

Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch

Chemical composition and biological activity of the essential oils' comparative study from *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch leaves

Orlando Vieira de Sousa¹, Rafael Cypriano Dutra¹, Célia Hitomi Yamamoto¹ & Daniel Sales Pimenta²

RESUMO – O presente trabalho comparou a composição química e a atividade biológica dos óleos essenciais das folhas jovens e adultas de *Eremanthus erythropappus*. Os óleos foram obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em ágar e a toxidez pelo bioensaio em *Artemia salina*. Os constituintes majoritários foram β -pineno (24,19 e 22,30%), β -cariofileno (22,33 e 23,52%), β -mirceno (9,95 e 10,11%) e germacreno D (10,01 e 8,80%) para folhas jovens e adultas, respectivamente. Os óleos essenciais foram ativos contra *S. aureus* e *C. albicans* e apenas o óleo das folhas adultas inibiu o crescimento de *Salmonella* spp. As CL_{50} sobre *A. salina* foram de 9,59 μ g/mL (folhas jovens) e 9,25 μ g/mL (folhas adultas). Os resultados indicam que pequenas variações na composição química dos óleos essenciais podem ocasionar alteração na atividade biológica.

PALAVRAS-CHAVE – *Eremanthus erythropappus*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, *Artemia salina*.

SUMMARY – The essential oils in young and mature *Eremanthus erythropappus* leaves were obtained by hydrodistillation using Clevenger's apparatus and analyzed by gas chromatograph coupled to mass spectrometer. The agar diffusion method was used for determination antimicrobial activity and the toxicity was evaluated by *Artemia salina* model. The main compounds were β -pinene (24.19 and 22.30%), β -caryophyllene (22.33 and 23.52%), β -myrcene (9.95 and 10.11%) and germacrene D (10.01 and 8.80%) to young and mature leaves, respectively. The essential oils were active against *S. aureus* and *C. albicans* and only the essential oil obtained from mature leaves inhibited the growth of *Salmonella* spp. Both essential oils presented toxicity with LC_{50} 9.59 μ g/mL (young leaves) and 9.25 μ g/mL (mature leaves). The results indicated that small variation in chemical composition could change the biological activities.

KEYWORDS – *Eremanthus erythropappus*, essential oil, antimicrobial activity, *Artemia salina*.

INTRODUÇÃO

E*remanthus erythropappus* (DC) McLeisch, também chamada de *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz-Bip, pertence à família Asteraceae, sendo popularmente conhecida como "candeia-da-serra" (Souza *et al.*, 2003) é encontrada na Argentina, Paraguai e, no Brasil distribuem-se nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste (Pedralli *et al.*, 1997). Na medicina popular é usada como cicatrizante e no combate às infecções (Pérez, 2001). O óleo essencial da madeira, rico em α -bisabolol, apresenta propriedades antibacteriana, antimicótica (Bolmann *et al.*, 1981), antiulcerogênica (Gottlieb & Kubitzki, 1983), antiflogística, dermatológica e espasmódica (Pérez, 2001).

Estudos químicos de *E. erythropappus* resultaram na identificação do α -bisabolol (Gottlieb & Magalhães, 1958), costunolólido, eremantina (Baker *et al.*, 1972), vanilosmina (Corbrella *et al.*, 1974) e 15-desoxigoyazensolólido (Vichnewski *et al.*, 1976). Outros sesquiterpenóides e lactonas sesquiterpenoídicas também fo-

ram identificadas na espécie (Bohlmann *et al.*, 1981; Lima *et al.*, 1985; Vichnewski *et al.*, 1989; Braun *et al.*, 2003).

Fatores ambientais tais como luminosidade, umidade, disponibilidade de nutriente, estação do ano, período do dia, ciclo e parte da planta (Perri *et al.*, 1999; Vesela *et al.*, 1999; Andrade & Gomes, 2000; Carvalho-Filho *et al.*, 2006), assim como fatores genéticos (Skoula *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2001) podem modificar a biossíntese de substâncias naturais nos vegetais. Por exemplo, variabilidade na composição química foi demonstrada no óleo essencial da madeira de *E. erythropappus* quando coletada em diferentes localidades (Lopes *et al.*, 1990) sendo possível que durante a vida foliar ocorram alterações nos processos metabólicos, ocasionando mudanças na composição química do óleo essencial das folhas. Baseado nessa hipótese, o presente trabalho teve como objetivo comparar a composição química e a atividade biológica dos óleos essenciais das folhas jovens e adultas de *E. erythropappus*.

Recebido em 27/8/2007

¹Departamento Farmacêutico/FFB, ²Departamento de Botânica/ICB, UFJF

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

E. erythropappus (DC) McLeisch foi coletada em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, em julho de 2004 e uma exsicata (CESJ nº 25363), identificada pela Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Salimena Pires, depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Extração do óleo essencial

Após a coleta, 100g das folhas frescas, jovens e adultas de *E. erythropappus* foram trituradas em liquidificador e colocadas em aparelho de Clevenger e a extração, feita por hidrodestilação durante 2h. Após desidratação em sulfato de sódio anidro, o óleo foi estocado a -18°C para análise.

Avaliação da composição química

As amostras dos óleos essenciais obtidos das folhas jovens e adultas de *E. erythropappus* foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (aparelho Shimadzu QP5050A), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida (CBP-5; 30m x 0,25mm x 0,25 μm), mantendo-se um fluxo de 1mL/min de hélio como gás de arraste, e aquecimento, com temperatura programada ($60^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$; $3^{\circ}\text{C min}^{-1}/240^{\circ}\text{C}$; $10^{\circ}\text{C min}^{-1}/280^{\circ}\text{C}/10\text{min}$) e energia de ionização de 70 eV. Volume de injeção de 1 mL das amostras diluídas em CH_2Cl_2 no modo *Split* com uma razão de 1:5. A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi realizada por comparação dos espectros de massas e índices de retenção com os valores de literatura dos componentes mais comuns de óleos essenciais (Adams, 1995). Os índices de retenção ou índices de Kovats foram calculados através da co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos, C9 – C22 e aplicando a equação de Van Den Dool & Kratz (Van Den Dool & Kratz, 1963).

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi testada pelo método de difusão em ágar (Koneman *et al.*, 1997) usando as seguintes amostras de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 90271, *Salmonella* spp. ATCC 13311 e *Candida albicans* ATCC 10231. Cilindros estéreis de 5,5mm foram colocados, em duplicata, sobre a superfície dos meios ágar caseína de soja (bactérias) e ágar Sabouraud (levedura) previamente inoculados com suspensões padronizadas das amostras de referência a serem testadas, e preenchidos com as soluções-teste contendo 5, 10 e 50mg dos óleos essenciais de *E. erythropappus*. Ampicilina (5 μg) e nistatina (10 μg) foram utilizadas como substâncias químicas de referência para bactérias e levedura, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24h para as bactérias e $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 5 dias para a levedura. Os resultados foram demonstrados como média da determinação do diâmetro da zona de inibição do crescimento em milímetros (mm).

Avaliação da toxidez pelo bioensaio em *Artemia salina*

O bioensaio foi realizado transferindo-se 10 larvas de *Artemia salina* para tubos de ensaio, em quadruplicata, contendo as seguintes concentrações: 0,5, 1, 5, 10 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Meyer *et al.*, 1982). Os tubos foram

mantidos sob iluminação e as larvas sobreviventes foram contadas após 24h de exposição ao óleo essencial. O timol foi utilizado como substância de referência. A CL_{50} foi determinada pela regressão linear entre o logaritmo da dose fornecida e unidades probabilísticas de porcentagem de mortos pelo teste dos probitos (Litchfield & Wilcoxon, 1949).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A Tabela I mostra os constituintes químicos dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *E. erythropappus*.

TABELA I
Caracterização dos constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *E. erythropappus* IK = índice de Kovats

| Constituintes | IK | Porcentagem | |
|--------------------------|------|---------------|----------------|
| | | Folhas jovens | Folhas adultas |
| α -pineno | 1002 | 4,17 | 3,42 |
| β -pineno | 1041 | 24,19 | 22,30 |
| β -mirreno | 1049 | 9,95 | 10,11 |
| limoneno | 1073 | 0,43 | 0,41 |
| β -felandreno | 1075 | 0,51 | 0,37 |
| <i>cis</i> -ocimeno | 1078 | 0,27 | - |
| <i>trans</i> -ocimeno | 1084 | 1,03 | 0,59 |
| 4-terpineol | 1316 | 0,30 | - |
| δ -elemeno | 1470 | 0,38 | - |
| α -copaeno | 1506 | 3,84 | 5,02 |
| β -bourboneno | 1522 | 0,29 | 0,40 |
| β -elemeno | 1526 | 2,40 | 2,16 |
| α -gurjuneno | 1543 | 0,43 | 0,51 |
| β -Cariofileno | 1547 | 22,33 | 23,52 |
| α -humuleno | 1590 | 2,62 | 2,60 |
| <i>cis</i> -muroliadieno | 1609 | 0,19 | 0,22 |
| γ -muroleno | 1611 | 0,21 | 0,26 |
| germacreno-D | 1614 | 10,01 | 8,80 |
| valenceno | 1628 | 0,31 | 0,29 |
| bisciclogermacreno | 1633 | 5,04 | 5,04 |
| α -muroleno | 1640 | 0,78 | 0,67 |
| γ -cadineno | 1654 | 0,60 | 0,60 |
| δ -cadineno | 1656 | 3,52 | 4,01 |
| Espatuleno | 1727 | 0,31 | 0,63 |
| óxido de cariofileno | 1729 | 1,13 | 2,03 |
| di- <i>epi</i> -cubenol | 1768 | 0,25 | 0,30 |
| cubenol | 1781 | 0,42 | 0,69 |
| cadinol | 1797 | 1,29 | 1,67 |
| murolol | 1801 | 0,45 | 0,47 |
| α -cadinol | 1812 | 1,43 | 1,14 |
| <i>n</i> -nonadecano | 2038 | - | 0,19 |
| <i>n</i> -eicosano | 2235 | 0,20 | 0,34 |
| <i>n</i> -heneicosano | 2234 | - | 0,20 |
| Porcentagem total | | 99,78 | 98,96 |

pus após análises por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi observado que houve uma redução de 4,05% da porcentagem total dos constituintes do óleo essencial das folhas adultas (98,96%) em relação às folhas jovens (99,78%).

As substâncias identificadas pertencem às classes dos monoterpenóides e dos sesquiterpenóides, exceto três ácidos graxos (*n*-nonadecano, *n*-eicosano e *n*-he-neicosano) que estão presentes, especialmente, nas folhas adultas. Os constituintes majoritários para folhas jovens e adultas foram respectivamente: β -pineno (24,19% e 22,30%); β -cariofileno (22,33% e 23,52%); β -mirceno (9,95% e 10,11%); germacreno-D (10,01% e 8,80%); biciclogermacreno (5,04% e 5,04%); α -copaeno (3,84% e 5,02%); α -pineno (4,17% e 3,42%); δ -cadineno (3,52% e 4,01%) e α -humuleno (2,62% e 2,60%). Foram encontrados sesquiterpenos bicíclicos; porém, não foi verificada a presença de α -bisabolol, constituinte majoritário da madeira da candeia (Braun *et al.*, 2003).

Após a extração, o rendimento do óleo essencial das folhas jovens foi de 0,45% e o das folhas adultas, 0,25%, demonstrando que as folhas jovens produzem uma maior quantidade ou possuem mecanismos de armazenamento que impedem a volatilização dos constituintes. Entre os constituintes dos óleos essenciais identificados, o *cis*-ocimeno, o 4-terpineol e o δ -elemeno não foram encontrados nas folhas adultas. Os demais constituintes estão presentes em ambos os óleos, mostrando assim uma semelhança em sua constituição.

É possível que exista uma prioridade anatômica e química das folhas na produção dos óleos essenciais como forma de adaptação ao ambiente. Além disso, os teores de β -cariofileno e α -humuleno são maiores em folhas adultas podendo servir como indicativo da qualidade do óleo essencial, devido à maior formação de óxido e hipóxido (isto pode ser comprovado analisando a Tabela I em que o teor de óxido de cariofileno é maior em folhas adultas).

A Tabela II apresenta os valores (em mm) correspondentes à zona de inibição do crescimento mi-

TABELA II
Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *E. erythropappus*

| Microorganismos testados | Zona de inibição do crescimento (mm) | | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------------------|------|------|----------------|------|------|--------|
| | Folhas jovens | | | Folhas adultas | | | Padrão |
| | 5mg | 10mg | 50mg | 5mg | 10mg | 50mg | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 | 12 | 16 | 11 | 12 | 16 | 24 |
| <i>Streptococcus mutans</i> | - | - | - | - | - | - | 20 |
| <i>Salmonella</i> spp | - | - | - | 10 | 12 | 13 | 26 |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | - | - | - | - | 20 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - | - | - | - | 20 |
| <i>Candida albicans</i> | - | - | 9 | - | - | 11 | 16 |

TABELA III
Determinação da CL₅₀ dos óleos essenciais das folhas de *E. erythropappus* pelo bioensaio em *Artemia salina*

| Amostras | Concentrações (µg/mL) | CL ₅₀ (µg/mL) | Intervalo de Confiança (95%) |
|----------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Folhas jovens | 0,5, 1, 5, 10 e 50 | 9,60 | 6,67-13,80 |
| Folhas adultas | 0,5, 1, 5, 10 e 50 | 9,25 | 6,50-13,16 |
| Timol | 10, 50, 100, 500 e 1000 | 480,20 | 337,3 – 683,5 |

crobiano dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *E. erythropappus* em relação à *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp e *C. albicans*. Os óleos essenciais de folhas jovens e adultas, nas concentrações de 5, 10 e 50mg, inibiram o crescimento de *S. aureus*, produzindo zona de inibição de 11, 12 e 16mm, respectivamente. Nestas mesmas concentrações, o óleo essencial das folhas adultas também inibiu o crescimento de *Salmonella* spp (10, 12 e 13mm). Uma atividade sobre *C. albicans* foi observada na concentração de 50mg dos óleos testados.

A zona de inibição de crescimento no teste de difusão é bastante influenciada pela velocidade de difusão das substâncias no ágar (CLSI, 2006). Sendo assim, é possível que a baixa polaridade dos óleos essenciais diminua a velocidade de difusão desses, gerando resultados negativos. No entanto, esses resultados demonstram que pequenas variações na composição dos óleos essenciais de *E. erythropappus* podem promover alteração na atividade antimicrobiana. O óleo essencial das folhas adultas inibiu o crescimento de *Salmonella* spp. e essa mesma observação não foi detectada com o óleo essencial das folhas jovens. Além disso, a atividade sobre *C. albicans* pode reforçar esta hipótese. Desse modo, é importante selecionar o material vegetal a ser estudado, assim como, caracterizar os constituintes antes de realizar estudos de atividade biológica.

Na Tabela III encontram-se os valores das CL₅₀ determinada pelo bioensaio em *Artemia salina*. Nas concentrações testadas, os óleos essenciais foram ativos, produzindo CL₅₀ de 9,60µg/mL e 9,25µg/mL, respectivamente para folhas jovens e adultas. No aspecto toxicidade, portanto, os óleos essenciais foram cerca de 52 vezes mais potentes que o timol (CL₅₀ = 480,20µg/mL).

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *E. erythropappus* possuem componentes das classes dos monoterpenóides e dos sesquiterpenóides e foram ativos contra *S. aureus*, *Salmonella* spp, *C. albicans* e *Artemia salina*. Pequena variação na composição dos óleos essenciais pode ser indicativa da discreta diferença observada na atividade biológica. Os resultados corroboram com as informações sobre os usos populares de *E. erythropappus*. Entretanto, o aprofundamento de estudos químico, farmacológico e toxicológico torna-se necessário para que o uso na medicina popular seja seguro.

REFERÊNCIAS

- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995. 469p.
- Andrade, A.M.; Gomes, S.S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. Floresta e Ambiente. 2000 (7): 181-9.
- Baker, P.M.; Fortes, C.C.; Fortes, E.G.; Gazzinelli, G.; Gilbert, B.; Lopes, J.N.C.; Pellegrino, J.; Tomassini, T.C.B.; Vichnewsky, W. Chemoprophylactic agents in schistosomiasis: eremanthine, costunolide, a-cyclocostunolide and bisabolol. J. Pharm. Pharmacol. 1972 (25):853-7.
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; Robison, H.; King, R. Germacranolides from *Piptolepis* ericoides and *Vanillosmopsis* species. Phytochemistry. 1981 (20):731-4.
- Braun, N.A.; Meier, M.; Kohlenberg, B.; Hammerschmidt, F.-J. Two new bisabolene diols from the stem wood essential oil of *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz-Bip. (Asteraceae). J. Essent. Oil Res. 2003 (15):139-42.

6. Carvalho-Filho et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Rev. Bras. Farmacog.* 2006 (16):24-30.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard - 9th Edition. M2-A9. 2006. (26):1-52.
8. Corbrella, A.; Gariboldi, P.; Jommi, G. Structure and absolute stereochemistry of vanillosmin, a guaianolide from *Vanillosmopsis erythropappa*. *Phytochemistry.* 1974 (13):459-65.
9. Gottlieb, O.R.; Kubitzki, K. Ecogeographical phytochemistry. A novel approach to the study of plant evolution and dispersion. *Naturwiss.* 1983 (70):119-26.
10. Gottlieb, O.R.; Magalhães, M.T. Essential oil of the wood of *Vanillosmopsis erythropappa*. *Perf. Essent. Oil Rec.* 1985 (49):711-4.
11. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.N.; Schreckenber, P.C.; Winn Jr, W.C. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia-New York: Lippincott; 1997. 5th ed., 1395 p.
12. Lima, P.D.D.B.; Garcia, M.; Rabi, J.A. Selective extraction of α -Methylene- γ -Lactones. Reinvestigation of *Vanillosmopsis erythropappa*. *J. Nat. Prod.* 1985 (48):986-8.
13. Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1949 (96):99-113.
14. Lopes, J.N.C.; Lopes, J.L.C.; Vichnewski, W.; Rodrigues, D.C.; Gottlieb, O. R. Chemical variability of *Vanillosmopsis erythropappa*. *An. Acad. Bras. Ciências.* 1991 (63):21-4.
15. Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; Mclaughlin, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active constituents. *Planta Med.* 1982 (45):31-4.
16. Pedralli, G.; Teixeira, M.C.B.; Nunes, Y.R. Estudos sinecológicos sobre a candeia (*Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip) na estação ecológica de Tripui, Ouro Preto, MG. *Rev. Árvore.* 1997 (21):301-6.
17. Pérez, J.F.M. Sistema de manejo para a candeia (*Eremanthus erythropappus* (D.C.) MacLeish. 2001. 71 p. Dissertação (Mestrado em Manejo Ambiental), Universidade Federal de Lavras.
18. Perri, N.B.; Anderson, R.E.; Brennan, N.J.; Douglas, M.H.; Heaney, A.J.; Mcgimpsey, J.A.; Smallfield, B.M. Essential oils from dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plant parts, seasons, and sites. *J. Agric. Food Chem.* 1999 (47):2048-54.
19. Skoula, M.; Abbes, J.E.; Johnson, C.B. Genetic variation of volatile oils and rosmarinic acid in populations of *Salvia sufruticosa* Mill. growing in Greece. *Bioch. Syst. Ecol.* 2000 (28):551-61.
20. Sousa, O.V.; Oliveira, M.S.; Rabello, S.V.; Cunha, R.O.; Costa, B.L.S.; Leite, M. N. Estudo farmacognóstico de galhos de *Vanillosmopsis erythropappa* Schult. Bip. - Asteraceae. *Rev. Bras. Farmacog.* 2003 (13):50-3.
21. Van Den Dool, H.; Kratz, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 1963 (11):463-71.
22. Veselá, D.; Šaman, D.; Valterová, I.; Vanek, T. Seasonal variations in the contents of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L. *Phytochem. Anal.* 1999 (10):319-21.
23. Vichnewski, W.; Lopes, J.N.C.; Santos-Filho, D.; Herz, W. 15-Deoxygoyazensolide, a new heliangolide from *Vanillosmopsis erythropappa*. *Phytochemistry.* 1976 (15):1775-6.
24. Vichnewski, W.; Takahashi, A.M.; Nasi, A.M.T.; Rodrigues, D.C.; Gonçalves, G.; Dias, D.A.; Lopes, J.N.C.; Goedken, V.L.; Gutiérrez, A.B.; Herz, W. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Eremanthus seidelii*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. *Phytochemistry.* 1989 (28):1441-51.
25. Vieira, R.F.; Grayer, R.J.; Paton, A.; Simon, J.E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonóides and RAPD markers. *Bioch. Syst. Ecol.* 2001 (29):287-304.

Endereço para correspondência

Orlando Vieira de Sousa
 Universidade Federal de Juiz de Fora,
 Faculdade de Farmácia e Bioquímica
 Campus Universitário, Martelo
 CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG.
 E-mail: orlando.sousa@uff.edu.br