



© 2015

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 14 (1): 42 - 47

ISSN 0717 7917

www.blacpma.usach.cl

Artículo Original | Original Article

Composição química e atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* Cowan

[Chemical composition and cytotoxic activity of essential oils from the leaves and stems of *Eperua duckeana* Cowan]

Lidiam Maia LEANDRO¹, Valdir Florêncio da VEIGA-JUNIOR¹,
André Pablo Bezerra SALES² & Cláudia do Ó PESSOA²

¹Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas Manaus – AM, Brasil.

²Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE, Brasil

Contactos / Contacts: Valdir Florêncio da VEIGA-JUNIOR - E-mail address: valdirveiga@ufam.edu.br

Abstract: Essential oils from leaves and stems of *Eperua duckeana* Cowan (Fabaceae) were extracted by hydrodistillation and analyzed by GC/FID and GC/MS. Sixteen and nineteen components were identified by comparison by their retention indices (RI) and mass spectra. The major components identified in leaves were (E)-caryophyllene (31.8%), caryophyllene oxide (25.7%) and α -humulene (4.4%), and stems (E)-caryophyllene (34.5%) and germacrene D (25.9%). The stems oil essential showed high cytotoxicity against tumor cell lines of leukemia (HL-60). This is the first report regarding the essential oil composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Eperua duckeana* Cowan.

Keywords: Fabaceae, Amazon, cytotoxicity

Resumo: Óleos essenciais de folhas e galhos de *Eperua duckeana* Cowan (Fabaceae) foram extraídos por hidrodestilação e analisados por CG-DIC e CG-EM. Dezesesseis e dezenove componentes foram identificados por comparação com seus índices de retenção (IR) e espectros de massas. Os componentes principais identificados nas folhas foram o (E)-cariofileno (31,8%), óxido de cariofileno (25,7%) e o alfa-humuleno (4,4%), nos galhos (E)-cariofileno (34,5%) e o D-germacreno (25,9%). O óleo essencial dos galhos mostrou alta citotoxicidade contra linhagens de células de leucemia (HL-60). Esse é o primeiro relato abordando a composição dos óleos essenciais e a atividade citotóxica do óleo essencial de *Eperua duckeana* Cowan.

Palavras-chave: Fabaceae, Amazon, citotoxicity

Recibido | Received: 24 de Marzo de 2013

Aceptado | Accepted: 26 de abril de 2014

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 15 de Noviembre de 2014

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2015

Declaración de intereses | Declaration of interests: Ao CNPq, CAPES, LPN e UFPI

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: LM Leandro, VF Veiga-Junior, APB Sales, CÓ Pessoa. 2015. Composição química e atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* Cowan **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 14(1): 42 – 47.

INTRODUÇÃO

O gênero *Eperua* (Fabaceae) é constituído por quatorze espécies endêmicas da Amazônia Central (Cowan, 1975). As espécies encontradas na Amazônia brasileira são conhecidas popularmente como Muirapiranga (Silva *et al.*, 2004) e as madeiras, comercializadas como “wallaba”, são usadas em construções pesadas devido a sua particular resistência à deterioração em contato com a água, assim como para lenha e carvão vegetal (Cowan, 1975).

Algumas das espécies desse gênero, principalmente *E. oleifera*, *E. purpurea* e *E. falcata*, exsudam um óleo resina que é utilizado na medicina popular de modo análogo ao da copaíba, como cicatrizante, antifúngico e bactericida (Veiga-Junior & Pinto, 2002). Uma revisão recente realizada por Leandro & Veiga-Junior (2012) revela que as classes de substâncias investigadas nesse gênero são: terpenos, principalmente diterpenos de esqueletos labdano (King & Jones, 1955; Medina & De Santis, 1981; De Santis & Medina, 1987; Maillou *et al.*, 1987; Ávila & Medina, 1993; Amusant *et al.*, 2007) e clerodano (Ávila & Medina, 1991; Ávila *et al.*, 1992; Ávila & Medina, 1993); além de flavonóides (Braz-Filho *et al.*, 1973; Villeneuve e Vergnet, 1988; Royer *et al.*, 2010). O único sesquiterpeno relatado em espécies do gênero *Eperua* é o (*E*)-cariofileno, detectado no óleo essencial de *E. bijuga* (Maia & Andrade, 2009). Para esse sesquiterpeno têm sido atribuídas várias atividades biológicas, tais como: antitumoral (Loizzo *et al.*, 2007; Goren *et al.*, 2011), imunomoduladora (Goren *et al.*, 2011), anti-inflamatória (Passos *et al.*, 2007), anestésica (Ghelardini *et al.*, 2001), prevenção e tratamento de colites (Cho *et al.*, 2007) e antimicrobiana (Sabulal *et al.*, 2006).

As árvores da espécie *E. duckeana* são conhecidas por “muirapiranga de folha miúda” (Silva *et al.*, 2004) ou “Pau-de-óleo” (Veiga-Junior & Pinto, 2002) e apesar de serem comuns na Amazônia Central, nunca foram estudadas química ou farmacologicamente. O objetivo deste trabalho foi a análise da composição dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* coletada no Amazonas além da avaliação da citotoxicidade em linhagens de células tumorais de câncer de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295), colorretal (HCT 116) e leucemia (HL-60).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material

O material vegetal da espécie *E. duckeana* foi coletado na Reserva Florestal Ducke em Manaus (AM), em outubro 2009. Essa espécie foi identificada durante o projeto “Flora da Reserva Ducke” (Ribeiro, 1999) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia– INPA e encontra-se identificada e catalogada e sua exsiccata depositada no herbário do INPA sob registro Nº 230699.

Extração dos óleos essenciais

O material vegetal (folhas e talos) foi seco à temperatura ambiente e triturado em moinho de facas. As amostras foram submetidas ao processo de hidrodestilação em extrator do tipo Clevenger modificado por um período de 4h. Os óleos essenciais foram tratados com sulfato de sódio anidro e conservados sob refrigeração até a análise. O rendimento foi determinado pela relação da massa do óleo obtido e a massa do material vegetal seco utilizado na extração.

Análise dos óleos essenciais e identificação dos constituintes

A caracterização cromatográfica foi realizada em cromatógrafo à gás Shimadzu® (CG 2010) com detector de ionização de chama (CG-DIC) usando coluna CP-Sil 5 CB (100% dimetilpolissiloxano) da Varian®, com medidas de 15 cm x 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm e em Cromatógrafo QP-2010 da Shimadzu® com detector por espectrometria de massas (CG-EM) e coluna VF-1MS da Varian®, com as mesmas medidas da análise por CG-DIC. Conduzidas sob as seguintes condições: o gás hélio (He) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 2,0 mL/min, a injeção foi realizada em modo split 1:10, a temperatura do injetor em 250 °C e do detector em 290 °C. A programação do forno foi 60 °C a 240 °C a 3 °C/min. Na análise por CG-EM foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 70 eV e realizada sob as mesmas condições utilizadas para CG-DIC.

A identificação dos constituintes individuais foi realizada por comparação dos Índices de Retenção (IR) obtidos por CG-DIC com dados da literatura (Adams, 2007) e por comparação dos padrões de fragmentação dos espectros de massas com os da Espectroteca Wiley. Os Índices de Retenção foram calculados utilizando comparação dos Tempos de Retenção com os de uma série homóloga de *n*-alcanos (C9 a C22) na equação de Van den Dool &

Kratz (Van den Dool & Kratz, 1963). As concentrações dos componentes foram calculadas usando a área dos picos individuais de cada substância no CG-DIC.

Ensaio de Citotoxicidade in vitro

A citotoxicidade dos óleos essenciais foi determinada pela conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, como descrito por Mosmann *et al.* (1983). Os óleos foram avaliados frente a 4 linhagens tumorais humanas: OVCAR-8 (adenocarcinoma de ovário), HL-60 (leucemia promielocítica), SF-295 (glioblastoma) e HCT 116 (carcinoma colorretal). Essas linhagens, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI/EUA), foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Os óleos essenciais dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) puro e estéril na concentração estoque de 10 mg/mL foram diluídos seriadamente em meio RPMI (0,09-50 µg/mL) e adicionados a placas de 96 poços (100 µL/poço) contendo as células previamente plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ células/mL para linhagens OVCAR-8 e SF-295; 0,7 x 10⁵ células/mL para a linhagem HCT-116 e 0,3 x 10⁶ células/mL para a linhagem HL-60. Depois de 72 h de incubação em estufa a 37° C e 5% de CO₂, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante aspirado e foram adicionados 150 µL de MTT 10% m/v por poço. Após incubação a 37° C por 3 h, as placas foram novamente centrifugadas e aspiradas. O precipitado foi ressuspenso em 150 µL de DMSO e foi feita a leitura em Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter a λ 595 nm. O quimioterápico doxorubicina (0,01-0,58 µg/mL) foi usado como controle positivo. O cálculo das CI₅₀ (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos desvios foram realizados a partir da regressão não-linear no programa *GraphPad Prism* (Versão 6).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações dos óleos essenciais de *E. duckeana* forneceram rendimentos de 0,64% para as folhas e de 0,10% para os talos. Os óleos apresentaram perfis diferentes, principalmente no que diz respeito aos

constituintes majoritários. Os índices de retenção (IR) e as porcentagens dos constituintes identificados nos óleos essenciais estão listados na Tabela 1.

Nos óleos essenciais das folhas e talos foram identificados 16 compostos (83%) e 19 compostos (88%) da composição química percentual, respectivamente. Os constituintes majoritários identificados no óleo das folhas foram (*E*)-cariofileno (31,8%) e óxido de cariofileno (25,7%), enquanto que para o óleo dos talos foram (*E*)-cariofileno (34,5%) e germacreno D (25,9%). A concentração do (*E*)-cariofileno nos talos foi semelhante aos das folhas, entretanto, algumas diferenças podem ser observadas na composição dos dois óleos. A concentração de germacreno D no óleo dos talos (25,9%) foi aproximadamente 20 vezes maior que do óleo das folhas (1,1%). Em contrapartida, óxido de cariofileno está presente no óleo das folhas em alta concentração (31,8%) e ausente nos talos.

Além disso, α-humuleno (4,4% folhas e 3,9% talos), β-elemeno (4,0% folhas e 2,4% talos), α-copaeno (3,6% folhas e 3,0% talos) e β-selineno (3,3% folhas e 3,6% talos) foram identificados nos dois óleos em baixa concentração. Entretanto, constituintes como α-bergamoteno (1,4%), alloaromadendreno (0,4%), δ-selineno (1,3%), δ-cadineno (3,3%) e α-cadineno (0,1%) foram observados apenas no óleo dos talos, enquanto que óxido de cariofileno (25,7%) e valenceno (1,7%) foram observados apenas no óleo das folhas. Esta é a primeira descrição da composição química dos óleos de *Eperua duckeana* na literatura.

A atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas e talos foi avaliada frente às linhagens de células tumorais de câncer de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295), colorretal (HCT 116) e leucemia (HL-60). Segundo critérios estabelecidos pelo National Cancer Institute (NCI, USA), o valor limite de CI₅₀ para extratos com atividade citotóxica promissora é de 30 µg/mL (Costa-Lotufo *et al.*, 2005). O óleo das folhas apresentou atividade citotóxica moderada frente às células tumoral de leucemia (CI₅₀ 27,86 µg/mL) e o óleo dos talos apresentou alta atividade citotóxica frente a HL-60 (CI₅₀ 4,33 µg/mL) e atividade moderada frente às linhagens OVCAR-8 (CI₅₀ 28,58 µg/mL) e SF-295 (CI₅₀ 26,13 µg/mL) conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 1
Composição química dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana*

Constituintes	Percentual (%)		IR*	IR**
	Folhas	Talos		
δ-elemeno	0,7	0,7	1335	1335
α-cubebeno	0,5	0,7	1347	1345
ciclosativeno	1,2	0,4	1361	1369
α-ylageno	0,7	0,4	1368	1373
α-copaeno	3,6	3,0	1373	1374
β-cubebeno	0,5	0,5	1387	1387
β-elemeno	4,0	2,4	1390	1389
(E)-cariofileno	31,8	34,5	1417	1417
γ-elemeno	1,3	1,9	1431	1431
α-bergamoteno	-	1,4	1434	1432
α-humuleno	4,4	3,9	1449	1452
alloaromadendreno	-	0,4	1456	1458
germacreno D	1,1	25,9	1480	1484
β-selineno	3,3	3,6	1481	1489
δ-selineno	-	1,3	1491	1492
valenceno	1,7	-	1494	1496
α-muuroleno	1,1	0,7	1497	1500
δ-cadineno	-	3,3	1521	1522
α-cadineno	-	0,1	1533	1537
germacreno B	1,8	3,2	1552	1559
óxido de cariofileno	25,7	-	1590	1582
TOTAL	83,3	88,3	-	-

IR*: Valores de Índice de Retenção calculados; IR**: valores de referência (Adams, 2007).

Tabela 2
Atividade citotóxica *in vitro* dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* frente às linhagens tumorais humanas de leucemia (HL-60), adenocarcinoma de ovário (OVCAR-8), glioblastoma (SF-295) e carcinoma colonretal (HCT-116)

Amostra (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)*			
	HL-60	OVCAR-8	SF-295	HCT-116
Folhas	27,86 (22,56 – 34,40)	30,15 (19,71 – 46,12)	38,15 (32,08 – 45,36)	48,51 (43,42 – 54,21)
Talos	4,33 (2,50 – 7,49)	28,58 (24,40 – 33,49)	26,13 (21,44 – 31,85)	30,87 (26,23 – 36,34)
Doxorrubicina	0,01 (0,01 – 0,02)	0,02 (0,01 – 0,02)	0,01 (0,01 – 0,02)	0,01 (0,01 – 0,02)

Os dados originados de experimentos independentes e apresentados como valores de CI₅₀ e intervalo de 95% de confiança (IC95%) obtidos por regressão não-linear.

O óleo essencial que mostrou atividade citotóxica mais promissora foi o óleo dos talos, em especial para linhagem tumoral humana de leucemia (CI₅₀ 4,33 µg/mL), enquanto que o óleo das folhas apresentou apenas atividade moderada para a linhagem citada e também para as outras duas testadas. De acordo com a composição química, o componente em maior concentração em ambos os óleos é o (*E*)-cariofileno (aproximadamente 30%), porém como apenas o óleo dos talos mostrou alta atividade, então, pressupõe-se que outros constituintes são os responsáveis por tal citotoxicidade. O germacreno D, como o segundo constituinte majoritário do óleo dos talos, pode influenciar positivamente na atividade frente à linhagem tumoral humana de leucemia (HL-60).

Diversos autores sugerem a presença de (*E*)-cariofileno como o responsável pela atividade antitumoral de óleos essenciais. Silva *et al.* (2008) estudaram o óleo essencial das folhas de *Casearia sylvestris* e mostraram uma citotoxicidade seletiva contra as linhagens de células tumorais HeLa, A-549 e HT-29 e verificaram que os padrões de β-cariofileno e α-humuleno mostraram citotoxicidade similar àquelas apresentadas pelo óleo, indicando que estes compostos podem ser os responsáveis pelos efeitos tóxicos que foram observados no óleo essencial.

A atividade citotóxica apresentada pelos óleos de *Eperua duckeana* pode ser causada pelos compostos majoritários (*E*-cariofileno ou germacreno D), pelo sinergismo entre eles ou com outras substâncias presentes no óleo essencial que podem atuar com efeitos aditivos, causando a inibição do crescimento das células tumorais.

CONCLUSÃO

A composição química e a atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas e talos de *Eperua duckeana* foram avaliadas. (*E*)-cariofileno (31,8%), óxido de cariofileno (25,7%) e α-humuleno (4,4%) foram os constituintes observados em maior concentração nos óleos das folhas enquanto que nos óleos dos talos os constituintes majoritários foram (*E*)-cariofileno (34,5%) e germacreno D (25,9%), sendo que este óleo apresentou promissora atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais de leucemia (HL-60). Esta é a primeira descrição da composição química e avaliação biológica de óleos essenciais de *Eperua duckeana*.

AGRADECIMENTOS

Nós desejamos agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, (FAPEAM) e a Fundação Cearense de Pesquisa (FUNCAP). Nós também gostaríamos de agradecer ao National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA) pela doação das linhagens usadas nesse estudo preliminar *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- Adams RP. 2007. **Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Allured Publishing Corporation: Illinois, USA.
- Amusant N, Moretti C, Richard B, Prost E, Nuzillard JM, Thévenon MF. 2007. Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). **Holz Roh Werkst** 65: 23 - 28.
- Ávila D, Medina JD. 1991. A cis-clerodane diterpenic acid from *Eperua purpurea*. **Phytochemistry** 30: 3474 - 3475.
- Ávila D, Medina JD, Deeming AJ. 1992. A new clerodane-type diterpenoid from *Eperua leucantha*. **J Nat Prod** 55: 845 - 850.
- Ávila D, Medina JD. 1993. Constituents of the seed pods of *Eperua purpurea*. **J Nat Prod** 56: 1586 - 1589.
- Braz-Filho R, Gottlieb OR, Pinho SLV, Monte FJQ, Rocha AI. 1973. Flavonoids from Amazonian Leguminosae. **Phytochemistry** 12: 1184 - 1186.
- Cho JY, Chang H-J, Lee S-K, Kim H-J, Hwang J-K, Chun HS. 2007. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of beta-caryophyllene, a sesquiterpene. **Life Sci** 80: 932 - 939.
- Costa-Lotufo LV, Khan MTH, Ather A, Wilke DV, Jimenez PC, Pessoa C, Moraes MEA, Moraes MO. 2005. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **J Ethnopharmacol** 99: 21 - 30.
- Cowan RS. 1975. A monograph of the genus *Eperua* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Smithson Contrib Bot** 28: 1 - 49.

- De Santis V, Medina JD. 1987. Three new natural ketones from *Eperua purpurea*. **Acta Cien Venez** 38: 143 - 147.
- Ghelardini C, Galeotti N, Mannelli LDC, Mazzanti G, Bartolini A. 2001. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. **II Farmaco** 56: 387 - 389.
- Goren AC, Piozzi F, Akcicek E, Kilic T, Carikci S, Mozioglu E, Setzer WN. 2011. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochem Lett** 4: 448 - 453.
- King FE, Jones G. 1955. The Chemistry of extractives from hardwoods. Part XXI. The structure of Eperuic Acid. **J Chem Soc** 658 - 665.
- Leandro LM, Veiga-Junior VF. 2012. O Gênero *Eperua* Aublet: Uma Revisão. **Sci Amazonia** 1: 14 - 22.
- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. 2007. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Res** 27: 3293 - 3299.
- Maia JGS, Andrade EHA. 2009. Database of the amazon aromatic plants and their essential oils. **Quim Nova** 32: 595 - 622.
- Maillo MA, De Santis V, Medina JD. 1987. Constituents of the trunk resin of *Eperua leucantha*. **J Med Plant Res** 53: 229 - 230.
- Medina JD, De Santis V. 1981. Constituents of the trunk resin of *Eperua purpurea*. **J Med Plant Res** 43: 202 - 206.
- Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 65: 55 - 63.
- Passos GF, Fernandes ES, Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM, Calixto JB. 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J Ethnopharmacol** 110: 323 - 333.
- Ribeiro JES. 1999. **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-firme na Amazônia Central**. Ribeiro JES, Hopkins MJG, eds., INPA/DFID, Manaus, Brasil.
- Royer M, Stien D, Beauchêne J, Herbette G, McLean JP, Thibaut A, Thibaut B. 2010. Extractives of the tropical wood wallaba (*Eperua falcata* Aubl.) as natural anti-swelling agents. **Holzforschung** 64: 211 - 215.
- Sabulal B, Dan M, John JA, Kurup R, Pradeep NS, Valsamma RK, George V. 2006. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry** 67: 2469 - 2473.
- Silva MF, Souza LAG, Carreira LMM. 2004. **Nomes populares das Leguminosas do Brasil**, EDUA/INPA/FAPEAM: Manaus, Brasil.
- Silva SL, Chaar JS, Figueiredo PMS, Yano T. 2008. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amaz** 38: 107 - 112.
- Van den Dool H, Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography **J Chromatogr** 11: 463 - 471.
- Veiga-Junior VF, Pinto AC. 2002. O gênero *Copaifera* L. **Quím Nova** 25: 273 - 286.
- Villeneuve F, Vergnet AM. 1988. Study on flavans in a tropical essential oil "*Eperua falcata* Aubl.". **Actual Bot** 3: 19 - 24.