóxica dos óleos essenciais de <i>Piper aduncum</i> sobre as linhagens de células tumorais e não tumorais.....	30
Tabela 4 – Valores de CI ₅₀ em µg/mL do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> frente às linhagens de células tumorais.....	31

LISTA DE SIGLAS

µg - Micrograma

µM – Micromolar

Abs Am - Absorbância da amostra

Abs Cont - Abs do Controle

Abs Inf. Cor - Abs de Influência da cor

ABTS⁺ - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ANOVA – Análise de variância unidirecional

ATT – Teste de atividade antioxidante total

BAG - Banco Ativo de Germoplasma

CG-MS - Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectômetro de Massas

DPPH - 2,2-difenil1-picrilhidrazil

EAC – Carcinoma Ascítico de Erlick

HeLa - Adenocarcinoma de cérvix humana

HEMOPE – Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

HL-60 - Leucemia promielocítica aguda

HT 29 - Adenocarcinoma colorretal humano

L929 - fibroblasto murino

LMR - Leitor de microplacas

MCF-7 – Adenocarcinoma de mama humano

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

OEPad – Óleo essencial de *Piper aduncum*

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

TEAC - Equivalência ao Trolox

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Uso etnofarmacológico de plantas medicinais.....	15
2.2 Gênero Piper e a espécie 166	
2.3 Ação antitumoral de compostos fitoquímicos obtidos de óleos essenciais.....	17
2.4 Atividade antioxidante de compostos fitoquímicos e sua correlação com atividade antitumoral.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4 METODOLOGIA.....	21
4.1 Coleta do material botânico.....	21
4.2 Extração do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i> (OEPad).....	21
4.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-MS).....	21
4.4 Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH.....	22
4.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS.....	22
4.6 Teste de atividade antioxidante total (AAT): redução do complexo fosfomolibdênio.....	23
4.7 Teste de Citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais e não tumorais.....	23
4.8 Citotoxicidade frente a células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	24
4.8.1 Preparação da cultura de PBMC humano.....	24
4.8.2 Citotoxicidade.....	24
4.9 Análise estatística.....	24
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Caracterização fitoquímica do óleo essencial de <i>Piper aduncum</i>	25
5.2 Atividades antioxidantes.....	27
5.3 Atividade citotóxica.....	29
5.4 Citotoxicidade frente às células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC)...	30
6 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais está associada ao tratamento, cura e prevenção de diversas doenças, tornando-se uma das mais antigas práticas terapêuticas da medicina, e tem impulsionado vários estudos com o objetivo de identificar e analisar compostos químicos com propriedades terapêuticas. A busca por medicamentos com baixa toxicidade e elevada atividade terapêutica tem direcionado os cientistas a estudarem o uso de drogas de origem vegetal na produção de novos medicamentos, onde aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (LIMA *et al.* 2016; ALVES *et al.* 2017).

O Brasil representa uma das floras mais diversas do mundo, apresentando uma enorme fonte de substâncias com potenciais atividades biológicas, sendo representado na primeira colocação do ranking de países megadiversos (LEUZINGER *et al.* 2019).

Além de seu enorme valor associado à manutenção dos ecossistemas, o Brasil tem sua biodiversidade ligada diretamente ao crescimento da economia mundial, associada a vários setores como produção de alimentos, combustíveis, extratos, óleos e medicamentos. Diante do exposto, e da enorme biodiversidade citada, uma das classes em destaque é a família Piperaceae que compreende 5 gêneros (Piper, Peperomia, Manekia, Zippelia e Macropiper) com aproximadamente 4.000 espécies difundidas em todo o mundo e a maioria delas são dos gêneros Piper e Peperomia. As espécies desta família encontram-se presentes por toda a América (OLIVEIRA *et al.* 2020).

O gênero Piper corresponde a cerca de 700 espécies, e é o maior entre a família Piperaceae, com ocorrência em diferentes habitats, na sua maioria habitats úmidos, em áreas desmatadas ou em florestas. Esse gênero é de grande importância econômica, especialmente devido a presença de conteúdos oleífero em suas estruturas e é bastante difundido na medicina tradicional (ALVES *et al.* 2017).

Espécies do gênero Piper destacam-se em pesquisas na área da química no setor agrícola como alternativa sustentável aos produtos xenobióticos de origem sintética e na prospecção biotecnológica para a agricultura. Essas plantas são conhecidas especialmente pela produção de óleos essenciais e pelo acúmulo de metabólitos secundários, como fenilpropanóides, lignanas, amidas e alcalóides (WANKE *et al.* 2007; MONTEIRO *et al.* 2009).

Piper aduncum é uma das espécies de plantas que vem apresentando um crescente interesse, principalmente quanto à extração do seu óleo essencial, tornando-se um produto

de forte potência econômica, utilizado principalmente como inseticida e fungicida, na agricultura e medicina. A espécie *Piper aduncum* é um arbusto medicinal nativo da América tropical e está amplamente espalhada em quase todo território nacional, o que abre portas para novos estudos para identificação do seu potencial medicinal (CHAHAL *et al.* 2011).

É possível observar que a fitoterapia vem se tornando cada vez mais relevante para cura, prevenção e/ou tratamento de diversas doenças, inclusive do câncer, que tornou-se uma das principais causas de morte no mundo (TORRE *et al.* 2015), estima-se que até 2030, ocorram 27 milhões de novos casos de câncer a cada ano, (TEIXEIRA *et al.* 2021), causados por fatores que podem ser intrínsecos e extrínsecos.

O uso da terapia derivada de plantas apesar de ser uma técnica antiga vem crescendo ao longo das décadas e, cada vez mais, se torna frequente o interesse em plantas com ações antioxidantes e antitumorais. O conhecimento da biologia do câncer demonstra que a administração de drogas citotóxicas em altas doses nem sempre é adequada devido ao grande histórico de resistência aos medicamentos das células neoplásicas, bem como à indução de neutropenia nos pacientes. É sabido das dificuldades para produzir e confirmar a eficiência e eficácia das novas drogas alopáticas através de metodologias tradicionais, o que faz com que esses produtos sejam cada vez mais raros (LUDWICZUK; ASAKAWA, 2019).

Porém, é preciso uma contínua busca por novos tratamentos para as neoplasias; Sendo assim, espera-se que o óleo essencial de *Piper aduncum* apresente atividades antitumorais e antioxidantes e com baixa citotoxicidade para células não tumorais. O estudo em questão também torna-se relevante pelo fato de que a espécie estudada, ainda não apresenta na literatura dados suficientes que abordem a relação de suas moléculas ativas com suas atividades biológicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso etnofarmacológico de plantas medicinais

As primeiras civilizações evidenciaram em algumas espécies vegetais possuíam substâncias ativas com poder curativo, o que permitiu mostrar empiricamente seu potencial farmacológico indicando o uso de produtos naturais como uma das principais formas de tratamento para a população (BADKE *et al.* 2011).

Atualmente, os medicamentos usados na terapia de inúmeras doenças são derivados de vegetais, microorganismos, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados. Estudos mostram que medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87 % das doenças humanas, com atividades relacionadas a ação antibacteriana, anticoagulante, imunossupressora e anticancerígena.(NEWMAN *et al.* 2003)

Mudanças sociais e econômicas bem como surgimento de diversos protocolos farmacológicos favoreceram a utilização de medicamentos industrializados, contudo, tendo em vista o grande potencial das espécies e suas vantagens como, grande biodiversidade, baixo custo, fácil acessibilidade e presença de compostos químicos ativos, impulsionaram os estudos nessa área. Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil aprovou pela Portaria nº 648 a Política Nacional de Atenção Básica, que inclui plantas medicinais no SUS com o objetivo de incentivar e investir nessa forma de tratamento (DE SOUZA *et al.* 2019).

Estudos fitoquímicos e etnofarmacológicos são cada vez mais importantes para ampliar os conhecimentos do uso popular de extratos naturais, comprovar cientificamente as atividades de seus componentes, além de ajudar na busca de princípios ativos contra diversas patologias. O Brasil é conhecido mundialmente por sua grande biodiversidade, contendo milhares de famílias e espécies de plantas, que são utilizadas na medicina popular, contudo, é comum que as plantas nativas sejam utilizadas sem o devido conhecimento de seus componentes fitoquímicos e suas reais propriedades farmacológicas. Tornam-se, então, necessários pesquisas e estudos sobre a finalidade de cada planta no organismo, além de ressaltar a necessidade de um controle de qualidade e a inserção de um padrão de comercialização (LIMA *et al.* 2016)

A partir desses estudos etnobotânicos é possível investigar as propriedades biológicas das plantas como forma de tratamento de doenças, contribuindo fortemente para a descoberta de novos compostos fitoterápicos (ARTHUR LADEIRA *et al.* 2017)

2.2 Gênero Piper e a espécie *Piper aduncum*

As espécies da família Piperaceae são alvos de muitas pesquisas, por apresentarem potencial biológico devido ao variado perfil metabólico. Entre os principais constituintes químicos da família Piperaceae estão os sesquipertenos e seus derivados que podem estar ligados a atividade anti-inflamatória, lignanas associados ao potencial antioxidante e anti-inflamatório, fenilpropanoides como dilapiol que está associado a atividades antimicrobianas, entre outros compostos produzidos (SILVA *et al.* 2014).

O gênero Piper é amplamente distribuído em regiões tropicais e temperadas de ambos os hemisférios, com boa representatividade na América Central e na América do Sul, obtendo maior destaque por ser um grupo pantropical com aproximadamente 2000 espécies. Existem 291 espécies no Brasil, e destas, 184 são endêmicas, e a Floresta Atlântica, com 160 espécies descritas, é o lugar característico deste gênero no Brasil (REFLORA, 2017).

As espécies de Piper apresentam uma variedade de fitoquímicos, como flavonóides e alcalóides, o que por sua vez, reflete em um grande potencial biológico com diversas aplicações relatadas, como antifúngica, pesticida, antioxidante, antitumoral e tripanocida, entre outras, além do uso em preparações cosméticas, como os óleos essenciais vendidos na indústria cosmética, como citado anteriormente.

O gênero Piper compreende uma enorme diversidade de espécies, as quais muitas ainda não foram estudadas em relação ao seu efeito anticancerígeno e constituição fitoquímica, sugerindo que futuras pesquisas sejam realizadas com o objetivo de esclarecer tais atividades biológicas através da ligação com seus respectivos componentes fitoquímicos (WANG *et al.* 2014).

A espécie *Piper aduncum*, é um arbusto de ampla distribuição tropical, com ocorrência em solos areno-argilosos, e é conhecida popularmente como “pimenta-de-macaco”. Na literatura é possível identificar algumas atividades relacionadas ao seu uso, como por exemplo, atividades moluscicida, citotóxica e antibacteriana. A taxonomia de espécies de *Piperaceae* é considerada complexa, passível de modificações através de novas descobertas. As variadas propriedades atribuídas ao óleo essencial de *P. aduncum* é resultado de uma vasta composição química, com presença de diferentes metabólitos secundários, onde a presença e concentração dos mesmos pode variar de acordo com o ambiente coletado bem como temperatura, altitude, luminosidade entre outras variáveis (GAMBOA *et al.* 2018).

2.3 Ação antitumoral de compostos fitoquímicos

O câncer é o nome correspondente a mais de 100 tipos de doenças, que possuem características em comum, como o crescimento desordenado das células formando uma massa celular, também chamada de tumor. Tais tumores podem ser considerados benignos, não são classificados como câncer, pois podem ser retirados através de procedimentos cirúrgicos, sem causar dano ao organismo e raramente levar o paciente a óbito. No entanto podem existir os tumores chamados de malignos, classificados como câncer. Estes podem desenvolver a capacidade de se locomover para os demais órgãos e/ou tecidos, processo chamado de metástase. Tal patologia pode ser desenvolvida por diversos fatores, havendo relação dos fatores genéticos (internos), que correspondem à capacidade do organismo em se defender das agressões externas, e os fatores ambientais (externos), que englobam o meio ambiente e os hábitos do indivíduo (sedentarismo, dieta, exposição solar excessiva, tabagismo, consumo de álcool em excesso, entre outros.) (OPPERMANN, 2014). As plantas medicinais têm sido utilizadas há muitos anos devido a suas propriedades químicas e farmacológicas (BOURHIA *et al.* 2019). Os quimioterápicos de origem vegetal presentes na terapêutica representam um grande incentivo às pesquisas nesta área. A vincristina e vimblastina são bons exemplos de alcaloides, que foram isolados da espécie *Catharanthus roseus*. Diversos trabalhos experimentais e epidemiológicos vêm demonstrando que o consumo de algumas plantas pode promover ação quimiopreventiva e/ou antineoplásica (WANG *et al.* 2014).

A maior disponibilidade e acesso resultam no aumento do uso de terapias alternativas ou complementares, nos países desenvolvidos o uso está impulsionado pela preocupação com os efeitos adversos provocados por fármacos sintetizados. Apesar do grande desenvolvimento científico e tecnológico em pesquisas com fármacos antineoplásicos, ainda é possível observar vários tipos de câncer que ainda não possuem tratamento adequado, sendo assim, muitas vezes o tratamento está associado com forte imunossupressão, deixando o paciente cada vez mais exposto. Portanto, a busca por novos medicamentos nessa área e os estudos etnobotânicos tornou-se uma ferramenta de valor inestimável para a caracterização e desenvolvimento de novos agentes antitumorais sendo um excelente meio no desenvolvimento de novas drogas.

2.4 Atividade antioxidante de compostos fitoquímicos e sua correlação com atividade antitumoral

Os radicais livres são moléculas altamente reativas, por possuírem elétrons de valência de maneira desemparelhada. Esses compostos são produzidos rotineiramente pelo organismo humano, através de atividades metabólicas intrínsecas. Quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a concentração de antioxidantes, acarreta o estresse oxidativo, que é responsável por processos fisiopatológicos como inflamação, diabetes, aterosclerose, doenças hepáticas, Alzheimer, Parkinson, câncer, até o envelhecimento (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

O potencial de alguns extratos de plantas em retardar ou inibir a oxidação de moléculas através da supressão de reações de oxidação em cadeia, confere efeito protetor que torna a sua utilização uma alternativa na medicina complementar. Desse modo, tem aumentado o interesse pela pesquisa sobre novos antioxidantes naturais, levando as indústrias farmacêuticas a terem maior atenção em novas fontes, principalmente às de origem vegetal. Os antioxidantes considerados vegetais apresentam natureza muito variada, contudo, compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante (MAHBOUBI *et al.* 2013).

Em relação a avaliação da capacidade antioxidante de produtos naturais, os métodos mais utilizados, devido a praticidade e custo são o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (DPPH) e o ABTS (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato). Em relação ao DPPH, este método baseia-se na medida da capacidade de uma determinada substância com capacidade antioxidante em sequestrar o DPPH, radical livre estável em virtude da deslocação do elétron desemparelhado por toda a molécula, reduzindo-o à hidrazina. Quando uma determinada molécula, que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (ALVES *et al.* 2010).

Já a avaliação através do método com ABTS é baseada na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o ânion radical de longa vida ABTS. Nesse ensaio, o ABTS é oxidado pelo radical peroxil ou outros oxidantes para seu radical cátion, ABTS.⁺, que é colorido, e a capacidade antioxidante é medida pela habilidade que o composto em teste possui em decrescer a cor, reagindo diretamente com o radical ABTS (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Os produtos naturais apresentam resultados promissores frente a atividade

antioxidante, os metabólitos secundários como polifenóis, chalconas, flavonas e flavononas, bem como alcalóides, lignoides, terpenos e esteróides, segundo a literatura, são os principais envolvidos com esta atividade. Estudos ainda relatam que são os metabólitos secundários também os principais responsáveis pela atividade anticancerígena, anti-hipertensiva, antioxidante, anti-lipêmica, ansiolítica, antidepressiva e anti-inflamatória (REZENDE *et al.* 2016)

Nesse sentido, a eficiência e a atividade antioxidante destes compostos bioativos dependem não apenas de suas estruturas, bem como concentração, as quais são amplamente influenciadas por fatores genéticos e condições ambientais. Por tanto, além da identificação dos principais componentes fitoquímicos, faz-se necessário o conhecimento das concentrações utilizadas, para que atinja uma concentração ideal, atuando como antioxidantes e apresentando impacto positivo sobre a arquitetura celular (MAHBOUBI *et al.* 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar a composição química e analisar as atividades biológicas do óleo essencial de *Piper aduncum*.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas da espécie *Piper aduncum* (OEPad);
- Identificar a composição química do óleo essencial de OEPad;
- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de OEPad;
- Analisar a citotoxicidade do OEPad frente a linhagens de células tumorais, HT-29 (Câncer de cólon humano), HeLa (câncer cervical humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), não tumorais, L929 (fibroblastos murino) e Vero (células epiteliais de rim de macaco verde), e células mononucleares de sangue periférico.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do material botânico

O material vegetal (folhas) de *Piper aduncum* foi coletada em novembro de 2019 no Vale Nacional do Catimbau – Buíque/PE. A espécie foi introduzida no Herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) sob o número 55167.

4.2 Extração do óleo essencial de *Piper aduncum* (OEPad)

O óleo essencial foi extraído das folhas frescas de *P. aduncum* (500 g) por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por 4 h. Sulfato de sódio anidro foi utilizado para remover toda a água do óleo e armazenado em recipiente âmbar selado a 4° C.

4.3 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-MS)

Para a caracterização fitoquímica do óleo essencial de *Piper aduncum* foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) Agilent 5975C, equipado com coluna apolar HP-5 (30mX0,25mm, 0,25µm, Agilent), injetor split/splitless e detector do tipo quadrupolo. O óleo essencial foi analisado sob as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial do forno de 40 °C (mantida por 2 min) com aquecimento a uma taxa de 4 °C/min até a temperatura final de 230 °C, mantida por 5 minutos. O injetor foi mantido a 250 °C e o hélio foi usado como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As temperaturas do detector quadrupolo e da fonte de íons foram 230 °C e 150 °C, respectivamente, com potencial de ionização a 70 eV e faixa de varredura de 35-350 m/z e 1.0 scan/s. Para cada análise, uma alíquota de 1 µL de uma solução com concentração de 1000 µL/mL dos óleos essenciais dissolvidos em hexano foi inserida no equipamento em modo split 1:50. Em seguida, uma alíquota de uma solução de padrões de hidrocarbonetos, contendo uma série homóloga de alcanos (C9 a C30), foi analisada nas mesmas condições cromatográficas usadas para os óleos essenciais. A partir da análise dos tempos de retenção dos compostos nas amostras dos óleos essenciais e dos padrões de hidrocarboneto foi calculado o índice de retenção para cada componente do óleo, segundo a equação de Kratz. Os compostos foram identificados a partir dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, usando comparações dos índices de retenção calculados com os índices de retenção disponíveis na base de dados do laboratório e verificação com padrões autênticos. A quantificação dos componentes presentes no óleo

essencial foi realizada em um cromatógrafo gasoso (CG), com detector de ionização por chama (DIC) (Thermo Trace GC Ultra, Thermo Scientific, Milan, Italy) equipado com coluna HP-5 (30 mx0.25 mmx 0.25 µm, Agilent) e injetor split/splitless. A programação de temperatura no cromatógrafo gasoso foi a mesma utilizada nas análises por GC-MS.

4.4 Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH

O ensaio é baseado na transferência de elétrons por uma substância antioxidante no qual 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH, de cor roxa) é reduzido a difenil-picril-hidrazina (de cor amarela) (Melo *et al.* 2020). O óleo essencial de *Piper aduncum* (1 mg) foi solubilizado em DMSO e diluído para as concentrações de 15,63 – 500 µg/mL. O ensaio foi realizado através da adição de 2,5 mL de DPPH (1 mM) a 0,2 mL de solução do óleo essencial, seguido de incubação por 25 min no escuro, a absorbância em 517 nm foi lida. O controle negativo consistiu em DPPH adicionado a 0,2 mL de metanol. O ácido ascórbico foi usado como padrão antioxidante. O sequestro de radicais DPPH foi calculado usando a equação:

$$\text{DPPH (\%)} = [(As - Ac) / Ac] \times 100.$$

Onde: As = absorbância da amostra e Ac = absorbância do controle.

4.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ABTS

O consumo de radicais livres pelo óleo essencial de *Piper aduncum* também foi avaliado com base na descoloração do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS). Uma solução estoque de ABTS (7 mM) foi preparada em persulfato de potássio (2,45 mM). Para o ensaio, o óleo essencial de *Piper aduncum* (1 mg) foi solubilizado em DMSO e diluído para as concentrações de 15,63 – 500 µg/mL. 100 µL de cada diluição foi adicionada a 3 mL de ABTS e a absorbância resultante foi lida a 734 nm. O TROLOX foi usado como padrão antioxidante. O branco do ensaio foi o metanol. O sequestro de radicais ABTS foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{ABTS (\%)} = [(As - Ac) / Ac] \times 100.$$

Onde: As = absorbância da amostra e Ac = absorbância do controle.

4.6 Teste de atividade antioxidante total (AAT): redução do complexo fosfomolibdênio

A Capacidade Antioxidante Total foi determinada através do método por fosfomolibdênio (Barboza *et al*, 2018). Um volume de 100 µL da amostra (500 µg/mL) foi adicionado a 1 mL de solução reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28mM e momolibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram incubados a 95°C por 90 min e, em seguida, a absorbância foi medida a 695 nm. O ácido ascórbico foi usado como referência e a capacidade antioxidante total foi expressa como equivalente de ácido ascórbico. Como controle negativo foi utilizado um volume de 100 µL de metanol em 1 mL da solução reagente. Todo o ensaio foi realizado em triplicata. A AAT (%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$ATT (\%) = [(abs amostra - abs branco)/(abs ácido ascórbico - abs branco) \times 100].$$

4.7 Teste de Citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais e não tumorais

A atividade citotóxica foi realizada através do método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Essa metodologia baseia-se na conversão do MTT em cristais de formazan pela ação da enzima succinil desidrogenase presente nas mitocôndrias de células viáveis (ALLEY *et al.*, 1988; MOSMANN, 1983). As linhagens celulares utilizadas foram HT-29 (Câncer de cólon humano), HeLa (câncer cervical humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), L929 (fibroblastos murino) e Vero (células epiteliais de rim de macaco verde) adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas no Laboratório de Experimentação *in vitro* e *in vivo*, Departamento de Antibióticos, UFPE. As linhagens foram mantidas em meio de cultura DMEM e RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina) em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. As células, previamente testadas contra micoplasmas, foram plaqueadas (10⁵ células/mL) em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida, o óleo essencial dissolvido em DMSO foi adicionado aos oços na concentração final de 50 µg/mL. Após 72 h, foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. O experimento foi realizado em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 5.1 demo.

4.8 Citotoxicidade frente a células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

4.8.1 Preparação da cultura de PBMC humano

Os linfócitos e monócitos foram preparados a partir de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), cedidos pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). A utilização de células leucocitárias humanas foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (Número do parecer 5.105.261). As células foram isoladas usando um gradiente Ficoll® 1.077 (Sigma-Aldrich) e contadas em uma câmara de Neubauer usando solução de azul de tripan (0,4%). As células foram usadas apenas quando a viabilidade era acima de 95%. As PBMC foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% (p/v) de soro fetal bovino contendo 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) em placas de 96 poços a uma densidade de 10^6 células/mL. Para os ensaios de viabilidade as células foram incubadas com diferentes concentrações do óleo essencial de *Piper aduncum* por 72 h.

4.8.2 Citotoxicidade

As PBMC foram incubadas com o óleo essencial de *Piper aduncum* (0,39 – 50 $\mu\text{g/mL}$) por 72 h e a viabilidade celular foi avaliada através do teste de MTT. A diferença entre os valores das médias da viabilidade celular foi avaliada pela Anova *one way* e pós teste *Tukey* no programa *GraphPad Prism* 5.01. demo.

4.9 Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos como a média $\pm$ DP de pelo menos três experimentos independentes. As comparações estatísticas foram realizadas usando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. Um valor de $p > 0,05$ (5% de probabilidade) indicou significância. Todas as análises de dados foram feitas usando o software *GraphPad Prism* 5.01. demo.

5 RESULTADOS

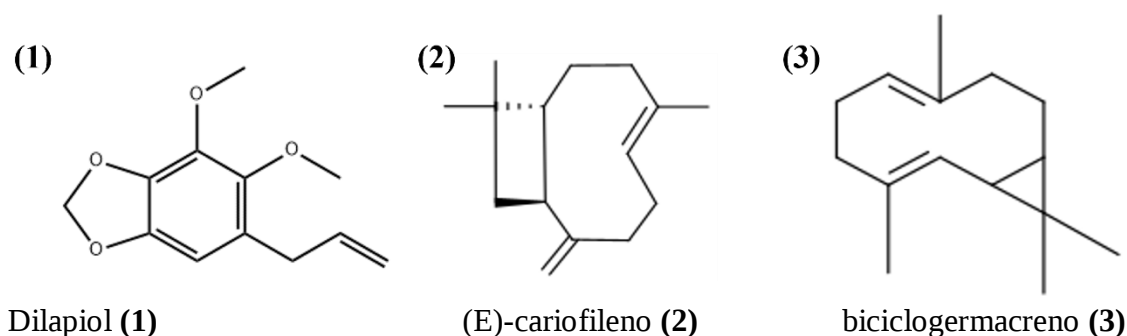
5.1 Caracterização fitoquímica do óleo essencial de *Piper aduncum*

O óleo essencial de *Piper aduncum* foi caracterizado por CG-MS, e cerca de 31 compostos foram identificados (**Tabela 1**). Entre eles, três componentes foram considerados majoritários: dilapiol (**1**) (58,58%), (E)-cariofileno (**2**) (7,30%), biciclogermacreno (**3**) (3,95%) (Figura 1).

Tabela 1– Caracterização fitoquímica do óleo essencial de *P. aduncum*

Composto	RT lit.	RT cal.	% EOPadu.	S.D
β -pineno	974	974	1,01	0,08
α -felandreno	1002	1003	0,49	0,01
limoneno	1024	1027	0,23	0,05
(Z)- β -ocimeno	1032	1038	1,87	0,05
(E)- β -ocimeno	1044	1049	2,42	0,03
δ -elemeno	1335	1339	0,07	0,01
ciclosativo	1369	1368	0,11	0,01
α -ylangeno	1373	1373	0,06	0,01
α -copaeno	1374	1377	0,51	0,02
β -elemeno	1389	1393	0,39	0,08
α -gurjuneno	1409	1411	0,20	0,04
(E)-cariofileno	1417	1421	7,30	0,59
β -copaneno	1430	1430	0,06	0,01
α -humuleno	1452	1454	1,01	0,01
desidro-aromadendrano	1460	1461	0,19	0,01
γ -muurolene	1478	1476	0,05	0,46
germacreno D	1480	1481	2,60	0,12
trans-muurola-4(14),5-dieno	1493	1491	0,03	0,01
biciclogermacreno	1500	1496	3,95	0,03
δ -amorfenol	1511	1506	0,86	0,02
cubebol	1514	1515	0,82	0,04
miristicina	1517	1522	2,32	0,08
germacreno B	1559	1558	0,54	0,01
(E)-nerolidol	1561	1565	0,87	0,02
Palustrol	1567	1569	0,07	0,01
viridiflorol	1592	1594	1,26	0,07
ledol	1602	1606	0,18	0,01
dilapiol	1620	1638	58,58	2,49
epi- α -muurolol	1640	1648	0,56	0,02
α -cadinol	1652	1659	0,26	0,03
apiol	1677	1687	0,16	0,02
			89,03	

Figura 1– Estrutura química dos constituintes majoritários identificados no óleo essencial de *Piper aduncum*



O principal composto encontrado na espécie chamado de dilapiol, é um metabólito secundário produzido pelo metabolismo vegetal e é amplamente utilizado pelo ser humano na medicina tradicional e possui atividades biológicas como moluscicida, antimicrobiana, fungicida, larvicida e inseticida (MAIA *et al.* 1998). Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com achados na literatura, onde demonstram a maior presença do dilapiol em óleos essenciais.

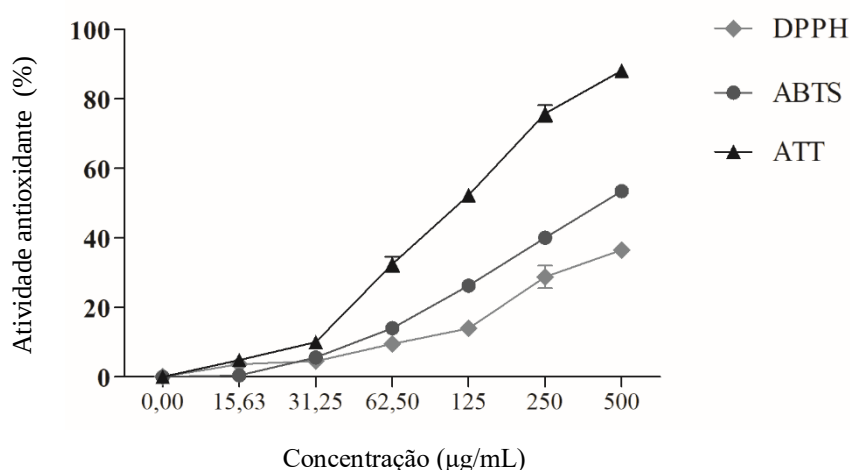
Negreiros *et al.* (2012) analisaram óleos essenciais extraídos de populações de *Piper aduncum* presentes no Banco Ativo de Germoplasma (BAG), localizado no campo experimental da Embrapa no estado do Acre, e obtiveram maiores teores de dilapiol para as populações 207 e 208 (ambas acima de 81%). O alto valor encontrado pode ser atribuído a metodologia utilizada, onde alguns componentes considerados minoritários podem ter sido perdidos por serem mais voláteis durante processamento. O composto dilapiol está presente na literatura em diversos estudos, como para atividade antimicrobiana (BRAZÃO *et al.* 2012), atividade antileishmania (BARROS *et al.* 2018) , entre outras.

Cidade *et al.* (2018) também relataram a presença dos compostos beta-cariofileneo e biciclogermacreno (3,07% e 0,74% respectivamente) na caracterização química do óleo essencial dos frutos *Piper alatabaccum*, relacionados com a investigação da atividade antioxidante, corroborando com os achados do presente estudo. Todavia, os resultados de concentrações diferentes pode ser explicado pela utilização de partes diferentes para obtenção do óleo, bem como local e época de coleta, contudo a presença desses sesquiterpenos mostram a alta variação de compostos apresentada pelo gênero *Piper*.

5.2 Atividades antioxidantes

A atividade antioxidante promovida pelo óleo essencial de *Piper aduncum* foi avaliada através de diferentes metodologias como antioxidante total (AAT), ABTS e DPPH, como apresentado na figura abaixo. Pode-se observar que o óleo essencial possui ação antioxidante e vale salientar que esta ação foi melhor evidenciada através do método ATT, onde na maior concentração testada (500 µg/mL) apresentou porcentagem de atividade antioxidante próximas a 100%, seguido do ABTS e DPPH como mostra a figura 2. Os resultados de atividade antioxidante também foram expressos em CE₅₀ (**tabela 2**).

Figura 2 -Atividade antioxidante promovida pelo óleo essencial de *Piper aduncum* em diferentes testes



Através da figura 02, é possível afirmar que a atividade antioxidante apresenta-se de maneira dose-dependente, ou seja, quanto maior a concentração, maior a atividade antioxidante. Zibri *et al.* (2019) relatam que ao analisar a capacidade antioxidante de produtos como o óleo essencial, extratos ou frações, alguns fatores podem afetar a capacidade dos mesmos em reagir e eliminar tais radicais, entre eles a solubilidade das amostras e/ou estereosseletividade dos radicais. Essas condições podem interferir e explicar o porquê de alguns óleos não apresentarem atividade antioxidante pelo ensaio DPPH, e apresentaram atividade frente a outros ensaios como ABTS e ATT, como no caso do presente estudo. Na tabela a seguir é possível observar os valores expressos em CE₅₀.

Tabela 2 – Resultados da atividade antioxidante, expressos em CE₅₀, do óleo essencial de *Piper aduncum*

	CE ₅₀ (µg/mL) (intervalo de confiança 95%)		
	DPPH	ABTS	ATT
EOPadu	ND	400,40 (365,40 – 438,90)	114,80 (108,20 – 121,90)
TROLOX	NT	21,88 (17,35 – 27,59)	NT
VIT. C	28,49 (22,43 – 36,19)	NT	23,51 (21,89 – 25,26)

Legendas: EOPadu – Óleo essencial de *Piper aduncum*, NT – Não testado, ND – Não determinado

De acordo com os resultados expostos, tais discrepâncias podem ser explicadas quando as características principais de cada método são associadas. O método ABTS por exemplo, tem como característica principal a capacidade de reagir com compostos lipofílicos e hidrofílicos. Já o método DPPH, possui afinidade apenas para aqueles compostos considerados hidrofílicos, o que pode justificar os maiores teores obtidos pela técnica ABTS. Todavia, outros estudos também relataram eficiência para a técnica DPPH, Costa *et al.* (2021) avaliaram a capacidade antioxidante do óleo essencial extraído dos frutos de *Piper nigrum* através da metodologia DPPH, apresentando CE₅₀ de 2,81 mg/mL, o que fortalece o perfil antioxidante do gênero *Piper*. Silva *et al.* (2014) também avaliaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos de *P. arboreum* e *P. dilatatum* frente ao método DPPH, onde apresentaram atividade antioxidante com valores de CE₅₀ de 239,60 e 367,70, respectivamente. Albuquerque *et al.* (2018) investigaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Piper hispidinervum* em diferentes metodologias. No estudo, na maior concentração testada (100 µg/mL) o óleo essencial apresentou 33,75 % de inibição para o método com DPPH, e 66,59% para ABTS, Pode-se perceber que o resultado da atividade antioxidante pode variar de acordo com o método empregado e características físico-químicas, e evidencia o potencial antioxidante das espécies de *Piper*.

5.3 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica do óleo essencial de *Piper aduncum* foi avaliada frente a linhagens de células tumorais e não tumorais. Pode-se observar que o óleo essencial apresentou percentual de inibição acima de 70% frente às linhagens HeLa (câncer cervical humano) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) com 93,37% e 82,71%, respectivamente. Vale salientar que para as linhagens de células não tumorais, não houve percentual de citotoxicidade significativo, característica de grande importância no estudo de formulações candidatas com ação anticancerígena.

Tabela 3 - Atividade citotóxica dos óleos essenciais de *Piper aduncum* sobre as linhagens de células tumorais e não tumorais.

% de viabilidade celular $\pm$ EPM					
Produtos	MCF-7	HT-29	HeLa	L929	VERO
EOPad	59,73 $\pm$ 0,58	82,71 $\pm$ 0,45	93,37 $\pm$ 2,42	42,93 $\pm$ 0,27	21,33 $\pm$ 2,69
Paclitaxel	83,14 $\pm$ 1,59	57,35 $\pm$ 1,42	93,15 $\pm$ 2,80	98,34 $\pm$ 0,90	34,68 $\pm$ 3,47

Os resultados expressos para EOPad estão na concentração de 50 μ g/mL. O paclitaxel foi testado na concentração de 10 μ g/mL. Legendas: EOPadu – Óleo essencial de *Piper aduncum*. HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano), MCF-7 (câncer de mama humano), HeLa (adenocarcinoma de cérvix humana), Vero (células epiteliais de rim de macaco), L929 (fibroblasto murino).

Os resultados de citotoxicidade também foram expressos em CI_{50} . A menor CI_{50} apresentada pelo óleo essencial de *P. Aduncum* foi para a linhagem HeLa (câncer cervical humano) com 3,56 μ g/mL (Tabela 4)

Tabela 4 – Valores de CI_{50} em μ g/mL do óleo essencial de *Piper aduncum* frente às linhagens de células tumorais

Produtos	HeLa	HT-29
EOPad	3,56 (2,92 – 4,35)	9,09 (7,16 – 11,53)
Paclitaxel	0,14 (0,10 – 0,23)	6,16 (4,88 – 7,77)

Legendas: EOPad – Óleo essencial de *Piper aduncum*. HeLa (adenocarcinoma de cérvix humana), HT-29 (adenocarcinoma colorretal humano).

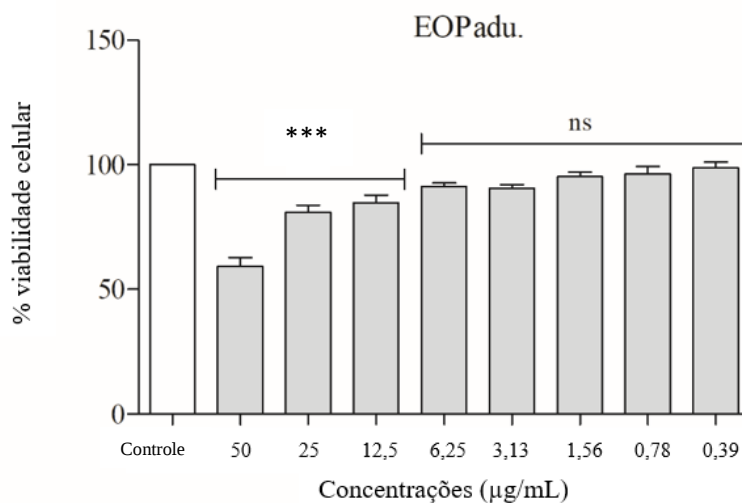
Corroborando com estes achados e enfatizando o perfil citotóxico do gênero *Piper*, Tomio (2011) investigou a atividade citotóxica do extrato etanólico das partes aéreas *P. aduncum* frente as linhagens celulares L299, HeLa, B16F10, K562 e NALM-6 obtendo CI_{50} de

70, 56 $\mu\text{g/mL}$, 5,50 $\mu\text{g/mL}$, 24,91 $\mu\text{g/mL}$, 11,40 $\mu\text{g/mL}$ e 0,16 $\mu\text{g/mL}$, através do método MTT, como resultado, o extrato etanólico apresentou atividade citotóxica significativa. A diferença entre as faixas obtidas de CI_{50} pode ser devido a utilização de solventes diferentes.

5.4 Citotoxicidade frente às células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC)

Na figura 3 está exposta a porcentagem de inibição do óleo essencial de *Piper aduncum* sobre as células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs). Estas células são pertencentes ao sistema imunológico compostas por linfócitos e monócitos, e são utilizadas em grande escala por pesquisadores que realizam pesquisas sobre câncer, bem como o desenvolvimento de vacinas, com intuito de avaliar a citotoxicidade de produtos frente às mesmas.

Figura 3- Porcentagem de inibição do óleo essencial de *P. aduncum* sobre as células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).



Análise estatística feita em relação ao controle. Os valores estão expressos sobre as médias de três análises em três replicatas $\pm$ SD. Valores de p: ***p < 0,0001.

Legenda: EOPadu – Óleo essencial de *Piper aduncum*, ns – não significativo

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o óleo essencial nas concentrações testadas não apresentou-se potencial citotóxico significativo. O óleo essencial de *P. aduncum* se apresentou citotóxico para as PBMCs apenas na maior concentração utilizada (50 $\mu\text{g/mL}$) com percentual de inibição de 61,73 %. Sendo assim, a concentração citotóxica para a linhagem tumoral, obtida para linhagem HeLa é cerca de 16 vezes menor do que a concentração citotóxica para as células de PBMCs. É possível sugerir que utilizando o óleo

essencial na concentração eficiente encontrada de 3,56 µg/ml não causou efeitos citotóxicos significativos para as células mononucleadas de sangue periférico. Estes resultados reforçam o perfil de seletividade para células de linhagem tumoral e não para células de linhagem não tumoral ou normal. Todavia, outros testes são sugeridos a fim de comprovar sua margem de segurança de uso.

6 CONCLUSÃO

Os principais metabólitos secundários presentes no óleo essencial de *P.aduncum* foram biciclogermacreno, cariofileno e dilapiol, e por sua vez o óleo essencial apresentou considerável atividade antioxidante, bem como promissora atividade citotóxica frente às linhagens celulares testadas, com melhores resultados para a linhagem celular HeLa. O trabalho sugere que o óleo essencial extraído da espécie investigada pode apresentar-se como candidata em potencial a formulações de produtos antitumorais, visto que os dados sugerem seletividade frente a linhagens tumorais e não para as linhagens não tumorais. Vale salientar que o óleo essencial de *P. aduncum* também não apresentou citotoxicidade significativa frente a PBMCs. Ainda se faz necessário a continuidade dos estudos para que seja comprovada a sua segurança na prática clínica, além de realizar outras metodologias que identifiquem os componentes presente no óleo responsável pelas atividades biológicas desenvolvidas nesta pesquisa

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L. R. M. *et al.* Caracterização Química E Atividade Antioxidante Do Óleo Essencial De *Piper hispidinervum* (Piperaceae). **Química orgânica**, 2018.
- ALLEY, M.C. *et al.* Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. **Cancer research**, 1988.
- ALVES, C. Q. *et al.* Antimicrobial and antiproliferative activity of *Bauhinia forficata* link and *Cnidoscolus Quercifolius* extracts commonly used in folk medicine. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, 2017.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, 2010.
- ARTHUR LADEIRA, M. *et al.* An Overview of Neolignans of the Genus Piper L.: Isolation Methods and Biological Activities. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 2017.
- BADKE, M. R. *et al.* Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, 2011.
- BARBOZA, B. R. *et al.* Phytochemical bioprospecting, antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities of saline extract from *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2018.
- BARROS, A. M. C. *et al.* Atividade antileishmania de um derivado do dilapiol obtido a partir de *Piper aduncum* L.(Piperaceae). Dissertação de mestrado Universidade Federal do Amazonas, 2018.
- BOURHIA, M. *et al.* Phytochemical Screening and Toxicological Study of *Aristolochia baetica* Linn Roots: Histopathological and Biochemical Evidence. **Journal of Toxicology**, 2019.
- BRAZÃO, M. A. B. *et al.* Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* L. e seu componente, dilapiol, frente a *Staphylococcus* spp. Multirresistentes, 2012.
- CHAHAL, J. R. *et al.* Introdução, fitoquímica, usos tradicionais e atividade biológica do gênero Piper: uma revisão. International **Journal of Current Pharmaceutical Review and Research** 2, 2011.
- CIDADE, A. F. *et al.* Caracterização e atividade antioxidante do óleo essencial de *Piper alatabaccum*. **Reunião Anual da SBPC-UFAL**, 2018.
- COSTA, K. P. *et al.* Atividade antioxidante dos extratos etanólicos e dos óleos essenciais de *Xylopia aromática* e *Piper nigrum*. **Brazilian Journal of Development**, 2021.
- DE MELO, C. M. L. *et al.* Linin isolated from *Caesalpinia pulcherrima* leaves has antioxidant, antifungal and immunostimulatory activities. **International Journal of**

Biological Macromolecules, 2020.

DE SOUZA, Xisto Serafim de Santana *et al.* Alternativas de viabilização do uso de plantas medicinais através do SUS em Campina Grande – PB. In: **Geosaude-2019**. 2019.

GAMBOA, F. *et al.* Antimicrobial Activity of *Piper marginatum* Jacq and *Ilex guayusa* Loes on Microorganisms Associated with Periodontal Disease. **International Journal of Microbiology**, 2018.

LEUZINGER, M. D. *et al.* Governance for megadiversity: Brazil/Australia. Brasília: **Centro Universitario de Brasília**, 2019.

LIMA, R.A. Estudo químico das cascas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek e o seu potencial antimicrobiano. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia), Universidade Federal de Rondônia. 2016.

LIMA, I. E. O. *et al.* Comercialização de plantas medicinais no município de Arapiraca-AL. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 2016.

LUDWICZUK A. ASAKAWA Y. Bryophytes as a source of bioactive volatile terpenoids – A review. **Food and Chemical Toxicology**, 2019.

MAHBOUB, M. *et al.* Total Phenolic and Flavonoids Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Azilia eryngioides* Extracts. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, 2013.

MAIA, J. G. S. *et al.* Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L growing wild in the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, 1998.

MONTEIRO, D. *et al.* Flora do Parque Nacional do Itatiaia-Brasil: Manekia e Piper (PIPERACEAE). **Rodriguésia**, 2009.

NEGREIROS, JR da S. *et al.* Caracterização fitoquímica de acessos de *Piper aduncum* L. do banco ativo de germoplasma da Embrapa Acre. In: **Embrapa Acre-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Congresso Brasileiro De Recursos Genéticos, 2., 2012, Belém, PA. Anais. Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

NEWMAN, David J. *et al.* Kenneth M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. **Journal of natural products**, 2003.

OLIVEIRA, M. L. B. *et al.* O gênero *Piper* no Brasil: O estado da arte da pesquisa. **Biodiversidade**, 2020.

OPPERMANN, C. P. Entendendo o câncer. Porto Alegre: **Artmed**, 2014.

REFLORA. Piperceae in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2017

REZENDE, F.M. *et al.* Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **VI Botânica**

no Inverno, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016.

SALVADOR, M. HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1.ed. Canoas:Editora da Ulbra. 2004.

SILVA, J.A. *et al.* Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum*. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. 2014.a

SILVA, J.K.R.*et al.* Antifungal Activity and Computational Study of Constituents from *Piper divaricatum* Essential oil Against *Fusarium* Infection in Black Pepper. **Molecules**. Pará, 2014.b

TEIXEIRA, G. T. *et al.* Perfil clínico patológico do câncer de mama em mulheres ocupacionalmente expostas aos agrotóxicos na região Sudoeste do Paraná, 2021.

TOMIO, Thaís Aparecida et al. Atividade Citotóxica E Antitumoral Dos Extratos e Compostos Isolados De *Rapanea ferruginea* e *Piper aduncum*, 2011.

TORRE, L. A. *et al.* Global cancer statistics: 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 2015.

WANG, Y.-H. *et al.* Anticancer Principles from Medicinal Piper (Hú Jião) Plants. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, 2014.

WANKE, S. *et al.* Evolution of Piperales-matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 2007.

ZIBRI, I. *et al.* GC-MS analysis of the volatile profile and the essential oil compositions of Tunisian *Borago Officinalis* L.: Regional locality and organ dependency. **Industrial Crops and Products**, 2019.