



# Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*

Cardoso, C.A.L.<sup>1,2\*</sup>; Silva, J.R.M.<sup>2</sup>; Kataoka, V.M.F.<sup>1</sup>; Brum, C.S.<sup>1</sup>; Poppi, N.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS, Dourados, MS, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

Recebido 10/08/2008 - Aceito 12/02/2009

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, toxicidade e composição por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *C. pubescens*. Pela comparação da atividade antioxidante em termos de  $CI_{50}$  o método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico apresentou melhor resposta (880  $\mu\text{g/mL}$ ) que o método radical livre DPPH (1780  $\mu\text{g/mL}$ ). O método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico tem como característica responder melhor para amostras mais apolares enquanto que o método com DPPH para amostras mais polares. O extrato hexânico apresentou em sua composição sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados e  $\beta$ -sitosterol. O extrato não foi considerado tóxico para *Artemia salina*.

*Palavras-chave:*  $\beta$ -sitosterol; atividade antioxidante; *C. pubescens*.

## INTRODUÇÃO

Os conhecimentos sobre plantas medicinais foram acumulados ao longo do tempo até chegarem aos dias atuais e constituem o conhecimento popular sobre as ervas medicinais. Atualmente, o conhecimento da composição química das plantas medicinais torna-se necessário para a confirmação da presença dos princípios ativos.

O isolamento de mono e sesquiterpenos é um trabalho que exige cuidado, pois são compostos voláteis ou de fácil volatilização o que pode acarretar em grande perda de massa durante o trabalho de isolamento. Uma forma rápida de analisar os componentes voláteis dos óleos essenciais, entre eles os mono e sesquiterpenos, sem grandes riscos de perder a amostra é utilizar a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Esta técnica de separação e análise é bastante empregada na identificação e quantificação de substâncias voláteis ou facilmente volatilizáveis (Zhao et al., 2005).

A família Myrtaceae apresenta cerca de 140 gêneros com aproximadamente 3000 espécies. Ela é dividida em duas

subfamílias: Myrtoideae, de ampla ocorrência na América tropical, e Leptospermoideae, que ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia (Limberger et al., 2004).

A espécie *Campomanesia pubescens* (D.C.) O. Berg. é frutífera de porte arbustivo, com 1-2 m de altura. A floração de *C. pubescens* ocorre de agosto a setembro. Os frutos de ambas amadurecem em novembro-dezembro e apresentam polpa succulenta de sabor acidulado (Lorenzi et al., 2006).

Estudos químicos, empregando CLAE, com as folhas relataram a presença de quercetina, miricitrina e rutina em *C. xanthocarpa*; miricitrina em *C. pubescens* e miricitrina e quercetina em *C. guazumaefolia* (Schmeda-Hirschmann, 1995).

Não existem na literatura outros trabalhos da composição química de *C. pubescens*.

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, toxicidade e composição por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *C. pubescens*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta, identificação e preparação do extrato vegetal

As folhas de *C. pubescens* (D.C.) O. Berg. foram coletadas em dezembro de 2006, no Estado do Mato Grosso do Sul, na cidade de Campo Grande-MS. A exsiccata 2031 foi depositada no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) em Dourados.

As folhas frescas (800 g) de *C. pubescens* foram trituradas em liquidificador e extraídas por maceração com hexano (2 L), à temperatura ambiente por sete dias, por três vezes consecutivas. O solvente foi removido sob pressão reduzida, fornecendo 7,39 g de extrato. Foi obtida uma porcentagem de 0,92 de extrato hexânico em relação à massa das folhas frescas. O extrato hexânico das folhas de *C. pubescens* foi diluído em hexano para a concentração de 2,20 mg/mL e foi imediatamente analisado por CG-EM.

\*Autor correspondente: Claudia Andrea Lima Cardoso - Curso de Química - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS - Rodovia Dourados-Itahum, km 12 - CEP: 79804-970 - Dourados - MS, Brasil - Telefone: (67) 3411-9216 - Fax: (67) 3411-9121 - e-mail: claudia@uems.br

### Análise por CG-EM

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em cromatógrafo Varian, GC 3900, equipado com detector de massas Varian Saturn 2100.

Foi empregada uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de poli-dimetil-siloxano com 5% de fenila (ZB-5, Varian), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e fase de 0,25  $\mu\text{m}$ , sob a condição: gás de arraste hélio (fluxo de 1 mL/min); volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ , razão de split (1:20), com temperatura inicial de 50°C e aquecimento de 50 °C a 250 °C a 3 °C/min e 250 °C a 280 °C a 5 °C/min. As temperaturas do injetor e do detector ion-trap foram de 240 °C e 280 °C, respectivamente, manifold a 70 °C e linha de transferência 240 °C. Os parâmetros do espectrômetro de massas incluíram impacto eletrônico a 70 eV, com intervalo de massas de 40-550 m/z e um intervalo de varredura de 0,5s.

A identificação das substâncias foi realizada através da comparação de seus índices de retenção e espectros de massas com os dados da literatura (Adams, 1995) e com a biblioteca do equipamento (Nist 2.0). Foi utilizada uma mistura de *n*-alcanos ( $\text{C}_8$ - $\text{C}_{22}$ ) como referência externa (1,56 mg/mL). Os índices de retenção foram calculados pelas fórmulas de Van den Dool e Kratz's (Zhao et al., 2005):

$$I = \frac{(T_{rx} - Tr_z)}{(T_{rz+1} - Tr_z)} 100 + 100z$$

onde: *I* é o índice de retenção para temperatura programada do analito,  $Tr_z$ ,  $Tr_{z+1}$ , e  $Tr_x$  são os tempos de retenção (em minutos) dos dois padrões de *n*-alcanos contendo *z* e *z*+1 átomos de carbono e da substância de interesse, respectivamente.

### Avaliação do seqüestro de radicais empregando o método DPPH

A determinação da atividade antioxidante empregando o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) a 0,004%, foi baseada na habilidade de compostos em doar um próton para o DPPH e formar estruturas de ressonância estáveis, estabilizando assim o radical livre. Este ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Blois (1958), onde alíquotas de 1 mL da amostra nas concentrações de 10-2200  $\mu\text{g/mL}$  foram adicionadas a 2 mL da solução de DPPH e incubada na temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorbância de cada amostra foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. O controle foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Com os dados obtidos foi calculado o  $\text{CI}_{50}$  do extrato.

O efeito "seqüestro" de radical (%) foi calculado usando a seguinte equação:

$$\text{Efeito "seqüestro" de radical (\%)} = (A_0 - A) \times 100 / A_0$$

Onde  $A_0$  é a absorbância do DPPH (controle) e *A* é a absorbância da amostra mais DPPH.

### Avaliação da inibição da peroxidação lipídica empregando o método $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

O ensaio de atividade antioxidante empregando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi realizado como descrito por Tepe et al. (2005) com algumas modificações. Uma solução estoque de  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico foi preparada a partir de 0,5 mg de  $\beta$ -caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio e adicionado a 25  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico e 200 mg de Tween 20. O clorofórmio foi removido sobre nitrogênio líquido. A mistura resultante teve seu volume completado para 100 mL de água milli-Q aerada. O teste foi realizado através da adição de 2,5 mL da mistura e 0,3 mL de amostra nas concentrações de 10-2200  $\mu\text{g/mL}$  e imediatamente a leitura foi realizada no tempo zero a 470 nm e duas depois dos tubos permanecerem incubados a 50 °C em banho-Maria. O controle foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Com os dados obtidos foi calculado o  $\text{CI}_{50}$  do extrato.

A inibição da peroxidação foi calculada a partir da equação:

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = (\text{conteúdo de } \beta\text{-caroteno depois de 2 hs do ensaio} / \text{conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100.$$

### Teste de toxicidade sobre *Artemia salina*

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados em um béquer contendo água marinha artificial (38,0 g sal marinho/L), ficando sob luz e oxigenação por 24 horas. Após esse período foram colocadas, em média, 10 larvas recém eclodidas em frascos na concentração de 550, 1100 e 2200  $\mu\text{g/mL}$  do extrato dissolvidos em água marinha artificial. A contagem das larvas foi realizada 24 horas após o contato das mesmas com as soluções. Os dados foram tratados em um programa que utiliza o sistema Probitos de análise para o cálculo da  $\text{DL}_{50}$ , que é a dose letal para 50% dos indivíduos de uma população.

## RESULTADO

Os rendimentos do extrato hexânico das folhas foi de 0,92 %. A Tabela 1 apresenta a composição química do extrato hexânico das folhas, onde a percentagem relativa foi obtida empregando a área de cada pico em relação ao somatório das áreas de todos os picos do cromatograma.

No extrato hexânico das folhas foram identificados sesquiterpenos e triterpenos (Figura 1), os quais são substâncias de baixa polaridade. Em relação ao

sesquiterpenos foram vinte e três compostos representando 58,8 % da área relativa da amostra, sendo que destes os sesquiterpenos hidrocarbonetos corresponderam a 34,8 % da área relativa, enquanto os oxigenados representaram 24,0 %. Os majoritários foram biciclogermacreno (13,6%), espatulenol (12,6%), germacreno D (10,4%),  $\delta$ -cadineno (2,6%) e  $\alpha$ -cadinol (2,6%). O  $\beta$ -sitosterol (21,8 %) foi identificado na amostra pela análise do espectro de massas e também pela co-adição desta na amostra.

Tabela 1 - Sesquiterpenos do extrato hexânico das folhas de *C. pubescens*.

	Compostos	HexFo	$I_{Cal.}$	$I_{Lit.}$
01	$\delta$ -Elemeno	0,7	1337	1339
02	$\beta$ -Elemeno	1,0	1392	1391
03	<i>E</i> -Caryofileno	1,5	1420	1418
04	$\alpha$ -Humuleno	1,3	1454	1454
05	$\gamma$ -Muuroleno	0,7	1477	1477
06	Germacreno D	10,4	1481	1480
07	Biciclogermacreno	13,6	1497	1494
08	<i>trans</i> - $\beta$ -Guaieno	0,6	1501	1500
09	Germacreno A	0,3	1506	1503
10	$\gamma$ -Cadineno	1,2	1515	1513
11	$\delta$ -Cadineno	2,6	1524	1524
12	Germacreno B	0,8	1557	1556
13	<i>E</i> -Nerolidol	2,1	1564	1564
14	Espatulenol	12,6	1577	1576
15	Globulol	2,5	1583	1583
16	$\beta$ -óxido de Himachaleno	0,4	1609	1610
17	$\alpha$ -Acorenol	1,0	1628	1630
18	$\gamma$ -Eudesmol	0,3	1632	1630
19	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0,9	1641	1640
20	$\alpha$ -Muurolol	0,3	1646	1645
21	$\beta$ -Eudesmol	0,5	1650	1649
22	$\alpha$ -Cadinol	2,6	1654	1653
23	Criptomeridiol	0,8	1809	1808
Total	Sesquiterpenos	58,8		
	Hidrocarbonetos	34,8		
	Oxigenados	24,0		

<sup>1</sup>Compostos em ordem de eluição. HexFo = extrato hexânico das folhas.  $I_{Cal.}$  = índice de retenção de temperatura-programada;  $I_{Lit.}$  = índice da literatura (Adams, 1995).

O ensaio com o radical livre DPPH é seguido da diminuição da absorbância de 517 nm, no qual ocorre a redução de antioxidantes devido à habilidade das substâncias em transferir átomos de hidrogênio para os radicais (Djeridane et al., 2006).

O extrato hexânico de *C. pubescens* apresentou baixo efeito de “seqüestro” de radical, e não surgimento da coloração amarela em nenhuma das concentrações testadas. Sendo obtido um valor de  $CI_{50}$  de 1780  $\mu$ g/mL para o extrato.

O ensaio  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico simula a oxidação dos componentes celulares da membrana lipídica em presença de antioxidantes, assim como, a capacidade de inibição da formação de radicais peróxidos a partir da oxidação do ácido linoléico (Mata et al., 2007).

O extrato hexânico de *C. pubescens* apresentou um valor de  $CI_{50}$  de 880  $\mu$ g/mL frente ao teste  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Nas concentrações acima de 1100  $\mu$ g/mL houve a manutenção da coloração alaranjada do  $\beta$ -caroteno a qual indica ação antioxidante e pode ser observada visualmente.

biciclogermacreno (13,6%), espatulenol (12,6%), germacreno D (10,4%),  $\delta$ -cadineno (2,6%) e  $\alpha$ -cadinol (2,6%). O  $\beta$ -sitosterol (21,8 %)

O extrato hexânico não apresentou mortalidade dos microcrustáceos na concentração de 2200  $\mu$ g/mL.

## DISCUSSÃO

A comparação da atividade antioxidante em termos de  $CI_{50}$  o método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico apresentou melhor resposta do que para o método radical livre DPPH. O método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico tem como característica responder melhor para amostras mais apolares enquanto que o método com DPPH para amostras mais polares. (Sultana et al., 2007). Sendo que pela composição obtida e também pela polaridade do extrato este é rico em substâncias de baixa polaridade. A baixa resposta para o teste com o radical livre DPPH pode ser atribuída à ausência de conjugação para formação de estruturas de ressonância estáveis durante a formação do radical nestas moléculas (Di Majo et al., 2005). As substâncias identificadas apresentam uma capacidade do seqüestro de oxigênio, em função de suas duplas ligações, o que contribui significativamente para a atividade antioxidante no ensaio do ácido linoléico (Sultana et al., 2007). A literatura relata que respostas diferentes são determinadas para os mesmos extratos ou substâncias nos dois testes o que é atribuído às diferenças estruturais dos componentes das amostras, pois cada teste tem um princípio distinto de oxidação (Sultana et al., 2007).

Segundo Siqueira et al. (1998) um extrato para ser considerado tóxico deve apresentar uma reposta de  $CI_{50}$  para *Artemia salina* menor que 1000  $\mu$ g/mL. Como no presente estudo o extrato hexânico não apresentou mortalidade dos microcrustáceos na concentração de 2200  $\mu$ g/mL este não foi considerado tóxico.

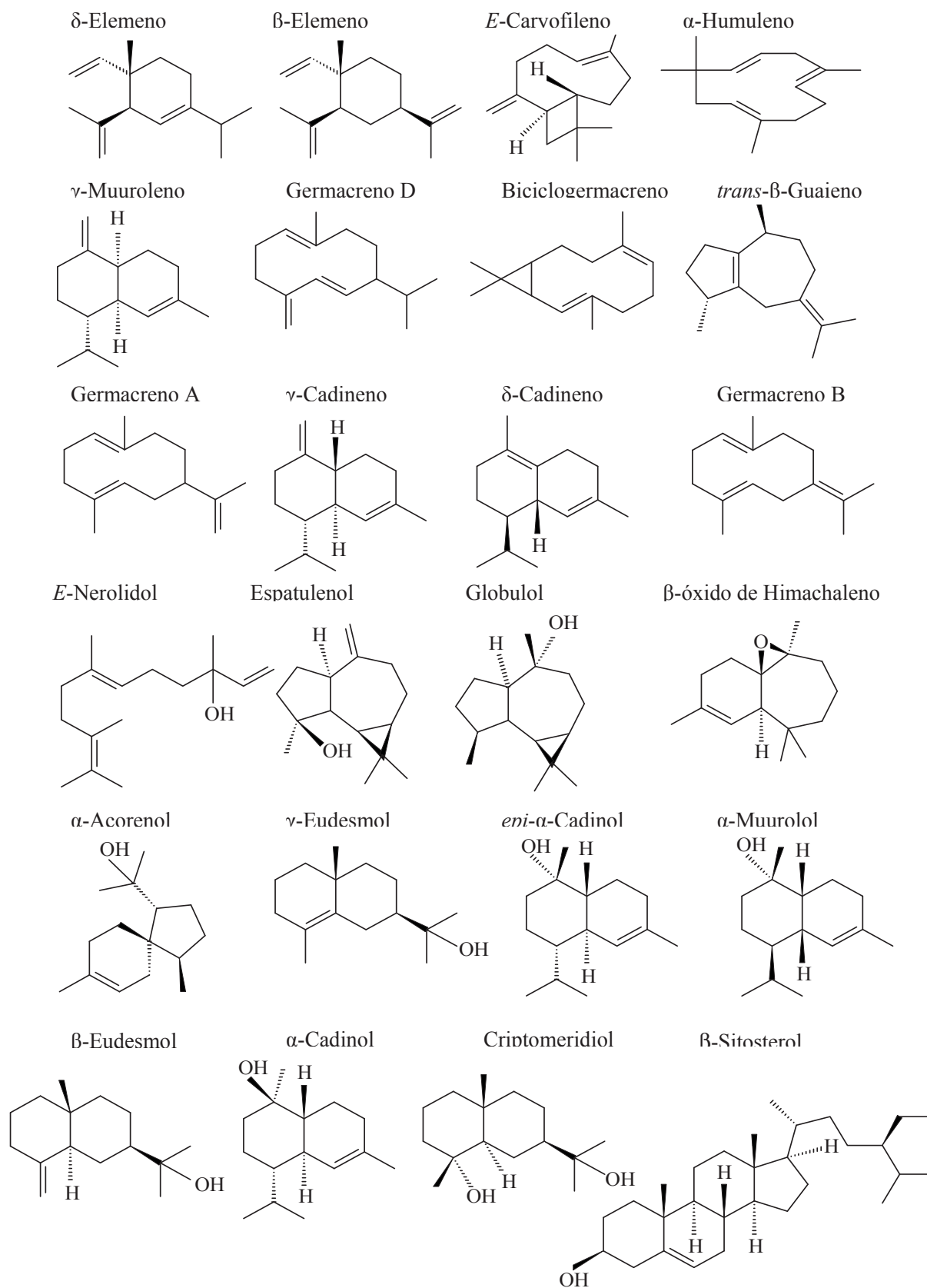


Figura 1. Substâncias identificadas no extrato hexânico das folhas de *C. pubescens*.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (Fundect) pelo apoio financeiro concedido a pesquisa, UEMS e CNPq.

## ABSTRACT

*Assessment of antioxidant activity, toxicity and chemical composition by GC-MS of the hexane extract from the leaves of Campomanesia pubescens*

**In this study, the antioxidant activity, toxicity and composition of the hexane extract of *C. pubescens* leaves were assessed. By comparing the antioxidant activity results, expressed in terms of the IC<sub>50</sub>, the  $\beta$ -carotene/linoleic acid method gave a better response (880  $\mu$ g/mL) than the DPPH free radical method (1780  $\mu$ g/mL). The first method is known to respond better to samples of low polarity and the DPPH method to more polar samples. GC-MS analysis of the hexane extract indicated the presence of hydrocarbon and oxygenated sesquiterpenes and  $\beta$ -sytosterol. The extract was not considered toxic to *Artemia salina*.**

**Keywords:**  $\beta$ -sytosterol; antioxidant activity; *C. pubescens*

## REFERÊNCIAS

Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation; 1995. 469p.

Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181:1199-200.

Di Majo D, Giammanco M, La Guardia M, Trípoli E, Giammanco S, Finotti E. Flavanones in citrus fruit: structure-antioxidant activity relationships. *Food Res Intern* 2005; 38(10):1161-6.

Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 2006; 97:654-60.

Limberger RP, Sobral M, Henriques AT, Menut C, Bessi re J-M.  leos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quím Nova* 2004; 27:916-9.

Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: (de consumo in natura)*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda; 2006. p.186.

Mata AT, Proença C, Ferreira AR, Serralheiro MLM, Nogueira JMF, Araújo MEM. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem* 2007; 103:778-86.

Schmeda-Hirschmann G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. *Fitoterapia* 1995; 66:373-4.

Siqueira JM, Bomm MD, Pereira NFG, Garcez WS, Boaventura MAD. Estudo químico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Qu m Nova* 1998; 21:557-9.

Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chem* 2007; 104:1106-14.

Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem* 2005; 90:333-40.

Zhao CX, Liang YZ, Fang HZ, Li XN. Temperature-programmed retention indices for gas chromatography-mass spectroscopy analysis of plant essential oils. *J Chromatogr A* 2005; 1096:76-85.