

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Zanthoxylum petiolare* A. St. -Hil. & Tul (RUTACEAE)

Daniel Eugenio Saraiva Filho¹; Maria da Conceição Araújo Mesquita²; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle³

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Recursos Naturais (MARENA) pela UECE; E-mail: daniel.eugernio@aluno.uece.br, ²Maria da Conceição Araújo Mesquita, ³Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil químico e a atividade antifúngica do óleo essencial das folhas da espécie *Zanthoxylum petiolare*. Para isso foram realizados estudo fitoquímico e antifúngico. Os testes fitoquímicos, realizados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), evidenciou a presença de vários metabólitos secundários, onde os terpenos foram majoritários. Os testes de sensibilidade foram realizados por microdiluição em caldo em cepas de fungos dermatófitos e leveduriformes. Neste ensaio o óleo essencial da espécie em estudo não apresentou efeito frente às cepas de *Candida* spp. Por outro lado apresentou efeito inibitório contra as cepas de *Trichophyton rubrum*. Através deste estudo, a espécie de *Z. petiolare* foi considerada uma planta promissora para estudos posteriores com o propósito de se encontrar novos metabólitos com ações farmacológicas.

Palavras-Chave: Atividade farmacológica, Óleo essencial, Antifúngico.

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta grande parcela de sua população como consumidor de plantas com fins fitoterápicos, e esse consumo sofre variação dependendo da região. Estas plantas têm origem no cultivo caseiro ou são encontradas diretamente na flora silvestre, onde neste último caso são frequentemente comercializadas nas feiras livres (Reis; Mariot; Steenbock, 2003).

Com ampla distribuição nas regiões tropicais e temperadas do mundo, a família Rutaceae é constituída por mais de 1600 espécies distribuídas em cerca de 150 gêneros (Pirani & Costa, 1999). Segundo Barroso e colaboradores (1986), os gêneros da família

Rutaceae apresentam grande ocorrência de espécies na Austrália e África. No Brasil, a família está representada por aproximadamente de 29 gêneros e 182 espécies.

É uma família reconhecida pela produção de grande quantidade de metabólitos secundários, principalmente cumarinas, alcaloides, triterpenos e limonoides, bem como pela ampla atividade biológica de muitos desses metabólitos (Terezan *et al.*, 2010). O gênero *Zanthoxylum* apresenta mais de 200 espécies distribuídas por zonas tropicais e temperadas do mundo. É um dos gêneros mais conhecidos da família Rutaceae, com ocorrência em praticamente todo o Brasil, onde 25 espécies estão presentes (Pirani *et al.*, 2007).

Nos últimos anos os antimicrobianos de origem vegetal têm despertado o interesse da classe científica em consequência de suas atividades sobre grandes diversidades de microorganismos além de serem usados como alternativas aos antibióticos tradicionais (Deus; Alves; Arruda, 2011).

Desta forma inúmeras espécies de plantas são utilizadas como alternativa terapêutica em função da presença de metabólitos secundários com atividades antimicrobianas usualmente associadas aos seus óleos essenciais (OE). Os óleos essenciais são caracterizados como elementos voláteis que estão associados com inúmeras funções imprescindíveis à sobrevivência vegetal, exercendo papel crucial na defesa contra microorganismos. Além do mais, tem sido determinado cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% apresentam propriedades antimicrobianas (LIMA *et al.*, 2006). Assim várias pesquisas vêm evidenciando efeitos de compostos com atividades biológicas extraídos de óleos essenciais, de forma a assumir o papel de fungicidas naturais (BRITO *et al.*, 2015).

Neste sentido, a referida pesquisa buscou identificar a composição química do OE de *Z. petiolare*, assim como avaliar sua capacidade antifúngica frente a cepas de fungos dermatófitos e leveduriformes.

METODOLOGIA

Extração do óleo essencial

Logo após a coleta da planta, a extração do O.E ocorreu pelo método de hidrodestilação, as folhas foram separadas dos caules e colocadas em um balão juntamente com 2, 5L de água destilada, onde permaneceram por um período de 2 horas em hidrodestilador tipo Clevenger. Após esse processo foi realizada a coleta do O.E em

recipiente de vidro, sua pesagem e estocagem em refrigerador para posteriores análises.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

A análise por CG-EM foi realizada em um instrumento Agilent modelo GC-7890B /MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), gás carreador hélio com fluxo 1,00 mL.min⁻¹, temperatura do injetor 250 °C, detector a 150 °C e linha de transferência a 280 °C. Foi a seguinte programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min⁻¹ até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos ocorreu pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecidos pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 – 243.893 compostos), e de dados da literatura.

TESTE DE SENSIBILIDADE

Microorganismos

Os testes foram realizados contra fungos dermatófitos e leveduriformes que se encontravam estocados e identificados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú (LAMIC-UVA), as cepas utilizadas foram repicadas em meio de cultura Sabouroud Dextrose Ágar, incubadas em estufa fúngica com temperatura em torno de 37° C por um período de 24 a 48h para o crescimento das leveduras e 5 a 7 dias para dermatófitos.

Microdiluição em caldo

Para o teste de sensibilidade antifúngica utilizou-se uma amostra de 10 mg do O.E pesada em balança analítica de precisão, em seguida diluída em 1 mL de óleo mineral e homogeneizada em agitador Vortex. O procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar para evitar contaminações externas. Em microplacas para microtitulação estéreis com 96 poços foram adicionados com uma micropipeta 100µL do meio de cultura RPMI-1640 Medium (*Roswell Park Memorial Institute médium*) em

todos os poços. Posteriormente, foi adicionada a amostra (O.E) em duplicata na primeira linha da placa e então, fizeram-se diluições seriadas. Na última linha foi adicionados 100µL da droga controle, Anfotericina B para leveduras e Cetoconazol para dermatófitos, os quais sofreram diluições seriadas. Ao final, foi adicionado o inóculo fúngico em todos os poços da placa, exceto no controle negativo. As placas foram embaladas em papel filme e colocadas em estufa com temperatura em torno de 37°C para o crescimento dos microorganismos, 24 a 48h para leveduras e 5 a 7 dias para dermatófitos. Desta forma, a leitura das placas consistiu na visualização do crescimento ou inibição fúngica.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada conforme o método descrito por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M38-A), onde é definida pela menor concentração de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microorganismo no teste de sensibilidade por diluição em caldo. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi indicada conforme o método descrito por Fontenelle *et al.*, (2007) que é determinada como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de matar um microorganismo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na composição química do óleo essencial de *Z. petiolare*, três compostos foram considerados majoritários, destacando-se o spathulenol, com 19,85% da área total, seguido pelo geranial, com 16,31%, e com 12,54%, o cis-Citral. Outros compostos também foram detectados em quantidades menores (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do OE de *Zanthoxylum*.

Composto	¹ IK _{calc}	² IK _{lit}	Área (%)
cis-3-Hexen-1-ol	851	855	0,73
6-Methyl-5-heptene-2-one	987	985	0,83
D-Limonene	1031	1024	5,39
Linalool	1102	1095	0,46
Nerol	1230	1227	2,41
cis-Citral	1244	1235	12,54
Geraniol	1256	1249	1,93
Geranial	1273	1264	16,31
2-Undecanol	1302	1303	0,54
δ-Elemene	1342	1335	1,32

α -Copaene	1382	1374	1,24
Geranylacetate	1385	1379	2,11
β -Bourbonene	1392	1387	0,94
β -Cubebene	1396	1387	1,24
Spathulenol	1587	1577	19,85
Caryophyllene oxide	1590	1582	0,95
Viridiflorol	1593	1592	5,44
Humuleneepoxide II	1620	1608	2,03
α -Muurolol	1651	1644	3,52
α -Cadinol	1664	1652	8,62
Composição Total			93,80

¹Valores de IK calculado.

²Valores de IK da literatura (Adams, 2007).

Segundo a literatura, Arruda e colaboradores, 1994 confirmam o isolamento de sete compostos extraídos de extratos das folhas de *Z. petiolare*, dos quais cinco foram anteriormente caracterizados erroneamente como sendo de *Z. acutifolium*: (+) - sesamina, (+) - piperitol, (+) - piperitol-y, y-éter dimetilalílico, (E,E,Z)-N-(2-metilpropil)-2,4,8-tetradecatrienamida, lionirosinol-3- α -O- β -glucopiranosídeo, bem como os novos compostos protolimonóides e lignanas. Procedimentos de isolamento semelhantes realizados com as hastes da mesma planta produziu os compostos 3,6,7, sitosterol, (E,E)-N-(2-metilpropil) - 2,4_tetradecadienamida e lupeol.

Os metabólitos detectados na espécie estudada corroboram com os resultados descritos na literatura para o gênero *Zanthoxylum*, conhecido por apresenta flavonoides, alcaloides, taninos, esteroides, saponinas e triterpenoides em sua composição (Brito *et al.*, 2015).

No que concerne a atividade antifúngica, para as espécies de leveduras *Candida tropicalis* e *Candida albicans*, não foi detectada nenhuma atividade anti *Candida* para o OE da espécie de *Z. petiolare* durante o teste de sensibilidade por microdiluição em caldo. Este comportamento apresentado pelas espécies vegetais pode estar associado entre outros fatores como o tipo de extrato, parte vegetal e procedência dos isolados fúngicos (Giordani, *et al.*, 2015).

A tabela 2 apresenta os valores de CIM e CFM do OE de *Z. petiolare* contra as cepas testadas. Na avaliação CIM, observou-se que o OE de *Z. petiolare* exerce efeitos inibitório em concentrações que variaram de 0,156 mg/mL à 0,312 mg/mL, contra as cepas de dermatófitos.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *Z. petiolare* frente às espécies de *Trichophyton rubrum* e *Candida sp.*

Espécie	Óleo essencial	<i>T. rubrum</i> LABMIC 0204		<i>T. rubrum</i> LABMIC 0208		<i>T. rubrum</i> LABMIC 0209		<i>T. rubrum</i> LABMIC 0210	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
		(mg/mL)		(mg/mL)		(mg/mL)		(mg/mL)	
<i>Z. petiolare</i>	Folhas	0,312	0,625	0,156	0,312	0,156	0,312	0,312	0,625
Cetoconazol		-		-		-		-	
Espécie	Óleo essencial	<i>C. tropicalis</i> LABMIC 0110		<i>C. tropicalis</i> LABMIC 0112		<i>C. albicans</i> LABMIC 0104		<i>C. albicans</i> LABMIC 0103	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
		(mg/mL)		(mg/mL)		(mg/mL)		(mg/mL)	
<i>Z. petiolare</i>	Folha	N.I		N.I		N.I		N.I	
Anfotericina B		-		-		-		-	

LABIMIC: Laboratório de Microbiologia; NI: Não inibiu.

Para as amostras que apresentaram atividade antifúngica, este efeito pode estar concernente a diversos metabólitos secundários, como é o caso de saponinas, terpenos, alcaloides, cumarinas, lignanas e esteróides sendo alguns desses identificados no presente estudo (Goulart *et al.* 2013).

Na literatura foram encontrados vários estudos referentes ao potencial antifúngico para espécies do gênero *Zanthoxylum* como, por exemplo, *Z. rhoifolium* frente a cepas de *C. albicans* (Tavares *et al.*, 2014), *Z. budrunga* frente a cepas de *Aspergillus fumigatus*, *Hensinela californica* e *Rhizopus orizae* (Islam, *et. al.*, 2001), *Z. tingoassuiba* frente a cepas de *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* e *T. rubrum* (Detoni *et al.*, 2009). Entretanto, em alguns casos as espécies foram testadas por métodos diferentes dos empregados neste estudo.

CONCLUSÃO

O gênero *Zanthoxylum*, de acordo com o levantamento realizado, apresenta diversas classes de metabólitos secundários na constituição química de suas partes vegetativas, no entanto o estudo fitoquímico da espécie *Z. petiolare* proporcionou o isolamento e a identificação de uma mistura de triterpenos, classe de metabólitos muito

comum em espécies do gênero. Evidenciou-se ainda atividade antifúngica do OE da referida espécie frente aos dermatófitos testados. Entretanto não foi observada atividade contra as cepas de *Candida* spp testadas.

REFERÊNCIAS

- Arruda, M. S. P. et al. Protolimonoid and lignans from *Zanthoxylum petiolare*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p.1303-1306, 1994.
- Brito, D. I. V. et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, supl. II, p.836-844, 2015.
- Detoni, C. B. et al. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 8, p. 684 – 691, 2009.
- Deus, R. J. A.; Alves, C. N.; Arruda, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.1-7, 2011.
- Giordani, C.; Santin, R.; Cleff, M. B. Levantamento de extratos vegetais com ação anti-*Candida* no período de 2005-2013. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.175-185, 2015.
- Goulart, L.S. et al. Prospecção antifúngica em *Agonandra brasiliensis* Antifungal prospecting in *Agonandra brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 289 – 294, 2013.
- Islam, A. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. **Fitoterapia**, v. 72, ed. 4 , p. 428-430, 2001.
- Lima, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida* de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev Bras Farmacogn** v. 16, p. 197-201, 2006
- Pirani, J. R. Revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae). Análise cladística de Pteleinae. Sinopse de *Rutaceae* do Brasil. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999
- Pirani, J. R.; Costa, M. A. S. Rutaceae. In: Ribeiro, J. E. S. Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Pirani, J. R.; Begale, F. F.; Silva, F. G, 2007.
- Reis, M. S.; Mariot, A.; Steenbock, W. Diversidade e Domesticação de Plantas Mediciniais. In. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed., Porto Alegre/ Florianópolis, p. 45-74, 2003.

Tavares, L. C. et al. Structure-Activity Relationship of Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium* Having Antimicrobial Activity. **Journal PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

Terezan, A. P. et al. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (*Rutaceae*) in leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 882-886, 2010.