

1.06.01 – Química / Química Orgânica

BIOATIVIDADES DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea odorifera* (LAURACEAE)

Ana E. T. Alcoba^{1*}, Priscila M. de Andrade¹, Daiana C. de Melo¹, Mayker L. D. Miranda², Lizandra Guidi Magalhães³

1. Estudante de IC do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais.
2. Pesquisador do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais.
3. Pesquisadora da Universidade de Franca – UNIFRAN.

Resumo:

Na busca contínua de produtos naturais com potenciais antiparasitários, este estudo objetivou avaliar, *in vitro*, as atividades leishmanicida e citotóxica dos óleos essenciais das folhas de *Ocotea odorifera*, bem como determinar a sua composição química.

O óleo essencial (OE) das folhas de *O. odorifera* foi obtido por hidrodestilação em aparato clevenger e analisado por CG-EM. O rendimento do óleo foi de 1,5 % e o constituinte safrol foi identificado em maior concentração (36,3 %).

O óleo essencial avaliado exibiu alta atividade leishmanicida frente formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* com $CI_{50} = 4,67 \mu\text{g/mL}$. Em relação à atividade citotóxica, o OE demonstrou também toxicidade frente a macrófagos peritoneais ($CC_{50} = 49,52 \mu\text{g/mL}$).

Estes resultados indicam que moléculas bioativas presentes no OE das folhas de *O. odorifera* podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou como fonte de matérias-primas farmacêuticas com atividade leishmanicida.

Autorização legal: Procedimento aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética da Universidade de Franca sob o protocolo número 010/14.

Palavras-chave: Óleo essencial; safrol; *Leishmania amazonensis*.

Apoio financeiro: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais.

Introdução:

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo, que afeta mais de 12 milhões de pessoas em 98 países e apresenta alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia, América

Latina, Bacia Mediterrânea, Oriente Médio e Austrália. Especificamente no Brasil, essa doença está presente em 19 dos 27 estados com padrão de transmissão rural. O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasito (BASTOS et al. 2016).

Lauraceae é uma família botânica conhecida por possuir espécies com interesse comercial pelos seus óleos essenciais, com aproximadamente 50 gêneros e 2500 espécies. Destas, 400 espécies distribuídas em 25 gêneros são encontradas no Brasil, possuindo grande incidência na região Amazônica. Os trabalhos já publicados descrevem a composição química dos óleos essenciais de Lauraceae com predominância de terpenos (YAMAGUCHI et al. 2013)

A espécie *O. odorifera* é reconhecida fitoquimicamente pela síntese de flavonoides, como o canferol e quercetina, polipropanoides, esteroides e óleos essenciais com sesquiterpenos (ROGATTO et al. 2014).

Os óleos essenciais são considerados fontes de substâncias naturais de baixo peso molecular, constituídos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides. Possuem diversas atividades biológicas, como por exemplo, propriedade antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antinociceptiva, leishmanicida, antiinflamatória e inseticida (JACOB et al. 2017). Por este motivo, os óleos essenciais extraídos de plantas têm despertado o interesse de nosso grupo de pesquisa na busca por produtos naturais com promissoras atividades biológicas.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, as atividades leishmanicida e citotóxica e determinar a composição química do óleo essencial das folhas de *Ocotea odorifera*, uma espécie de Lauraceae ocorrente no sul de Minas Gerais.

Metodologia:

As folhas de *O. odorifera* foram coletadas na região de Machado-MG em julho

de 2016. O material vegetal foi identificado pelo botânico Walnir F. G. Junior e uma amostra depositada no Herbário do IFSULDEMINAS sob o registro nº #0306.

Para extração do óleo essencial, as folhas (100 g) foram reduzidas em moído de facas e submetidas às extrações dos óleos essenciais pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo cleveger, por um período de 2 horas a partir da ebulição. Em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação. Foram realizadas três lavagens do hidrolato com três porções de 10 mL de diclorometano. Os óleos essenciais extraídos foram secos com sulfato de sódio anidro, acondicionados em pequenos frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração até a realização dos ensaios biológicos e análise por CG-EM. Todo o procedimento foi feito em triplicata.

Os óleos essenciais foram diluídos em hexano e submetidos à análise em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-5000 da Shimadzu® com detector por espectrometria de massas (CG-EM). A análise foi realizada com coluna capilar de sílica fundida, modelo DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme) da Shimadzu®, sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 1,0 mL/min. A injeção em modo Split 1:20 foi realizada com injetor a 240 °C. A temperatura do detector foi de 270 °C e o forno de 60 a 180 °C a 3 °C/min. Para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

A determinação da composição química dos óleos essenciais foi realizada através dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os compostos voláteis foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares (série homóloga de C₁₀-C₂₉) que foram coinjetados com a amostra. Os índices de retenção e os espectros de massas foram comparados com dados das espectrotecas Wiley e Nist e da literatura (ADAMS, 2007).

Para avaliação da atividade leishmanicida, as formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 164 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, cerca de 1x10⁶ parasitos foram distribuídos em placas de 96 poços e o óleo essencial foi previamente dissolvido em DMSO (Synth) e adicionado às culturas nas concentrações de 3,12 a 50 µg/mL. Anfotericina B foi adicionada nas culturas nas concentrações de 0,19 a 3,12

µg/mL. Para a atividade citotóxica, a obtenção dos macrófagos peritoneais, foi aplicado em camundongos BALB/c 500 µL de tioglicolato de sódio a 3 %, via intraperitoneal. As metodologias utilizadas neste trabalho para as atividades leishmanicida e citotóxica já foram previamente relatadas na literatura (ESTEVAM et al. 2016; DE LIMA et al. 2012).

Resultados e Discussão:

O óleo essencial das folhas de *O. odorifera* apresentou elevado rendimento de 1,5 %, semelhante ao rendimento observado anteriormente para o óleo essencial de *Endlicheria citriodora* outra espécie da família Lauraceae que apresentou o mesmo rendimento (YAMAGUCHI et al. 2013).

A análise do óleo essencial das folhas de *O. odorifera* exibiu uma mistura complexa de monoterpeno, sesquiterpenos e fenilpropanoides, com destaque aos fenilpropanoides (38,1 %), sesquiterpenos hidrocarbonados (30,0 %) e monoterpenos oxigenados (11,4 %). O total de constituintes identificados foi de 98,9%. O constituinte majoritário do óleo essencial das folhas de *O. odorifera* foi o safrol (36,3 %) Figura 1.

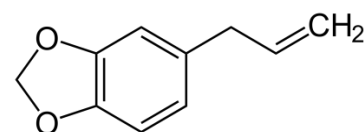


Figura 1 – Estrutura química do safrol

Os constituintes minoritários identificados foram: α-pineno (0,7 %), sabineno (2,5 %), β-pineno (0,9 %), p-cimeno (0,5 %), limoneno (1,6 %), eucaliptol (3,7 %), camfor (6,5 %), α-terpineol (1,2 %), bicicloelemeno (2,6 %), eugenol (1,8 %), α-copaeno (6,0 %), β-elemeno (2,7 %), β-cariofileno (1,3 %), aristoleno (3,9 %), α-humuleno (1,8 %), viridifloreno (4,2 %), γ-cadineno (6,6 %), δ-cadineno (0,9 %), espatulenol (5,8 %), globulol (1,4 %), γ-eudesmol (1,5 %), iso-espatulenol (0,3 %) e β-eudesmol (1,4 %).

A atividade leishmanicida observada no presente trabalho pode estar relacionada à presença do safrol que é comercializado no mundo inteiro sendo utilizado em vários ramos industriais, como no preparo de medicamentos com propriedades sudoríficas, antirreumáticas, antiparasitárias, antissifilíticas, diuréticas e como repelente de mosquitos e fixador em perfumes (PINTO-JUNIOR et al., 2010).

O óleo essencial das folhas de *O. odorifera* apresentou promissora atividade leishmanicida e quando testados frente às

formas promastigotas de *L. amazonensis*, observou-se um aumento da lise dos parasitos também com o aumento da concentração dos óleos essenciais, apresentando valor de CI_{50} de 4,67 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como padrão o anfotericina B ($CI_{50} = 1,88 \mu\text{g/mL}$).

Em relação à atividade leishmanicida, é descrito na literatura que amostras que exibem valores de $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ são consideradas altamente ativas, ativas ($10 < IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$), moderadamente ativa ($50 < IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) e inativa ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (DE LIMA et al. 2012).

O óleo essencial das folhas de *O. odorifera* exibiu toxicidade frente aos macrófagos peritonias de camundongos com valor de $CC_{50} = 49,52 \mu\text{g/mL}$, enquanto que o fármaco anfotericina B (controle positivo) demonstrou $CC_{50} = 51.86 \mu\text{g/mL}$. É descrito na literatura que amostras com $CC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ foram classificadas como altamente tóxicas, tóxicas ($10 < CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), moderadamente tóxicas ($100 < CC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$) e não tóxicas ($CC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) (DE LIMA et al. 2012).

Em suma, a forte atividade anti-*Leishmania* e a citotoxicidade observadas para o óleo essencial das folhas de *O. odorifera* são devidas ao fato de que a maioria dos óleos essenciais possui um grande número de constituintes que não possuem alvos celulares específicos. Os óleos essenciais possuem caráter apolar e podem facilmente atravessar as paredes celulares e membranas citoplasmáticas. Assim sendo, os componentes dos óleos essenciais atravessam a membrana, causam a coagulação do citoplasma, desnaturam as proteínas, interrompem vias metabólicas como a biossíntese de vários lipídios e podem finalmente levar à morte celular por necrose e apoptose (RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

Conclusões:

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que o óleo essencial de folhas de *O. odorifera* possui forte atividade anti-*Leishmania amazonensis* e apresentou-se tóxico contra macrófagos peritonias de camundongos. Entretanto, ainda são necessários estudos adicionais *in vivo* para justificar e avaliar melhor o potencial uso do óleo essencial das folhas de *O. odorifera* como agente leishmanicida.

Referências bibliográficas

ADAMS RP. 2007. In Identification of Essential Oil Components by Gas

Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 804 p.

BASTOS MM, BOECHAT N, HOELZ LVB AND OLIVEIRA AP. 2016. Antileishmanial chemotherapy: a review. Rev Virtual Quim 8: 2072-2104.

DE LIMA JPS, PINHEIRO MLB, SANTOS AMG, PEREIRA JLS, SANTOS DMF, BARISON A, SILVA-JARDIM I AND COSTA EV. 2012. *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). Rev Virtual Quim 4: 692-702.

ESTEVAM EBB, MIRANDA MLD, ALVES JM, EGEA MB, PEREIRA PS, MARTINS CHG, ESPERANDIM VR, MAGALHÃES LG, BOLELA AC, CAZAL CM, SOUZA AF AND ALVES CCF. 2016. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das folhas frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). Rev Virtual Quim 8: 1842-1854.

JACOB RG, OLIVEIRA DH, DIAS IFC, SCHUMACHER RF AND SAVEGNAGO L. 2017. Essential oils as a sustainable raw material for the preparation of products with higher value-added. Rev Virtual Quim 9: 294-316.

PINTO-JUNIOR AR, CARVALHO RIN, NETTO SP, WEBER SH, SOUZA E, FURIATTI RS. 2010. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. Ciência Rural 40: 637-643.

RAUT JS AND KARUPPAYIL SM. 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind Crops Prod 62: 250-264.

ROGATTO JM, FERREIRA MCC, ONO RM, CARVALHO LC, SOARES DF, VIEIRA DCM, CHAVASCO JK. 2014. Caracterização do potencial antimicrobiano de *Ocotea odorifera* (VELLOZO) ROHWER. Revista da Universidade Vale do Rio Verde 12: 886-894.

YAMAGUCHI KKL, VIEGA-JUNIOR VF, PEDROSA TN, VASCONCELLOS MC AND LIMA ES. 2013. Biological activities of essential oil of *Endlicheria citriodora*, a methyl geranate – rich Lauraceae. Quim Nova 36: 826-830.