

Análise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de Piper amalago, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

MARCELA SILVA DOS SANTOS¹

GILSANE VON POSER²

SÉRGIO BORDIGNON²

VERA LUCIA SARDÁ RIBEIRO³

ALEXANDRE DE BARROS FALCÃO FERRAZ⁴

RESUMO

O carrapato-de-boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é um problema que traz muitos prejuízos a pecuária. Em estudos prévios, foi avaliada a atividade acaricida dos óleos essenciais das folhas de *P. amalago* (Pa), *P. mikanianum* (Pm) e *P. xylosteoides* (Px). Devido ao baixo rendimento dos óleos essenciais, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito acaricida do extrato metanólico (EM) das folhas de Pa, Pm e Px em larvas de carrapato e analisar a sua constituição fitoquímica. Com base nos ensaios fitoquímicos detectou-se a presença de alcalóides e flavonóides nas três espécies, e através do teste de imersão larval observou-se que apenas *P. mikanianum* apresenta atividade acaricida.

Palavras-chaves: Piper, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, teste de imersão larval.

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS

³ Faculdade de Veterinária – UFRGS

⁴ Professor-Orientador do Curso de Pós Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada /ULBRA (alexandre.ferraz@ulbra.br)

ABSTRACT

Cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, is a major problem for livestock and brings a lot of damage. In previous studies the acaricidal activity of the essential oils *P. amalago* (Pa), *P. mikanianum* (Pm) e *P. xylostoeides* (Px) was evaluated. Due to the low yield of the essential oils, the aim of this study was to evaluate the acaricidal effect of methanolic extract (ME) from the leaves of Pa, Pm and Px in tick larvae and to analyze their phytochemical composition. Based on the phytochemical analysis we detected the presence of alkaloids and flavonoids in the three species, and through the larval immersion test, only *P. mikanianum* displayed acaricidal activity.

Keywords: *Piper*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, larval immersion test.

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) é uma das espécies de carrapatos com maior distribuição mundial, causador de diversos problemas para pecuária nas regiões tropical e subtropical. Conhecido popularmente como carrapato-de-boi, este é responsável por inúmeros prejuízos, como a perda de sangue do animal por sua ação hematófaga, lesões causadas na pele do gado por sua fixação que pode favorecer o aparecimento de infecções secundárias, perda na qualidade do couro e, além disso, é vetor de várias doenças como a babesiose e a febre maculosa (SABATINI et al., 2001; DURCONEZ et al., 2005). Por outro lado, as perdas causadas pelo carrapato podem ser minimizadas com o uso de acaricidas. Todavia, o uso contínuo desses produtos tem permitido o desenvolvimento de cepas destes artrópodes resistentes à agentes acaricidas (KLAFKE et al., 2006). Muitos destes produtos, além de contaminar o ambiente possuem um alto custo. Assim, a pesquisa de novos produtos acaricidas é necessária para auxiliar no controle deste parasita.

O gênero *Piper* (Piperaceae) possui aproximadamente 1000 espécies (SIMPSON; OGORZALY, 1995). Várias espécies pertencentes a este gênero são utilizadas como plantas ornamentais, temperos,

alucinógenos e na medicina popular (PARMAR et al., 1997). Algumas espécies de *Piper* apresentam elevado valor comercial e notável potencial econômico, como *Piper nigrum*, conhecida popularmente como pimenta-preta mundialmente utilizada como tempero (SIMPSON; OGORZALY, 1995; SIDDIQUI et al., 2004). Alguns efeitos medicinais dos extratos de *Piper*, como antibacteriano e antipirético, são conhecidos e disseminados na medicina popular em várias partes do mundo. Os compostos que conferem estas e outras propriedades medicinais são importantes na defesa das plantas para repelir insetos, fungos oportunistas e nematóides (EVANS et al., 1984; PARMAR et al., 1997). Alguns extratos e óleos essenciais de plantas pertencentes a este gênero têm demonstrado eficácia no controle de insetos causadores de pestes (CHAURET et al., 1996, FAZOLIN et al., 2007). Dentre as plantas estudadas neste trabalho, *Piper mikanianum* é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul utilizada popularmente para distúrbios estomacais, no tratamento de amenorréias, leucorréias e como abortivo (ALICE et al., 1995). *Piper amalago*, encontra-se distribuída desde o México até o Brasil sendo utilizada popularmente para aliviar dores no peito e como agente antiinflamatório (PARMAR, 1997).

Em estudos prévios com óleos voláteis da *P. amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides*, as amostras de *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* apresentaram um potente efeito acaricida no teste de imersão larval (FERRAZ et al., 2010). Devido ao baixo rendimento dos óleos essenciais, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito acaricida do extrato metanólico das folhas destas três espécies de *Piper* em larvas de carrapato, utilizando o teste de imersão larval descrito por Ribeiro e colaboradores (2007) e analisar a sua constituição fitoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As partes aéreas de *P. amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* foram coletadas em abril de 2008, em Morro Reuter, Picada Café e São Francisco de Paula, no estado do Rio Grande do Sul. O material foi identificado pelo Prof. Dr. Sérgio Bordignon. As espécies foram depositadas no herbário de Universidade Luterana do Brasil (HERULBRA) com os números 3123, 3125, e 3500, respectivamente.

Análise fitoquímica

As folhas de *P. amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* foram analisadas através do *screening* fitoquímico de acordo com a metodologia descrita por Harborne (1998) e Simões et al. (2007). Estes métodos consistem em reações colorimétricas para a caracterização dos metabólitos secundários presentes no material vegetal, tais como: alcalóides (Mayer, Bertrand e Dragendorff), antraquinonas (reação de Borntraeger), cardiotônicos (Salko-

wsky, Keller-Killiani, Baljet), cumarinas (fluorescência em papel alcalinizado), flavonóides (reação cianidina), taninos (teste da gelatina) e saponinas (teste da espuma). Os resultados foram confirmados através da literatura e por cromatografia em camada delgada em sílica gel, utilizando sistemas eluentes e reveladores indicados por Wagner e Bladt (1996).

Preparação e análise cromatográfica do extrato metanólico

Os extratos metanólicos foram obtidos por maceração das folhas secas (3 x 24h) e trituradas (1:10 – m/v). As amostras foram filtradas e concentradas sob pressão em evaporador rotatório. Para análise cromatográfica os extratos foram aplicados em placas de sílica para cromatografia de camada delgada com sistemas eluentes pré-estabelecidos por Wagner e Bladt (1996).

Preparação das amostras

Para o teste de imersão larval, os extratos metanólicos foram dissolvidos e diluídos em etanol, nas concentrações de 1%, 0,5%, 0,25% e 0,0625%.

Preparação dos carrapatos

Fêmeas de *R. (Boophilus) microplus* em fase posterior ao ingurgitamento, medindo aproximadamente 4,5mm foram coletadas de animais infestados, foram limpas com água e secas em papel toalha. O peso médio dos carrapatos era de 0,30g. Essas fêmeas foram incubadas em temperatura 27-28°C e 70-80% de umidade relativa até a ovoposição. A

partir destes ovos, foram obtidas as larvas para o teste de imersão larval.

Teste de Imersão Larval

Os experimentos foram realizados com aproximadamente 100 ovos (0,005g) acondicionados em envelopes de tecido TNT (1,0cm X 1,5cm). Os envelopes foram incubados em temperatura de 27-28°C e 70-80% de umidade relativa por 14 dias, até a eclosão dos ovos. Após mais 14 dias de incubação, os envelopes contendo as larvas, foram submersos por 5 minutos em 10mL nas soluções teste. Etanol e água foram utilizados como controles negativos. Após 1h, para a evaporação do solvente, os envelopes foram incubados em temperatura de 27-28°C e 70-80% de umidade relativa por 48h. Larvas (vivas e mortas) foram contadas para avaliar o percentual de mortalidade. Os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise fitoquímica das folhas das três espécies de *Piper* detectou-se a presença de flavonóides e alcalóides. Uma vez que não há estudos fitoquímicos com estas espécies, torna-se necessário buscar a ocorrência destas classes de metabólitos secundários em outras plantas deste gênero. Segundo trabalho de Quílez e colaboradores (2010) com as folhas de *Piper carpunya*, foram identificados os flavonóides vitexina, isovitexina e isoembigenina. Dessa mesma forma, Dragull e colaboradores (2003) relatam a ocorrência dos alcalóides 3 α ,4 α -epoxi-5 β -pipermetistina e avaina nas folhas de *Piper methysticum*. A ausência de antraquinonas, saponinas, taninos, cumarinas

determinada nos ensaios fitoquímicos também é embasada na ausência de relatos destas classes na literatura para o gênero *Piper*. A análise do extrato metanólico por cromatografia em camada delgada no sistema eluente hexano:tolueno (93:7) com posterior nebulização de anisaldeído sulfúrico como agente cromogênico indicou a presença de produtos majoritários. Após o cálculo do fator de retenção e consulta a literatura foi possível constatar nos extratos metanólicos de *P. xylosteoides* e *P. mikanianum* a presença de safrol e apiol, respectivamente.

O extrato metanólico de *P. amalago* não apresentou atividade acaricida em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 1). Este resultado corrobora com dados prévios que demonstraram uma ineficiência do óleo essencial desta planta frente às larvas *R. (B.) microplus* (FERRAZ et al., 2010). Através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foi possível identificar os compostos presentes no óleo essencial de *P. amalago*. Os compostos encontrados em maior quantidade foi uma mistura de monoterpenos, limoneno e β -felandreno (20,52%) (FERRAZ et al., 2010). Cabe mencionar que para o limoneno, já foram descritas atividades biológicas, como inseticida (PRATES et al., 1998) e até mesmo acaricida (FERRARINI et al., 2008). Entretanto, acredita-se que por este produto estar em uma mistura e em baixa concentração no óleo, não foi possível produzir o efeito demonstrado no estudo anterior, no qual sua toxicidade frente às larvas de *R. (B.) microplus* foi encontrada nas concentrações de 10mg/mL até 2,5mg/mL de limoneno puro (FERRARINI et al., 2008). O extrato metanólico de *P. xylosteoides* também não demonstrou atividade (Tabela 1), diferenciando-se do resultado obtido no teste de imersão larval com o óleo essencial extraído de

suas folhas, onde apresentou atividade acaricida nas concentrações de 1% que matou 97% das larvas e na concentração de 0,5% matou 25% das larvas. Na análise do óleo por CG-EM, o composto majoritário encontrado foi o fenilpropanóide safrol que representou 47,80% da mistura (FERRAZ et al., 2010). O safrol é um composto que possui atividade inseticida relatada em literatura (HUANG et al., 1999) entretanto a análise cromatográfica indicou uma baixa concentração deste produto no extrato metanólico. Os resultados obtidos no teste de imersão larval com o extrato metanólico das folhas de *P. mikanianum*, demonstram eficácia nas concentrações de 1%, 0,5% e 0,25% (Tabela 1). Observa-se que nas concentrações mais altas, o extrato foi letal e na concentração de 0,25% matou 60% das larvas. No ensaio realizado com o óleo essencial, foi obtido o mesmo resultado nas concentrações mais altas, porém na concentração de 0,25%, o óleo matou 90% das larvas. Na análise por CG-EM do óleo da *P. mikanianum*, o componente majoritário encontrado foi o apiol, correspondendo a 64,90% da constituição do óleo volátil (FERRAZ et al., 2010). Estudos comprovam a atividade biológica do apiol, onde uma delas é a interferência no crescimento e na redução da fecundidade de moscas adultas da espécie *Parasarcophaga dux* (KHALAF, 2004).

Tabela 1 - Atividade acaricida do extrato metanólico de *Piper amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* em % de mortalidade.

Concentração/ Amostra	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,0625%
EMPa	0	0	0	0	0
EMPm	100	100	60±10	13±3,53	3±2,08
EMPx	0	0	0	0	0

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o extrato metanólico de *Piper mikanianum* é um bom candidato para o desenvolvimento de novos agentes acaricidas e seu efeito parece estar relacionado à presença de apiol.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA e da Fundação de Amparo a pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- ALICE, C. B. et al. **Plantas medicinais de uso popular:** atlas farmacognóstico. Canoas: Ed. ULBRA, 1995.
- CHAURET, D.C. et al. Insecticidal Neolignans from *Piper decurrens*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 152 -155, 1996.
- DRAGULL, K.; YOSHIDA, W.Y.; TANG, C.S. Piperidine alkaloids from *Piper methysticum*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 193-198, 2003.
- DUCORNEZ, S. et al. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with modified Larval Packet Test. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 285-292, 2005.
- EVANS, P.H.; BOWERS, W.S.; FUNK, E.J. Identification of fungicidal and nematocidal

components in the leaves of *Piper betle* (Piperaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1254–1256, 1984.

FAZOLIN, M. et al. Insecticidal properties of essential oils of *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. and *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum against *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 113-120, 2007.

FERRARINI, S. R. et al. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p.149-53, 2008.

FERRAZ, A. B. F. et al. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* Species. *in press Parasitology Research*, v. 107, n. 1, p. 243-248, abr. 2010.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods**. Oxford: Clarendon Press, 1984.

HUANG, Y.; HUNG, H. O. S.; MANJUNATHA, K. R. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae). **Journal of economic entomology**, v. 92, p. 676-683, 1999.

KHALAF, A. F. Toxicological efficacy of some indigenous dill compounds against the flesh fly, *Parasarcophaga dux* Thomson. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 34, p. 227-237, 2004.

KLAFKE, G. M. et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 386–390, 2006.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597–673, 1997.

PRATES, H. T. et al. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 34, p. 243-249, 1998.

QUÍLEZ, A. et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-Helicobacter pylori activities of several fractions isolated from *Piper carpubunya* Ruiz & Pav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 583-589, 2010.

RIBEIRO, V. L. S. et al. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 199–203, 2007.

SABATINI, G. A. et al. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 53–62, 2001.

SIDDIQUI, B. S. et al. New Insecticidal Amides from Petroleum Ether Extract of Dried *Piper nigrum* L. Whole Fruits. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 1349-1352, 2004.

SIMÕES, C. M. O. et al. Introdução à análise fitoquímica. In: _____. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis;

Porto Alegre: Ed. da UFSC; Ed. da UFRG, 2007. p.229-245.

SIMPSON, B. B.; OGORZALY, M. O. (Eds.). **Economic Botany: plants in our world**. 2. ed.

New York: McGraw-Hill, 1995.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug analysis a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1996.