

ANATOMIA E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE  
*PIPER REGNELLII* (MIQ.) C. DC. VAR. *REGNELLII*

ANATOMY AND ESSENTIAL OIL OF THE LEAVES OF  
*PIPER REGNELLII* (MIQ.) C. DC. VAR. *REGNELLII*

Antonio Salatino <sup>(1)</sup> e José Bonzani da Silva <sup>(1)</sup>

RESUMO

Descrevem-se as características anatômicas das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*. Efetuou-se a extração do óleo essencial e, por meio da análise cromatográfica em camada delgada, foram identificados cariofileno, limoneno, linalol e geraniol.

SUMMARY

Anatomic characteristics of the *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* leaves are described. Extraction of the essential oil was made and by means of the thin layer chromatographic analyses caryophyllene, limonene, geraniol and linalol were identified.

1 — INTRODUÇÃO

Na família Piperaceae, o gênero *Piper*, segundo Caminhoá (1916), apresenta espécies que são utilizadas na medicina popular e, também, como condimento. Dentre as espécies empregadas para fins terapêuticos, destaca-se *Piper umbellatum* L., conhecida vulgarmente por "Pariparoba", "Caapeua", "Caapeba", "Caena", "Catage" e "Aguaxima", conforme citação da Farmacopéia Brasileira I (Silva, 1926).

Caminhoá (1916) menciona que as raízes de pariparoba são usadas no tratamento das obstruções do fígado e do baço, e as folhas cozidas são aplicadas externamente na região do fígado. Muitos têm sido

(1) Dept. Botânica do Inst. Biociências da Univ. S. Paulo.

os trabalhos publicados em época recente relatando análises de drogas e concluindo que elevada porcentagem destas drogas eram adulteradas ou completamente falsificadas. Na análise de pariparoba, a Disciplina de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Univ. S. Paulo tem encontrado com freqüência a falsificação de folhas de *Piper umbellatum* L. por *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *regnellii*.

Em face destas falsificações, escolhemos para este trabalho folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *regnellii*, visando contribuir para o conhecimento das características anatômicas e da composição do seu óleo essencial. Os resultados obtidos nestas análises fornecerão subsídios à Farmacognosia para o reconhecimento de falsificações de folhas de *Piper umbellatum* L. por folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *regnellii*.

## 2 — MATERIAL E MÉTODOS

As folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *regnellii* foram coletadas em janeiro de 1974 no Campus da Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". As folhas foram colhidas de exemplares cultivados em ambiente aberto, totalmente expostos ao sol. Destes exemplares, foram preparadas exsiccatas que se encontram depositadas no herbário do Dept.º de Bot. do Inst. de Bioc. da Univ. S. Paulo sob n.º SPF-16071. A identificação foi feita por comparação com exsiccatas existentes no herbário do mencionado Departamento, bem como com a descrição de Yuncker (1972).

Para o estudo da venação, o material foi diafanizado de acordo com a técnica de Felipe e Alencastro (1966) e em seguida corado com safranina 1% em álcool etílico 50%, desidratado e montado em bálsamo.

O estudo anatômico foi feito em folhas adultas, sendo analisadas as estruturas do limbo, pecíolo e expansão deste.

A localização do óleo essencial foi executada por meio de solução de Sudan III, segundo técnica de Wattiez e Sternon (1935).

A caracterização do oxalato de cálcio foi feita de acordo com a técnica de Wasicky (1959).

A verificação da presença de mucilagem e canais mucilaginosos foi feita tratando-se cortes transversais do limbo e pecíolo com soluções aquosa e alcoólica de azul de metileno a 0,5% entre lâmina e lâmina.

O óleo essencial foi extraído por arrastamento com vapor de água no aparelho de Clevenger, modificado por Wasicky (1963).

Os testes de solubilidade foram executados empregando-se 0,1 ml do óleo e igual volume de: n-hexano, éter de petróleo, benzeno, acetato de etila, éter dietílico, acetona, etanol, metanol e água.

A densidade relativa foi determinada a 22°C pelo método de Wasicky (1959).

O índice de refração foi obtido a 24°C no refratômetro de Abbé.

O isolamento e a identificação do óleo essencial foram feitos através da análise cromatográfica em camada delgada. Para o isolamento, empregaram-se migrações entre placas, conforme a técnica de Wasicky (1963). A fim de tornar possível o emprego de um número maior de placas simultaneamente, foram feitas as modificações que se seguem. Construíram-se guarnições de cobre com a forma de um "U" invertido. A fase móvel foi colocada em um recipiente de "Pyrex". As placas de vidro com o adsorvente e a amostra depositada foram separadas uma da outra pelas guarnições de fios de cobre, sendo o conjunto preso por quatro ripas de pinho apresentando dois orifícios nas extremidades. Na superfície inferior dessas ripas, foram colocadas tiras de espuma de "Nylon". As placas foram pressionadas por meio de parafusos providos de borboletas. O conjunto de placas com a amostra foi colocado na cuba onde se achava a fase móvel.

Efetuuou-se a primeira migração com n-hexano num percurso de 15 cm. Após observação à luz ultra-violeta de ondas curtas, marcou-se o limite inferior das manchas que se localizavam na região superior das placas. A seguir, efetuou-se uma segunda migração com benzeno até a marca mencionada. Observando-se as placas à luz ultra-violeta, verificou-se que os componentes distribuíam-se em 5 faixas, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub>, codificadas a partir do ponto de saída. As faixas foram raspadas e eluídas com clorofórmio.

Para a identificação do linalol e geraniol, tornou-se necessário recromatografar a fração F<sub>1</sub> com clorofórmio em placas preparativas. A luz ultra-violeta revelou a presença de quatro faixas (F<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub>F<sub>1</sub> e F<sub>4</sub>F<sub>1</sub>). As quatro frações, eluídas com clorofórmio, foram cromatografadas comparativamente com soluções clorofórmicas a 1% dos padrões de linalol e geraniol. Como reveladores, foram empregados aldeído anísico e tricloreto de antimônio (Stahl, 1969).

Para identificação do limoneno, cromatografou-se a fração F<sub>4</sub> comparativamente com solução clorofórmica a 1% do padrão de limoneno, com n-hexano. Como revelador, foi empregado o tricloreto de antimônio (Stahl, 1969).

O cariofileno foi identificado cromatografando-se a fração F<sub>5</sub> com n-hexano, comparativamente com solução clorofórmica a 1% do padrão. Como reveladores, foram empregados aldeído anísico e tricloreto de antimônio (Stahl, 1969).

As frações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub> foram cromatografadas, respectivamente, com benzeno e clorofórmio, sendo depois reveladas as placas com aldeído anísico (Stahl, 1969).

Em todas as análises acima mencionadas, a camada empregada foi de silicagel GF<sub>254</sub>, com espessura de 250 μm. As migrações foram ascendentes, unidirecionais. As migrações foram efetuadas em cuba aberta, segundo técnica de Wasicky (1963). A temperatura ambiente oscilou entre 22°C e 25°C.

## 3 — RESULTADOS

3.1 — *Venação*

De acordo com a classificação de Ettingshausen (1861, *in* Felipe e Alencastro, 1966), o padrão de nervação das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii* é o campilódromo (fig. 1). O detalhe da nervação menor é mostrado na figura 4.

3.2 — *Anatomia*3.2.1 — *Epidermes* (fig. 7)

As epidermes, em vista frontal, apresentam-se constituídas de células de tamanhos diversos, com paredes finas retilíneas, às vezes ligeiramente sinuosas. Os estômatos encontram-se somente na epiderme abaxial. São quase todos do tipo anomocítico e encontram-se distribuídos regularmente. Observam-se de 3 a 5 células epidérmicas envolvendo as células-guarda. Como resultado médio de 50 contagens, foi obtido o número médio de 140 estômatos por milímetro quadrado, com um desvio padrão igual a 28.

3.2.2 — *Nervura mediana* (fig. 5)

A secção transversal da nervura mediana, ao nível do terço inferior da folha, mostra a epiderme superior dotada de células de diversos tamanhos, sendo recoberta por uma delgada cutícula. Ambas as epidermes apresentam pelos tectores pluricelulares unisseriados, formados de 2 a 8 células que apresentam cutícula estriada.

O colênquima é espesso, com até 8 fileiras de células e do tipo angular.

O parênquima fundamental que envolve os feixes vasculares apresenta células isodiamétricas de paredes finas e que deixam entre si meatos. A maioria dessas células incluem oxalato de cálcio na forma de rafídios.

Nesta região, observam-se três feixes vasculares. Na região do floema e também do xilema, os feixes são limitados por uma fileira de fibras com paredes relativamente pouco espessadas e lume grande.

No parênquima do floema, observam-se células grandes que incluem conteúdo pardo-amarelado.

O colênquima e a epiderme inferior apresentam características semelhantes às dos correspondentes tecidos da face superior.

3.2.3 — *Limbo entre nervura mediana e bordo* (fig. 3)

A secção transversal mostra a epiderme superior constituída de células retangulares de diversos tamanhos. É recoberta por delgada

cutícula, finamente estriada. Abaixo da epiderme, há uma ou duas camadas de células sub-epidérmicas grandes, desprovidas de inclusões, com exceção de algumas que apresentam cristais aciculares.

O parênquima paliçádico é constituído por uma ou duas fileiras de células. A maioria delas incluem rafídios.

O parênquima lacunoso consta de 4 a 5 fileiras de células em espessura. São células arredondadas ou alongadas e deixam entre si grandes lacunas. O número de rafídios é bem menor que no parênquima pliçádico. É comum a presença de células grandes que incluem conteúdo pardo-amarelado semelhante àquele mencionado nas células do floema.

Abaixo do parênquima lacunoso, nota-se a presença de uma fileira de células grandes, isodiamétricas e aclorofiladas. Também nestas células, notamos a presença de oxalato de cálcio na forma de rafídios.

A epiderme inferior é formada por células com características semelhantes às da superior, com a diferença que na primeira observam-se estômatos. Estes apresentam-se em ligeiras elevações da epiderme. A câmara sub-estomática é grande, formada pela ausência de uma ou duas células da camada sub-epidérmica.

#### 3.2.4 — *Pecíolo* (fig. 6)

Os feixes vasculares dispõem-se em duas fileiras concêntricas. A fileira externa mostra feixes pequenos que se alternam com os feixes internos que são maiores. São separados por largos raios de parênquima.

O colênquima é descontínuo, mostrando faixas de diversos tamanhos, que geralmente são relacionados com os feixes vasculares.

O parênquima fundamental que envolve os feixes vasculares é rico em rafídios.

A epiderme mostra células pequenas, retangulares. Observam-se pelos semelhantes aos da nervura mediana.

#### 3.2.5 — *Expansão do pecíolo* (fig. 2)

Observam-se duas fileiras de feixes vasculares, uma interna, outra externa. Como no pecíolo, a fileira interna é formada por feixes mais desenvolvidos. Os feixes vão reduzindo o seu tamanho à medida que se aproximam de ambas as extremidades.

O colênquima acha-se relacionado com os feixes vasculares, estando ausente junto aos feixes menores.

O parênquima fundamental mostra grande quantidade de rafídios.

### 3.3 — *Histoquímica*

O óleo essencial localiza-se principalmente nos idioblastos que incluem conteúdo pardo-amarelado, mas praticamente todas as células dos parênquimas clorofilianos possuem gotas de óleo.

Os cristais aciculares mostraram ser constituídos de oxalato de cálcio.

### 3.4 — Teor e características físicas do óleo essencial

As folhas frescas forneceram um teor de 0,6% de óleo essencial de cor pardo-amarelada, sabor picante e odor desagradável.

O óleo mostrou-se totalmente solúvel nos solventes orgânicos empregados e praticamente insolúvel em água.

A média de 5 determinações da densidade a 20°C foi 0,8445, com um desvio padrão de 0,0023.

O valor médio de 5 determinações do índice de refração a 24°C foi 1,4185.

### 3.5 — Identificação do cariofileno, limoneno, linalol e geraniol

As características dos cromatogramas obtidos estão expressas na tabela 1.

TABELA 1 — Características dos cromatogramas das frações F<sub>1</sub>F<sub>1</sub>, F<sub>3</sub>F<sub>1</sub>, F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub>, ao lado dos padrões de geraniol, linalol, limoneno e cariofileno.

| Frações                       | Padrões     | Fase móvel  | hRf do padrão | cor da mancha do padrão | hRf das manchas da fração | cor das manchas da fração |
|-------------------------------|-------------|-------------|---------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| F <sub>1</sub> F <sub>1</sub> | geraniol    | clorofórmio | 28            | parda                   | 28                        | parda                     |
| F <sub>3</sub> F <sub>1</sub> | linalol     | clorofórmio | 44            | parda                   | 36                        | violeta                   |
|                               |             |             |               |                         | 46                        | parda                     |
| F <sub>4</sub>                | limoneno    | n-hexano    | 80            | violeta                 | 3                         | azul                      |
|                               |             |             |               |                         | 6                         | púrpura                   |
|                               |             |             |               |                         | 38                        | azul                      |
|                               |             |             |               |                         | 56                        | violeta                   |
|                               |             |             |               |                         | 78                        | violeta                   |
|                               |             |             |               |                         | 88                        | azul                      |
| F <sub>5</sub>                | cariofileno | n-hexano    | 80            | vermelha                | 73                        | parda                     |
|                               |             |             |               |                         | 83                        | vermelha                  |
|                               |             |             |               |                         | 90                        | azul                      |

3.6 — *Análise cromatográfica qualitativa das frações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>*

As características dos cromatogramas obtidos encontram-se expressas na tabela 2.

TABELA 2 — Características dos cromatogramas das frações F<sub>2</sub> e F<sub>3</sub>. Fase móvel: F<sub>2</sub>, clorofórmio; F<sub>3</sub>, benzeno. Revelador: aldeído anísico.

| F <sub>2</sub> |                    | F <sub>3</sub> |          |
|----------------|--------------------|----------------|----------|
| hRf            | Cor                | hRf            | Cor      |
| 2              | amarelo-esverdeado | 15             | azul     |
| 26             | azul               | 41             | marrom   |
| 35             | marrom             | 46             | amarelo  |
| 43             | violeta            | 57             | vermelho |
| 49             | vermelho           | 72             | verde    |
| 54             | marrom             | 80             | azul     |
| 60             | laranja            | 84             | pardo    |
| 67             | verde-escuro       | 88             | azul     |
|                |                    | 90             | vermelho |
|                |                    | 95             | azul     |

## 4 — DISCUSSÃO

O caráter pubescente das nervuras e do pecíolo, mencionado por Hoehne, Kulmann e Handro (1941) e por Yuncker (1972), não foi por nós observado.

Próximo à metade do pecíolo, tem início uma expansão que cresce até chegar ao caule, envolvendo-o parcialmente. Relativamente a esta formação, Yuncker (1972), bem como Metcalf e Chalk (1950), nada mencionam. Joly (1966) comenta o seguinte, referindo-se às Piperaceae: “As folhas são sempre inteiras, predominando a disposição alterna, com estípulas (muitas vezes estas se apresentam soldadas simulando uma bainha)”.

Metcalf e Chalk (1950) assinalam a presença de pelos glandulares nos gêneros *Piper* e *Peperomia*. No nosso material, constatamos somente a presença de pelos tectores.

Os testes histoquímicos, efetuados para verificar a presença de canais mucilaginosos no pecíolo, citados por Metcalf e Chalk (1950) no gênero *Piper*, resultaram negativos.

Peckolt (1894, *in* Hegnauer, 1963) verificou em *Piper umbellatum* L. a presença de 0,05% de óleo essencial em folhas frescas. No nosso material, observamos um teor bem mais elevado (0,6%).

A análise cromatográfica revelou a existência aparente de 33 componentes no óleo essencial, dentre os quais quatro foram identificados: cariofileno (sesquiterpeno), limoneno (monoterpeno), geraniol e linalol (ácóois terpênicos). Segundo Hegnauer (1963), os óleos essenciais no gênero *Piper* apresentam em sua composição monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanos.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- CAMINHOA, J. M. — 1916 — *Elementos de botânica geral e médica*. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional. Vol. III. 439 p.
- FELIPPE, G. M. e ALENCASTRO, F. M. M. R. de — 1966 — Contribuição ao estudo da nervação foliar das Compositae dos Cerrados: I — Tribus Heleniae, Heleanteae, Inulae, Mutisiae e Senecioneae. *An. Acad. Brasil. Ciên.*, 38(Supl.):125-157.
- HEGNAUER, R. — 1963 — *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Birkhäuser-Verlag. Basen und Stuttgart. 5. Band. 536 p.
- HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M. e HANDRO, O. — 1941 — *O Jardim Botânico de São Paulo*. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. 656 p. + 48 pr.
- JOLY, A. B. — 1966 — *Botânica. Introdução à Taxonomia Vegetal*. Cia. Ed. Nacional e Ed. USP. São Paulo, XXII + 634 p.
- METCALF, C. R. e CHALK, L. — 1950 — *Anatomy of the Dicotyledones*. Clarendon Press. Oxford. Vol. II. 725-1500.
- SILVA, R. A. D. da — 1926 — *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. Companhia Editora Nacional. São Paulo. XL + 1149 p.
- STAHL, E. (ed.) — 1969 — *Thin layer chromatography*. Springer-Verlag. Berlin. 2<sup>nd</sup> ed. XXIV + 1041 p.
- WASICKY, Ro. — 1959 — Estudo farmacognóstico da folha de *Psidium cattleyanum* Sabine. Tese para concurso de Livre-Docência, apresentada na Fac. Farm. Odont. USP. São Paulo. 177 p.
- WASICKY, Ro. — 1963 — Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleo essencial. *Rev. Fac. Farm. Bioquim.* São Paulo. 1(1):77-81.
- WASICKY, Ro. — 1963 — Entwicklung von Dünnschichtchromatogrammen ohne Anwendung Geschlossenerentwicklungskammern. *Naturwissenschaften*, Berlin, 17:569-570.
- WATTIEZ, N. e STERNON, E. — 1935 — *Éléments de chimie végétale*. Masson & Cie. Éditeurs. Paris. 729 p.
- YUNCKER, T. G. — 1972 — The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*. São Paulo, 2:171-172.

Fig. 1 — Aspecto geral da venação.

Fig. 2 — Diagrama da secção transversal da expansão do pecíolo.

Fig. 3 — Secção transversal da região entre nervura mediana e limbo; c. ól. — célula que contém óleo essencial.

Fig. 4 — Detalhe da venação menor.

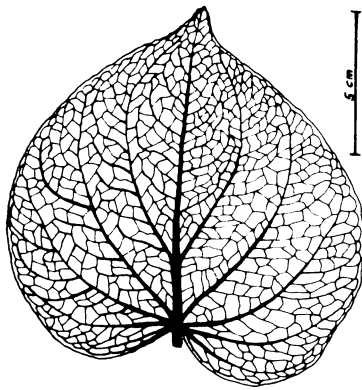
Fig. 1 — General outlines of venation.

Fig. 2 — Diagram of the transverse section of the petiole outgrowth.

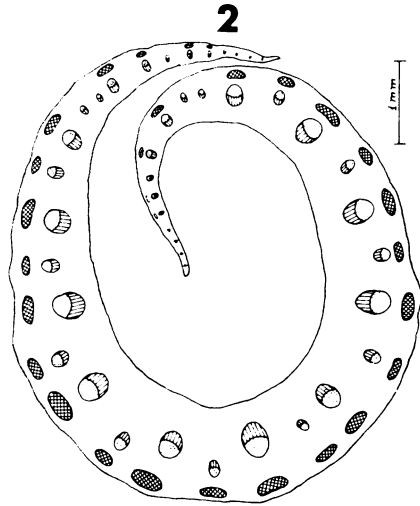
Fig. 3 — Transverse section of the region between midrib and margin; c. ól. — oil containing cell.

Fig. 4 — Detail of minor venation.

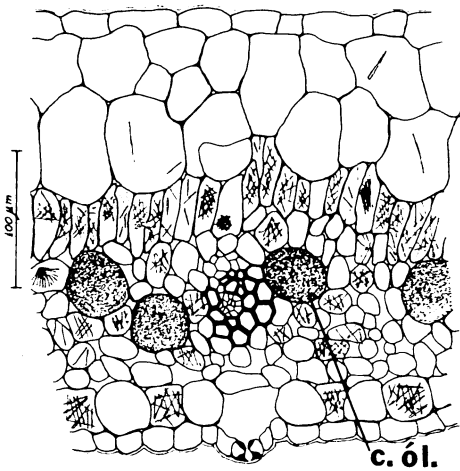




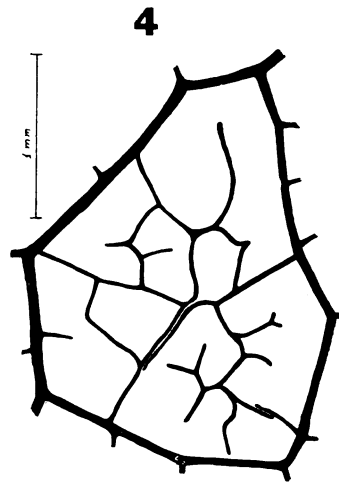
1



2



3



4

Fig. 5 — Secção transversal da nervura mediana; c. ól. — célula que contém óleo essencial.

Fig. 6 — Diagrama da secção transversal do pecíolo.

Fig. 7 — Epiderme abaxial em vista frontal.

Fig. 5 — Transverse section of the midrib; c. ól. — oil containing cell.

Fig. 6 — Diagram of the transverse section of the petiole.

Fig. 7 — Front view of the abaxial epidermis.

