ISSN 2178 9665

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS DA C*urcuma zerumbet*

Márcia Moura dos SANTOS[1]
Carlos Cleomir de Souza PINHEIRO[2]
Márcia Seixas de CASTRO[3]

[1]Bolsista PIBIC/CNPQ; [2]Orientadores INPA/COTI; [3]Co-orientador INPA/COTI

INTRODUÇÃO

Os seres humanos estão expostos a uma série de agentes oxidantes que podem causar danos oxidativos as biomoléculas (lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos), que poderiam levar a um grande número de patologias, incluindo câncer e arteriosclerose. Assim, presume-se que a ingestão de antioxidantes, capazes de neutralizar os radicais livres, possa ter um papel importante na prevenção destas doenças (Harborne e Willians 2000; Fritz *et al.* 2003).

Os antioxidantes presentes nas plantas podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores de enzimas e como quelantes de metais (Wang e Lin 2000) e a maioria de seus efeitos biologicamente ativos é derivada das funções antioxidantes (Velioglu *et al.* 1998). Recentemente, há um aumento no interesse em antioxidantes naturalmente encontrados em frutos usados em fitoterápicos, a fim de substituí-los pelos antioxidantes sintéticos, os quais têm uso restrito devido a seus efeitos colaterais, tais como carcinogenicidade (Ito *et al.* 1983).

Dessa forma, a identificação de fontes vegetais com alta capacidade antioxidante é de extrema importância. Entre as fontes vegetais temos a *C. zerumbet* conhecida popularmente como gajitsu, é uma espécie herbácea, perene, pertencente à família vegetal Zingiberaceae de ocorrência espontânea na Ásia (Schulz *et al*. 2002). Suas partes vegetais empregadas com finalidades terapêuticas são os rizomas, os quais podem ser empregados na forma de infuso, decocto, tintura, pó ou pedaços mastigáveis (Kato e Fischer 1996; Teske e Trentini 1997). Valendo-se disto, algumas empresas farmacêuticas têm transformado os rizomas em produtos para tratar gastrite e problemas digestivos (Yasuda *et al.* 1988).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais da *C. zerumbet* para futuras aplicações biotecnológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A planta *Curcuma zerumbet* foi coletada no município de Careiro da Várzea/AM e sua identificação foi feita pela taxonomista, Dr. Jana Leon-Škorničková, depositada no herbário do INPA com número de registro 003. O material coletado dos rizomas e as folhas que separadamente foram lavadas em água corrente, cortados, secos e triturados em liquidificador semi-industrial, depois armazenados em sacos plásticos para posterior utilização. Os rizomas foram utilizados para preparo dos extratos hidroalcoólico, aquoso e extração de óleos essenciais, enquanto as folhas somente para obtenção dos óleos essenciais.

Amostras

Extrato hidroalcoólico: para cada 200g do rizoma triturado foram misturados em 1000 mL de solução hidroalcoólico 1:1 (álcool etílico 96° GL /água destilada) em frasco Mariotte, para posterior maceração, após 7 dias em contando com liquido extrator filtrado com algodão e evaporada em rotaevaporador.

Extrato aquoso: foram misturados 50g do rizoma triturado em 1000mL de água destilada. Esta solução foi aquecida em um béquer por cerca de 15min., constantemente agitada com um bastão. Depois dessa etapa, o extrato foi filtrado com algodão e armazenado na geladeira até ser liofilizado. A liofilização foi realizada no aparelho Liofilizador LS 3000 (TERRONI®) por três dias consecutivos e após desidratados foram pesados para calcular o teor extrativo (TE), definido como:

$$\mathbf{TE = (ME/MM)x\ 100}$$

Onde: ME: massa do extrato
MM: massa do material

Óleos essenciais: O óleo essencial da folha e do rizoma seco da planta foi extraído por processo de hidrodestilação. A temperatura inicial foi de 100 °C e reduzida posteriormente a 80 ºC e com tempo de extração de 6 horas. Os volumes foram retirados, medidos em tubo de ensaio graduado e pesados em balança analítica para calculo de seu rendimento expresso em porcentagem (%) v/p (volume de óleo por massa de material) e p/p (massa de óleo por massa de material) (Pinheiro 2005).

ISSN 2178 9665

Análises fitoquímicas

Análises dos compostos orgânicos nos extratos foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Produtos Naturais, por Triagem Fitoquímica de acordo com a metodologia de Matos (1980), enquanto os óleos essenciais foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). CG-EM foram enviadas para Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

Triagem fitoquímica: O extrato aquoso e o extrato hidroalcoólico foram submetidos a uma série de reações de caracterização; para o extrato aquoso realizou-se as seguintes reações: heterosídeos antociânicos (cores diferentes pela variação do pH); para o extrato hidroalcoólico foram: fenóis e taninos (reação com cloreto férrico), antonianinas, antocianidinas, chalconas, xantonas, flavononóis e auronas (presença de coloração em pH 3, 8,5 e 11), leucoantocianidinas, catequinas e flavononas (coloração da amostra alcalinizada e acidificada após aquecimento), esteroides e triterpenoides (extração com clorofórmio, anidrido acético e ácido sulfúrico), confirmação de catequinas (reação com ácido clorídrico e aquecimento), segundo metodologia de Matos (1980).

Cromatografia de Camada Delgada: o perfil cromatográfico dos óleos essenciais e extratos foram avaliados através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando placas de sílica gel GF254 (ALUGRAM®). Foram preparadas 10 mL das seguintes fases móveis: Hexano/acetona (4:1), Acetato de etila /diclorometano (4:1), Clorofórmio/Etanol 96° GL (4:1 e 1:4). As amostras dos óleos essenciais foram diluídas em hexano e os extratos em etanol 96°GL, posteriormente aplicadas sobre as placas com auxilio de um capilar. Após a aplicação da amostra a placa entrou em contato com fase móvel contida numa cuba cromatográfica. Depois que o solvente ascendeu pela placa, esta foi retirada da cuba e aguardou-se a evaporação do eluente para visualização (Matos 1980; Chaves 1997). Verificou-se a coloração das manchas (bandas) no espectro visível, sob luz ultravioleta (UV) de 254 e 365 nm, e foram reveladas com uso do Iodo. Após a etapa de revelações das manchas foram calculados os fatores de retenção (Rf).

Determinação da atividade antioxidante

Este ensaio foi realizado de acordo com Brand-Willians *et al.* (1995), com pequenas modificações, que permitiu a utilização de microplacas de 96 poços. Inicialmente, a solução de DPPH (0,8 mmol/L) foi preparada. Em seguida foi realizada a diluição da solução de forma que sua absorbância próxima de 1.000 ± 0,1. Na microplaca foi adicionado 30µL do extrato e 270µL da solução de DPPH, em triplicata.

No controle foi utilizado o mesmo volume do teste. Em seguida as microplacas foram incubadas em temperatura ambiente na ausência de luz por 30 minutos e então mesurado as absorbâncias em um leitor de microplacas (DTX800, Beckman) no comprimento de onde 517nm. Para obtenção da concentração mínima inibitória de 50% dos radicais DPPH (IC50), uma curva de concentração foi feita a partir dela, então gerou a equação da reta, sendo os resultados desta equação em µmoles/mL. A solução do padrão e da amostra foram oitos concentração diferentes de 0,781 a 100µg/mL, estas diluições foram de 1:1 até a 8° diluição, o último volume descartado. Padrão a ser utilizados nesta determinação foi a quercetina Os cálculos de inibição foram feitos mediante a formula seguir:

$$\%Inibição = 100\ X\ (1 - \frac{Abs2\ amostra - Abs\ controle}{Abs\ controle})$$

Análise estatística

Para a análise estatística foram aplicadas medidas capazes de estimar parâmetros tais como média e desvio-padrão. Para os resultados dos dados coletados foram avaliados estatisticamente pela análise da variância, ANOVA e comparação realizada pelo teste de Tukey, utilizando-se o nível de 5% de significância (Gomes 1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor extrativo dos extratos aquosos corresponde a 3,94 % (massa do extrato por massa de material) pelo método decocção e o extrato hidroalcolico 24,45 %. O processo de hidrodestilação apresentou rendimento de óleo essencial do rizoma em média 1% v/p e 0,75% p/p; as da folha apresentam maior rendimento em volume que os rizomas sendo, 1,51% v/p e rendimento em peso de 0,95% p/p.

Os óleos essenciais apresentam forte odor característico, sendo a coloração do óleo da folha verde-escuro e os rizomas de coloração violeta. Guptas *et al.* (1976) usando o método de hidrodestilação encontrou nos rizomas da *Curcuma zedoaria* cerca de 1,5 a 5% v/p de óleo; essa diferença pode ser explicada pelas condições de cultivo, colheita e processamento (Ribeiro e Diniz 2008).

A triagem fitoquímica foi realizada com os extratos aquoso foi positiva para catequinas, flavonas, flavonóis e xantonas; nos extratos hidroalcoólico foram para fenóis, catequinas, flavanonas, flavonóis, triterpenos, esteroides e saponinas,

ISSN 2178 9665

sendo negativo para os outros compostos; que não significa ausência, pois, podem ter sido mascaradas com a cor indicativa de outro metabólito segundo explica Matos (1980).

A presença desses compostos bioativos é importante para a aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Entre eles principalmente os fenóis, flavonóides e triterpenóides apresentam ação antioxidante em consequência da estrutura química e suas propriedades redutoras (Sousa *et al*. 2007).

Cromatografia de Camada Delgada, testes para detecção de compostos orgânicos, apresentaram separação de manchas nos óleos essenciais das folhas e dos rizomas eluídos com hexano/acetona (4:1) conforme a Figura 1 e a Tabela 1. Observando a placa dos óleos essenciais (Fig. 1) muitas das manchas são comuns entre si, como no UV 365 nm banda azul-claro (Rf=0,6). A maioria das manchas reveladas no Iodo indica que os rizomas e as folhas têm compostos similares, pois apresentaram mesmo Rf que é característico de cada composto sob as mesma condições de eluição (Falkenberg *et al*. 2007).

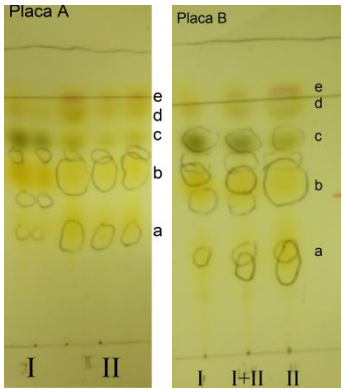

Figura 1. Placas cromatográficas do Óleo essencial do rizoma (**I**) e folha (**II**) *C. zerumbet* eluídas em hexano/acetona (8:2) reveladas com Iodo. Bandas I (rizoma): **a)** amarela (0,3); **b)** laranja (0,6); **c)** verde (0,7); **d)** marrom (0,8); Bandas II (folhas): **a)**; **b)**; **c)**; **d)**; **e)** rosa (0,8).

Na análise do cromatograma de CG-EM das amostras de óleos essenciais (fig. 2) vários picos estavam presentes do rizoma e da folha, sendo um total de 69 e 79 picos respectivamente, os quais correspondem a diferentes compostos. Os compostos presentes nos óleos essenciais são moléculas de baixo peso molecular, voláteis e principalmente pertencem à classe dos monoterpenos e sesquiterpenoides (Falkenberg *et al*. 2007).

Lobo *et al.* (2009) faz referência a 37 compostos encontrados pelo mesmo método de cromatografia em óleos de rizomas nativos do nordeste da Índia dos quais o curzerenone (22,3%) foi majoritário seguindo do 1,8-cineole (15,9%) e germacrone (9,0%) em outra investigação do mesmo autor esses mesmos óleos apresentaram 1,8-cineole (18.5%), cymene (18.42%), a-phellandrene (14.9%) e b-eudesmol (10.6%). Comparando esses constituintes com óleo do rizoma de *C. zerumbet*, a curzerenone (6,95 %) foi encontrada em menor quantidade. O óleo essencial apresentou também isovelleral (20,99%), methyl-n-tetradecanoate (8,49%) e hydroxy-valerenic acid (5,88 %).

Os compostos voláteis majoritários dos óleos da folha foram os 1,8 cineole (16,93%), 4,4a,5,6,7,8-Hexahydronaphthalen-2(3H)-one (9,93 %), curzerenone (8,13 %), camphor (6,15 %) e elemene (4,81 %). Na extração realizada ano passado o óleo da folha teve a presença dos mesmos compostos, porém em diferentes porcentagens com menor quantidade de curzerenone (17,9%) e 4,4a,5,6,7,8-Hexahydronaphthalen-2(3H)-one (12,5%) enquanto houve aumento de 1,8 cineole (9,5%). Esse 1,8 cineole apresenta ação antimicrobiana e antioxidante (Rodrigues, *et al*. 2009) o que aponta esse composto como um marcador do efeito antioxidante do óleo essencial das folhas de *C. zerumbet*.

ISSN 2178 9665

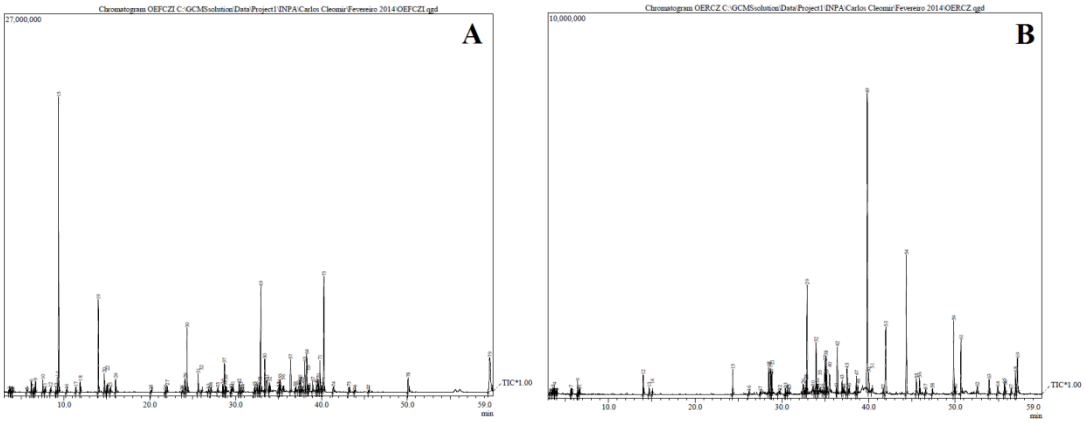

Figura 2. Perfil do Cromatograma do óleo essencial de *C. zerumbet*. Nota: A= folha; B= rizoma.

Atividade Antioxidante

As amostras, de um modo geral, apresentam ação antioxidante com concentração inibitória (CI 50), em ordem crescente, o extrato aquoso liofilizado (7,30 ±0,14), extrato hidroalcoólico (7,96 ±0,08), extrato aquoso do rizoma não liofilizado (18,11 ±1,27); óleo essencial da folha (30,32 ±0,33); e por ultimo o óleo essencial do rizoma (31,73 ±0,64). A comparação da "concentração eficiente" ou o valor IC50 das amostras com controle positivo BHS (87,24 ±1,57) evidentemente é baixa, mas é indicativo de substâncias com potencial antioxidante presentes nos óleos essenciais. Valores próximos ao estudo de Sacchetti *et al.* (2005) que obteve IC50 de 59.6 ± 0.42 a 64.3 ± 0.45% em espécies como *Cananga odorata, Cymbopogon citratus, Rosmarinus officinalis* e *Curcuma longa*.

CONCLUSÃO

As amostras dos óleos essências foram as que apresentaram melhor efeito antioxidante e com auxilio da CG-EM foi possível identifica um dos compostos envolvidos nessa ação como 1,8 cineole, apesar de ser necessária a determinação dos outros compostos voláteis e aplicação dos mesmos. Para continuidade pode-se fazer avaliação de formulações de higiene e cosmética com uso desses óleos para avaliação do efeito conservante e terapêutico.

REFERÊNCIAS

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(1): 25-30.

Chandel, S.H. 1970. Tannins and related phenolics. In: Joslyn, M. A. *Methods in Food Analysis.* New York, Academic Press, p.70, 1-75.

Chaves, M.H. 1997. Análise de extratos de plantas por Cromatografia em Camada Delgada: metodologia aplicada à disciplina "Química Orgânica". *Química Nova*, 20(5): 307-309.

Falkenberg, M.B.; Santos, R.I.; Simões, C.M.O. 2007. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed. Editora da UFRGS, Porto Alegre. p. 313-316.

Fritz, K.L.; Seppanen, C.M.; Kurzer, M.S.; Csallany, A.S. 2003. The *in vivo* antioxidant activity of soybean isoflavones in human subjects. *Nutr. Res.*, 23(4): 479-487.

Gomes, F. P. 1985. *A estatística moderna na pesquisa agropecuária*. Piracicaba, São Paulo, 162 p.

Guptas, S.; Banerjee, A.; Achari, B. 1976. Isolation of ethyl p-metoxycinnamate, the major antifungical principle of *Curcuma zedoaria*. *Lloydia*, 3(4): 218-222.

Harborne, J. B.; Willians, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.*, Oxford, 55 (6): 481-504.

Ito, N.; Fukushima, S.; Hasegawa, A.; Shibata, M; Ogiso, T. 1983. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70(2): 343–347.

Kato, E.T.M.; Fischer, D.C.H. 1996. Estudo morfo-histológico e cromatográfico em camada delgada comparativo de raízes e rizomas de *Curcuma zedoaria* (Bergius) Roscoe – droga, óleo essencial e extrato fluido. *LECTA-USF*, 14(2): 9-26.

Lobo, R.; Prabhu, K.S.; Shirwaikar, A.; Shirwaikar, A. 2009. *Curcuma zedoaria* Rosc. (white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 61: 13–21.

Matos, F.J.A. 1980. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Editora Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 129p.

Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*., 26(2): 211-219.

ISSN 2178 9665

Pinheiro, C.C.S. 2005. Processo de Obtenção de Zerumbona extraída das raízes de Zingiber zerumbet (L.) Smith cultivada em Manaus. *Patente: PI 0505343-9* / Concessão: 28/11/2005.

Ribeiro, P.G.F.; Diniz, R.C. 2008. *Plantas Aromáticas e Medicinais - Cultivo e Utilização*. Instituto Agronômico do Paraná, Londrina. 218 p.

Rodrigues, F.F.G; Costa, J.G.M; Coutinho, H.D.M. 2009. Synergy Effects Of Antibiotics Gentamicin And The Essential Oil Of Croton Zehntneri. *Phytomedicine*, 16(11): 1052-1055.

Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621–632.

Schulz, V.; Hansel, R.; Tyler, V.E. 2002. *Fitoterapia racional*. 4.ed. São Paulo: Manole, p.208.

Sousa, C.M.; Silva, H.R.E. ; Vieira-Jr, G.M. ; Ayres, M.C.C. ; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S. ; *et al*. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30: 351-355.

Teske, M.; Trentini, A.M.M. 1997. *Herbarium compêndio de fitoterapia*. 3.ed. Herbarium laboratório botânico, Curitiba, 317 p.

Velioglu, Y.S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Columbus, 46(10): 4113-4117.

Wang, S. Y.; Lin, H., S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2): 140-146.

Yasuda, K.; Mukai, H.; Fujimoto, S.; Nakajima, M.; Kawai, K. 1988. The diagnosis of pancreatic cancer by endoscopic ultrasonography. *Gastrointest Endosc*, 34: 1-8.