
COMPONENTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *PTYCHOPETALUM OLACOIDES* BENTHAM

CHEMICAL COMPOUNDS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *PTYCHOPETALUM OLACOIDES* BENTHAM

Montrucchio, D.P.¹; Miguel, O.G.¹; Miguel, M.D.¹; Monache, F.D.²; Carvalho, J.L.S.¹.

1- Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná. Av. Pref. Lothário Meissner, 3400, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil. dpmontrucchio@ufpr.br

2- Centro Chimica Recettori Università Católica Del Sacro Cuore, Rome - Italy

RESUMO

Ptychopetalum olacoides Bentham, popularmente conhecida como marapuama ou muirapuama, é uma olacaceae nativa na região norte do Brasil, conhecida e utilizada há longo tempo por suas propriedades estimulantes e afrodisíacas. O estudo fitoquímico das cascas dos galhos desta árvore de pequeno porte revelou a presença de vários ácidos graxos, esteróides e xantinas, incluindo os ácidos palmítico e esteárico, -sitosterol, estigmasterol, lupeol, glutinol, -amirina, cafeína, teobromine e adenina. Os ensaios antimicrobianos mostraram que o extrato alcoólico tem ação inibitória no crescimento de cepas de *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum*. Por outro lado, os extratos não apresentaram efeitos contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*.

Palavras-chave: muirapuama; muirapuamina; cafeína; antimicrobiano.

ABSTRACT

Ptychopetalum olacoides Bentham, popularly known as marapuama or muirapuama is an Olacaceae native of North Brazil, known and used for its stimulating and aphrodisiac properties for a long time. The phytochemical study of the stems of this tree revealed the presence of several fatty acids, sterols and xanthines, including palmitic and stearic acids, -sitosterol, stigmasterol, lupeol, glutinol, -amirin, caffeine, theobromine and adenine. Antimicrobial assays showed that the alcoholic extract of the plant has inhibitory action on the growth of strains of *Colletotrichum acutatum* and *Fusarium oxysporum*. On the other hand, the extracts have no effect against strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*.

Keywords: muirapuama; muirapuamine; caffeine; antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

Ptychopetalum olacoides Bentham, popularmente conhecida como marapuama or muirapuama, é uma planta nativa do norte do Brasil, aparecendo como uma árvore de pequeno porte (SILVA, 1925). Em sua região de origem, é utilizada no tratamento de problemas nervosos, porém seu principal uso é como estimulante sexual (SIQUEIRA, 1998).

Algumas pesquisas já realizadas mostraram que as raízes e cascas de *P. olacoides* contêm óleos essenciais, vários ácidos graxos e seus ésteres, esteróides como o -sitosterol e lupeol, e um alcalóide denominado *muirapuamina*, embora sua estrutura química não tenha sido demonstrada (AUTERHOFF, 1971; AUTERHOFF, 1968; PANKOW, 1969; TOYOTA, 1979; MONTRUCCHIO, 2002).

A pesquisa aqui apresentada revelou a presença de vários esteróides, incluindo o -sitosterol, estigmasterol, lupeol, glutinol e -amirina; dois ácidos graxos ácido palmítico e ácido esteárico; e três xantinas cafeína, teobromina e adenina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e extração

Galhos de *P. olacoides* foram coletados em junho de 1999, no estado do Pará, norte do Brasil. O material foi seco ao ar livre, moído e gentilmente cedido pela empresa Yerbalatina Phytoactives (Colombo Paraná Brasil). Esse material, num total de 2 kg, foi extraído com 8 litros de etanol por maceração, durante 2 semanas, e o extrato obtido foi posteriormente concentrado a vácuo, até 200ml. O extrato concentrado foi mantido sob refrigeração durante 24 horas, filtrado sob vácuo, e o líquido clarificado foi fracionado com n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. As frações resultantes foram purificadas por eluição em filtro de vidro contendo sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, com solventes em polaridade crescente: n-hexano, cloroformio, acetato de etila, butanol e metanol, conforme MIGUEL (1996).

2.2. Isolamento

A fração hexânica foi evaporada à secura, resultando em um óleo aromático de coloração esverdeada. Esse óleo foi dissolvido em acetato de etila e colocado em freezer por 24 horas, resultando em 200,4mg de um precipitado de coloração branca (H01), o qual foi filtrado e lavado com acetato de etila. O líquido resultante foi cromatografado em uma coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, eluída inicialmente com benzina de petróleo, e na seqüência com benzina de petróleo:acetato de etila (95:05), aumentando a polaridade em 5%, até 30% de acetato de etila. A eluição foi monitorada por CCD em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck. Das frações 24 e 25 foram obtidos 24,6mg de um pó branco (H02), o qual foi lavado com metanol gelado, e da fração 29 foi obtido 5mg de um pó branco (H03), posteriormente sendo revelado como uma mistura de esteróides.

A fração clorofórmica foi cromatografada em uma coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, eluída inicialmente com uma solução de n-hexano:acetato de etila (80:20), seguido de aumento da polaridade em 5% até acetato de etila puro, e então com uma solução de acetato de etila:metanol (95:05), aumentando a polaridade em 5% até metanol puro. A eluição foi monitorada por CCD em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ Merck. As frações de 1 a 8 resultaram em uma resina aromática de coloração esverdeada, da qual foram isolados 283mg de um pó branco (C01) por precipitação com éter de petróleo. Das frações 54 a 75 foram isolados 34mg de uma substância de coloração branca, lavada com metanol gelado e codificada como substância C02. Das frações 76 a 87 foram isolados 5,4mg de uma substância codificada como C03.

A fração acetate de etila foi inicialmente evaporada à secura, e então dissolvida em 4ml de metanol, resultando em um precipitado de coloração esverdeada. A fração foi mantida em freezer por 24 horas e posteriormente filtrada sob vácuo e lavada com metanol gelado, resultando em 23,5mg de uma substância denominada AE01. O líquido remanescente foi cromatografado em uma coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck, eluída inicialmente com uma solução de n-hexano:acetato de etila (80:20), aumentando a polaridade em 5% até acetato de etila puro, e então com acetato de etila:metanol (95:05), aumentando a polaridade com metanol em 5%, até 50%. Essa eluição foi

monitorada por CCD em placas de sílica gel 60 F₂₅₄. Das frações 76 a 82 foram precipitados 2mg de uma substância nomeada AE02, lavada com acetona gelada.

2.3. Identificação

As substâncias H01, H02, H03, C02 e AE01 foram analisadas e tiveram sua estrutura química identificada por meio de ressonância de próton e carbono 13 (¹H NMR, ¹³C NMR), infravermelho (IR), cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC, GC-MS) e HPLC, por comparação direta dos seus dados espectrais com aqueles obtidos a partir de padrões conhecidos. A análise por GC foi realizada em cromatógrafo Shimadzu 14B com coluna megabore DB1 (0.53mm x 30m); a análise por IR foi realizada em KBr; os espectros de ¹H NMR foram obtidos a 300 MHz em CDCl₃ ou piridina D (AE01); os espectros de ¹³C NMR foram obtidos a 75.5 MHz em CDCl₃ ou piridina D (AE01); as análises por HPLC foram obtidas com uma coluna purospher RP18 e um sistema de acetonitrila, metanol e água.

2.4. Atividade antimicrobiana

O extrato alcoólico e suas sub-frações foram testadas para avaliar uma possível atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6531) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), usando o método de difusão em ágar (JORGE, 1999; ULUBELEN, 2000). As frações testadas foram hexano (H), clorofórmio (C), butanol (B), metanol (M) e etanol (E), como extrato total e em diluições de 1:2, 1:4 e 1:8; 20l de cada diluição foram separadamente impregnados em discos de papel de 6mm de diâmetro. Foram utilizadas culturas jovens (24 horas) de *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, diluídas em salina estéril para formar suspensões entre 10⁹ e 10¹² ufc/ml, que foram então inoculadas em placas contendo agar Mueller-Hinton. Os discos de papel previamente preparados foram aplicados na superfície das placas inoculadas, assim como um controle positivo de cloranfenicol e um controle negativo de discos impregnados somente com os solventes puros. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas, e as áreas de inibição foram medidas, quando presentes.

Foram também analisados os extratos alcoólico e aquoso da planta para verificação de sua atividade antifúngica contra cepas de *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum* (AUER, 1986; STANGARLIN, 1999). O extrato etanólico foi preparado a partir de 50g do material moído, extraído em soxhlet durante 4 horas com etanol, e o extrato aquoso foi preparado a partir de 50g do material, extraído por maceração a quente durante 4 horas. Os extratos foram incorporados separadamente em 1000ml de agar dextrose-batata, e divididos em placas de Petri. As colônias foram inoculadas nas placas de agar incorporadas com extrato aquoso, placas incorporadas com o extrato alcoólico e placas contendo somente o agar dextrose-batata, como controle positivo de crescimento. As placas foram incubadas a 25°C durante 5 dias, e então analisadas pela medida do diâmetro das colônias formadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O composto H01 foi inicialmente analisado por GC e demonstrou a presença de duas substâncias, com tempos de retenção de 16,749 e 18,721 minutos. A análise posterior por GC-MS, ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) e ¹³C NMR (CDCl₃, 75,5MHz) demonstrou a presença de dois ácidos graxos, identificados como ácido palmítico e ácido esteárico.

Ácido palmítico: GC: tempo de retenção 16,749 min.; ^1H NMR: 0.87, 1.26, 1.63, 2.34 ppm; ^{13}C NMR: 14.13, 22.70, 31.92, 29.05 a 29.68, 24.66, 34.05, 180.17 ppm; GC-MS: 74, 87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227, 241, 270 m/z.

Ácido esteárico: GC: tempo de retenção 18,721 min.; ^1H NMR: 0.87, 1.26, 1.63, 2.34 ppm; ^{13}C NMR: 14.13, 22.70, 31.92, 29.05 a 29.68, 24.66, 34.05, 180.17 ppm; GC-MS: 74, 87, 101, 143, 157, 185, 199, 255, 269, 298 m/z.

A substância H02 foi analisada por GC como H01, mostrando um tempo de retenção de 43,136 minutos. As análises por ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz) e ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75,5MHz) confirmaram a substância em questão como sendo o lupeol.

Lupeol: GC: tempo de retenção 43,136 min.; ^1H NMR: 0.75, 0.76, 0.82, 0.94, 0.96, 1.02, 1.67, 2.36, 3.18, 4.56, 4.68 ppm; ^{13}C NMR: 38.69, 27.40, 78.90, 38.83, 55.28, 18.31, 34.27, 40.81, 50.42, 37.20, 20.92, 25.12, 38.04, 42.80, 27.41, 35.57, 42.99, 48.28, 47.98, 150.96, 29.83, 40.00, 27.98, 15.37, 16.20, 16.11, 14.52, 17.99, 109.32, 19.30 ppm.

A substância H03 foi analisada por GC em comparação com uma co-injeção de uma mistura de esteróis, indicando a presença de estigmasterol, -sitosterol, -amirina, lupeol e glutinol.

H03: GC: tempo de retenção: 38,155 min. (estigmasterol); 40,286 min. (-sitosterol); 41,134 min. (-amirina); 43,085 min. (lupeol); 43,526 min. (glutinol).

A substância C02 foi analisada por IR (KBr), ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz), ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75,5MHz) e HPLC, e teve sua estrutura definida como cafeína, quando comparada a um padrão de referência.

Cafeína: IR: 1701, 1658, 1485, 1458, 1431 cm^{-1} ; ^1H NMR: 3.41, 3.58, 4.00, 7.52 ppm; ^{13}C NMR: 27.86, 29.68, 33.53, 107.53, 141.33, 148.64, 151.65, 155.36 ppm; MS: 67, 82, 109, 137, 165, 194 m/z.

A substância AE01 foi analisada por ^1H NMR (Piridina D, 300MHz) e ^{13}C NMR (Piridina D, 75,5MHz), comparada com um padrão de referência e identificada como -sitosterol glicosilado.

B-sitosterol glicosilado: ^1H NMR: 0.67, 0.94, 0.88, 0.90, 1.01, 2.48, 3.90, 4.60 ppm; ^{13}C NMR: 37.30, 29.79, 75.11, 21.09, 140.76, 121.69, 26.27, 31.90, 50.20, 36.74, 22.70, 39.79, 42.30, 56.66, 24.32, 28.34, 56.10, 11.79, 19.77, 36.20, 19.23, 34.06, 30.07, 45.90, 29.29, 19.04, 18.83, 23.23, 11.97, 102.40, 78.38, 78.22, 77.94, 74.99, 62.67 ppm.

Devido à presença de cafeína, outro extrato da planta foi produzido e analisado para verificar a presença de outras xantinas. 80g do material moído foi extraído em soxhlet com 250ml de n-hexano, seguido de 250ml de clorofórmio, 250ml de acetato de etila e 250ml de metanol. A fração clorofórmica foi analisada por HPLC, mostrando a presença de 7 substâncias diferentes. Este extrato clorofórmico foi então extraído num sistema ácido/básico, inicialmente com HCl 1%, depois alcalinizado com NH_4OH e extraído com acetato de etila. A fração acetate de etila foi evaporada à secura,

resultando em 35mg de um extrato alcaloídico. Este foi analisado sozinho e em co-injeção com padrões de xantinas (cafeína, teofilina, teobromina e adenina) por HPLC. Como resultado, foi demonstrada a presença de cafeína (8,76 min.), teobromina (6,13 min.) e adenina (4,75 min.).

As frações testadas para atividade antibacteriana não mostraram nenhuma atividade significativa contra as cepas testadas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Enquanto o controle positivo de cloranfenicol mostrou áreas de inibição de 25 a 28mm, a fração clorofórmica total produziu áreas de inibição de 6mm contra *E. coli* e *S. epidermidis*, e 7mm contra *S. aureus*. Por outro lado, o extrato alcoólico testado para suas atividades antifúngicas mostrou uma significativa atividade inibitória contra *C. acutatum* (60% de inibição quando comparado com o controle) e uma ação menos significativa contra *F. oxysporum* (38% de inibição quando comparado com o controle).

4 CONCLUSÃO

Nove substâncias foram identificadas, sendo dois ácidos graxos ácidos palmítico e esteárico; seis esteróides estigmasterol, -sitosterol, -sitosterol glicosilado, -amirina, glutinol e lupeol; três xantinas cafeína, teobromina e adenina. Com exceção das três xantinas, todas as outras substâncias já haviam sido reportadas.

Alguns artigos fazem referência a um alcalóide denominado muirapuamina [1,4], porém sua estrutura não é demonstrada. Os resultados obtidos sugerem que este alcalóide seja, na verdade, a cafeína, a qual aparece como principal alcalóide na planta, sendo possivelmente um dos responsáveis pela ação estimulante da muirapuama.

Artigo Recebido 07/05 Aceito 11/05

REFERÊNCIAS

- Silva RAD. Rev. Bras. Med. Pharm 1925; 1:37.
Siqueira IR, Lara DR, Silva D, Gaieski FS, Nunes DS. Pharmaceutical Biology 1998; 36:327.
Auterhoff H, Momberger B. Arch. Pharm. 1971; 304:223.
Auterhoff H, Pankow E. Arch. Pharm. 1968; 301:481.
Pankow E, Auterhoff H. Arch. Pharm. 1969; 302:209.
Toyota A, Ninomiya R, Kobayashi H, Kawanishi K, Uhara Y, Kato A, et. al. Shoyakugaku Zasshi 1979; 33:57.
Montrucchio DP, Miguel OG, Miguel MD. Rev. Cienc. Farm. 2002; 23:11.
Miguel. OG. 1996. Tese (Doutorado em Química) Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina.
Jorge LIF, Pregnotatto BP, Chicourel EL, Zamariolli LA, Graciano RAS. Rev. Cienc. Farm. 1999; 20:449.
Ulubelen A, Öksüz S, Kolak U, Bozok-Johansson C, Celik C, Voelter W. Planta Medica 2000; 66:458.
Auer CG, Bettiol W. IPEF 1986; 32:49.
Stangarlin JR, Schwan-Estrada KRF, Cruz MES, Nozaki MH. Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento 1999; 11:16.