

POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ALELOPÁTICO DAS AMIDAS ISOLADAS DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Ottonia martiana* Miq.

Miriam Machado Cunico, Josiane G. Dias, Marilis D. Miguel e Obdulio Gomes Miguel*

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, 80210-170 Curitiba - PR, Brasil

Celso Garcia Auer

Departamento de Fitopatologia, EMBRAPA-Floresta, Estrada da Ribeira, km 111, 83411-000 Colombo - PR, Brasil

Lílian C. Côcco, André R. Lopes e Carlos I. Yamamoto

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-990 Curitiba - PR, Brasil

Franco Delle Monache

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis - SC, Brasil

Recebido em 25/7/05; aceito em 31/10/05; publicado na web em 18/4/06

ANTIMICROBIAL AND ALLELOPATHIC POTENTIAL OF THE AMIDES ISOLATED FROM THE ROOTS OF *Ottonia martiana* Miq., PIPERACEAE. Two amides, piperovatine and isopiperlonguminine, were isolated from the roots of *Ottonia martiana* Miq., a herbaceous shrub commonly used in folk medicine in the treatment of toothache. The crude extract (CE) and isolated compounds were submitted to bioautography and allelopathic assay. The bioautograms allowed the detection of compounds with antibacterial activity and the identification of the bioactive substance piperovatine. The CE and amides exhibited an allelopathic effect on *Lactuca sativa* (lettuce) seedling growth but did not affect the seeds' germinability.

Keywords: *Ottonia martiana*; bioautography; allelopathy.

INTRODUÇÃO

Ottonia martiana Miq., espécie pertencente à família Piperaceae, é um arbusto comum da Floresta Atlântica da região sul do Brasil¹. É conhecida pelos nativos do litoral paranaense como “anestesia”, devido ao seu emprego popular como anestésico local em odontalgias^{2,3}. Em outras regiões do Brasil (sul, sudeste e norte) é conhecida como “jaborandi, taburutá e jaguarandi”⁴.

Estudos fitoquímicos realizados com extratos desta espécie vegetal revelaram a presença das amidas piperovatina, piperlonguminina e isopiperlonguminina, além de esteróides (isômeros de β -sitosterol e estigmasterol) e do sal nitrato de potássio^{2,3,5}. Apesar destas amidas serem previamente conhecidas por terem sido isoladas de outras espécies de Piperaceae⁶⁻¹⁷, pouco se conhece sobre suas atividades biológicas, entre as quais destacam-se efeitos de salvação, dormência e sensação de queimadura na língua¹¹, além da ação piscicida¹³, inseticida¹⁴ e antibacteriana¹⁸. Em estudos recentes, o potencial antimicrobiano do extrato bruto de *O. martiana* frente aos fitopatógenos *Cylindrocladium spathulatum*¹⁹, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e *Rhizoctonia* sp.²⁰ também foi comprovado.

Como a busca por substâncias naturais tem sido intensificada face a urgência de novos fármacos, estudos fitoquímicos com enfoque multidisciplinar têm sido contemplados²¹⁻²³. Porém, a escolha de métodos simples, sensíveis, práticos, confiáveis e que eliminem etapas no processo de separação de constituintes bioativos torna-se indispensável^{21,24}. Também cabe ressaltar que muitas substâncias químicas presentes nos vegetais podem levar ao surgimento de efeito alelopático (interferência na germinação de sementes e no desenvolvimento de outras plantas) de grande interesse científico, visto muitos aleloquímicos serem utilizados na medicina popular para tratamento de diversas doenças²⁵.

Diante do exposto, justifica-se re-isolar as amidas isopiperlon-

gumina e piperovatina, para realizar um estudo fitoquímico com enfoque multidisciplinar, a fim de detectar e identificar amidas antimicrobianas com potencial alelopático em extratos das raízes de *O. martiana*, por meio dos ensaios de bioautografia, germinação de sementes e crescimento de plântulas de *L. sativa* (alface).

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação e material

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Kofler “hot stage”. Os espectros de RMN foram obtidos em um aparelho Bruker – Avance 400 (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz). Nas separações cromatográficas em coluna (CC) e em camada delgada (CCD) empregou-se sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A análise qualitativa foi realizada por meio de cromatografia gasosa capilar acoplada à espectrometria de massas (CG-EM, Varian 3800 - SATURN 2000), 70 eV, coluna CP-SIL 5 CB (60 m x 0,32 mm d.i. x 1,00 mm), He como gás de arraste, velocidade linear de 1,6 mL min⁻¹, e temperaturas de 300 °C no injetor, 300 °C no detector e na coluna a temperatura programada de 100-300 °C em uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹, permanecendo em 300 °C por 10 min.

Para a bioautografia foram utilizadas cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) e *Escherichia coli* (ATCC 11229), fornecidas pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

Para a avaliação do potencial alelopático utilizaram sementes de *Lactuca sativa* (alface), classe fiscalizada, cultivar Babá, com 99% de viabilidade.

Material vegetal

As raízes de *O. martiana* foram coletadas em Coroados, mu-

*e-mail: obdulio@ufpr.br

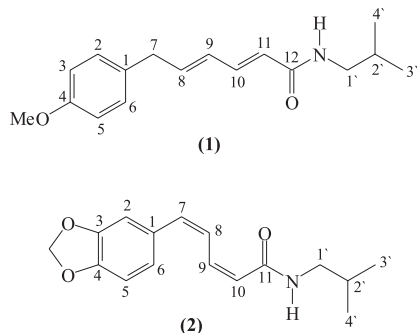
nicípio de Guaratuba, estado do Paraná, em abril de 2000. A identificação botânica foi realizada por Dr. G. Hatschbach do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba, Paraná, (MBM), com exsiccata da espécie depositada no herbário MBM, sob número 259.057.

Extração, fracionamento e isolamento

As raízes (198,95 g) foram desidratadas em estufa de ar seco circulante à 40 °C, reduzidas a um pó fino, e extraídas exaustivamente por maceração a frio com metanol (95%) durante 7 dias (3x1 L). Uma parte do material obtido após filtração e evaporação completa do MeOH, sob pressão reduzida à 40 °C, foi reservada para utilização em bioensaios (1 g). A outra parte (6,96 g) foi particionada com 250 mL de hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH). A fase DCM (FDCM) obtida após evaporação do solvente (1,97 g) foi submetida à CC com os eluentes hexano, AcOEt e MeOH em misturas de polaridade crescente (5%). Os eluatos assim obtidos foram coletados em frascos de 20 mL, monitorados por CCD, comparados com amostras autênticas, reunidos e armazenados em local apropriado (fresco e ventilado) para evaporação lenta dos solventes. O aparecimento de cristais nas paredes dos frascos coletores (frações 20 e 12) permitiu o isolamento de piperovatina (**1**) e isopiperlonguminina (**2**), respectivamente.

Piperovatina (**1**): C₁₇H₂₃O₂N. Cristais brancos. Mp 115-119 °C. MS *m/z* (rel. int): 273 ([M]⁺, 52), 201 (12), 173 (100), 159 (24), 152 (65), 139 (63), 121 (44), 96 (55).

Isopiperlonguminina (**2**): C₁₆H₁₉O₃N. Cristais brancos. Mp 139-141 °C. MS *m/z* (rel. int): 273 ([M]⁺, 25), 216 (16), 201 (57), 173 (58), 172 (23), 152 (4), 143 (31), 135 (13), 115 (100), 96 (24).



Bioautografia

No teste para o potencial antimicrobiano da *O. martiana*, foi empregado o método de bioautografia²⁶, adaptado das modificações propostas por Romeiro²⁷, buscando-se detectar e identificar substâncias bioativas. As suspensões bacterianas foram padronizadas em solução salina segundo a escala 0,5 de MacFarland²⁸. Volumens de 3 µL do extrato bruto (1 mg mL⁻¹), FHex, FDCM, FAcOEt, FBuOH (1mg mL⁻¹), piperovatina (0,1 mg mL⁻¹), isopiperlonguminina (0,1 mg mL⁻¹) e da fração 12-19 da fase DCM (mistura de isopiperlonguminina com piperovatina – 0,1 mg mL⁻¹) foram aplicados sobre placas de sílica gel GF₂₅₄ (2,5 x 5,0 cm), as quais foram submetidas ao sistema eluente n-hexano:acetato de etila (70:30 v/v). Após secagem, as cromatoplasmas foram depositadas em placas de Petri onde foram vertidos os meios de cultura ágar nutriente (NA) contendo as suspensões bacterianas previamente padronizadas e o revelador cloreto de trifeniltetrazolium (1%)²⁴. Após 24 h de incubação à 35 °C, as substâncias cromatograficamente separadas que exibiram atividade antibacteriana foram reconhecidas nos

bioautogramas por meio da formação das zonas de inibição ao redor de suas bandas. O teste foi realizado em duplicata.

Ensaio da germinação de sementes e crescimento das radículas e hipocótilos das plântulas

Para o potencial alelopático utilizaram-se os métodos adaptados daqueles descritos por Ferreira e Aquila²⁹. Os organismos-teste utilizados neste bioensaio foram sementes de alface, que foram submetidas a resfriamento de 4 °C por 72 h para superação de dormência. Os bioensaios da germinação de sementes e do desenvolvimento das radículas e hipocótilos das plântulas foram realizados em câmara de germinação com temperatura controlada (16,8–17,2 °C). As sementes foram acondicionadas em caixas Gerbox (11 x 11 cm) previamente forradas com duas folhas de papel de filtro estéreis, as quais foram umedecidas com 1 mL do extrato, fases ou substâncias a serem testadas e mantidas à 40 °C por 24 h para total evaporação do solvente e adição de 3 mL de água destilada estéril.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e em quatro concentrações (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 mg mL⁻¹). As caixas Gerbox com soluções-teste e controle (solvente: EtOH) receberam o mesmo número de sementes (25).

As leituras para avaliação da germinação foram diárias ao longo de 5 dias consecutivos. A medição das radículas e hipocótilos foi realizada após este período (7 dias). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado. As médias dos resultados foram comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,05), utilizando-se o programa estatístico SANEST³⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amidas piperovatina (**1**) e isopiperlonguminina (**2**) apresentaram, respectivamente, Tr = 14,348 e 15,356 min no cromatograma (CG-EM). Ambas foram obtidas como cristais brancos.

O composto **1**, de fórmula molecular C₁₇H₂₃O₂N, apresentou ponto de fusão 115-119 °C e íon molecular *m/z* 273 (CG-EM). O ponto de fusão juntamente com os dados espectrais (CG-EM) foram consistentes com aqueles descritos na literatura para a piperovatina^{2,10,17}.

O composto **2**, de fórmula molecular C₁₆H₁₉O₃N, apresentou ponto de fusão 139-141 °C e íon molecular *m/z* 273 (CG-EM). Os dados espectrais (CG-EM) juntamente com o ponto de fusão foram similares aos da isopiperlonguminina, amida descrita como o correspondente isômero *cis,cis* da piperlonguminina^{10,17}. As pequenas diferenças verificadas encontram-se na faixa do erro experimental.

O teste de bioautografia permitiu detectar várias zonas de inibição de crescimento bacteriano nos bioautogramas do EB e FDCM das raízes de *O. martiana* frente às bactérias Gram positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*, indicando a presença de componentes bioativos com *Rfs* 0,35; 0,58; 0,7 e 0,81 (Estruturas 1 e 2). Surpreendentemente, quando Cunico *et al.* avaliaram o extrato etanólico dos órgãos totais desta espécie vegetal (20,5 mg/mL), foram detectadas zonas de inibição somente nos ensaios frente a *S. aureus*³, provavelmente em razão do extrato aplicado nas cromatoplasmas ser menos concentrado e, conseqüentemente, da menor concentração de substâncias bioativas. Zonas de inibição não foram detectadas nos bioautogramas ensaiados frente as bactérias Gram negativas testadas. Além disso, na análise dos bioautogramas frente as bactérias Gram positivas testadas verificou-se que EB, FDCM, piperovatina e a fração 12-19 da fase DCM apresentaram zonas de inibição com *Rfs* similares (0,35), fato que levou à identificação de uma das substâncias responsáveis por esta bioatividade: a amida piperovatina. A bioautografia confirmou neste trabalho a sua praticidade, visto ser uma técnica que pode ser

Tabela 1. Percentagem de germinação (G), inibição de germinação (IG), crescimento (C) e inibição de crescimento (IC) das plântulas de alface, observados nos bioensaios submetidos a diferentes concentrações do extrato bruto e substâncias isoladas das raízes de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae

Amostras (mg/mL)	Hipocótilos						Radículas		
	G(%)	IG(%)	C(mm)	C(%)	IC(%)	C(mm)	C(%)	IC(%)	
Extrato bruto das raízes(EB)	0,8	97,5	2,5	24,76 b	83,76	16,24	11,98 b	87,70	12,30
	0,4	100,0	0,0	15,46 a	52,30	47,70	7,56 a	55,34	44,66
	0,2	97,5	2,5	21,70 b	73,41	26,59	9,50 a	69,54	30,46
	0,1	97,5	2,5	13,20 a	44,65	55,35	8,58 a	62,81	37,19
	T			29,56 c			13,66 c		
Piperovatina	0,8	97,5	2,5	26,42 b	89,37	10,63	12,04 a	88,14	11,86
	0,4	100,0	0,0	28,98 c	98,03	1,97	13,18 ab	96,48	3,52
	0,2	100,0	0,0	30,38 c	102,77	-2,77	10,98 a	80,38	19,62
	0,1	100,0	0,0	23,14 a	78,28	21,72	12,00 a	87,84	12,16
	T			29,56 c			13,66 b		
Isopiperlonguminina	0,8	97,5	2,5	27,42 a	78,43	21,57	15,44 b	71,28	28,72
	0,4	100,0	0,0	33,78 ab	96,62	3,38	20,30 c	93,72	6,28
	0,2	97,5	2,5	32,30 ab	92,39	7,61	16,96 b	78,30	21,70
	0,1	100,0	0,0	28,82 a	82,43	17,57	13,58 a	62,69	37,31
	T			34,96 b			21,66 c		
FD12-19(Piperovatina + isopiperlonguminina)	0,8	97,5	2,5	18,96 b	54,23	45,77	19,18 c	88,55	11,45
	0,4	97,5	2,5	16,60 a	47,48	52,52	15,98 b	73,77	26,23
	0,2	100,0	0,0	19,32 b	55,26	44,74	12,14 a	56,04	43,96
	0,1	100,0	0,0	19,22 b	54,97	45,03	16,10 b	74,33	25,67
	T			34,96 c			21,66 d		

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (95% de significância) - T (Testemunha)

utilizada tanto para extratos de plantas como para substâncias isoladas, principalmente por ser um ensaio simples, confiável, eficiente e sensível, pois menos de 2,5 µg de substância bioativa formam áreas de inibição visíveis²².

No teste de germinação de sementes observou-se que as soluções-teste (EB, piperovatina, isopiperlonguminina e fração 12-19 da FDCM) não apresentaram, nas concentrações testadas, influência sobre a germinabilidade da *L. sativa* (percentual final da germinação), porém promoveram um atraso na germinação. Isto corrobora com o fato de que o efeito alelopático muitas vezes não é percebido sobre a taxa de germinação, que indica o percentual final de germinação no tempo, mas sobre a velocidade de germinação, que indica o tempo necessário para germinação, ou sobre outro parâmetro do processo³¹.

Os resultados da avaliação do potencial alelopático podem ser melhor visualizados na Tabela 1.

No bioensaio para o potencial alelopático sobre o desenvolvimento das plântulas de *L. sativa* verificou-se que EB, nas concentrações testadas, produziu efeitos inibitórios sobre o crescimento das radículas (12,30 a 44,66%) e dos hipocótilos (16,24 a 55,35%). A piperovatina, nas concentrações de 0,1 e 0,8 mg mL⁻¹, inibiu o crescimento dos hipocótilos (10,63 a 21,72%) e na concentração de 0,2 mg mL⁻¹, apresentou uma tendência de estímulo sobre o crescimento dos hipocótilos (2,77%). Em muitos casos, uma substância pode estimular o crescimento vegetal em baixas concentrações e em concentrações mais altas, produzir um efeito inibitório^{32,33}. Sobre o crescimento das radículas, a piperovatina apresentou um baixo efeito inibitório (11,86 a 19,62%). A isopiperlonguminina (0,8; 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹) apresentou efeito inibitório sobre o crescimento das radículas (21,70 a 37,31%) e sobre o crescimento dos hipocótilos, nas concentrações de 0,1 e 0,8 mg mL⁻¹, um baixo potencial de inibição foi evidenciado (17,57 a 21,70%). Surpreendentemente, a fração 12-19 da FDCM, contendo uma mistura de piperovatina com isopiperlonguminina (1:3

- w/w), potencializou o efeito inibitório sobre o crescimento das radículas e hipocótilos de alface, quando comparado ao exibido pelas mesmas quando testadas isoladamente. Apesar destes resultados sugerirem um efeito sinérgico entre as substâncias piperovatina e isopiperlonguminina, a possibilidade da fração 12-19 apresentar outros aleloquímicos com efeitos mais significativos não foi excluída, já que constituintes minoritários podem exercer forte ação e mascarar resultados de atividades biológicas de frações supostamente “puras”.

Neste trabalho, a utilidade e praticidade da bioautografia para detecção e isolamento de amidas antibacterianas foram confirmadas e o potencial alelopático foi evidenciado.

Como muitos aleloquímicos são utilizados na medicina popular para cura de doenças²⁵, controle de plantas invasoras³⁴ e na sustentabilidade de uma região, sem degradação das fontes naturais ou riscos ao meio ambiente, estudos complementares devem ser realizados com esta espécie vegetal.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro e ao Dr. G. Hatschbach do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba (MBM), pela identificação da espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

- Yuncker, T. G.; *Hoehnea* **1972**, *2*, 131.
- Lopes, M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 1989.
- Cunico, M. M.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.; Kerber, V. A.; Montrucchio, D. P.; Auer, C. G.; Grigoletti Jr., A.; *Rev. Cienc. Farm.* **2003**, *24*, 141.
- Guimarães, E. F.; Falcão Ichaso, C. L.; Gonçalves Costa, C.; *Flora Illustrada Catarinense* **1978**, *1*, 12.
- Cunico, M. M.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.; Carvalho, J. L. S.; Montrucchio, D. P.; Ferreira, J. L.; Oliveira, J. S.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 803.

6. Pinder, A. R.; Price, S. J.; *J. Chem. Soc.* **1967**, C, 2598.
7. Dunstan, W. R.; Garnett, H.; *J. Chem. Soc.* **1895**, 67, 94.
8. Hänsel, R.; Leuschke, A.; Bohlmann, F.; *Planta Med.* **1980**, 40, 161.
9. Giesbrecht, A. M.; Alvarenga, M. A.; Gottlieb, O. R.; Gottlieb, H. R.; *Planta Med.* **1981**, 43, 375.
10. Costa, S. S.; Mors, W. B.; *Phytochemistry* **1981**, 20, 1305.
11. Makapugay, H.; Soejarto, D. D.; Kinghorn, A. D.; Bordas, E.; *J. Ethnopharmacol.* **1983**, 7, 235.
12. Sengupta, S.; Ray, A. B.; *Fitoterapia* **1987**, 63, 147.
13. Macferren, M. A.; Rodríguez, E.; *J. Ethnopharmacol.* **1998**, 60, 183.
14. Sáez, J.; Granados, H.; Escobar, G.; Cardona, W.; Atehortua, L.; Callejas, R.; Cortes, D.; Gonzalez, C.; *Revista Colombiana de Química* **1998**, 27, 77.
15. Stör, R. J.; Xiao, P.; Bauer, R.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, 75, 133.
16. Antunes, P. A.; Chierice, G. O.; Constantino, R. F.; Aroca, R. F.; *Vib. Spectrosc.* **2001**, 27, 175.
17. Facundo, V. A.; Morais, S. M.; Braz Filho, R.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 79.
18. Cunico, M. M.; Carvalho, J. L. S.; Kerber, V. A.; Higaskino, C. E. K.; Cruz Almeida, S. C.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2004**, 14, 141.
19. Cunico, M. M.; Miguel, O. G.; Miguel, M. D.; Carvalho, J. L. S.; Peitz, C.; Auer, C. G.; Grigoletti Jr., A.; *Visão Acadêmica* **2003**, 4, 77.
20. Cunico, M. M.; Carvalho, J. L. S.; Silva, V. C.; Montrucchio, D. P.; Kerber, V. A.; Grigoletti Jr., A.; Auer, C. G.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; *Arq. Inst. Biol.* **2004**, 71, 121.
21. <http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/hostettmann.html>, acessada em Janeiro 2005.
22. Pinto, A. C.; Siqueira Silva, D. H.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 45.
23. Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 429.
24. Zanetti, G. D.; Manfron, M. P.; Hoelzel, S. C. S. M.; Pagliarin, V. P.; Morel, A. F.; *Acta Farm. Bonaerense* **2003**, 22, 159.
25. Nunes, A. P. M.; Araújo, A. C.; *Anais da X Semana de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, Brasil, 2003.
26. Weltzien, H. C.; *Naturwissenschaften* **1958**, 45, 288.
27. Romeiro, R. S.; *Métodos em bacteriologia de plantas*, Ed. UFV : Viçosa, 2001.
28. Bier, O.; *Microbiologia e Imunologia*, 30ª ed., Ed. Melhoramentos: São Paulo, 1994.
29. Ferreira, A. G.; Áquila, M. E. A.; *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **2000**, 12, 175.
30. Zonta, E. P.; Machado, A. A.; (SANEST) *Sistema de Análise Estatística*, IFM, 1984, CD-ROM.
31. Ferreira, A. G.; Borghetti, F.; *Germinação: do básico ao aplicado*, Ed. Artmed: Porto Alegre, 2004.
32. Tukey Jr., H. B.; *Botanical Review* **1969**, 35, 1.
33. Leather, G. R.; Einhellig, F. A.; *J. Chem. Ecol.* **1988**, 14, 1821.
34. Grassi, R. F.; Resende, U. M.; Silva, W.; Macedo, M. L. R.; Butera, A. P.; Tulli, E. O.; Saffran, F. P.; Siqueira, J. M.; *Quim. Nova* **2005**, 28, 199.