

## COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA RESINA DE *PROTIUM HEBETATUM* DALY (BURSERACEAE)

### CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM RESIN OF THE *PROTIUM HEBETATUM* DALY (BURSERACEAE)

Kennedy Lima da Silva<sup>1\*</sup>, Giulliano Scarante Cezarotto<sup>2</sup>, Raquel Rodrigues de Souza<sup>3</sup>, Carlos Eduardo Garção de Carvalho<sup>4</sup>, João Paulo Ribeiro Oliveira<sup>5</sup>, Clarice Maia Carvalho<sup>4</sup>, Délcio Dias Marques<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Docente do Centro Universitário Uninorte, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>2</sup>Mestre em Ciência, Inovação e Tecnologia pela Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>3</sup>Licenciada em Química pela Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>4</sup>Docentes da Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Rio Branco, Acre, Brasil.

<sup>5</sup>Pós-Graduando em Agronomia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

\*kennedy.lima00@gmail.com

#### RESUMO

O estudo do perfil químico de óleo essencial da resina de espécie do gênero *Protium* vem contribuir para o conhecimento do gênero, bastante difundido no estado do Acre, principalmente na região do Alto Juruá. A resina do *Protium hebetatum* Daly, popularmente conhecidas como breu, breu-branco, foi coletada em propriedade particular, em período chuvoso, ao longo da BR-307, no município de Mâncio Lima, Acre-Brasil. O perfil químico foi analisado por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM), registrando na composição do óleo essencial 8 monoterpenos, 16 sesquiterpenos e 4 compostos que não foram identificados. Os constituintes monoterpênicos mais relevantes foram o  $\alpha$ -felandreno (17,36%),  $\alpha$ -pineno (9,16%) e o *p*-cimeno (7,24%). Em relação aos sesquiterpenos, os principais constituintes foram o *E*-cariofileno (11,16%) e *D*-germacreno (10,24%). Este óleo essencial mostrou atividade bacteriana frente às bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniaea*, com halo de inibição de  $7,67 \pm 2,89$  e  $8,50 \pm 0,71$  mm, respectivamente. Assim, o óleo essencial da resina *P. hebetatum* relevou a presença marcante de sesquiterpenos (57,14%) e mostrou atividade antibacteriana contra bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniaea*, sendo este o primeiro relato para estas espécies bacterianas.

**Palavras-chave:** Breu. Óleo essencial. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniaea*.

#### ABSTRACT

The study of the chemical profile of essential oil from resin of a species of the genus *Protium* contributes to the knowledge of the genus, which is widespread in the state of Acre, especially in the Alto Juruá region. The *Protium hebetatum* Daly resin, popularly known as breu, breu-branco, was collected in private property, in the rainy season, along BR-307, in the municipality of Mâncio Lima, Acre, Brazil. The chemical profile was analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC/MS), recording in the composition of the essential oil 8 monoterpenes, 16 sesquiterpenes and 8 compounds that were not identified. The most relevant monoterpene constituents were  $\alpha$ -felandrene (17.36%),  $\alpha$ -pinene (9.16%) and *p*-cymene (7.24%). Regarding sesquiterpenes, the main constituents were *E*-karyophyllene (11.16%) and *D*-germacrene (10.24%). This essential oil showed bacterial activity against gram-negative bacteria: *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniaea*, with a halo inhibition of  $7.67 \pm 2.89$  and  $8.50 \pm 0.71$  mm, respectively. Thus, the essential oil of the *P. hebetatum* resin revealed the marked presence of sesquiterpenes (57.14%) and antibacterial activity against gram-negative bacteria: *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniaea*, this being the first report for these bacterial species.

**Keywords:** Breu. Essential oil. *Escherichia coli*. *Klebsiella pneumoniaea*.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Burseraceae é constituída por árvores e arbustos que ocorrem principalmente nos continentes Americano, Africano e Indo-Asiano [1]. Apesar da grande distribuição

geográfica da família, a maior densidade genérica de espécies ocorre no hemisfério sul. Atualmente, a família Burseraceae pertence a Ordem Sapindales, classe dicotiledônea e subclasse Rosidae, com mais de 700 espécies divididas em 19 gêneros em três tribos: Bursereae, com oito gêneros; Canarieae, com oito gêneros, e Protieae, com três gêneros [1]. O gênero *Protium* Burm. f. (tribo Protieae), com mais de 160 espécies, é considerado o maior representante da tribo e o segundo da família Burseraceae [2,3].

As espécies do gênero *Protium* são conhecidas pelo exsudado resinoso, denominado na região do estado do Acre por breu ou breu-branco. Entretanto, no território nacional a resina recebe vários outros nomes como almecega, goma-limão, almíscar e guapoi [4]. A resina é solúvel em solventes apolares como éter etílico e clorofórmio, sendo rica em óleo essencial e triterpenos [5].

A região do Alto Juruá, no estado do Acre, apresenta grande diversidade de espécies do gênero *Protium*, onde a resina é utilizada pela população, principalmente, como anti-inflamatório, além do uso para calafetar as embarcações [6]. Para além da aplicação tecnológica, a região tem demonstrado interesse na comercialização e divulgação de conhecimento das espécies produtoras de óleos essenciais e suas propriedades biológicas [7,8].

Com o intuito de contribuir com o conhecimento químico das espécies do gênero *Protium* e de seu potencial biológico, o presente trabalho tem por objetivo a identificação da composição química do óleo essencial do exsudado resinoso da espécie *Protium hebetatum* Daly e avaliar a atividade antibacteriana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniaea* e *Streptococcus pneumoniaea*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### ***2.1 Coleta de Amostra Botânica***

A resina da espécie *Protium hebetatum* Daly foi coletada ao longo da BR-307, no município de Mâncio Lima, Acre, Brasil, em setembro de 2014, no período chuvoso, com coordenadas geográficas: latitude sul 7° 28' 51" e longitude oeste: 72° 54' 20". A exsicata obtida *in loco* foi registrada com o voucher 18.374 no Herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, sendo identificada pelo professor PhD. Douglas C. Daly.

### ***2.2 Extração e Rendimento do Óleo Essencial***

O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação com aparelho tipo Clevenger, com adaptações, utilizando 367,43 g de resina e 1.000 mL de água destilada, por um período oito (8) horas. O rendimento porcentual foi calculado com relação ao volume de óleo extraído e a massa de resina (% v/m).

### **2.3 Cromatografia Gasoso Líquida Acoplado a Espectrômetro de Massa (CG/EM)**

A análise de CG/EM do óleo essencial foi realizada no Instituto de Análise Forense (IAF) do Departamento de Polícia Técnico Científica da Polícia Civil do Estado do Acre, em aparelho CG/EM, modelo 5975C da Agilent Technologies. Foi utilizado coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm d.i x 0,25 µm filme interno) e o hélio (He) como gás de arraste, em modo Split razão 1:50. A temperatura do injetor foi de 290°C, em gradiente inicial de 80°C, por 5 minutos, aumentando 4°C min<sup>-1</sup> até 285°C, permanecendo por 40 minutos. A temperatura do detector e da interface do sistema foi de 290°C, com detector de massas por impacto de elétrons a 70 eV. Os espectros de massas foram registrados numa varredura de 30 a 600 Dalton.

A confirmação dos constituintes químicos foi realizada pelo reconhecimento dos espectros de massa obtidos conforme os cromatogramas, por comparação com o banco de dados da biblioteca do próprio equipamento e por comparação visual com os espectros de massas publicados na literatura [9] e, em última instância, usando também o banco de dados do NIST, National Institute of Standards and Technology [10].

### **2.4 Atividade Antibacteriana**

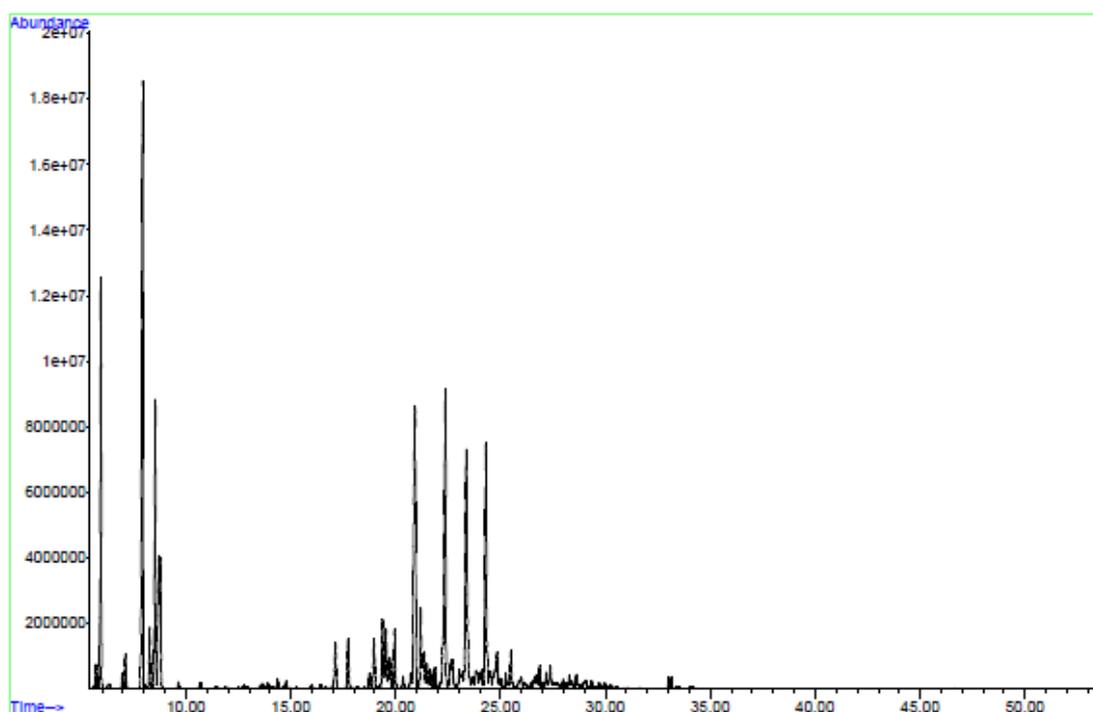
A atividade antibacteriana foi realizada com as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). As amostras foram submetidas ao ensaio utilizando a técnica de difusão em disco [11]. As cepas foram crescidas a 37°C, por 4-6 horas, sendo sua turbidez ajustada para escala 0,5 de McFarland. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Muller-Hinton. Sobre o meio de cultura, foram depositados discos de papel e, sobre estes, 20 µL da amostra pura a ser analisada, sendo incubada a 37°C por 24 horas. Por se tratar de amostra pura, não foi usado controle negativo e como controle positivo foi utilizada solução de cloranfenicol a 30 mg mL<sup>-1</sup>. Foram consideradas com atividade antibacteriana as amostras que não permitiram o crescimento bacteriano ao redor do disco. Os halos de inibição produzidos foram medidos com ajuda de paquímetro digital.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial da resina da espécie *P. hebetatum* Daly, obtido por hidrodestilação, apresentou um rendimento de 4,60% (v/m), que é considerado relativamente medianos, quando comparado com os resultados obtidos da espécie *P. icicariba* que obteve rendimento entre 2,9 a 9,7% [12]. Durante o processo de extração, o óleo essencial revelou propriedade organoléptica de um aroma muito agradável.

O perfil químico do óleo essencial da resina *P. hebetatum* Daly, analisado por CG/EM, revelou um total de vinte e oito (28) constituintes em sua composição química, conforme mostrado pelo cromatograma (Figura 1) e detalhamento na Tabela 1.

**Figura 1** - Cromatograma do óleo essencial da resina do *P. hebetatum* Daly



A análise dos espectros de massas obtidos permitiu identificar um total de vinte (24) compostos, representando 93,96% em proporção de massa dos constituintes registrados (Tabela 1). Entre os constituintes registrados foram classificados em oito (8) monoterpenos (28,57%), dezessete (16) sesquiterpenos (57,14%) e quatro (4) constituintes não identificados (14,28%), do perfil químico do óleo essencial da resina do *P. hebetatum*.

**Tabela 1** – Perfil químico do óleo essencial da resina da espécie *P. hebetatum* Daly

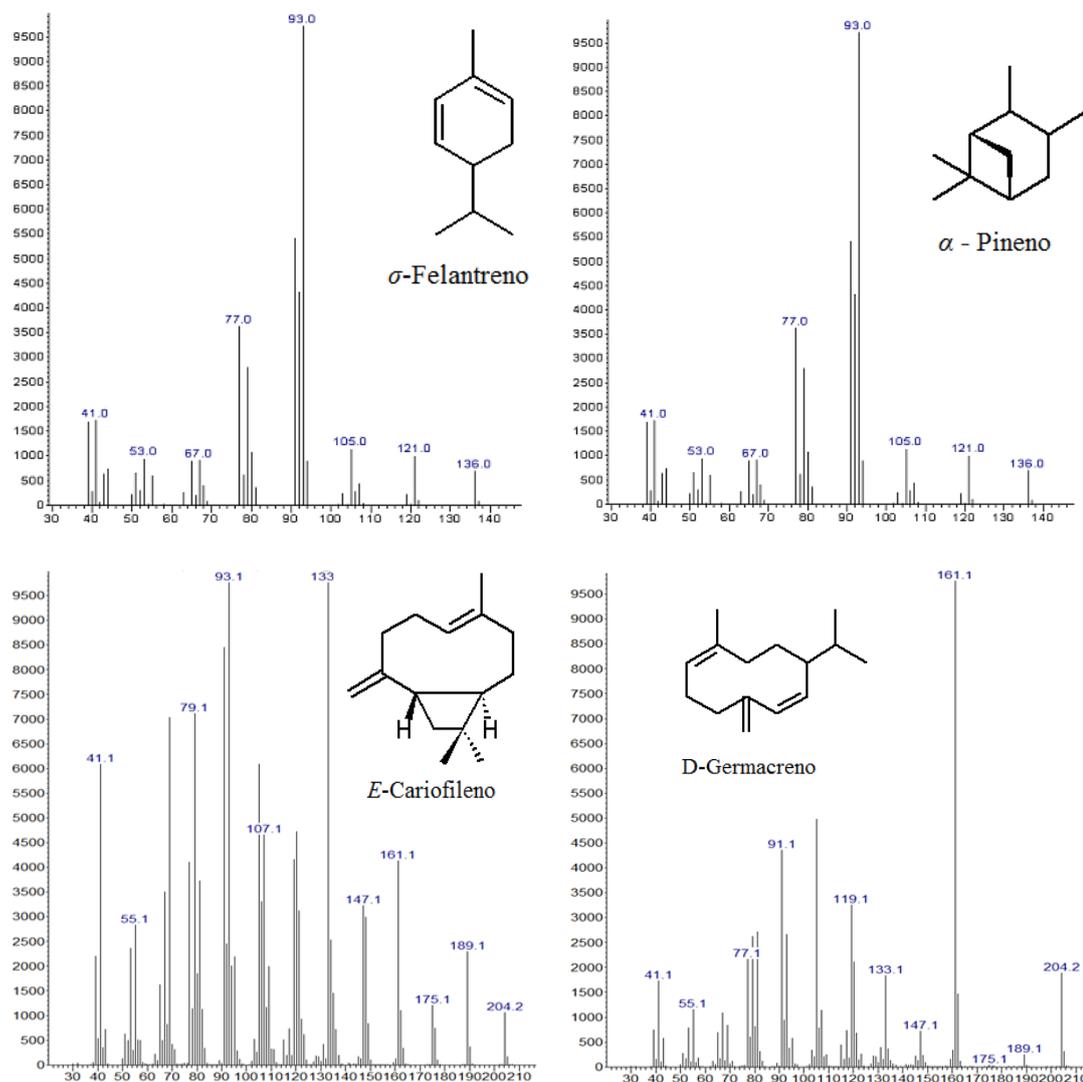
Ord	Compostos	A.P.%	T.R.	I.K.	I.B.	M <sup>+</sup>
-----	-----------	-------	------	------	------	----------------

1	$\alpha$ -Tujeno	0,679	5,704	930	93	136
2	$\alpha$ -Pineno	9,160	5,937	939	93	136
3	$\beta$ -Pineno	0,833	7,108	979	93	136
4	$\alpha$ -Felandreno	17,363	7,929	1002	93	136
5	$\alpha$ -Terpineno	1,424	8,265	1017	121	136
6	<i>p</i> -Cimeno	7,241	8,531	1024	119	134
7	$\beta$ -Felandreno	4,398	8,712	1029	93	136
8	1,8-Ceneol	2,471	8,776	1031	43	154
9	$\delta$ -Elemeno	1,679	17,121	1338	121	204
10	$\alpha$ -Cubebeno	1,584	17,729	1348	161	204
11	$\alpha$ -Copaeno	1,529	18,965	1376	161	204
12	$\beta$ -Bourboneno	2,241	19,372	1388	81	204
13	não identificado	1,262	19,534	*	*	*
14	$\beta$ -Elemeno	0,813	19,734	1390	93	204
15	não identificado	1,589	19,948	*	*	*
16	<i>E</i> -Cariofileno	11,160	20,918	1419	93	204
17	não identificado	2,150	21,183	*	*	*
18	<i>Y</i> -Elemeno	0,602	21,481	1436	121	204
19	6,9-Guaiadieno	0,711	21,869	1444	105	204
20	<i>D</i> -Germacreno	10,242	22,367	1485	161	204
21	Muurula-4(14),5-dieno	0,673	22,613	1493	161	204
22	Biciclogermacreno	0,784	22,690	1500	121	204
23	$\delta$ -Amorfeno	8,548	23,363	1512	161	204
24	$\gamma$ -Cadineno	7,579	24,295	1513	161	204
25	não identificado	1,039	24,832	*	*	*
26	$\delta$ -Cadineno	1,063	25,498	1523	161	204
27	<i>E</i> -Bisaboleno	0,606	26,863	1531	93	204
28	Óxido de cariofileno	0,577	27,367	1583	79	220
<b>Total Identificado (%)</b>		<b>93,96</b>				

A.P. = Área do pico, T.R. = Tempo de retenção, I.K. = Índice Kolvat, I.B. = Íon básico, M<sup>+</sup> = Íon molecular.

Os principais constituintes monoterpeneo identificados foram o  $\alpha$ -felandreno (17,36%), sendo também este o principal constituinte da amostra, seguido do  $\alpha$ -pineno (9,16%) (Figura 2). Em relação aos constituintes classificados como sesquiterpeneo, os majoritários foram identificados como sendo o *E*-cariofileno (11,16%) seguido do *D*-germacreno (10,24%). Normalmente, a presença do cariofileno em óleo essencial implica a existência de outro constituinte, em baixa concentração, decorrente da sua oxidação, o óxido de cariofileno (0,61%). Assim, caso não se tenha certeza de que este óxido é natural ou originado durante o processo de extração, é denominado por artefato. A presença deste artefato normalmente é identificada pela alteração de coloração do óleo, de amarelo claro para azul, característica do óxido de cariofileno. Em conformidade com esta característica, a amostra analisada apresentou coloração azulada de baixa intensidade.

**Figura 2** – Espectros de massas dos principais constituintes do óleo essencial da resina do *P. hebetatum* Daly



Conforme [13] o perfil químico do óleo essencial da resina do *P. hebetatum* Daly, coletado na Reserva Floresta Ducke, em Manaus, Amazonas, Brasil, apresentou apenas cinco constituintes, sendo dois majoritários: o *p*-cinenos, de maior concentração (59,4%), seguido do  $\sigma$ -pineno (15,5%). Uma revisão realizada sobre a química e farmacologia das espécies do gênero *Protium* relatou dez constituintes na composição química do óleo essencial da resina da mesma espécie [14]. Outro estudo, realizado com a mesma espécie coletada na Reserva Ducke, relatou o total de 35 constituintes químicos no óleo essencial extraído da resina [15], compatível com a composição química do óleo essencial da espécie do presente estudo.

Na região de coleta da amostra, o breu é utilizado pela população como cicatrizante. Neste sentido, foi também realizado ensaio biológico do óleo essencial da espécie em estudo, utilizando cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas. O óleo essencial da resina do *P.*

*hebetatum* Daly apresentou atividade antibacteriana especificamente contra as bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniaea*, com halo de inibição de  $7,67 \pm 2,89$  e  $8,50 \pm 0,71$  mm, respectivamente. Os resultados obtidos foram considerados de efeito moderado de inibição, quando comparados ao controle positivo (*E. coli*  $25,67 \pm 0,58$  mm; *K. pneumoniaea*  $17,66 \pm 0,58$  mm). Estudos sobre a eficácia microbiana da folha do *P. hebetatum*, também evidenciaram efeito inibidor moderado contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* [16].

## CONCLUSÃO

O óleo essencial da resina da espécie *Protium hebetatum* Daly apresentou rendimento relativamente mediano 4,60% (v/m), se comparado com o rendimento publicado na literatura. Contudo o perfil químico revelou a presença marcante de sesquiterpenos (57,14%) representando o dobro dos monoterpenos. Apesar do rendimento relativamente, e em função do aroma agradável do óleo resinoso, se vislumbra possibilidades de aplicação nas indústrias de cosméticos e perfumarias, o que contribuiria para o desenvolvimento sustentável da região do Alto Juruá do estado do Acre.

O óleo essencial da resina do *P. hebetatum* Daly apresentou atividade antibacteriana somente contra bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniaea*, revelando este como o primeiro relato para estas espécies bacterianas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Capes pela concessão das bolsas de Iniciação Científica e de mestrado, o que possibilitou a ascensão na pesquisa de SILVA, K. L. culminando com a obtenção do título de Mestre em Ciência, Inovação e Tecnologia.

## REFERÊNCIAS

- [1]. WEEKS, A.; ZAPATA, F.; PELL, S.K.; DALY, D.C.; MITCHELL, J.D.; FINE, P.V. To move or to evolve: contrasting patterns of intercontinental connectivity and climatic niche evolution in “Terebinthaceae” (Anacardiaceae and Burseraceae). **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. 209, p. 1-20, 2014.
- [2]. RAMOS-ORDOÑEZ, M.F.; ARIZMENDI, M.D.C.; MARTÍNEZ, M.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J. The pseudaril of Bursera and Commiphora, a foretold homology? **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 84, p. 509-520, 2013.

- [3]. SANTAMARIA-AGUILAR, D.; LAGOMARSINO, L.P. Two new species and a new combination in *Protium* (Burseraceae) from Costa Rica. **Phytokeys**, v. 76, p. 89-113, 2017.
- [4]. LIMA, F.V.; MALHEIROS, A. OTUKI, M.F.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V.; MONACHE, F.D. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3B, p. 578-582. 2005.
- [5]. MARQUES, D.D.; SATORI, R.A.; LEMOS, T.L.G.; MACHADO, L.L.; SOUZA, J.S.N. MONTE, F.J.Q. Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 227-230, 2010.
- [6]. MARQUES, D.D. **Contribuição ao conhecimento químico da flora Acreana: *Protium hebetatum* Daly, *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *ulei* (Swat) Daly e *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *heptaphyllum***. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- [7]. MURTHY, K.S.R.; REDDY, C.M.; RANI, S.S.; PULLAIAH, T. Bioactive principles and biological properties of essential oils of Burseraceae: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 2, p. 247-258, 2016.
- [8]. BORGES, A.D.C.; CARVALHO, C.E.C.; MARQUES, D.D.; GRAEBNER, I.B.; SANTOS, A.L. Estudo da citronela como tema gerador para o ensino da química no estado do Acre. **Scientia Naturalis**, v. 2, n. 1, p. 280-292, 2020.
- [9]. ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy**, 4. ed. San Diego: Allured, 2007.
- [10]. National Institute of Standards and Technology. **Chemistry webbook**. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em: 15 jun 2020.
- [11]. NCCLS. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada. 8 ed., p. 58, NCCLS, Pensilvania, Estados Unidos da América., 2003.
- [12]. SIANI, A.C.; GARRIDO, I.S.; MONTEIRO, S.S.; CARVALHO, E.S.; RAMOS, M.F.S. *Protium icariba* as a source of volatile essences. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 5, p. 477-489, 2004.
- [13]. RAMOS, M.F.S.; SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R.; GUIMARÃES, A.C.; RIBEIRO, J.E.L.S. Essential oils from oleoresins of *Protium spp.* of the Amazon region. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 150, p. 383-387, 2000.
- [14]. RUDIGER, A.L.; SIANE, A.C.; VEIGA-JUNIOR, V.F. The chemistry and pharmacology of the south America genus *Protium burm.* F. (Burseraceae). **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2007.
- [15]. PINTO, D.S.; CARVALHO, L.E.; LIMA, M.P.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R.; RIBEIRO, J.E.L.S. Volatiles of foliar rachis, branches and resin elicited by insects from *Protium hebetatum* grows wild in Amazon. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 6, p. 699-703, 2010.

[16]. CONRADO, G.G.; SIMPLICIO, F.G; COSTA, K.R.C; REHDER, V.L.G; ESPINAR, M.F.; SOUZA, G.O.; SAMPAIO, P.T.B. Antibacterial activity and chemical compounds of leaves and branches of *Protium hebetatum*, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, supl. II, p. 865-874, 2015.