

ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Vernonia remotiflora* E *Vernonia brasiliana*: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA**Ana Isabel V. Maia, Maria Conceição M. Torres e Oflia Deusdênia L. Pessoa**

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, CP 12.200, 60021-970 Fortaleza - CE, Brasil

Jane Eire S. A. de Menezes e Sônia Maria O. Costa

Centro de Ciências e Tecnologia, Curso de Licenciatura em Química, Universidade Estadual do Ceará, CP 1531, 60740-000 Fortaleza - CE, Brasil

Vanessa Lúcia R. Nogueira e Vânia Maria Maciel Melo

Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, 60455-970 Fortaleza - CE, Brasil

Elnatan B. de Souza, Maria Gilvânia B. Cavalcante e Maria Rose Jane R. Albuquerque*

Coordenação de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, CP D-3, 62040-340 Sobral - CE, Brasil

Recebido em 8/3/09; aceito em 22/10/09; publicado na web em 9/3/10

VOLATILE LEAF OILS OF *Vernonia brasiliana* AND *Vernonia remotiflora*: CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY. The chemical composition of the essential oils, obtained by hidrodistillation, from leaves of two *Vernonia* species (*V. remotiflora* and *V. brasiliana*), was determined by GC-FID and GC-MS. Both essential oils were predominantly constituted by sesquiterpenes (92.0 - 93.4%). The main constituents of the oil from *V. brasiliana* were (*E*)-caryophyllene (36.7%), germacrene D (35.5%), and α -humulene (11.7%), while (*E*)-caryophyllene (42.2%) and bicyclogermacrene (20.0%) were the major ones in the oil from *V. remotiflora*. Although with moderate activity both oils showed acetylcholinesterase and antibacterial activities.

Keywords: *Vernonia remotiflora*; *Vernonia brasiliana*; essential oils.

INTRODUÇÃO

A família Asteraceae (Compositae), abrange aproximadamente 1.100 gêneros incluindo 25.000 espécies, representadas na sua grande maioria por ervas, arbustos e subarbustos.¹ Plantas como *Baccharis trimera* (carqueja), *Matricaria chamomilla* (camomila), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Vernonia condensata* (boldo-da-bahia) e *Arnica montana* (arnica verdadeira), as quais são largamente comercializadas como fitoterápicos, têm conferido à família Asteraceae grande reputação, particularmente como produtora de compostos bioativos.²

O gênero *Vernonia*, um dos maiores e mais importante gênero da família Asteraceae, é representado por aproximadamente 1.500 espécies distribuídas especialmente nas regiões tropicais e sub-tropicais, sendo a África e a América do Sul, os principais centros de dispersão.³ Inúmeras espécies de *Vernonia* integram o elenco de plantas medicinais de várias partes do mundo, inclusive do Brasil, onde o uso de plantas como fonte de medicamentos é bastante difundido. Compostos bioativos como lactonas sesquiterpênicas com propriedades anticâncer e antiplasmódica,^{4,5} glicosídeos esteroidais com atividade anti-inflamatória⁶ e sesquiterpenoides citotóxicos⁷ têm sido isolados de plantas do gênero *Vernonia*. Adicionalmente, plantas deste gênero são ricas em glândulas oleíferas e muitos dos seus óleos essenciais apresentam atividades biológicas, como antimicrobiana e inseticida.^{8,9}

Como parte de um projeto de pesquisa cujo objetivo maior é estudar a composição química volátil e não volátil de asteráceas do Estado do Ceará, tem-se investigado os óleos essenciais e extratos de espécies de *Vernonia*.¹⁰ Neste trabalho é apresentada, pela primeira vez, a composição química dos óleos essenciais de exemplares de *V. brasiliana* e *V. remotiflora*. Em estudo preliminar demonstrou-se que o extrato de *V. brasiliana* possuía atividade sobre *Plasmodium berghei*

e *P. falciparum*.¹¹ Posteriormente, De Almeida e colaboradores isolaram, da referida espécie, um triterpeno com atividade antiplasmódica, corroborando a atividade expressada pelo extrato.¹² *V. remotiflora* (sinonímia: *Lepidaploa remotiflora*) também foi objeto de estudo, tendo sido isoladas uma flavona¹³ e uma série de lactonas sesquiterpênicas.¹⁴

PARTE EXPERIMENTAL**Material botânico**

As folhas de *V. brasiliana* e *V. remotiflora*, ambas em estágio de floração, foram coletadas nos municípios cearenses de Sobral (junho de 2008) e Crato (julho de 2007), respectivamente. As exsicatas correspondentes às plantas encontram-se arquivadas nos Herbários Francisco José de Abreu Matos - UVA (*V. brasiliana*, N^o 30.120) e Prisco Bezerra - UFC (*V. remotiflora*, N^o 40.672).

Extração dos óleos essenciais

Porções individuais de folhas frescas de *V. brasiliana* (300 g) e *V. remotiflora* (380 g) foram acondicionadas em balão de 5 L juntamente com 2 L de água destilada e submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho doseador tipo Clevenger, por um período de 2 h. Os óleos obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro (30 mg) e sob atmosfera de nitrogênio e, em seguida, acondicionados em recipientes de vidro e mantidos sob refrigeração (próximo de 5°C) antes da análise.

Análise dos óleos

A análise qualitativa dos óleos essenciais das duas espécies foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), em espectrômetro modelo 17A/QP5050-Shimadzu,

*e-mail: rjane_7@hotmail.com

equipado com coluna apolar de sílica OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: ionização por impacto de elétrons a 70 eV; hélio como gás de arraste e fluxo de 1 mL/min; injetor no modo *split* (1:48); gradiente crescente de temperatura de 4 °C/min, de 40 a 180 °C e 20 °C/min de 180 a 250 °C. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 e 280 °C, respectivamente. Os espectros foram obtidos numa faixa *m/z* 30–450.

A análise quantitativa dos óleos foi realizada em cromatógrafo Trace GC Ultra, da Thermo Electron Corporation, equipado com um detector de chama e coluna capilar apolar de sílica OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Os parâmetros utilizados foram semelhantes aos descritos acima

Identificação dos constituintes químicos

A análise qualitativa dos óleos essenciais foi realizada por CG/EM, enquanto o percentual dos constituintes individuais foi determinado por CG/DIC, onde o teor de cada componente foi determinado com base na área de cada pico relacionada com a área total dos picos no cromatograma. Cada componente do óleo foi identificado com base no tempo de retenção (considerando-se uma série homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₆), índice de Kovats, corrigido por regressão linear, bem como por comparação do padrão de fragmentação próprio de cada componente, com espectros de massa de banco de dados virtual (Biblioteca Wiley Class-5000) e, ainda, por comparação visual com espectros de massa registrados na literatura.¹⁵

Ensaio antimicrobiano

O potencial antimicrobiano dos óleos foi testado segundo a técnica de difusão em discos, de acordo com Bauer e colaboradores.¹⁶ Foram empregadas bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25619; *Enterobacter aerogenes*, ATCC 12472; *Salmonella choleraesuis*, ATCC 10708; *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 10031) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923; *Bacillus subtilis*, ATCC 6633). As culturas de bactérias obtidas a partir de suspensões em caldo BHI com densidades ajustadas à turvação do tubo com 0,5 da escala de McFarland (10⁸ UFC/mL) foram semeadas na superfície de placas de agar Muller-Hinton (Difco), com auxílio de *swab* estéril, de modo a se obter um crescimento uniforme e confluyente. Em seguida, discos de papel de filtro embebidos com 30 µL de cada óleo (100 µg/mL) foram colocados sobre o meio. Discos de antibióticos comerciais (Cecon, SP) foram usados como controles positivos e como controle negativo foi usado o solvente clorofórmio. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A inibição do crescimento microbiano foi avaliada pela formação de halos de inibição ao redor dos discos, com a leitura dos halos de inibição feita com paquímetro, através do fundo da placa, com iluminação contra um fundo escuro. Os ensaios foram feitos em duplicata com três repetições. Os resultados desta avaliação encontram-se descritos na Tabela 2.

Ensaio da atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

Os óleos essenciais de *V. brasiliiana* e *V. remotiflora* foram também avaliados sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE), segundo a metodologia descrita por Ellman,¹⁷ modificada por Rhee,¹⁸ e como detalhadamente descrita por Santos e colaboradores.¹⁹ Neste ensaio, alíquotas de 5 µL foram dissolvidas em clorofórmio, na concentração de 2 mg/mL. Como controle positivo utilizou-se fisoestigmina, droga referência para este teste.^{18,19} Em virtude de sua eficácia o método de Ellman tem sido rotineiramente empregado, como ensaio preliminar, na avaliação da atividade de metabólitos secundários sobre a enzima AChE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais das folhas de *V. brasiliiana* e *V. remotiflora* foram investigados pela primeira vez. Os rendimentos dos óleos (p/v), calculados sobre o peso fresco do material vegetal, foram de 0,1 e 0,2%, respectivamente. A constituição química dos óleos foi realizada em espectrômetro de massa acoplado a cromatógrafo gás-líquido, enquanto o teor de cada componente foi determinado em espectrômetro equipado com detector de ionização de chama. Na Tabela 1, estão sumarizados os constituintes químicos, seus respectivos percentuais, índices de Kovats e teores. Foi determinado um percentual acima de 92% da composição química de cada óleo. O óleo essencial de *V. brasiliiana* apresentou uma pequena fração de monoterpenos, representada por um único constituinte, α -pineno (2,8%). De forma semelhante, o óleo essencial de *V. remotiflora* também apresentou um pequeno teor de monoterpenos (1,0%). Exceto pela presença do sesquiterpeno óxido de cariofileno (3,8%), no óleo de *V. remotiflora*, ambos os óleos foram predominantemente constituídos por hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sendo (*E*)-cariofileno (36,7–42,2%) o componente mais abundante nas duas amostras. Como componentes majoritários, no óleo de *V. brasiliiana*, destacam-se também germacreno-D (35,5%) e α -humuleno (11,7%). Bicyclogermacreno, com um teor de 35,5%, aparece também como constituinte principal do óleo de *V. remotiflora*. O óleo essencial de *V. brasiliiana* apresentou menor complexidade e exceto pela presença de δ -cadineno (1,5%), todos os seus componentes químicos foram detectados no óleo de *V. remotiflora*. Em estudos prévios, investigou-se a composição química dos óleos essenciais de *V. chalybaea* e *V. scorpioides*¹⁰ e a exemplo das espécies em estudo, seus óleos apresentaram elevados teores de (*E*)-cariofileno, 12,1 e 30,6%, respectivamente.

Tabela 1. Constituintes químicos dos óleos essenciais das folhas de *V. brasiliiana* (OEVB) e *V. remotiflora* (OEVR)

| Constituintes ^a | IK ^b | IK ^c | OEVB (%) ^d | OEVR (%) ^d |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| α -pineno | 939 | 936-938 | 2,8 | 0,1 |
| β -pineno | 979 | 976 | - | 0,7 |
| limoneno | 1029 | 1029 | - | 0,2 |
| α -copaeno | 1377 | 1378-1387 | 5,2 | 1,6 |
| β -bourboneno | 1388 | 1395 | - | 0,8 |
| β -elemeno | 1391 | 1401 | - | 2,6 |
| α -gurjuneno | 1410 | 1410 | - | 4,1 |
| (<i>E</i>)-cariofileno | 1419 | 1425-1429 | 36,7 | 42,2 |
| α -humuleno | 1455 | 1456-1460 | 11,7 | 7,9 |
| allo-aromadendreno | 1460 | 1462-1466 | 1,7 | 2,9 |
| germacreno-D | 1485 | 1484-1485 | 35,5 | 4,6 |
| bicyclogermacreno | 1500 | 1497-1499 | 1,1 | 20,0 |
| δ -cadineno | 1524 | 1521 | 1,5 | - |
| <i>trans</i> -calamenene | 1529 | 1520 | - | 1,5 |
| óxido de cariofileno | 1583 | 1573 | - | 3,8 |
| Teor de monoterpenos | | | 2,8 | 1,0 |
| Teor de sesquiterpenos | | | 93,4 | 92,0 |
| Teor total identificado | | | 96,2 | 93,0 |

^aConstituintes químicos listados de acordo com ordem de eluição em coluna OV-5. ^bIK = Índices de Kovats da literatura.²⁸ ^cIK = Índices de Kovats corrigidos para os óleos (OEVB) e (OEVR). ^dPercentual obtido por CG-DIC.

Os óleos essenciais foram avaliados quanto as suas propriedades antimicrobianas, frente a um painel de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, conforme ilustrado na Tabela 2. Os óleos essenciais

Tabela 2. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *V. brasiliiana* (OEVB) e *V. remotiflora* (OEVR)

| | OEVB | OEVR | ^a Gentamicina | ^a Cefazolina | ^a Cefotaxima |
|------------------------|----------------------------------|------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Gram-negativas | Média dos halos de inibição (mm) | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> | 9 | 12 | - | - | 21 |
| <i>E. aerogenes</i> | 12 | 13 | 18 | - | - |
| <i>S. choleraesuis</i> | 10 | 12 | - | 28 | - |
| <i>K. pneumoniae</i> | 9 | 9 | - | 23 | - |
| Gram-positivas | ^a Clindamicina | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 14 | 14 | 31 | - | - |
| <i>B. subtilis</i> | 12 | 9 | 22 | - | - |

^aControle positivo. Controle negativo = CHCl₃, Concentração dos óleos, controles positivos e controle negativo = 30 µg ou 30 µL.

mostraram atividade antibacteriana de largo espectro, inibindo o crescimento de todas as espécies de bactérias gram-negativas e gram-positivas testadas. Entretanto, mostraram potências opostas frente às bactérias *P. aeruginosa* e *B. subtilis*. Essa resposta pode ser atribuída a um ou mais dos diferentes constituintes minoritários presentes nestes óleos.

Na literatura são inúmeros os trabalhos sobre óleos essenciais ricos em sesquiterpenos apresentando, inclusive, (*E*)-cariofileno como principal componente, com atividade antimicrobiana²⁰ e antifúngica.²¹ Adicionalmente, óleos ricos na mistura (*E*)-cariofileno/biclogermacreno ou (*E*)-cariofileno/germacreno D, também têm demonstrado potente atividade antimicrobiana.^{22,23}

Concomitante ao ensaio antimicrobiano, foi avaliada, através de ensaio em CCDA, a atividade dos óleos frente à enzima acetilcolinesterase (Tabela 3). Conforme descrito na Tabela 3, ambos os óleos apresentaram halos de inibição relativamente próximos ao da substância controle (fisoestigmina, halo de inibição de 9 mm), particularmente o óleo de *V. remotiflora*, cujo halo de inibição foi de 8 mm. Estes resultados demonstram moderada atividade anticolinesterásica e agregam valor às plantas do gênero *Vernonia*, como fonte de compostos bioativos. Dohi e colaboradores²⁴ mostraram, em recente publicação, que o sesquiterpeno (*E*)-cariofileno, principal componente de ambos os óleos, não exibe atividade acetilcolinesterásica. Considerando os teores de germacreno-D (OEVB, 35,5% e OEVR, 4,6%) e biclogermacreno (OEVB, 1,1% e OEVR, 20,0%), acredita-se que nenhum destes constituintes pode ser o responsável pela atividade. Assim, a atividade expressada pelos óleos das duas espécies investigadas pode ser devido a um dos componentes minoritários ou a uma ação sinérgica destes.

Tabela 3. Inibição da enzima acetilcolinesterase exibida pelos óleos essenciais de *V. brasiliiana* (OEVB) e *V. remotiflora* (OEVR)

| Óleos essenciais | Halos de inibição (mm) |
|----------------------------|------------------------|
| OEVB | 7 |
| OEVR | 8 |
| ^a Fisoestigmina | 9 |

^aControle positivo. Concentração dos óleos e controle positivo = 2 mg/mL.

AGRADECIMENTOS

Às instituições de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro e bolsas de pesquisa e estudo.

REFERÊNCIAS

- Barroso, G. M.; *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, Imprensa Universitária: Belo Horizonte, 1986.
- Mello, J. R. B.; Mello, F. B.; Langeloh, A.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, *27*, 752; Januário, A. H.; Santos, S. L.; Marcussi, S.; Mazzi, M. V.; Pietro, R. C. L. R.; Sato, D. N.; Ellena, J.; Sampaio, S. V.; França, S. C.; Soares, A. M.; *Chem. Biol Interact* **2004**, *150*, 243; Callegari, A.; Speroni M.; *Pat. EP2014295-A2* **2009**; Valverde, A. L.; Cardoso, G. L. C.; Pereira, N. A.; Silva, A. J. R.; Kuster, R. M.; *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 263; Alam, M.; *Pat. US2009104292-A1*; *WO2009055433-A1* **2009**.
- Miserez, F.; Potterat, O.; Marston, A.; Mungai, G. M.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 283.
- Erasto, P.; Grierson, D. S.; Afolayan, A. J.; *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 117.
- Pillay, P.; Vleggaar, R.; Maharaj, V. J.; Smith, P. J.; Lategan, C. A.; Chouteau, F.; Chibale, K.; *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1200.
- Liu, J.; Liu, Y.; Si, Y.; Yu, S.; Qu, J.; Xu, S.; Hu, Y.; Ma, S.; *Steroids* **2009**, *74*, 51.
- Hou, J.; Yang, S.-P.; Xie, B.-J.; Liao, S.-G.; Lin, L.-P.; Ding, J.; Yue, J.-M.; *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, 571.
- Awaad, A. S.; *J. Pharm. Sci.* **1999**, *24*, 21.
- Vagionas, K.; Ngassapa, O.; Runyoro, D.; Graikou, K.; Gortzi, O.; Chinou, I.; *Food Chem.* **2007**, *105*, 1711.
- Albuquerque, M. R. J. R.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Nunes, E. P.; Nascimento, R. F.; Silveira, E. R.; *Flavour Frag. J.* **2007**, *22*, 249; Albuquerque, M. R. J. R.; Souza, E. B.; Mesquita, E. F.; Nunes, E. P.; Cunha, A. N.; Silveira, E. R.; *J. Essent. Oil. Res.* **2001**, *13*, 376; Costa, F. J.; Bandeira, P. N.; Albuquerque, M. R. J.; Pessoa, O. D. L.; Silveira, E. R.; Braz-Filho, R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1691.
- Carvalho, L. H.; Brandão, M. G.; Santos-Filho, D.; Lopes, J. L.; Krettli, A. U.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1991**, *24*, 1113.
- De Almeida Alves, T. M.; Nagem, T. J.; Carvalho, L. H.; Krettli, A. U.; Zani, C. L.; *Planta Med.* **1997**, *63*, 554.
- Jacobs, H.; Bunbury, M.; McLean, S.; *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 1164.
- Valdés, D. A.; Bardón, A.; Catalán, C. A. N.; Gedris, T. E.; Herz, W.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1998**, *26*, 685.
- Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.
- Bauer, A. W.; Kirb, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M.; *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493.
- Ellman, G. L.; *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- Rhee I. K.; Meent, M. V.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R.; *J. Chromatogr.* **2001**, *915*, 217.
- Santos, R. P.; Trevisan, M. T. S.; Silveira, E. R.; Pessoa, O. D. L.; Melo, V. M. M.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 53.
- Formisano, C.; Senatore, F.; Bruno, M.; Bellone, G.; *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 848.
- Garg, S. C.; Siddiqui, N.; *Pharmazie* **1992**, *47*, 467.
- Costa, E. V.; Pinheiro, M. L. B.; Silva, J. R. A.; Maia, B. H. L. N. S.; Duarte, M. C. T.; Amaral, A. C. F.; Machado, G. M. C.; Leon, L. L.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 78.
- Limem-Bem Amor, I.; Neffati, A.; Bem Sgaier, M.; Bhourri, W.; Boukaber, J.; Skandrani, I.; Bouhlel, I.; Kilani, S.; Bem Ammar, R.; Chraief, I.; Hammami, M.; Ghoul, M.; Chekir-Ghedira, L.; Ghedira, K.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 845.
- Dohi, S.; Terasaki, M.; Makino, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4313.