

Avaliação da citotoxicidade por *Artemia salina* do óleo essencial da espécie *Baccharis dracunculifolia* DC.

Evaluation of cytotoxicity by *Artemia salina* of oil essential species of *Baccharis dracunculifolia* DC.

RESUMO

Andressa Rockenbach
andressa.rockenbach2000@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Jociani Ascari
jascari@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil

Baccharis dracunculifolia é uma importante espécie do gênero *Baccharis*, nativa no Brasil, porém não endêmica, ocorre nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Este trabalho teve como objetivo a análise e identificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e detector de ionização de chamas (CG-EM-DIC) dos óleos essenciais das folhas provenientes de espécimes masculinos e femininos de *B. dracunculifolia*, avaliação da atividade citotóxica frente à *Artemia salina* Leach e avaliação da atividade antioxidante. Coletou-se o material vegetal na cidade de Santa Helena, Paraná, montou-se exsiccatas e depositou-as no Herbário da Embrapa Clima Temperado sob o número ECT0003428 para o espécime masculino e ECT0003427 para o espécime feminino. Obteve-se o óleo essencial por hidrodestilação. A análise CG-EM-DIC caracterizou 81,11% da amostra masculina, identificando majoritariamente o biciclogermacreno (14,18%), β -cariofileno (8,44%), (E)-nerolidol (8,02%) e limoneno (6,76%), e na amostra feminina identificou-se 73,56%, identificando majoritariamente o (E)-nerolidol (15,49%), biciclogermacreno (11,88%), limoneno (10,03%) e o β -cariofileno (6,66%). No teste citotóxico, o óleo essencial feminino foi mais tóxico com uma CL_{50} de 27,56 μ L/mL. Na atividade antioxidante o óleo essencial feminino apresentou 55,51 μ g de AAE/mL na concentração de 12,5 mg/mL, inibindo 25,53% do DPPH, evidenciando o potencial do óleo essencial feminino nas atividades biológicas.

PALAVRAS-CHAVE: *Baccharis dracunculifolia*. *Artemia salina*. DPPH.

Recebido: 18 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia is an important species of the genus *Baccharis*, native in Brazil, but not endemic, occurs in the South, Southeast and Midwest. The objective of this work was the analysis and identification by gas chromatography coupled to the mass spectrometry and flame ionization detector (GC-MS-FID) of the essential oils of leaves from male and female *B. dracunculifolia* specimens, evaluation of cytotoxic activity against *Artemia salina* Leach and evaluation of antioxidant activity. The plant material was collected in the city of Santa Helena, Paraná, assembled exsiccates and deposited in the Herbarium of Embrapa Temperate Climate under the number ECT0003428 for the male specimen and ECT0003427 for the female specimen. The essential oil was obtained by hydrodistillation. GC-MS-FID analysis characterized 81,11% of the male sample, mainly identifying bicyclogermacrene (14,18%), β -caryophyllene (8,44%), (E)-nerolidol (8,02%) and limonene (6,76%), and in the female sample, 73,56% were identified, mostly identifying (E)-nerolidol (15,49%), bicyclogermacrene (11,88%), limonene (10,03%) and β -caryophyllene (6,66%). In the cytotoxic test, female essential oil was more toxic with an LC_{50} of 27,56 μ L/mL. In antioxidant activity the female essential oil presented 55,51 μ g AAE/mL at a concentration of 12,5 mg/mL, inhibiting 25,53% of DPPH, highlighting the potential of female essential oil in biological activities.

KEYWORDS: *Baccharis dracunculifolia*. *Artemia salina*. DPPH.

INTRODUÇÃO

A espécie *B. dracunculifolia* DC. é conhecida popularmente como alecrim do campo, vassourinha do campo ou vassourinha, é nativa no Brasil, porém não endêmica, apresenta-se como um arbusto lenhoso, perene, dióico (HEIDEN; SCHNEIDER, 2015; SANTOS, 2012). Tal espécie ocorre naturalmente nos países como o Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e nos vales elevados da Bolívia, sendo que no Brasil, sua ocorrência se dá nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste principalmente, essa espécie é comum em áreas de cerrado, pampa e mata atlântica (COSTA, 2016; HEIDEN; SCHNEIDER, 2015).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas apresenta alta eficiência no reconhecimento e constatação de constituintes de óleos essenciais, realizando a separação dos compostos da amostra conferindo um espectro de massas em cada pico registrado, gera íons parcialmente constantes que analisando-os é possível indicar a fórmula molecular e o peso, entre outras informações que confirmam a estrutura química de cada composto (SOUZA, 2007).

A *Artemia salina* é um microcrustáceo da ordem Anostraca, habitante de águas salgadas, apresenta baixos custos de implantação e manutenção para seu cultivo, manuseio fácil, fazendo com que seja um modelo experimental excelente, utilizado em laboratórios, conhecido por revelar a toxicidade em ensaios biológicos e para a Concentração Letal Média (CL₅₀) como fator de avaliação, devido a sua resistência a taxas elevadas de salinidade e a sua sensibilidade perante compostos químicos (FALCÃO, 2018).

Compostos antioxidantes podem ser benéficos para a saúde e melhorar a qualidade de vida já que possuem a capacidade de fornecer proteção para um organismo dos possíveis malefícios provocados pelos radicais livres, adiando ou prevenindo o começo de doenças. Entre as técnicas para verificar a capacidade antioxidante de componentes, destaca-se o método de redução do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) radical orgânico livre estável, com boa estabilidade no escuro, simplicidade, aplicabilidade e viabilidade. O radical é originado sinteticamente e uma amostra pode apresentar capacidade de redução ou neutralização deste radical, acompanhado pelos valores de absorbância com um espectrofotômetro UV/visível (OLIVEIRA, 2015).

Dessa forma, o seguinte trabalho teve como objetivo a análise e identificação por CG-EM-DIC dos óleos essenciais das folhas provenientes de espécimes masculinos e femininos de *B. dracunculifolia* da região Oeste do Paraná, avaliação da atividade citotóxica frente à *A. salina* e avaliação da atividade antioxidante dos respectivos óleos essenciais.

MATERIAIS E MÉTODOS

COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas foram coletadas de espécimes masculinas e femininas de *B. dracunculifolia* na região Oeste do estado do Paraná, na cidade de Santa Helena. Coletou-se galhos com inflorescências da *B. dracunculifolia* feminina e masculina em maio de 2018 no período matutino e montou-se exsicatas. Os espécimes foram identificados pelo botânico Dr Gustavo Heiden e uma exsicata foi depositada no

Herbário da Embrapa Clima Temperado (ECT) sob o número ECT0003428 para o espécime masculino (P16M) e ECT0003427 para o espécime feminino (P15F).

PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Separou-se as folhas e colocou-as para secar a temperatura ambiente durante quatro dias, então triturou-se o material vegetal no moinho de facas e armazenou-se em frascos sob refrigeração até a data das extrações dos óleos essenciais.

OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial dos espécimes foram extraídos pelo método de hidrodestilação com um extrator do tipo Clevenger modificado. Juntamente com dois litros de água destilada foram colocados 100g de material vegetal em um balão de fundo redondo de cinco litros, o qual foi aquecido a 60°C aproximadamente, por três horas contínuas, originando-se o hidrolato. Através da extração líquido-líquido fez-se a separação do hidrolato aplicando éter etílico. A mistura então foi secada, filtrada, rotaevaporada, obtendo-se o óleo essencial final, sendo conservado na geladeira. Os rendimentos dos óleos foram calculados com base na massa inicial seca de cada material vegetal.

ANÁLISES QUÍMICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Para a análise dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa utilizou-se um cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-QP2010 Plus empregando uma coluna não-polar Rtx-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm). Identificou-se os compostos com base na comparação dos índices de retenção relativos calculados utilizando uma série de n-alcenos (C8-C19) e os espectros de massa do banco de dados do aparelho comparados com que há publicado na literatura (ADAMS, 2009).

Afim de obter-se as massas relativas dos componentes presentes na amostra foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu 2010 com detector de ionização de chama e uma coluna OV-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm).

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Para a eclosão dos ovos de *A. salina* Leach foi utilizada uma solução salina (38g/L de sal marinho e água destilada) com pH entre 8 e 9, temperatura ambiente de 25°C e sob iluminação artificial constante. Após 48 horas, dez larvas de *A. salina* foram transferidas para frascos com a amostra diluída do óleo essencial e avolumados com solução salina para 5 mL. Desse modo, foram testadas as concentrações de 15, 35, 50, 75, 125 e 150 µg/mL realizadas em triplicata, sendo a contagem de artemias efetuadas após 24 horas do experimento, considerando-se a quantidade de vivas e mortas. O teste acompanhou um controle positivo de lapachol e um controle negativo de solução salina. Foi realizado o cálculo da CL₅₀ e analisou-se os resultados utilizando-se o software GraphPad Prism 6.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi realizada em triplicata com o radical livre DPPH segundo o método de Granato *et al.* (2015) adaptado. Os óleos essenciais foram submetidos a testes com concentrações variadas entre 6,25 mg/mL - 100 mg/mL. Colocou-se uma alíquota de 40 µL das amostras diluídas em microplacas de 96 poços, adicionando-se 260 µL de uma solução com metanol 0,10 mol/L de DPPH. Para reagir devidamente, deixou-se a mistura em ambiente escuro e temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida,

foi medida a diminuição da absorbância do DPPH em um comprimento de onda de 517 nm no espectrofotômetro de microplacas. Como controle foi utilizado metanol e para o branco foi usada a solução de DPPH sem amostras dos óleos essenciais. Calculou-se a porcentagem de inibição do radical DPPH conforme equação seguinte: % de inibição do DPPH = $(1 - [\text{amostra A517} / \text{branco A517}]) \times 100$. A expressão da capacidade antioxidante total foi dada equivalente ácido ascórbico (AAE), calculando-se através de uma curva padrão de ácido ascórbico com concentrações na faixa de 0,98 a 14 µg/mL e por meio de uma curva padrão de ácido ascórbico na faixa das concentrações de 0,98 a 14 µg/mL, efetuando o coeficiente de correlação linear (R^2). Os resultados foram apresentados em µg equivalente ácido ascórbico/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

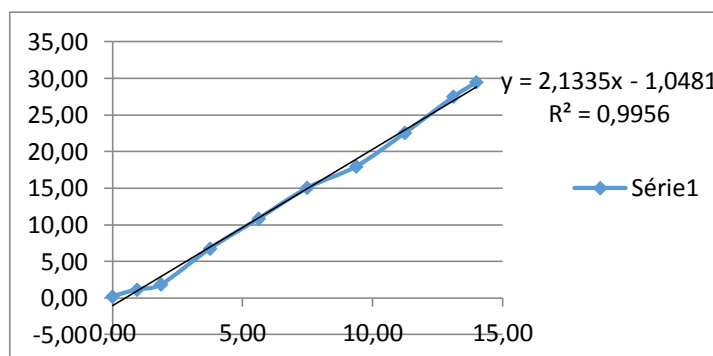
O rendimento obtido do óleo essencial de P16M foi de 1,12% e o rendimento do óleo de P15F foi de 1,25% em referência à massa inicial seca do material vegetal.

A análise química quantitativa por CG-EM-DIC caracterizou 81,11% da amostra masculina de *B. dracunculifolia* com 31 compostos detectados, e na amostra feminina identificou-se 73,56% com 29 compostos detectados. Os constituintes majoritários do espécime masculino (P16M) foram biciclogermacreno 14,18%, β-cariofileno 8,44%, (E)-nerolidol 8,02% e limoneno com 6,76% e para o espécime feminino (P15F) foram (E)-nerolidol 15,49%, biciclogermacreno 11,88%, limoneno com 10,03% e o β-cariofileno 6,66%.

Na avaliação da atividade citotóxica por *A. salina*, o óleo essencial feminino de *B. dracunculifolia* (P15F) apresentou uma CL_{50} de 27,56 µL/mL e o óleo essencial masculino (P16M) 62,67 µL/mL, enquanto que o controle positivo lapachol precisou de 73,04 µL/mL para matar 50% da população de artemias, verificando-se a maior citotoxicidade do óleo essencial feminino frente à *A. salina*.

Obteve-se uma curva analítica de ácido ascórbico (Figura 1) segundo os valores de porcentagem de inibição do radical DPPH de concentrações em série de ácido ascórbico. Obteve-se $y = 2,1335x - 1,0481$ na equação da reta da curva padrão de ácido ascórbico e coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,9956$.

Figura 1 – Curva analítica do padrão de referência (n = 9) do ácido ascórbico para a capacidade antioxidante de inibição do radical DPPH e seu coeficiente de correlação linear (R^2).

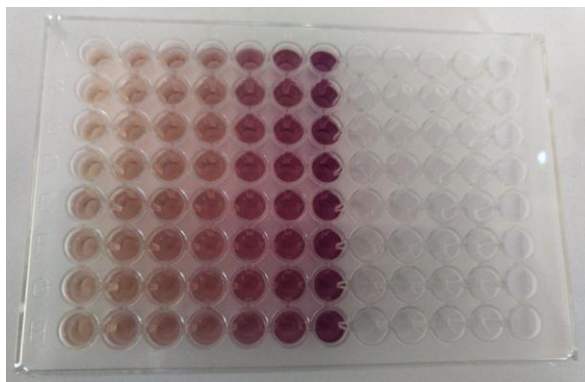


Fonte: Autoria própria (2019).

Com base na equação da reta gerada pela curva analítica ($y = 2,1335x - 1,0481$), realizaram-se os cálculos da atividade antioxidante das amostras, dado em µg de ácido ascórbico equivalente por mL de amostra (µg AAE/mL). Na

atividade antioxidante, o óleo essencial feminino (P15F) apresentou 55,51 μg de AAE/mL na concentração de 12,5mg/mL, observando-se inibição de 25,53% do DPPH, já o óleo essencial masculino (P16M) demonstrou 50,77 μg de AAE/mL na concentração de 12,5mg/mL, sendo 23,31% de inibição do DPPH.

Figura 2 – Poços da avaliação antioxidante com os óleos essenciais.



Fonte: Autoria própria (2019).

Segundo estudos realizados por Paroul *et al.* (2016) sobre a composição química de óleos essenciais e atividade antioxidante de extratos aquosos e óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e *B. trimera*, verificou que os extratos aquosos obtiveram maior atividade antioxidante com valor de IC_{50} de 0,037 e 0,049 mg/mL, e já os óleos essenciais obtiveram IC_{50} de 3,521 e 6,193 mg/mL para *B. dracunculifolia* e *B. trimera* respectivamente.

Comparando-se os óleos essenciais femininos e masculinos de *B. dracunculifolia* da região dos Campos Gerais e da região Oeste do Paraná, constata-se que existem variações químicas nas amostras analisadas, compostos existentes em uma amostra não transcorrem mutuamente na outra, enquanto alguns compostos são encontrados em ambas as amostras, diferindo-se na proporção de seus metabólitos secundários (BESTEN *et al.*, 2012).

De acordo com Besten *et al.* (2012) certos fatores podem interferir na composição química dos metabólitos secundários dos espécimes femininos e masculinos das plantas do gênero *Baccharis*, tais como a genética, o ambiente e a ecologia, dessa forma demonstra-se a importância de analisar ambos os óleos essenciais, já que as plantas desse gênero são geralmente dióicas e apresentam diferenças na composição química de seus espécimes.

CONCLUSÕES

Através desse trabalho foram identificados os constituintes químicos dos óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de *B. dracunculifolia*, demonstrando a diferença na composição química entre os indivíduos da espécie.

Nos ensaios citotóxico e antioxidante, os dois óleos essenciais de *B. dracunculifolia* apresentaram atividade significativa, principalmente o óleo feminino, demonstrando a necessidade e a relevância de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4th. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2009.

- BESTEN, M. A. *et al.* Chemical Composition Similarity between the Essential Oils Isolated from Male and Female Specimens of Each Five *Baccharis* Species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 6, p.1041-1047, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v23n6/07.pdf>. Acesso em 22 set. 2019.
- COSTA, G. M. B. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e de óleo essencial de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*)**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília. Disponível em: http://bdm.unb.br/bitstream/10483/17695/1/2016_GabrielaMarquesBatistaArca_njoCosta.pdf. Acesso em 7 ago. 2019.
- FALCÃO, L. **Atividade larvicida do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt e seu éster contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e toxicidade em diferentes modelos experimentais**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. Disponível em: http://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/3660.pdf. Acesso em 7 ago. 2019.
- GRANATO, D. *et al.* Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. **Journal of food science**. v. 80, n. 3, p. C584-C593, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1750-3841.12794>. Acesso em 7 ago. 2019.
- HEIDEN, G. & SCHNEIDER, A. 2015. *Baccharis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5151>. Acesso em 7 ago. 2019.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n1/1983-084X-rbpm-17-01-00036.pdf>. Acesso em 7 ago. 2019.
- PAROUL, N. *et al.* Composição Química e Atividade Antioxidante de *Baccharis trimera* Pers e *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **PERSPECTIVA**. v. 40, n. 151, p. 55–64, 2016. Disponível em: http://www.uricer.edu.br/site/pdfs/perspectiva/151_583.pdf. Acesso em 24 set. 2019.
- SANTOS, R. F. *et al.* Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 14, n. esp., p. 224-234, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v14nspe/17.pdf>. Acesso em 7 ago. 2019.
- SOUZA, J. P. B. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.